ОБЩАЯ ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

11



COMPREHENSIVE ORGANIC CHEMISTRY

The Synthesis and Reactions of Organic Compounds

CHAIRMAN AND DEPUTY CHAIRMAN OF THE EDITORIAL BOARD
SIR DEREK BARTON, F.R.S.
AND
W. DAVID OLLIS, F.R.S.

Volume 5 Biological Compounds

Edited by E. HASLAM
UNIVERSITY OF SHEFFIELD



PERGAMON PRESS
OXFORD · NEW YORK · TORONTO · SYDNEY · PARIS FRANKFURT

ОБЩАЯ ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

ТОМ 11

ЛИПИДЫ, УГЛЕВОДЫ, МАКРОМОЛЕКУЛЫ, БИОСИНТЕЗ

Перевод с английского

Канд. хим. наук
Л. Л. ДАНИЛОВА

и

докт. хим. наук
Э. П. СЕРЕБРЯКОВА

под редакцией акад.
Н. К. КОЧЕТКОВА

МОСКВА «ХИМИЯ» 1986

УДК 547

УДК 547

Общая органическая химия./Под ред. Д. Бартона и У. Д. Оллиса. Т. 11. Липиды, углеводы, макромолекулы, биосинтез./Под ред. Е. Хаслама. — Пер. с англ./Под ред. Н. К. Кочеткова. — М.: Химия, 1986. — 736 с., ил.

Настоящий том многотомного издания, подготовленного английскими учеными, посвящен химии липидов, углеводов и высокомолекулярных соединений, а также биосинтезу соединений различных классов.

Издание предназначено для научных работников, инженеров-химиков, преподавателей и аспирантов химических и химико-технологических вузов, биохимиков и биологов.

Табл. 29. Ил. 19. Библиогр. список 1698 назв.

О $\frac{1803000000\text{-}142}{050(01)\text{-}86}$ **свод. пл. подписных изд. 1986**

© 1979 Perqamon Press Ltd.
© Перевод на русский язык.
Издательство «Химия», 1986

СОДЕРЖАНИЕ

ЧАСТЬ 25. ХИМИЯ И БИОХИМИЯ ЛИПИДОВ 12

25.1. Жирные кислоты. *Ф. Д. Ганстон* 12

25.1.1. Номенклатура жирных кислот 12
25.1.2. Природные жирные кислоты 14
25.1.2.1. Насыщенные жирные кислоты 14
25.1.2.2. Моноеновые кислоты 15
25.1.2.3. Метиленразделенные полиеновые кислоты 16
25.1.2.4. Незаменимые жирные кислоты, простагландины, тромбоксаны 17
25.1.2.5. Сопряженные полиеновые кислоты 18
25.1.2.6. Кислоты ряда ацетилена и аллена 18
25.1.2.7. Разветвленные кислоты 19
25.1.2.8. Циклические кислоты 20
25.1.2.9. Оксигенированные кислоты 20
25.1.3. Методы определения строения жирных кислот 21
25.1.3.1. Газожидкостная хроматография 22
25.1.3.2. УФ-, ИК- и КР-спектроскопия 22
25.1.3.3. Спектроскопия ЯМР 22
25.1.3.4. Масс-спектрометрия 23
25.1.3.5. Окислительное расщепление с последующим частичным гидрированием 23
25.1.3.6. Идентификация функциональных групп 24
25.1.4. Химический синтез жирных кислот 24
25.1.4.2. Синтез *цис*-моно- и -полиеновых кислот из производных ацетилена 25
25.1.4.2. Синтез кислот с помощью реакции Виттига 26
25.1.4.3. Синтез простагландинов 28
25.1.5. Биосинтез жирных кислот 28
25.1.5.1. Биосинтез пальмитиновой кислоты 28
25.1.5.2. Биосинтез жирных кислот путем удлинения углеродной цепи 30
25.1.5.3. Биосинтез моноеновых кислот 30
25.1.5.4. Биосинтез полиеновых кислот 31
25.1.5.5. Биосинтез простагландинов и тромбоксанов 32
25.1.6. Спектральные свойства жирных кислот 33
25.1.6.1. УФ-Спектроскопия 33
25.1.6.2. ИК- и КР-Спектроскопия 33
25.1.6.3. Спектроскопия ЯМР 34
25.1.6.4. Масс-спектрометрия 37
25.1.7. Каталитическое гидрирование и химическое восстановление 38
25.1.7.1. Каталитическое гидрирование 38
25.1.7.2. Химическое восстановление 41
25.1.7.3. Биохимическое восстановление 42
25.1.8. Окисление кислородом 42
25.1.8.1. «Аутоокисление» 43
25.1.8.2. Реакции с синглетным кислородом 45
25.1.8.3. Образование гидропероксидов, катализируемое ферментами 45
25.1.8.4. Реакции гидропероксидов 47
25.1.9. Другие реакции окисления 49
25.1.9.1. Эпоксидирование 49
25.1.9.2. Гидроксилирование 50
25.1.9.3. Окислительное расщепление 53
25.1.10. Прочие реакции присоединения 55
25.1.10.1. Галогенирование 55
25.1.10.2. Оксимеркурирование 56
25.1.10.3. Получение производных, содержащих азот и серу 57
25.1.10.4. Превращение алкенов (алкинов) в циклопропаны (циклопропены) 59
25.1.10.5. Реакции метатезиса 59
25.1.10.6. Другие реакции по двойным связям 60

25.1.11. *цис,транс*-Изомеризация, миграция двойной связи и циклизация, диеновый синтез и димеризация 60
25.1.11.1. *цис,транс*-Изомеризация 60
25.1.11.2. Миграция двойной связи и циклизация 61
25.1.11.3. Диеновый синтез 62
25.1.11.4. Димеризация 63
25.1.12. Реакции по карбоксильной группе 64
25.1.12.1. Гидролиз 64
25.1.12.2. Этерификация, алкоголиз, ацидолиз и переэтерификация 65
25.1.12.3. Получение хлорангидридов и ангидридов 67
25.1.12.4. Получение азотсодержащих производных 67
25.1.12.5. Получение производных, содержащих серу 68
25.1.12.6. Получение и реакции α-анионов карбоновых кислот 68
Литература 68

25.2. Липиды. *Ф. Д. Ганстон* 70

25.2.1. Строение липидов 70
25.2.1.1. Введение 70
25.2.1.2. Ацилглицерины 71
25.2.1.3. Ацильные производные других спиртов (воска, кутины и суберины, диольные липиды, цианолипиды, сложные эфиры стероидов) 72
25.2.1.4. Гликозилдиацилглицерины 73
25.2.1.5. Фосфоглицериды 74
25.2.1.6. Липиды с простой эфирной связью 76
25.2.1.7. Сфинголипиды 77
25.2.2. Анализ липидов 79
25.2.2.1. Введение 79
25.2.2.2. Определение кислот, спиртов и альдегидов 80
25.2.2.3. Определение липидов 80
25.2.2.4. Фермеитативное деацилирование липидов 81
25.2.2.5. Выделение индивидуальных липидов 86
25.2.3. Синтез липидов 89
25.2.3.1. Синтез моно-, ди- и триглицеридов 89
25.2.3.2. Синтез эфиров фосфатидной кислоты 94
25.2.3.3. Синтез липидов с простой эфирной связью 97
25.2.3.4. Синтез сфинголипидов 98
25.2.4. Биосинтез липидов 101
25.2.4.1. Введение 101
25.2.4.2. Биосинтез фосфатидных кислот и диглицеридов 103
25.2.4.3. Биосинтез триглицеридов 104
25.2.4.4. Биосинтез гликозилдиацилглицеринов 104
25.2.4.5. Биосинтез фосфоглицеридов 104
25.2.4.6. Биосинтез липидов с простой эфирной связью 104
25.2.4.7. Биосинтез сфинголипидов 105
Литература 105

25.3. Мембраны и липопротеины. *П. Ф. Ноулс* 107

25.3.1. Биологическая роль мембран и сложность их организации 107
25.3.2. Состав биологических мембран 109
25.3.3. Липидные компоненты мембран 110
25.3.3.1. Фосфолипиды 111
25.3.3.2. Другие классы липидов 118
25.3.3.3. Смеси липидов 118
25.3.4. Белки и гликопротеины, входящие в состав мембран 121
25.3.5. Биологические мембраны 124
25.3.5.1. Локализация белков в мембранах 124
25.3.5.2. Липид-белковые взаимодействия в мембранах 124
Литература 125

ЧАСТЬ 26. ХИМИЯ УГЛЕВОДОВ 127

26.1. Моносахариды. *Л. Хаф, А. Ричардсон* 127
26.1.1. Введение 127
26.1.2. Строение моносахаридов 128
26.1.3. Конформация моносахаридов 133
26.1.4. Синтез моносахаридов 137
26.1.4.1. Укорочение углеродной цепи 137
26.1.4.2. Наращивание углеродной цепи 139
26.1.4.3. Изменение конфигурации 140
26.1.5. Восстановление моносахаридов 147
26.1.6. Окисление моносахаридов 148
26.1.6.1. Получение альдоновых кислот 148
26.1.6.2. Получение альдуроновых кислот 149
26.1.6.3. Получение альдаровых кислот 150
26.1.6.4. Получение кетопроизводных моносахаридов 150
26.1.6.5. Окисление гликольной группировки 153
26.1.7. Действие кислот и оснований 155
26.1.8. Производные моносахаридов 158
26.1.8.1. Гликозиды 159
26.1.8.2. Простые эфиры и ангидросахара 165
26.1.8.3. Сложные эфиры 171
26.1.8.4. Циклические ацетали 173
26.1.9. Моносахариды, содержащие другие функциональные группы 179
26.1.9.1. Амино- и нитросахара 179
26.1.9.2. Галогенпроизводные сахаров 185
26.1.9.3. Дезоксисахара 189
26.1.9.4. Тиосахара 190
26.1.9.5. Разветвленные сахара 193
26.1.9.6. Непредельные производные сахаров 195
Литература 198

26.2. Олигосахариды. *Л. Хаф, А. Ричардсон* 202
26.2.1. Введение 202
26.2.2. Определение строения олигосахаридов 203
26.2.3. Синтез олигосахаридов 205
26.2.3.1. Взаимопревращения олигосахаридов 205
26.2.3.2. Синтез олигосахаридов с построением новой гликозидной связи 206
Литература 207

26.3. Полисахариды. *Дж. Ф. Кеннеди, К. А. Уайт* 207
26.3.1. Нахождение в природе, номенклатура и классификация полисахаридов 207
26.3.2. Методы установления строения полисахаридов 216
26.3.2.1. Метилирование 218
26.3.2.2. Частичный гидролиз 219
26.3.2.3. Периодатное окисление 219
26.3.2.4. Расщепление по Смиту 221
26.3.2.5. Действие щелочей 222
26.3.2.6. Хроматографические методы 223
26.3.2.7. Масс-спектрометрия 225
26.3.2.8. Спектроскопия ЯМР 226
26.3.2.9. Электрофорез 226
26.3.2.10. Иммунохимические методы 227
26.3.2.11. Действие ферментов 227
26.3.2.12. Определение размера и формы молекул 233
26.3.3. Полисахариды растений и водорослей 234
26.3.3.1. Крахмал 234
26.3.3.2. Целлюлоза 238
26.3.3.3. Камеди 240
26.3.3.4. Слизи 242
26.3.3.5. Пектиновые вещества 244

26.3.3.6. Гемицеллюлозы 245
26.3.3.7. Другие полисахариды растений 247
26.3.3.8. Полисахариды водорослей 248
26.3.4. Полисахариды микроорганизмов 251
26.3.4.1. Тейхоевые кислоты 251
26.3.4.2. Пептидогликаны клеточной стенки (муреины) 252
26.3.4.3. Капсулярные и внеклеточные полисахариды 253
26.3.4.4. Полисахариды грибов 256
26.3.5. Зоополисахариды 257
26.3.5.1. *Гликоген* 257
26.3.5.2. Хитин 257
26.3.5.3. Гликозаминогликаны 258
26.3.6. Гликопротеины 263
26.3.6.1. Гликопротеины, обладающие гормональной активностью 265
26.3.6.2. Гликопротеины сыворотки и плазмы крови 267
26.3.6.3. Иммуноглобулины 269
26.3.6.4. Групповые вещества крови 272
26.3.7. Производные полисахаридов 273
26.3.7.1. Простые эфиры 273
26.3.7.2. Сложные эфиры 274
26.3.7.3. Производные красителей 274
26.3.7.4. Сшитые полисахариды 275
26.3.7.5. Нерастворимые в воде производные 275
Литература 275
26.4. Конформации полисахаридов. *Д. А. Рис* 282
26.4.1. Введение 282
26.4.2. Рентгеноструктурный анализ полисахаридов 282
26.4.3. Конформации полисахаридов в растворе 283
26.4.3.1. Упорядоченные состояния 285
26.4.3.2. Неупорядоченные состояния 289
26.4.4. Определение формы молекул полисахаридов в растворе 291
26.4.4.1. Ядерная магнитная релаксация 292
26.4.4.2. Переходы типа «порядок — беспорядок» 294
26.4.4.3. Описание упорядоченных конформаций в растворе 295
26.4.4.4. Описание неупорядоченных конформаций в растворе 296
26.4.5. Примеры упорядоченных конформаций полисахаридов в растворах и гелях 297
Литература 298

ЧАСТЬ 27. ОРГАНИЧЕСКИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЫ. *П. ХОДЖ* 300

27.1. Синтез органических макромолекул 300
27.1.1. Цепная полимеризация 301
27.1.2. Ступенчатая полимеризация и поликонденсация 308
27.1.3. Трехмерные сшитые полимеры 309
27.1.4. Модификация полимеров 311
27.2. Биосинтез каучука и гуттаперчи 313
27.3. Свойства полимеров 314
27.4. Применение высокомолекулярных соединений в органической химии 317
27.4.1. Хроматография 318
27.4.2. Органические реакции на полимерных носителях 323
Литература 336

ЧАСТЬ 28. БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ 340

28.1. Биосинтез. *Р. Томас* 340
28.1.1. Введение 340
28.1.2. История исследований в области биосинтеза 341
28.1.3. Биосинтетическая классификация природных соединений 342
28.1.4. Задачи и трудности химии природных соединений 344

28.1.5. Методы биосинтетических исследований 346
28.1.6. Структурный анализ природных соединений и установление взаимосвязей между ними 351
28.1.6.1. Метаболиты аминокислот 351
28.1.6.2. Метаболиты мевалоновой кислоты 353
28.1.6.3. Метаболиты смешанного генезиса 355
28.1.6.4. Метаболиты глюкозы 358
28.1.6.5. Поликетиды, построенные на основе ацетатных и пропионатных звеньев 358
28.1.7. Некоторые аспекты биосинтетических исследований 364
28.1.7.1. Авторадиография 364
28.1.7.2. Биосинтетический подход к определению структуры 368
28.1.7.3. Реакции расщепления кольца и молекулярные перегруппировки 372
28.1.7.4. Альтернативные пути образования полициклических фенолов 382
28.1.7.5. Рацемические фенольные метаболиты 386
28.1.7.6. Окислительная конденсация и биомиметический синтез 387
28.1.8. Современное состояние и перспективы биосинтетических исследований 390
Литература 392
28.2. Фотосинтез, фиксация азота и промежуточный метаболизм. *Э. Хаслам* 395
28.2.1. Введение 395
28.2.2. Фотосинтез 396
28.2.3. Фиксация азота 400
28.2.4. Цикл серы 404
28.2.5. Промежуточный метаболизм и биосинтез 405
Литература 406

ЧАСТЬ 29. АЦЕТАТНЫЕ ПУТИ БИОСИНТЕЗА 407

29.1. Биосинтез поликетидов. *Дж. Д. Бюлок* 407
29.1.1. Введение 407
29.1.1.1. Что такое поликетиды? 407
29.1.1.2. История исследования поликетидов 412
29.1.1.3. Поликетидные звенья 413
29.1.2. Основные механизмы биосинтеза поликетидов 416
29.1.2.1. Синтетаза жирных кислот 418
29.1.2.2. Поликетидсинтетазы 420
29.1.2.3. Основные типы структурных вариаций в биосинтезе поликетидов 426
29.1.2.4. Превращения поликетидов 427
29.1.3. Ароматические поликетиды 430
29.1.3.1. Ароматические тетракетиды 430
29.1.3.2. Флавоноиды 437
29.1.3.3. Реакции расщепления и конденсации простых поликетидов 441
29.1.3.4. Более сложные процессы циклизации 443
29.1.3.5. Афлатоксины и их предшественники 449
29.1.3.6. Тетрациклины 452
29.1.4. Частично восстановленные поликетиды 454
29.1.4.1. Типы частичного восстановления 454
29.1.4.2. Некоторые продукты жизнедеятельности грибов 455
29.1.4.3. Макролиды и родственные антибиотики из стрептомицетов 459
29.1.5. Методы исследования биосинтеза поликетидов 465
29.1.5.1. Биологические аспекты применения меченых соединений 465
29.1.5.2. Использование радиоактивных изотопов 470
29.1.5.3. Масс-спектрометрия 474
29.1.5.4. Спектроскопия ЯМР 475
Литература 479
29.2. Биосинтез терпеноидов. *Дж. Р. Хэнсон* 482
29.2.1. Введение 482
29.2.2. Получение меченых производных мевалоновой кислоты 485
29.2.3. Образование изопентенилпирофосфата 488

29.2.4. Образование фарнезилпирофосфата 490
29.2.5. Образование сквалена 492
29.2.6. Биосинтез холестерина 494
29.2.7. Связь холестерина с другими стероидами 497
29.2.8. Биосинтез растительных стеринов 501
29.2.9. Биосинтез пентациклических тритерпенов 503
29.2.10. Биосинтез монотерпеноидов 505
29.2.11. Биосинтез сесквитерпеноидов 509
29.2.12. Биосинтез дитерпеноидов 514
29.2.13. Биосинтез сестертерпеноидов 518
Литература 519
29.3. Биосинтез каротиноидов и витамина А. *Г. Бриттон* 521
29.3.1. Биосинтез каротиноидов 521
29.3.1.1. Введение 521
29.3.1.2. Образование фитоина 522
29.3.1.3. Возрастание степени ненасыщенности 523
29.3.1.4. Циклизация и другие реакции при двойной связи в положении 1,2 525
29.3.1.5. Заключительные модификации 530
29.3.1.6. Трансформации каротиноидов в организмах животных 535
29.3.2. Биосинтез витамина А 537
29.3.2.1. Структуры витаминов А и их образование из β-каротина 537
29.3.2.2. Зрительные пигменты 538
29.3.2.3. Молекулярная биология зрения 538
Литература 539

ЧАСТЬ 30. БИОСИНТЕЗ; ОБЩИЙ ОБЗОР 540

30.1. Биосинтез алкалоидов. *Р. Б. Герберт* 540
30.1.1. Введение 540
30.1.2. Биосинтез пирролидиновых алкалоидов 543
30.1.2.1. Тропановые и родственные алкалоиды 543
30.1.2.2. Никотин 547
30.1.2.3. Пирролизидиновые алкалоиды 550
30.1.2.4. Фенантроиндолизидиновые алкалоиды 551
30.1.3. Биосинтез пиперидиновых и пиридиновых алкалоидов 553
30.1.3.1. Простые пиперидиновые основания 553
30.1.3.2. Алкалоиды, структурно родственные анабазину 562
30.1.3.3. Алкалоиды Lythraceae 563
30.1.3.4. Алкалоиды Lycopodium 564
30.1.3.5. Хинолизидиновые алкалоиды 565
30.1.3.6. Пиридиновые алкалоиды 568
30.1.4. Биосинтез изохинолиновых и родственных алкалоидов 568
30.1.4.1. Фенетиламины и простые изохинолины 568
30.1.4.2. Простые бензилизохинолины 573
30.1.4.3. Апорфины 575
30.1.4.4. Морфин и родственные алкалоиды 580
30.1.4.5. Протоберберин и родственные алкалоиды 582
30.1.4.6. Алкалоиды Erythrina 587
30.1.4.7. Хасубанонин и протостефанин 589
30.1.4.8. Колхицин 590
30.1.4.9. Гомоапорфины 591
30.1.4.10. Шельхаммеридин и цефалотаксин 592
30.1.5. Биосинтез алкалоидов Amaryllidaceae и алкалоидов группы мезембрина 593
30.1.5.1. Алкалоиды Amaryllidaceae 593
30.1.5.2. Алкалоиды группы мезембрина 599
30.1.6. Биосинтез хинолиновых и родственных алкалоидов 601
30.1.6.1. Простые производные антраниловой кислоты 601
30.1.6.2. Фурохинолиновые алкалоиды 602
30.1.6.3. Акридоновые алкалоиды 604

30.1.6.4. Хиназолиновые алкалоиды 604
30.1.7 Биосинтез индольных алкалоидов 606
30.1.7.1. Простые производные индола 606
30.1.7.2. β-Карболиновые алкалоиды 607
30.1.7.3. Каликантин и фоликантин 608
30.1.7.4. Терпеноидно-индольные алкалоиды 608
30.1.7.5. Винкамин 615
30.1.7.6. Аппаричин и улеин 615
30.1.7.7. Алкалоиды Cinchona 615
30.1.7.8. Камптотецин 616
30.1.8. Биосинтез алкалоидов ипекакуаны 617
30.1.9. Биосинтез стероидных и терпеноидных алкалоидов 618
30.1.9.1. Стероидные алкалоиды 618
30.1.9.2 Терпеноидные алкалоиды 621
30.1.10 Биосинтез некоторых других алкалоидов 622
Литература 625
30.2. Биосинтез порфиринов, хлорофиллов и корринов. *М. Ахтар, П. М. Джордан* 634
30.2.1. Введение 634
30.2.2. Биосинтез гема 636
30.2.2.1. Введение 636
30.2.2.2. Биосинтез 5-аминолевулиновой кислоты 636
30.2.2.3. Биосинтез 5-аминолевулиновой кислоты в растениях 641
30.2.2.4. Биосинтез порфобилиногена 642
30.2.2.5 Биосинтез уропорфириногенов I и III 643
30.2.2.6. Превращение уропорфириногена III в копропорфирииоген III 651
30.2.2.7. Превращение копропорфириногена III в протопорфириноген IX 654
30.2.2.8. Превращение прогопорфириногена IX в протопорфирин IX 657
30.2.2.9. Превращение протопорфирина IX в гем 658
30.2.2.10. Образование производных гема и гемопротеинов 659
30.2.3. Биосинтез хлорофиллов 659
30.2.3.1. Хлорофилл *a* 659
30.2.3.2. Хлорофилл *b* 666
30.2.3.3. Бактериохлорофилл *a* 666
30.2.3.4. Бактериохлорофилл *b* 667
30.2.3.5. Бактериохлорофиллы *c* и *d* (хлорофиллы *Chlorobium*) 667
30.2.3.6. Бактериохлорофилл *e* 670
30.2.4. Биосинтез корринов 670
30.2.4.1. Введение 670
30.2.4.2. Начальные предшественники корринового ядра 672
30.2.4.3. Роль углеродного атома С-5 молекулы АЛК в формировании корринового ядра 673
30.2.4.4. Происхождение метильных групп корринового ядра 674
30.2.4.5. Превращение кобириновой кислоты в витамин B_{12} 680
30.2.4.6. Участие витамина B_{12} в ферментативных реакциях 681
Литература 681
30.3. Метаболиты шикимовой кислоты. *Э. Хаслам* 685
30.3.1. Шикиматный путь биосинтеза 685
30.3.2. Биосинтез ароматических аминокислот 693
30.3.3. Механизмы регуляции биосинтеза 698
30.3.4. Биосинтез изопреноидных хинонов 698
30.3.5. Метаболизм ароматических аминокислот 702
30.3.6. Шикиматный путь биосинтеза в высших растениях 710
30.3.7. Биосинтез других метаболитов 719
Литература 721
Предметный указатель 725

ЧАСТЬ 25

ХИМИЯ И БИОХИМИЯ ЛИПИДОВ

25.1. ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

Ф. Д. ГАНСТОН (University of St. Andrews)

Общепринятого определения термина «липид» не существует; автор этой главы предпочитает считать липидами природные производные жирных кислот и полагает, что описание жирных кислот должно предшествовать описанию природных соединений, в состав которых они входят. Все более возрастает интерес к физиологической роли и химии липидов, поскольку установлено, что жирные кислоты являются незаменимыми компонентами пищи, структурными компонентами клеточных мембран и биогенетически связаны с простагландинами. Эти открытия были сделаны главным образом благодаря совершенствованию хроматографических и спектральных методов изучения этих соединений.

25.1.1. НОМЕНКЛАТУРА ЖИРНЫХ КИСЛОТ

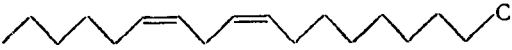
Многие жирные кислоты еще до полного установления их строения имели тривиальные названия, и эти названия настолько прочно утвердились в литературе, что их трудно исключить из употребления. В систематических названиях жирных кислот, основанных на номенклатуре IUPAC, отражены длина цепи, положение и природа кратных связей и наличие заместителей в их молекулах (табл. 25.1.1).

Широко используют и сокращенные обозначения, не получившие, однако, официального признания. Например, формула 20 : 4 5*c*8*c*11*c*14*c* означает кислоту состава C_{20}, содержащую четыре двойные связи, положение и конфигурация которых обозначены цифрами и буквами: *c* — *цис*-конфигурация, *t* — *транс*-конфигурация; тройную связь обозначают буквой *a*, двойную связь неизвестной конфигурации — буквой *e* (такое же обозначение используют при отсутствии изомерии).

Почти все природные полиеновые кислоты являются соединениями с метиленразделенными *цис*-двойными связями, так что для них достаточно указать положение только одной двойной связи. На этом принципе построена альтернативная система номенкла-

туры, в которой отсчет положения двойной связи производится от ω-метильной, а не от карбоксильной группы, и обозначается, например, ω6 или *n*-6. Так, например, для линолевой кислоты (1), строение которой может быть изображено также формулой (2), возможны следующие названия: линолевая кислота; 18:2 9*c*12*c*; 18:2 ω6; *цис,цис*-октадиен-9,12-овая кислота.

$$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7CO_2H \quad (1)$$



(2)

Сообщения, посвященные жирным кислотам и липидам, помимо общих химических и биохимических журналов публикуются в специализированных журналах: J. Am. Oil Chemists'Soc., Lipids, J. Lipid Res., Biochim Biophys. Acta (Lipids), Chem. Phys. Lipids, Fette Seifen Anstrichmittel, Jukagaku (J. Japanese Oil Chem. Soc.). и в обзорных выпусках: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids (ed. R. T. Holman et al.), Advances in Lipid Research (ed. R. Paoletti and D. Kritchevsky), Topics in Lipid Chemistry (ed. F. D. Gunstone).

Список книг и обзоров по этой тематике см. в сс. [1].

Таблица 25.1.1. Жирные кислоты

Тривиальное название	Систематическое название	Сокращенное обозначение
Вакценовая	Октадецен-11-овая	18:1 11*t*
Календовая	Октадекатриен-8,10,12-овая	18:3 8*t*10*t*12*c*
Каталповая	Октадекатриен-9,11,13-овая	18:3 9*t*11*t*13*c*
Крепениновая	Октадецен-9-ин-12-овая	18:2 9*c*12*a*
Лауриновая	Додекановая	12:0
Линолевая	Октадекадиен-9-12-овая	18:2 9*c*12*c*
α-Линоленовая	Октадекатриен-9,12,15-овая	18:3 9*c*12*c*15*c*
γ-Линоленовая	Октадекатриен-6,9,12-овая	18:3 6*c*9*c*12*c*
Линэлаидиновая	Октадекадиен-9,12-овая	18:2 9*t*12*t*
Мальваловая [a]	—	—
Миристиновая	Тетрадекановая	14:0
Олеиновая	Октадецен-9-овая	18:1 9*c*
Пальмитиновая	Гексадекановая	16:0
Паринаровая	Октадекатетраен-9,11,13,15-овая	18:4 9*c*11*t*13*t*15*c*
Рицинолевая	12-Гидроксиоктадецен-9-овая	12-OH 18:1 9*c*
Стеариновая	Октадекановая	18:0
Стеркуловая [a]	—	—
Тарировая	Октадецин-6-овая	18:1 6*a*
Элаидиновая	Октадецен-9-овая	18:9 9*t*
Элеостеариновая	Октадекатриен-9,11,13-овая	18:3 9*c*11*t*13*t*
Эруковая	Докозен-13-овая	22:1 13*c*

[a] См. формулу (14).

25.1.2. ПРИРОДНЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

В природе обнаружено свыше 500 жирных кислот. Часть из них широко распространена, хорошо изучена и важна в биологическом отношении. В наибольшем количестве промышленностью выпускаются [2] следующие жирные кислоты: олеиновая, линолевая, пальмитиновая, линоленовая, стеариновая, лауриновая, эруковая, миристиновая. Другую группу составляют соединения хотя и менее распространенные, но тоже широко известные и легко подвергающиеся метаболическим превращениям, характерным для жирных кислот. Имеются кислоты, содержащиеся в небольшом числе природных источников; биологическая роль этих кислот не выяснена, и они по большей части недостаточно изучены. Несмотря на это многие из них представляют определенный интерес. Большинство недавно обнаруженных кислот имеет необычное сочетание обычных (для соединений этого класса) структурных особенностей; лишь изредка в них обнаруживают новые структурные звенья.

В строении природных жирных кислот наблюдаются следующие закономерности.

1. Природные жирные кислоты, насыщенные или ненасыщенные, обычно представляют собой неразветвленные соединения с четным числом атомов углерода; однако существуют и соединения с нечетным числом атомов углерода, разветвленные и циклические.

2. Несмотря на большой диапазон возможных длин цепи (от C_2 до C_{80} и выше) наиболее распространены кислоты состава C_{16}, C_{18}, C_{20} и C_{22}.

3. Моноеновые кислоты обычно содержат *цис*-двойную связь, причем число возможных предпочтительных положений этой связи в углеродной цепи ограниченно; известны также *транс*-алкеновые и алкиновые кислоты.

4. Полиеновые кислоты обычно содержат от двух до шести *цис*-двойных связей, разделенных метиленовыми группами; известны также соединения с сопряженными двойными связями.

5. Замещенные кислоты встречаются редко; тем не менее известны соединения этого ряда, содержащие в качестве заместителей гидрокси-, оксо-, эпоксигруппы или атом фтора. Оптической активностью могут обладать только разветвленные, циклические или замещенные жирные кислоты [3].

25.1.2.1. Насыщенные жирные кислоты

В табл. 25.1.2 представлены насыщенные кислоты. Низшие члены этого ряда (C_4—C_{10}) входят в состав липидов молока; кислоты с промежуточной длиной цепи (C_8—C_{14}) содержатся в маслах семян растений семейства Lauraceae и Myristicaceae (отсюда названия: лауриновая и миристиновая кислоты); пальмитиновая

Таблица 25.1 2. Насыщенные кислоты нормального строения и их метиловые эфиры

Число атомов углерода в молекуле	Название кислоты		Т. пл., °С		Т. кип., °С [а]	
	систематическое	тривиальное	кислота	метиловый эфир	кислота	метиловый эфир
1	Метановая	Муравьиная	8,4	—	101	32
2	Этановая	Уксусная	16,6	—	118	57
3	Пропановая	Пропионовая	—20,8	—	141	80
4	Бутановая	Масляная	—5,3	—	164	103
5	Пентановая	Валериановая	—34,5	—80,7	186	127
6	Гексановая	Капроновая	—3,2	—69,6	206	151
7	Гептановая	Энантовая	—7,5	—55,7	223	174
8	Октановая	Каприловая	16,5	—36,7	240	195
9	Нонановая	Пеларгоновая	12,5	—34,3	256	214
10	Декаиовая	Каприновая	31,6	—12,8	271	228
11	Ундекановая	—	29,3	—11,3	284	250
12	Додекановая	Лауриновая	44,8	5,1	130 [б]	262
13	Тридекановая	—	41,8	5,8	140 [б]	—
14	Тетрадекановая	Миристиновая	54,4	19,1	149 [б]	114 [б]
15	Пентадекановая	—	52,5	19,1	158 [б]	127 [б]
16	Гексадекановая	Пальмитиновая	62,9	30,7	167 [б]	136 [б]
17	Гептадекановая	Маргариновая	61,3	29,7	175 [б]	148 [б]
18	Октадекановая	Стеариновая	70,1	37,8	184 [б]	156 [б]
19	Ноиадекановая	—	69,4	38,5	—	191 [в]
20	Эйкозановая	Арахиновая	76,1	46,4	204 [б]	188 [г]
21	Генэйкозановая	—	75,2	—	—	207 [в]
22	Докозановая	Бегеновая	80,0	51,8	—	206 [г]
23	Трикозановая	—	79,6	53,9	—	—
24	Тетракозановая	Лигноцериновая	84,2	57,4	—	222 [г]
25	Пентакозановая	—	83,5	59,5	—	—
26	Гексакозановая	Церотиновая	87,8	63,5	—	237 [г]
27	Гептакозановая	—	87,6	64,6	—	—
28	Октакозановая	Монтановая	90,9	67,5	—	—
29	Нонакозановая	—	90,4	68,8	—	—
30	Триаконтановая	Мелиссовая	93,6	71,5	—	—

[а] При 760 мм рт. ст. [б] При 1 мм рт. ст. [в] При 4 мм рт. ст. [г] При 2 мм рт. ст.

(наиболее распространенная среди насыщенных кислот) и стеариновая кислоты присутствуют в большинстве растительных и животных жиров.

25.1.2.2. Моноеновые кислоты

Известно более ста моноеновых жирных кислот. Типичным представителем этого класса соединений является олеиновая кислота (3); она наиболее распространена и изучена. Ее выделяют из богатых ею источников, например из оливкового масла.

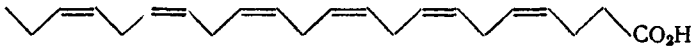
$$CH_3(CH_2)_7\overset{c}{C}O{=}CH(CH_2)_7CO_2H \quad (3)\ 18{:}1\ \ 9c$$

В кислотах такого типа двойная связь обычно имеет *цис*-конфигурацию и находится в определенных предпочтительных положениях, отражающих путь биосинтеза этих соединений. В наиболее общем случае двойная связь образуется под действием кислородзависимой Δ^9-десатуразы в положении 9 или в положении, соответствующем этому (после удлинения или укорочения цепи). Олеиновая кислота, например, вероятно является предшественником моноеновых кислот 20 : 1 11*c*, 22 : 1 13*c*, 24 : 1 15*c*, 26 : 1 17*c*, 28 : 1 19*c* и 30 : 1 21*c*, у которых двойная связь находится в фиксированном положении (ω9) по отношению к метильной группе. Δ^9-C_{16}-, -C_{17}- и -C_{19}-Кислоты являются предшественниками других рядов моноеновых кислот. Должны существовать Δ^6- и Δ^5-десатуразы, поскольку хорошо известны моноеновые кислоты с двойными связями в этих положениях [4].

Ниже приведены некоторые из более ста известных в настоящее время моноеновых кислот (см. также разд. 25.1.2.8 и 25.1.2.9): 14 : 1 9*c* (миристолеиновая); 16 : 1 3*t*, 6*t*, 9*c* (пальмитолеиновая), 11*c*, 17 : 1 9*c*; 18 : 1 3*t*, 5*c*, 5*t*, 6*c* (петрозелиновая), 6*t* (петрозелаидиновая), 9*c* (олеиновая), 9*t* (элаидиновая), 11*c* (*цис*-вакценовая), 11*t* (вакценовая); 19 : 1 9*c*; 20 : 1 5*c*, 9*c*, 11*c*; 22 : 1 5*c*, 11*c*, 13*c* (эруковая) и 24 : 1 15*c* (нервоновая).

25.1.2.3. Метиленразделенные полиеновые кислоты

Наиболее распространенными и важными являются полиеновые кислоты, которые содержат от двух до шести *цис*-двойных связей, разделенных метиленовыми группами. Типичными представителями этого класса соединений являются линолевая (**1**) и докозагексаеновая (**4**) кислоты.



(4) 22 : 6 ω3; 22 : 6 4*c*7*c*10*c*13*c*16*c*19*c*

Молекулы около ста кислот этого типа содержат в основном четное число атомов углерода (преимущественно C_{16}—C_{22}) [5]. Они метаболически родственны, образуются путем дегидрирования и удлинения цепи (см. разд. 25.1.5.4). Наиболее важны ω9-кислоты (производные олеиновой кислоты), ω6-кислоты (производные линолевой кислоты), ω3-кислоты (производные α-линоленовой кислоты) и ω7-кислоты (производные гексадецен-9-овой кислоты) (табл. 25.1.3).

Линолевая и линоленовая кислоты являются компонентами растительных масел и не образуются в организмах животных. α-Линолевая кислота является основной жирной кислотой льняного масла. Линолевая кислота обнаружена в большом количестве в подсолнечном, соевом, кукурузном маслах и масле семян сафлора красильного [6]. Полиеновые C_{20}- и C_{22}-кислоты обычно образу-

Таблица 25.1.3 Типичные метиленразделенные полиеновые кислоты (все двойные связи имеют цис-конфигурацию)

ω9-ряд	ω6-ряд	ω3-ряд	ω7-ряд
18:2 6, 9	18:2 9, 12 [а]	18:3 9, 12, 15 [д]	
20:2 8, 11	18:3 6, 9, 12 [б]	18:4 6, 9, 12, 15	16:2 6, 9
20:3 5, 8, 11	20:3 8, 11, 14 [в]	20:4 8, 11, 14, 17	18:2 8, 11
22:3 7, 10, 13	20:4 5, 8, 11, 14 [г]	20:5 5, 8, 11, 14, 17	18:3 5, 8, 11
22:4 4, 7, 10, 13	22:4 7, 10, 13, 16,	22:5 7, 10, 13, 16, 19	20:3 7, 10, 13
	22:5 4, 7, 10, 13, 16	22:6 4, 7, 10, 13, 16, 19	20:4 4, 7, 10,13

Тривиальные названия: [а] линолевая, [б] γ-линоленовая, [в] дигомо-γ-линоленовая, [г] арахидоновая, [д] α-линоленовая.

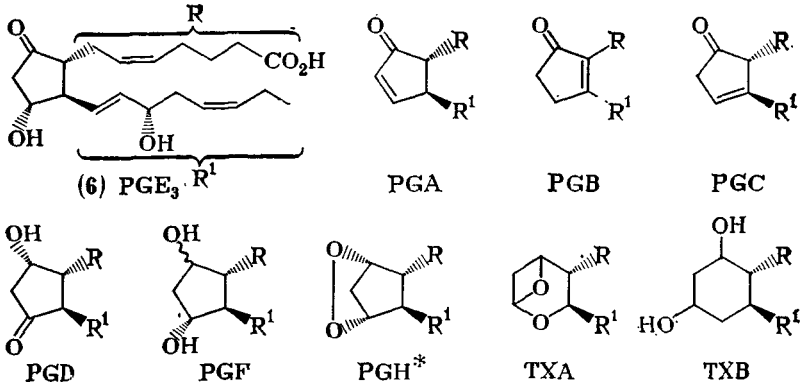
ются в организме животных из поступающих с пищей 16:1-, 18:1-, 18:2- и 18:3-соединений. У наземных животных полиеновые кислоты обнаружены в основном в составе полярных липидов; у рыб они входят в состав нейтральных и полярных липидов.

Несколько менее распространены такие полиеновые кислоты, как, например 18:3 3*t*9*c*12*c* и 20:3 5*c*11*c*14*c*, являющиеся представителями семейства метиленразделенных соединений с дополнительной двойной связью в положении 3 или 5. Эта двойная связь не всегда отделена от остальных метиленовой группой и может иметь *цис-* и *транс*-конфигурацию. Δ^7-Кислоты (например, 22:2 7,11 и 22:2 7,13), возможно, образуются из Δ^5-кислот путем удлинения их цепи. Длинноцепочечные кислоты, обнаруженные в микобактериях [типичный представитель — флеиновая кислота (5)], необычны тем, что содержат двойные связи, разделенные двумя метиленовыми группами.

$CH_3(CH_2)_{14}(CH{=}CHCH_2CH_2)_5CO_2H$ (5) 36:5 4,8,12,16,20

25.1.2.4. Незаменимые жирные кислоты, простагландины, тромбоксаны

В 1929 г. было установлено, что для нормального развития животных в их пищу должна входить линолевая (возможно и линоленовая) кислота; кислоты такого типа были названы незаменимыми. Причина их «незаменимости» окончательно не выяснена, но известно, что эти C_{18}-кислоты и(или) высшие полиеновые кислоты, образующиеся из незаменимых кислот в организмах животных, участвуют в построении биологических мембран и в образовании молекул простагландинов и тромбоксанов. Простагландины, впервые обнаруженные в сперме, часто встречаются в животных тканях и обладают широким спектром биологической активности [7].



У PGG в положении 15 находится группа OOH, а не OH

Типичным простагландином является PGE_3 (6), образующийся из 20 : 5 ω3-кислоты. Аналогично, из кислот 20 : 4 ω6 и 20 : 3 ω6 образуются соответственно PGE_2 и PGE_1. Другие простагландины отличаются только строением пятичленного карбоциклического ядра; каждый из них образует группу, состоящую из трех членов (1, 2 и 3). В родственных простагландинам тромбоксанах циклопентановое ядро заменено тетрагидропирановым.

25.1.2.5. Сопряженные полиеновые кислоты [8]

Кислоты с сопряженными кратными связями обнаружены в некоторых растениях. Это в основном C_{18}-кислоты, содержащие две—четыре двойные связи: из них наиболее известна α-элеостеариновая кислота (18 : 3 9*c*11*t*13*t*) — основной компонент тунгового масла. Из других C_{18}-кислот с тремя сопряженными двойными связями известны джакаровая (8*c*10*t*12*c*), календовая (8*t*10*t*12*c*), пуниковая (9*c*11*t*13*c*) и каталповая (9*t*11*t*13*c*). α-Паринаровая (9*c*11*t*13*t*15*c*) кислота содержит четыре сопряженные двойные связи. Сопряженную систему кратных связей содержат также некоторые ацетиленовые (см. разд. 25.1.2.6) и оксигенированные (см. разд. 25.1.2.9) кислоты.

25.1.2.6. Кислоты ряда ацетилена и аллена [3, 8, 9]

За исключением оксигенированных соединений, кислоты ряда ацетилена можно разделить на четыре группы. (1) Кислоты с одной тройной связью, например тариновая (18 : 1 6*a*), известны, но редки. (2) Более широко распространены ацетиленовые аналоги метиленразделенных полиненасыщенных кислот: 18 : 2 9*c*12*a* (крепениновая), 18 : 3 6*a*9*c*12*c*, 18 : 4 6*a*9*c*12*c*15*c* и 20 : 3 8*a*11*c*14*c*. (3) Группа высоконенасыщенных C_{17}- и C_{18}-кислот с сопряжен-

ными кратными связями включает кислоты: 17:2 8*a*10*t*, 17:3 8*a*10*t*17*e*, 18:2 9*a*11*t* (ксимениновая или санталбовая), 18:3 9*a*11*a*13*c* и 18:5 9*a*11*a*13*a*15*c*17*e*. (4) Кроме того, существует ряд высоконенасыщенных соединений C_9—C_{17}, которые не всегда являются кислотами и иногда входят в состав липидов растений и микроорганизмов. Типичным представителем этой группы является микомицин (7), содержащий 13 атомов углерода.

Среди природных кислот алленового ряда 14:3 2*t*4*e*5*e*, 18:2 5*e*6*e* и 18:3 5*e*6*e*16*t* представляет интерес C_8-гидроксикислота. Она входит в состав глицеридов *Sapium sebiferum* в виде эфира (8) с C_{10}-кислотой. Обе эти кислоты, возможно, образуются из более распространенной C_{18}-кислоты (9*c*12*c*, 6*c*9*c*12*c* или 6*a*9*c*12*c*).

$$CH{\equiv}C{-}C{\equiv}C{-}CH{=}C{=}CHCH\overset{c}{=}CHCH\overset{t}{=}CHCH_2CO_2H \quad (7)$$

$$CH_3(CH_2)_4CH\overset{c}{=}CHCH\overset{t}{=}CHCO_2CH_2CH{=}C{=}CH(CH_2)_3CO_2CH_2CH(OCOR^1)CH_2OCOR^2$$

(8)

25.1.2.7. Разветвленные кислоты [10]

Важнейшие разветвленные кислоты содержат одну (или более) метильную группу и обычно оптически активны [3]. Высокоразветвленные изопреноидные соединения (производные фитола) не включены в этот обзор, хотя они также входят в состав липидов [11].

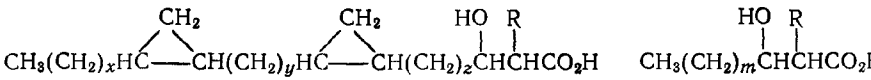
изо-Кислоты и *антеизо*-кислоты обычно содержат четное и нечетное число атомов углерода соответственно, причем *антеизо*-кислоты имеют в основном (*S*)-(+)-конфигурацию. Эти кислоты входят в состав ряда животных жиров, в особенности воска шерсти. Их биосинтез осуществляется подобно биосинтезу нормальных жирных кислот; среди них часто встречаются моногидроксипроизводные.

$CH_3CH(Me)(CH_2)_nCO_2H$ — *изо*-кислоты

$CH_3CH_2CH(Me)(CH_2)_nCO_2H$ — *антеизо*-кислоты

Туберкулостеариновая [(*R*)-(—)-10-метилстеариновая] кислота, выделенная из микобактерий, является типичным представителем кислот с единственным заместителем в середине цепи. В состав жира кашалота входит 7-метилгексадецен-7-овая кислота. Полиметилзамещенные кислоты содержатся в липидах из копчиковой железы птиц (например, 2,6-диметилдекановая), жире овец, в корм которых входило большое количество ячменя (например, 4,8-диметилтетрадекановая), и ряде бактериальных липидов (например, 2,4,6,8-тетраметилоктакозановая). Во всех случаях метильная группа появляется, вероятно, в результате замены одной или более молекул ацетата (или малоната) пропионатом (или метилмалонатом) в процессе биосинтеза [12].

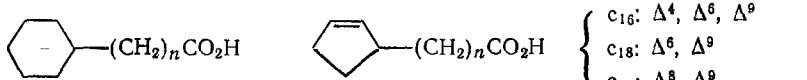
Миколовые кислоты (9), выделенные из бактерий, имеют высокую молекулярную массу, часто содержат кислородсодержащие функциональные группы (одну или более) и циклопропановые ядра. Из бактерий выделены также кориномиколовые (10, $m = 14$, $R{=}C_{14}H_{29}$) и нокардовые (10; $m = 30$—34, $R{=}C_8H_{15}$—$C_{12}H_{25}$) кислоты.



(9) $x = 17$, $y = 15$, $z = 16$, $R = C_{22}H_{45}$ или $C_{24}H_{49}$ (10)

25.1.2.8. Циклические кислоты

Известны природные жирные кислоты, содержащие трех-, пяти- и шестичленные циклы. Производные циклогексана (11) входят в состав сливочного масла и липидов некоторых микроорганизмов, обитающих в горячих источниках; они образуются, вероятно, путем удлинения углеродной цепи производного шикимовой кислоты.

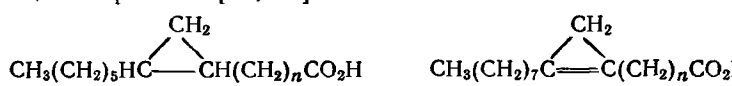


(11) $n = 10, 12$ (12)

c_{16}: Δ^4, Δ^6, Δ^9
c_{18}: Δ^6, Δ^9
c_{20}: Δ^8, Δ^9

В маслах семян растений семейства Flacourtiaceae содержится ряд однозамещенных производных циклопентена; к ним относятся кислоты C_6—C_{20} (12; $n = 0$—14) и кислоты C_{16}—C_{20}, которые могут содержать дополнительные двойные связи.

В состав бактериальных липидов входят кислоты (13) состава C_{17} и C_{19} (производные циклопропана), а также моноеновые кислоты состава C_{16} и C_{18}, из которых они образовались. Многие миколевые кислоты (см. разд. 25.1.2.7) также являются производными циклопропана [10, 13].



(13) $n = 7, 9$ (14) $n = 6, 7$

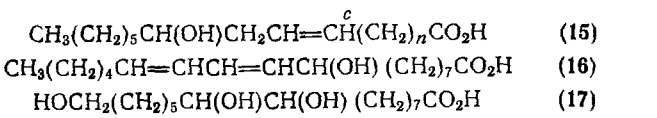
В маслах семян растений семейства Malvaceae, Bombaceae и Tiliaceae содержатся кислоты — производные циклопропена [13]. Наиболее распространенными из них являются стеркуловая (14; $n = 7$) и мальваловая (14; $n = 6$) кислоты.

25.1.2.9. Оксигенированные кислоты

Строению и химическим свойствам природных оксигенированных кислот посвящено большое число обзоров [9, 14, 15, 17, 18].

Гидроксикислоты обнаружены в липидах головного мозга, воске шерсти, липидах молока, растениях, микроорганизмах и кутинах.

Липиды головного мозга содержат α-гидроксикислоты C_{14}—C_{26} как с четным, так и с нечетным числом атомов углерода. В воске шерсти имеются α- и ω-гидроксикислоты *н-*, *изо-* и *антеизо*-строения. Гидроксикислоты, выделенные из растений, включают рицинолевую (**15**; $n = 17$), лесквероловую (**15**; $n = 9$), диморфеколовую (**16**) и алеуритовую (**17**) кислоты.



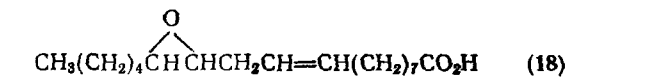
$$CH_3(CH_2)_5CH(OH)CH_2CH{=}\overset{c}{C}H(CH_2)_nCO_2H \quad (15)$$

$$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH{=}CHCH(OH)\,(CH_2)_7CO_2H \quad (16)$$

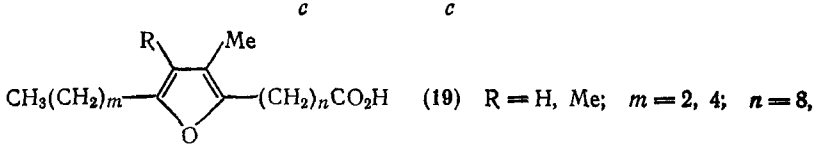
$$HOCH_2(CH_2)_5CH(OH)CH(OH)\,(CH_2)_7CO_2H \quad (17)$$

Оксокислоты — относительно редко встречающиеся соединения, однако свыше 60 соединений этого типа обнаружено в качестве минорных компонентов липидов молока. Найдены 4-оксопроизводные элеостеариновой и паринаровой кислот, а также оксомиколевые кислоты.

Природные эпоксикислоты, входящие в состав липидов, представлены в основном C_{18}-соединениями, выделенными из растений. Наиболее известна из них верноловая кислота (**18**). В липидах рыб имеются кислоты фуранового ряда (**19**).



$$CH_3(CH_2)_4\overset{c}{C}H\overset{O}{\diagup\!\diagdown}\overset{c}{C}HCH_2CH{=}CH(CH_2)_7CO_2H \quad (18)$$



$$CH_3(CH_2)_m\text{—}\underset{O}{\overset{R}{\overset{|}{\underset{|}{\diagup\!\diagdown}}}}\overset{Me}{\text{—}}(CH_2)_nCO_2H \quad (19)\ R = H,\ Me;\ m = 2,\ 4;\ n = 8,\ 10,\ 12$$

25.1.3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРОЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

В настоящем разделе кратко суммированы наиболее важные методы, применяемые в настоящее время для установления строения жирных кислот [19].

В природных источниках жирные кислоты присутствуют в виде смесей. Наличие компонента необычного строения часто обнаруживают по его аномальному поведению при ТСХ или ГЖХ, которое зависит от длины цепи, степени ненасыщенности, наличия или отсутствия боковых цепей или дополнительных полярных функциональных групп. Последующие исследования зависят от количества имеющейся кислоты, типа спектрального оборудования и способности экспериментатора интерпретировать полученные данные. Иногда строение может быть полностью установлено исключительно спектральными методами (УФ-, ИК-, КР- и ЯМР-спектроскопией или масс-спектрометрией). В других случаях кислоты сначала гидрируют и исследуют строение углеродного скелета пергидрокислоты, а затем определяют степень ненасыщенности и

наличие функциональных групп. Классические методы расщепления в настоящее время настолько усовершенствованы, что используя для идентификации продуктов газожидкостную хроматографию можно удовлетворительно исследовать всего несколько миллиграммов (и даже меньше) смеси изомерных кислот с количественной или полуколичественной оценкой. Специфические трудности, которые могут возникать при исследовании полиненасыщенных соединений, можно обойти, используя частичные реакции.

25.1.3.1. Газожидкостная хроматография [20]

Влияние кратных связей и функциональных группировок на поведение вещества при ГЖХ, а также эффекты, возникающие из-за различий в положении двойных или тройных связей, настолько хорошо изучены, что большой объем информации о строении соединения может быть извлечен непосредственно из данных по его удерживанию одной или несколькими стационарными фазами. Природные смеси, содержащие только наиболее распространенные жирные кислоты, обычно идентифицируют исключительно этим методом. Такой метод обычно дает удовлетворительные результаты для основных компонентов смесей, однако всегда существует опасность, что соединения необычного строения, присутствующие в следовых или чуть бóльших количествах, могут быть неверно идентифицированы.

25.1.3.2. УФ-, ИК- и КР-спектроскопия

УФ-Спектроскопия является основным методом определения жирных кислот с сопряженными двойными связями. Соединения, содержащие одну двойную связь или несопряженные двойные связи, определить таким способом невозможно [8]. ИК-Спектроскопию обычно применяют для обнаружения *транс*-двойных связей в моноенах, несопряженных или сопряженных полиенах. Для определения *цис*-двойных связей или тройных связей этот метод мало пригоден. Спектроскопию КР можно использовать для обнаружения *цис-* и *транс*-двойных и тройных связей. (См. также разд. 25.1.6.1 и 25.1.6.2.)

25.1.3.3. Спектроскопия ЯМР

Спектроскопия ПМР вначале не имела большого значения для исследования жирных кислот, так как использовали приборы с низкой разрешающей способностью (40 и 60 МГц), а молекулы этих соединений содержат слишком большое число протонов с очень сходным химическим окружением. Ситуация изменилась с появлением более мощных приборов (100 и 220 МГц), сдвигающих реагентов и более чувствительного метода — спектроскопии ЯМР ^{13}C (см. разд. 15.1.6.3).

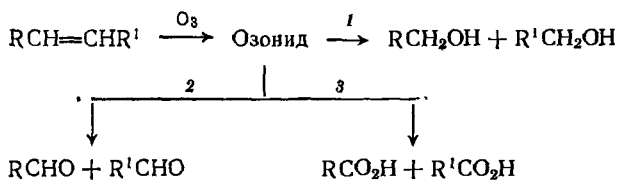
25.1.3.4. Масс-спектрометрия

Значение масс-спектрометрии для установления строения жирных кислот постоянно возрастает. В сочетании с ГЖХ она представляет собой один из наиболее эффективных методов идентификации химических соединений, поскольку требует очень небольшого количества исследуемого вещества. Хромато-масс-спектрометрия становится еще более эффективной при применении ЭВМ (см. разд. 25.1.6.4).

25.1.3.5. Окислительное расщепление с последующим частичным гидрированием

Наличие тройной или двойной связи в молекуле жирной кислоты обычно устанавливают методами ГЖХ, спектроскопии ЯМР или КР, конфигурацию двойной связи — методами ИК-, КР- или ЯМР-спектроскопии. Положение кратных связей наиболее часто определяют окислительным расщеплением с последующей идентификацией образующихся фрагментов методом ГЖХ.

К методам окислительного расщепления жирных кислот относится окисление по Рудлофу ($KMnO_4$—KIO_4) и озонолиз. При озонолизе могут образоваться спирты, альдегиды или кислоты, причем чаще образуются альдегиды или кислоты (схема 1).

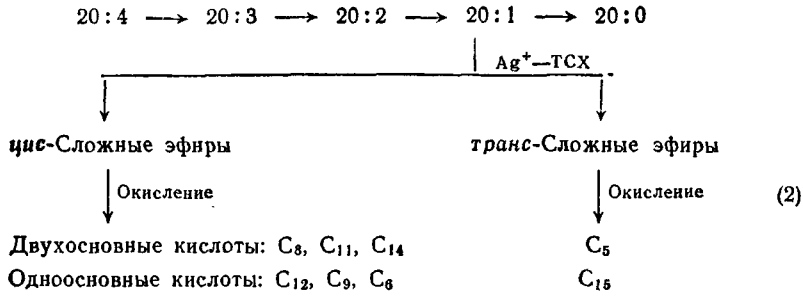


(1)

1 — $LiAlH_4$ или H_2, Pd/C; *2* — Ph_3P, или $(NC)_2C{=}C(CN)_2$, или Me_2S, или H_2, катализатор Линдлара, или пиролиз; *3* — Ag_2O, или $KMnO_4$, или H_2O_2

Идентификация продуктов расщепления полиненасыщенных кислот не всегда дает однозначный ответ на вопрос о строении исходного соединения. Так, гексановая, пропандиовая и пентандиовая кислоты образуются при окислении любого из изомеров (5,8,11,14; 3,8,11,14; 3,6,11,14 или 3,6,9,14) кислоты 20:4. Если в соединении имеются как *цис*-, так и *транс*-двойные связи, то установление строения становится еще более трудной задачей. Это затруднение можно, однако, обойти, применяя частичное восстановление гидразином, выделение фракции моноенов (если необходимо, отдельно *цис*- и *транс*-соединения) хроматографией в присутствии ионов серебра и окислением. Таким путем можно однозначно доказать строение кислоты 20:4 5*t*8*c*11*c*14*c* (схема 2). Эта же задача может быть решена с помощью частичного оксимеркурирования

(см. разд. 25.1.6.4 и 25.1.11.2).

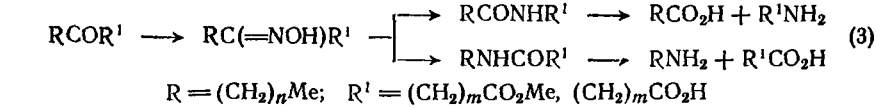


(2)

25.1.3.6. Идентификация функциональных групп

Среди природных жирных кислот встречаются, хотя и нечасто, соединения с метильными, оксо-, гидрокси- или эпоксигруппами, а также циклические производные. Многие из этих функциональных групп могут быть идентифицированы и их положение в молекуле может быть определено соответствующей комбинацией хроматографических и спектральных методов; химическая деградация в этом случае дает дополнительную полезную информацию.

Эпоксиды расщепляют метаиодной кислотой до альдегидов. Положение гидроксигруппы может быть определено окислением до кетона, последующим гидрированием для получения насыщенного оксосоединения (если необходимо), превращением в оксим, перегруппировкой Бекмана с образованием двух амидов и гидролизом до амина, аминокислоты и одно- или двухосновной кислоты (схема 3) с последующей идентификацией одного или нескольких из этих продуктов.



(3)

$R = (CH_2)_nMe$; $R^1 = (CH_2)_mCO_2Me$, $(CH_2)_mCO_2H$

25.1.4. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ [21, 22]

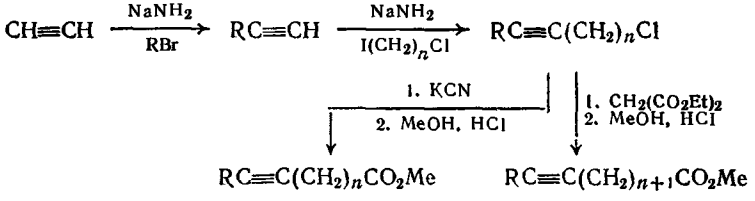
Наличие соответствующих методов синтеза и возрастающая потребность в жирных кислотах, которые нелегко выделять из природных смесей или которые отсутствуют в природных источниках, а также потребность в меченых соединениях для биохимических экспериментов привели к увеличению числа синтетических работ в этой области, причем основное внимание уделяется синтезу ненасыщенных кислот. Для ряда полиеновых кислот наиболее удачным оказался синтез из производных ацетилена (особенно для полностью *цис*-изомеров). Ненасыщенные кислоты с различными типами кратных связей в молекуле могут быть получены реакцией Виттига. Другие методы не получили широкого распространения.

за исключением стандартных методов удлинения цепи на один (через нитрилы), два (синтез с применением малонового эфира) или большее число атомов углерода (енаминовый или анодный синтез).

25.1.4.1. Синтез *цис*-моно- и -полиеновых кислот из производных ацетилена

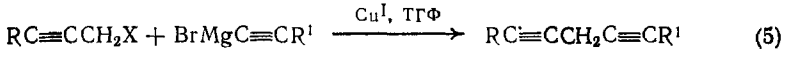
Успешное применение этого подхода основано на легкости алкилирования производных ацетилена и возможности восстановления полиинов до полностью *цис*-полиенов.

Моноиновые кислоты получают алкилированием ацетилена алкилгалогенидом (или его заменителем) и α,ω-иодхлоралканом и последующей заменой атома хлора на карбоксигруппу (через циаиид или реакцией с малоновым эфиром); таким путем можно ввести меченый атом углерода (схема 4).

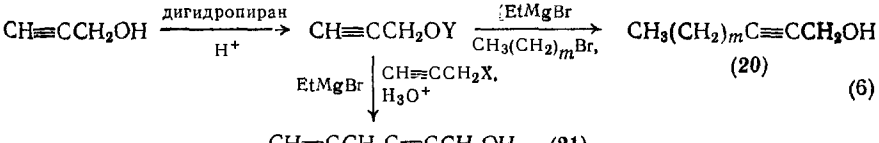


(4)

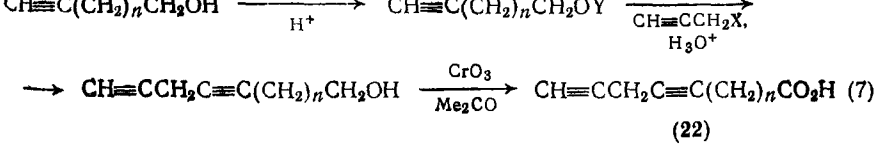
Полииновые кислоты, являющиеся полупродуктом синтеза природных полиеновых кислот, получают конденсацией алкина (в форме реактива Гриньяра) с пропаргилсодержащим соединением в присутствии солей меди(I) (схема 5). При этом необходимо тщательно выделять полупродукты, из которых конечные соединения образуются с наибольшим общим выходом. В оптимальных условиях пента- и гептаены могут быть получены с выходами 20 и 10 %, соответственно. Для получения пентаиновой кислоты (23) алкинол (20) конденсируют с гексадиинолом (21) и затем с алкадииновой кислотой (22) (схемы 6—8).



(5)



(6)



(7)

$$(20) \longrightarrow CH_3(CH_2)_mC{\equiv}CCH_2X \xrightarrow[\text{[ср. (21)]}]{BrMg(C{\equiv}CCH_2)_2OY} \longrightarrow CH_3(CH_2)_m(C{\equiv}CCH_2)_3OH \longrightarrow CH_3(CH_2)_m(C{\equiv}CCH_2)_3X \longrightarrow$$

$$\xrightarrow[\text{[ср (22)]}]{BrMgC{\equiv}CCH_2C{\equiv}C(CH_2)_nCO_2MgBr} CH_3(CH_2)_m(C{\equiv}CCH_2)_4C{\equiv}C(CH_2)_nCO_2H \quad (8)$$

(23)

X = I, OMs, OTs; Y = тетрагидропиранил

Полииновые кислоты представляют собой кристаллические твердые вещества, которые можно хранить при пониженной температуре; они могут быть очищены кристаллизацией перед частичным гидрированием, которое проводят над катализатором Линдлара (палладий на карбонате кальция, частично отравленный свинцом) в присутствии хинолина для увеличения избирательности. Полиен окончательно очищают удалением избыточно восстановленных или содержащих *транс*-двойные связи соединений хроматографией в присутствии ионов серебра.

25.1.4.2. Синтез кислот с помощью реакции Виттига

С помощью реакции Виттига (схема 9) конденсируют альдегиды или кетоны с производным алкилгалогенида. Образующийся при этом алкен обычно имеет *транс*-конфигурацию, однако в присутствии оснований Льюиса, например бромид- или иодид-ионов, образуются чистые *цис*-алкены. Алкилгалогенид служит предшественником алкилиденфосфорана ($R^1CH{=}PPh_3$), который может быть заменен фосфиноксидом $R^1CH_2P(O)R_2^2$ или фосфонатом $R^1CH_2PO(OEt)_2$; такая модификация широко используется в синтезе простагландинов.

$$RCHO + BrCH_2R^1 \longrightarrow RCH{=}CHR^1 \quad (9)$$

Более традиционный вариант реакции Виттига показан на примере синтеза календовой ($n = 6$, $m = 4$) и каталповой ($n = 7$, $m = 3$) кислот (схема 10) и крепениновой и линолевой кислот (схема 11). Эти схемы применимы и для синтеза меченых соединений.

$$CH_3(CH_2)_mC{\equiv}C\overset{t}{C}H{=}\overset{c}{C}HCH_2OH \xrightarrow[\text{2. } Ph_3P \text{ 3. NaOMe}]{\text{1. } PBr_3} CH_3(CH_2)_mC{\equiv}CCH{=}CHCH{=}PPh_3 \longrightarrow$$

$$\xrightarrow[\text{2. } H_2\text{, катализатор Линдлара}]{\text{1. } OHC(CH_2)_nCO_2Me} CH_3(CH_2)_m\overset{c}{C}H{=}CH\overset{t}{C}H{=}CH\overset{t}{C}H{=}CH(CH_2)_nCO_2Me \quad (10)$$

$$CH_3(CH_2)_4C{\equiv}CCH_2CH_2Br \xrightarrow[\text{2. Основание}]{\text{1. } Ph_3P} CH_3(CH_2)_4C{\equiv}CCH_2CH{=}PPh_3 \longrightarrow$$

$$\xrightarrow{OHC(CH_2)_7CO_2Me} CH_3(CH_2)_4C{\equiv}CCH_2CH{=}\overset{c}{C}H(CH_2)_7CO_2Me \xrightarrow[\text{катализатор Линдлара}]{H_2}$$

$$\longrightarrow CH_3(CH_2)_4CH{=}\overset{c}{C}HCH_2CH{=}\overset{c}{C}H(CH_2)_7CO_2Me \quad (11)$$

25.1.4.3. Синтез простагландинов

Возможное наличие фармакологической активности у природных простагландинов и родственных неприродных соединений послужило стимулом к развертыванию в последние годы широкой программы исследований в области их синтеза. Кори и др. осуществили синтез (схема 12), который стал родоначальником многочисленных модификаций. Согласно этой схеме, циклопентадиен превращают в бициклический иодолактон (24), молекула которого обладает требуемой стереохимией и содержит две потенциальные альдегидные функции, пригодные для конденсации по Виттигу с соединениями C_7 и C_5 с образованием диена (25). Из этого диена получают PGE_2 и $PGF_{2\alpha}$; если диен предварительно восстановить до моноена, то его можно превратить в PGE_1 и $PGF_{1\alpha}$.

25.1.5. БИОСИНТЕЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

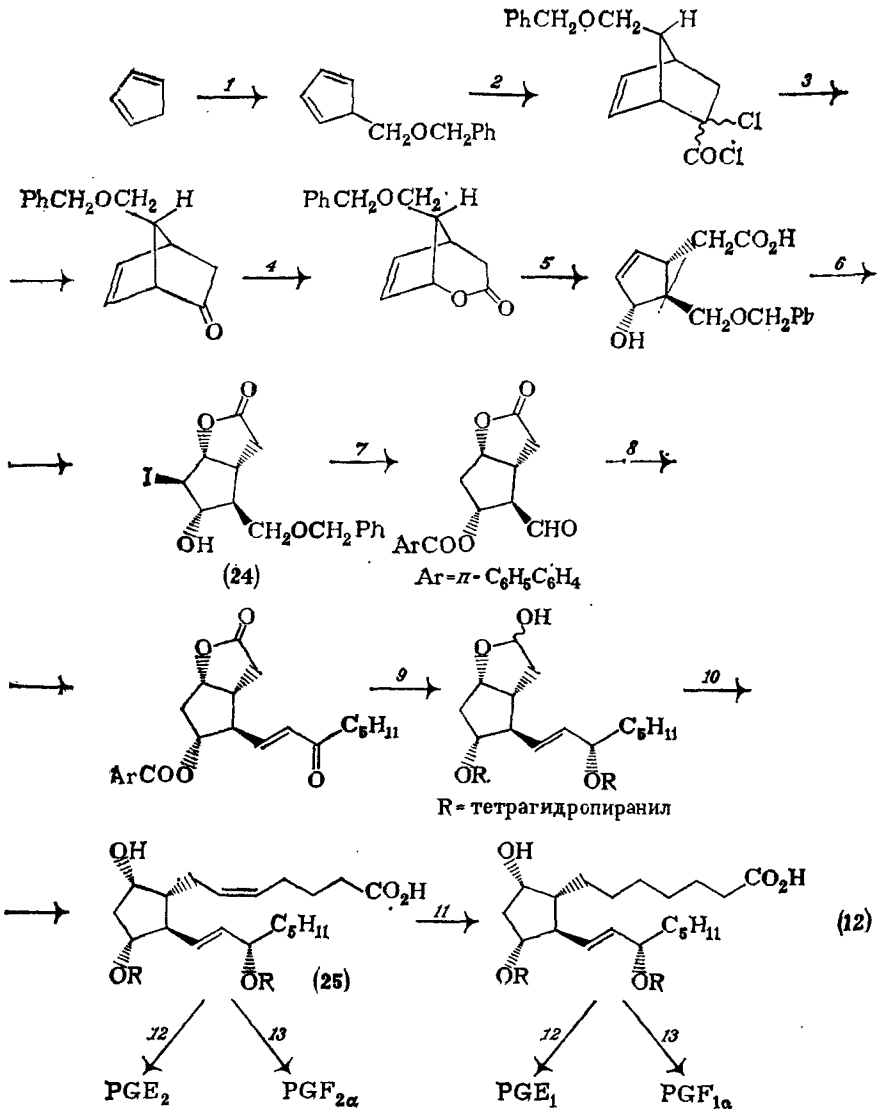
Поскольку жирные кислоты играют важную роль в жизнедеятельности растений и животных, их биосинтез широко изучается; в настоящее время известны его основные направления. В этом разделе большее внимание уделено химической природе различных промежуточных соединений, а не участвующим в процессе биосинтеза ферментам. В рассматриваемых ниже некоторых биохимических реакциях действительная природа субстрата не до конца ясна, и потому термины «ацетат», «пальмитат» и т. п. могут относиться как к свободной кислоте, так и к кислоте, связанной с коферментом или ферментом или даже входящей в состав липида. Наиболее часто кислоты участвуют в биохимических реакциях в виде сложных эфиров с тиолами и поэтому часто записываются как RCOSKoA или RCOSАПБ [остаток кислоты RCO_2H присоединен к тиольной группе фосфопантотеинового фрагмента кофермента А или ацилпереносящего белка (АПБ)].

25.1.5.1. Биосинтез пальмитиновой кислоты

Начальной стадией биосинтеза жирных кислот обычно является синтез пальмитиновой (16:0) кислоты из ацетата (8 моль). Не все ацетатные звенья эквивалентны: одно из них участвует в процессе конденсации в виде собственно ацетата, тогда как из остальных предварительно образуется малонат. Лишние карбоксильные группы в процессе конденсации элиминируются, так что все 16 атомов углерода в пальмитате происходят из ацетата (схема 13).

$$7\text{Ацетат} \longrightarrow 7\text{Малонат} \xrightarrow{\text{ацетат}} \text{Пальмитат} + 7CO_2 \qquad (13)$$

Превращение ацетата в малонат катализирует фермент (Е), содержащий биотин (ацетил-КоА-карбоксилаза) (схемы 14, 15). Остальные реакции катализирует группа ферментов (синтетаза



1–$Tl(OEt)_3$, $PhCH_2OCH_2Cl$; *2*–$CH_2{=}C(Cl)COCl$; *3*–NaN_3, нагревание, H^+; *4*–*м*-$ClC_6H_4CO_3H$; *5*–NaOH; *6*–KI, $NaHCO_3$; *7*–*п*-$C_6H_5C_6H_4COCl$ (ArCOCl); Bu_3SnH; H_2, Pd/C, H^+; CrO_3, C_5H_5N; *8*–$Na^+(MeO)_2P(O)\bar{C}HCOC_5H_{11}$; *9*–$LiBR_3H$; K_2CO_3; дигидропиран, *изо*-Bu_2AlH; *10*–$Ph_3P{=}CH(CH_2)_3CO_2Na$; *11*–H_2, Pd/C; −15 ÷ −20°C; *12*–CrO_3; H^+; *13*–H^+.

жирной кислоты), которые в животных тканях или дрожжевых клетках существуют в виде мультиферментного комплекса, а в бактериальных и растительных клетках — в легко диссоциирующей форме. Синтетаза содержит: а) трансацилазу, осуществляющую перенос ацетильной или малонильной группы на соответствующую тиольную функцию ацилпереносящего белка (схемы 16, 17); б) фермент, катализирующий реакцию ацетата с малонатом и образование 3-оксобутаноата (ацетоацетата) (схема 18); в) редуктазу, которая в присутствии NADPH восстанавливает 3-оксобутаноат в 3(*R*)-(—)-гидроксибутаноат (схема 19); г) дегидратазу, под действием которой образуется *транс*-бутен-2-оат (схема 20); д) вторую редуктазу, под действием которой в присутствии NADPH или NADH из *транс*-бутен-2-оата образуется бутаноат (схема 21). На этой стадии цикл завершается (схемы 14—21) и, таким образом, один из ацетатов (в виде малоната) присоединяется ко второму с образованием бутаноата.

$$АТР + HCO_3^- + Е \overset{Mn^{2+}}{\rightleftarrows} ADP + H_3PO_4 + CO_2\text{-}Е \quad (14)$$

$$CO_2\text{-}Е + CH_3COSKoA \rightleftarrows Е + HO_2CCH_2COSKoA \quad (15)$$

$$CH_3COSKoA + АПБSH \rightleftarrows CH_3COSАПБ + KoASH \quad (16)$$

$$HO_2CCH_2COSKoA + АПБSH \rightleftarrows HO_2CCH_2COSАПБ + KoASH \quad (17)$$

$$CH_3COSАПБ + HO_2CCH_2COSАПБ \rightleftarrows CH_3COCH_2COSАПБ + CO_2 + АПБSH \quad (18)$$

$$CH_3COCH_2COSАПБ + NADPH + H^+ \rightleftarrows CH_3CH(OH)CH_2COSАПБ + NADP \quad (19)$$

$$CH_3CH(OH)CH_2COSАПБ \overset{t}{\rightleftarrows} CH_3CH{=}CHCOSАПБ + H_2O \quad (20)$$

$$CH_3CH{=}CHCOSАПБ + NADPH + H^+ \rightleftarrows CH_3(CH_2)_2COSАПБ + NADP \quad (21)$$

При повторении цикла длина цепи увеличивается и образуются кислоты C_6, C_8, C_{10}, C_{12}, C_{14} и C_{16}. Другой фермент регулирует выведение кислоты C_{16} из цикла биосинтеза, и, таким образом, основным продуктом биосинтеза является пальмитиновая кислота. Иногда попутно синтезируется стеариновая кислота; кроме того в растениях должны существовать ферментные системы, катализирующие образование преимущественно короткоцепочечных кислот — лауриновой (12 : 0) и миристиновой (14 : 0).

Этот широко распространенный путь биосинтеза иногда осуществляется в измененной форме. Одним из необычных его направлений является образование моноеновых кислот (см. разд. 25.1.5.3). Возможно также, что замена первой молекулы ацетата другими кислотами, на которые обычным путем переносится далее малонат, приводит к образованию различных конечных продуктов. Так, из пропаноата образуется гептадеканоат, из 2-метилпропаноата — 16-метилгептадеканоат и из 2-метилбутаноата — 14-метилгексадеканоат. Ацетатные звенья, участвующие в процессе биосинтеза в виде малоната, в исключительных случаях могут быть

заменены пропаноатом (или метилмалонатом). По такому пути образуются разветвленные жирные кислоты у ягнят, корм которых содержал большое количество ячменя (см. разд. 25.1.2.7, а также разд. 25.1.5.2).

25.1.5.2. Биосинтез жирных кислот путем удлинения углеродной цепи

Кислоты RCO_2H, как насыщенные, так и ненасыщенные, превращаются в их гомологи $RCH_2CH_2CO_2H$ путем удлинения цепи в различных биохимических процессах через сходные промежуточные соединения (см. разд. 25.1.5.3, 25.1.5.4). При этом утилизируется ацетат (в основном при локализации процесса в митохондриях) или малонат (при локализации в микросомах); все промежуточные соединения участвуют в этом цикле в виде производных кофермента А. Вместо ацетата или малоната может быть использован пропаноат или метилмалонат; возможно, что некоторые разветвленные жирные кислоты с несколькими метильными группами образуются именно этим путем (схема 22).

$$\begin{aligned} &20:0 \longrightarrow \text{2-Метил-22:0} \longrightarrow \text{2,4-Диметил-24:0} \longrightarrow \\ &\longrightarrow \text{2,4,6-Триметил-26:0} \longrightarrow \text{2,4,6,8-Тетраметил-28:0} \end{aligned} \qquad (22)$$

25.1.5.3. Биосинтез моноеновых кислот

Эти соединения образуются двумя путями. Наиболее часто биосинтез идет в присутствии кислорода; анаэробный процесс менее распространен и существует только у низших форм живых организмов.

Липиды бактерий редко содержат полиеновые кислоты; в их состав обычно входят моноеновые кислоты и образованные из них кислоты — производные циклопропана. У анаэробных бактерий биосинтез моноеновых кислот осуществляется модифицированным путем. Одной из стадий обычного пути биосинтеза пальмитиновой кислоты является превращение 3-гидроксидекановой кислоты в ее Δ^{2t}-аналог, который затем восстанавливается до декановой кислоты. У анаэробных бактерий имеется специальный фермент — дегидратаза, наиболее эффективно использующий в качестве субстрата C_{10}-гидроксикислоту, а также (хотя и менее эффективно) C_8- и C_{12}-кислоты. При этом образуется равновесная смесь Δ^{2t}- и Δ^{3c}-моноеновых кислот. Первая из них восстанавливается обычным способом и в конечном счете превращается в длинноцепочечные насыщенные кислоты; вторая кислота минует стадию восстановления и превращается в 16:1- и 18:1-кислоты (схема 23).

$$\begin{aligned} &2:0 \longrightarrow\longrightarrow \text{3-OH-10:0} \longrightarrow 10:1\ 2t \longrightarrow\longrightarrow\longrightarrow\longrightarrow 16:0 \longrightarrow 18:0 \\ &\qquad\qquad\qquad

Для биосинтеза моноеновых жирных кислот у растений, животных и микроорганизмов большее значение имеет схема с участием кислорода и NADH (*или* NADPH). В большинстве случаев двойная связь возникает в положении 9 путем избирательного отщепления 9-*pro*-(*R*)- и 10-*pro*-(*R*)-атомов водорода под действием дегидрогеназы. Превращению подвергаются ацильные производные КоА, АПБ и, возможно, некоторые фосфолипиды. Таким образом синтезируются обычные Δ^9-кислоты с различной длиной цепи, а также кислоты, образующиеся из Δ^9-предшественников путем удлинения цепи (см. разд. 25.1.5.2).

25.1.5.4. Биосинтез полиеновых кислот

Полиеновые кислоты у растений и животных служат предшественниками простаглаидинов и компонентов липидов мембран. В растениях моноеновые кислоты превращаются в полиеновые путем образования дополнительных двойных связей на дистальном участке молекулы (между существующей двойной связью и ω-метильной группой) и только изредка на проксимальном (между существующей двойной связью и карбоксильной группой). У животных, напротив, дополнительные двойные связи создаются только на проксимальных участках молекул моноеновых и полиеновых кислот, поступающих с растительной пищей (схема 24).

$$\underbrace{CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH}_{\text{дистальный участок}}=\underbrace{CHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH}_{\text{проксимальный участок}}$$

Олеиновая кислота 18:1 9*c* ⟶ ω9-Полиеновые кислоты

↓ растения

Линолевая кислота 18:2 9*c*12*c* ⟶ ω6-Полиеновые кислоты (24)

↓ растения

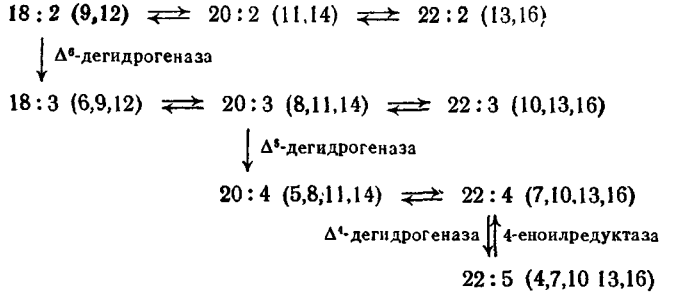
Линоленовая кислота 18:3 9*c*12*c*15*c* ⟶ ω3-Полиеновые кислоты

В растениях олеиновая кислота превращается в линолевую и линоленовую. Эти три C_{18}-кислоты наиболее распространены в растительном мире и являются предшественниками других ненасыщенных кислот (см. схему 24). Альтернативный биосинтез линоленовой кислоты осуществляется в хлоропластах (схема 25), причем 12:3-кислота должна быть 3*c*6*c*9*c*-изомером.

12:0 ⟶ 12:1 ⟶ 12:2 ⟶ 12:3 ⟶ 14:3 ⟶ 16:3 ⟶ 18:3 (25)

Животные, организм которых не способен создавать двойные связи на дистальном участке молекулы, продуцируют полиеновые кислоты (см. табл. 25.1.3) дегидрированием и удлинением цепи эндогенного или экзогенного олеата (ω9-кислоты) или гексадецен-9-оата (ω7-кислоты) или поступающего с растительной пищей линолеата (ω6-кислоты) или линоленаата (ω3-кислоты).

Кроме Δ^9-дегидрогеназы, которая в основном превращает насыщенные кислоты в моноеновые, в организме животных могут присутствовать только три другие обычные дегидрогеназы (Δ^6, Δ^5 и Δ^4). Δ^6-Дегидрогеназа наиболее эффективно действует на Δ^9-субстраты (которые могут иметь дополнительные двойные связи на дистальном конце молекулы). Образование Δ^6-кислот показано на схеме (26).

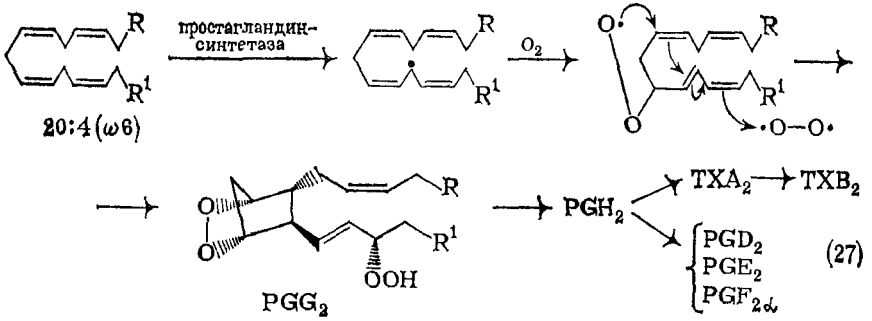


(26)

Взаимопревращения кислот, расположенных в горизонтальных рядах (см. схему 26), осуществляются с помощью процессов удлинения или укорочения цепи, однако переход на следующую горизонталь возможен лишь для соединений, способных служить субстратами Δ^6-, Δ^5- или Δ^4-дегидрогеназы. Так, линолевая кислота наиболее часто превращается в арахидоновую (20 : 4 ω6), олеиновую (20 : 3 ω9) и линоленовые (20 : 5 и 22 : 6 ω3) кислоты. Обратный процесс менее изучен, однако обнаружена 4-еноилредуктаза, необходимая для осуществления превращения 22 : 5 ω6 ⇄ 22 : 4 ω6 ⇄ 20 : 4 ω6.

25.1.5.5. Биосинтез простагландинов и тромбоксанов

Эти соединения являются C_{20}-кислотами (см. разд. 25.1.2.4), образующимися из природных полиеновых кислот. Из 20 : 3 ω6-, 20 : 4 ω6- и 20 : 5 ω3-кислот образуются PG_1, PG_2 и PG_3, соответственно.



(27)

$R = (CH_2)_2CO_2H$; $R^1 = (CH_2)_3CH_3$

Минимальный структурный фрагмент — система ω6,9,12, преимущественно C_{20}-кислота; биосинтез осуществляется через *эндо*-пероксиды (схема 27), которые являются предшественниками как простагландинов, так и тромбоксанов.

25.1.6. СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ

25.1.6.1. УФ-Спектроскопия [8,27]

Моноеновые и метиленразделенные полиеновые кислоты нельзя изучать этим методом, так как они поглощают в области слишком коротких длин волн. УФ-Спектроскопия, однако, незаменима для исследования кислот с сопряженными кратными связями и изучения реакций их образования (см. разд. 25.1.8, 25.1.11). Спектральные характеристики некоторых типичных хромофоров приведены в табл. 25.1.4.

25.1.6.2. ИК- и КР-Спектроскопия [8,27—30]

Спектры растворенных веществ используют в основном для идентификации функциональных групп (в частности, *транс*-двойных связей), тогда как спектры веществ в твердом состоянии дают информацию о структурных особенностях, полиморфизме, упаковке цепей, конформации и т. д.

Жиры и масла, в состав которых входят смеси только обычных насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, имеют очень похожие ИК-спектры с максимумами поглощения при 1380 (CH_3),

Таблица 25.1.4. Полосы поглощения некоторых хромофорных групп, имеющихся в молекулах природных жирных кислот в УФ-спектрах

Хромофор	Кислота	Растворитель	$\lambda_{макс}$, нм ($\lg \varepsilon_{макс}$)
Диеи	18:2 9*c*11*c*	Этанол	235 (4,41)
	18:2 9*c*11*t*	»	232
	18:2 9*t*11*t*	»	230 (4,55)
Диеновая кислота	10:2 2*t*4*c*	»	260 (4,38)
Оксодиен	9-оксо-18:2 10*t*12*t*	Метанол, циклогексан	275 (4,44) 267 (4,44)
Енин	18:2 9*a*11*c*	—	227 (4,15)
	18:3 9*c*12*a*14*c*	*Метанол*	227, 235 (пл.)
	18:2 9*a*11*t*	Этанол	229 (4,22), 240 (пл.)
Триен	18:3 9*c*11*c*13*t*	Циклогексан	262, 272 (4,69), 283
	18:3 9*c*11*c*13*t*	—	261, 270, 280
	18:3 9*t*11*t*13*t*	Этанол	259, 268 (4,78), 279
	18:3 8*c*10*t*12*c*	Циклогексан	265, 275, 287
Тетраен	18:4 9*c*11*t*13*t*15*c*	Этанол	291,5 (4,67), 305 (4,86), 320 (4,83)
	18:4 9*t*11*t*13*t*15*t*	Метанол	286 (4,77), 299 (4,97), 313 (4,94)
Диенин	18:3 9*a*11*t*13*t*	Этанол	266,5 (4,59), 277 (4,49)

1720 и 2915—2950 (CH_2), 1700—1715 (CO_2H), 1180—1260 и 1740 (CO_2R) $см^{-1}$. При наличии необычных структурных элементов могут появляться дополнительные полосы поглощения: 3450 (OH), 1725 (CO), 1850 и 1010 (циклопропенил), 850 и 825 (эпокси), 2220 и 1960 (аллены), 990 и 910 (винил), 950 (сопряженный енин) $см^{-1}$ [31].

Наиболее широко ИК-спектроскопию используют для исследования кислот, в которых предполагается наличие *транс*-двойных связей. Единичная такая связь проявляется характеристической полосой поглощения при 968 $см^{-1}$. Для несопряженных полиеновых кислот наблюдается приблизительная аддитивность. Так, линэлаидиновая кислота имеет полосу поглощения в той же области, что и элаидиновая, но более интенсивную. У сопряженных полиенов с одной и более *транс*-связями наблюдаются сдвиг полосы поглощения и, иногда, дополнительные полосы поглощения 998 (*tt*), 985 и 950 (*ct*), 994 (*ttt*), 993 и 965 (*ttc*), 988 и 937 (*ctc*), 997 (*tttt*), 993 и 952 (*cttc*) $см^{-1}$.

ИК-Спектры длинноцепочечных кислот в кристаллическом состоянии содержат ряд полос поглощения одинаковой ширины и интенсивности в области 1335—1175 $см^{-1}$, которые возникают из-за взаимодействия маятниковых и(или) крутильных колебаний CH_2-группы. Число таких полос соответствует $n/2$ для кислот с четным числом (n) атомов углерода и $(n+1)/2$ для кислот с нечетным числом атомов углерода [30].

Хотя ИК-спектры применяют для идентификации *транс*-двойных связей (полосы поглощения при 968 $см^{-1}$, обусловленные внеплоскостными деформационными колебаниями атомов водорода при двойной связи), полосы при 1657—1673 $см^{-1}$ (вибрационные колебания *цис-* и *транс*-двойной связи, соответственно) плохо проявляются из-за локальной симметрии окружения двойной связи. Однако в спектрах КР наблюдаются сильные полосы поглощения для *цис*-(1656 ± 1) и *транс*-(1670 ± 1) двойной связи и тройной связи (2232 ± 1 и 2291 ± 2 $см^{-1}$). Эти значения могут несколько изменяться, если кратная связь сопряжена с карбоксильной группой или является терминальной [32].

25.1.6.3. Спектроскопия ЯМР [33—35 в]

В спектрах ПМР насыщенных сложных эфиров, например метилстеарата, содержатся сигналы ω-метильной группы (δ 0,89), сложноэфирной метильной группы (δ 3,65), α-метиленовой группы (δ 2,31) и прочих метиленовых групп (δ 1,26). В спектрах более высокого разрешения можно получить отдельный сигнал β-метиленовой группы (δ 1,58), а при использовании сдвигающих реагентов — сигналы других метиленовых групп, расположенных вблизи сложноэфирной группировки.

В спектрах ненасыщенных сложных эфиров, например метилолеата, помимо указанных сигналов должен присутствовать три-

плет двух протоиов при двойиой связи (δ 5—6) и сигиал аллильных протоиов (δ 1,99). *цис-* и *транс*-Алкеиы имеют различные константы спии-спииового взаимодействия виииильных протоиов (~ 10 и ~ 15 Гц, соответствеиио) и различиые химические сдвиги аллильиых протонов (1,99 и 1,94, соответствеино). В спектрах метиленразделеииых полиеновых эфиров имеется сигиал метиленовой группы (δ 2,72), расположеииой между двумя *цис*-двойными связями.

Среди сложных эфиров моиоиенасыщеиных C_{18}-кислот с помощью спектроскопии ПМР при 220 МГц можио идентифицировать все моноиновые и *цис-* и *транс*-моиоеновые эфиры за исключением Δ^{10}-, Δ^{11}- и Δ^{12}-соедииений, которые можио различить, применяя сдвигающие реагенты.

В табл. 25.1.5 приведены химические сдвиги иекоторых наиболее важных функциональиых групп (при отсутствии влияния других групп) и дезэкранирующие эффекты этих групп вдоль алкильиой цепи. Эти даиные могут быть использованы для вычисления химических сдвигов для протонов ряда жирных кислот.

Более высокая чувствительность спектроскопии ЯМР ^{13}C к химическому окружеиию делает ее более информативной, чем спектроскопия ПМР, несмотря на иизкое содержание ^{13}C в необогащенных образцах. Спектр ЯМР ^{13}C метиловых эфиров насыщениых кислот (26) содержит семь отдельных сигиалов, а также сложный

Таблица 25.1.5. ПМР-Спектры[а] жирных кислот

Функциональная группа	Химический сдвиг δ, млн$^{-1}$	Дезэкранирующий эффект (в млн$^{-1}$) в положениях					
		α	β	γ	δ	ε	ξ
$-CO_2H$	—	1,035	0,360	0,095	0,055	0,030	0,005
$-CO_2CH_3$	3,65	0,955	0,320	0,060	0,035	0,020	0,005
$-CH_3$	0,885	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
$-CH=CH-$ (*c*)	5—6	0,730	0,065	0,020	0,015	0,005	0,000
$-CH=CH-$ (*t*)	5—6	0,685	0,050	0,005	0,000	0,000	0,000
$-CH\equiv C-$	—	0,820	0,160	0,130	0,040	0,025	0,015
$-CH=CHCH_2CH=CH-$ (*cc*)	2,72	0,770	0,075	0,025	0,025	0,010	0,000
 (*c*)	2,70 [в]	0,170	0,190	0,100	0,055	0,030	0,015
 (*t*)	2,45 [г]	0,170	0,150	0,075	0,035	0,020	0,010
 (*t*)	0,2 [д]	—0,100	0,075	0,020	0,000	0,000	0,000

[а] Приведены химические сдвиги (δ относительно $SiMe_4$) для основных функциональных групп жирных кислот и дезэкранирующие эффекты этих групп вдоль алкильной цепи для раствора в CCl_4). Базисный химический сдвиг для метиленовой группы 1,255 млн$^{-1}$. [б] 3,42 [—CH(OH)—], 3,62 [—CH(OOH)—], 4,2 [—CH_2O— в $RCOOCH_2CH(OCOR)CH_2OCOR$], 5,2 (=CHO—). [в] J=2,5—5,0. [г] J=0,5—2,5. [д] Для *цис*-изомера —0,3(1H), +0,6 (3H).

Таблица 25.1.6. Спектры ЯМР ^{13}C[а]

Функциональная группа	Химический сдвиг атома углерода функциональной группы, млн$^{-1}$	Дезэкранирующий эффект[б] (в млн$^{-1}$) в положениях					
		α	β	γ	δ	ε	ζ
—CO_2H	180,60	+4,43	—5,00	—0,58	—0,42	—0,25	0,00
—CO_2CH_3	174,04 51,26	+4,34	—4,73	—0,48	—0,39	—0,20	0,00
—CH_3	14,3	—7,01	+2,26	—0,31	0,00	0,00	0,00
—CH=CH— (*c*)	129,90	—2,50	—0,05	—0,45	—0,20	—0,10	0,00
—CH=CH— (*t*)	130,40	+2,85	—0,10	—0,55	—0,20	—0,10	0,00
—C≡C—	80,19	—10,96	—0,56	—0,84	—0,53	—0,16	—0,11
—CH(OH)—	71,85	+7,80	—4,00	+0,06	—0,06	—0,09	—0,05
—CH(OAc)—	74,35	+4,40	—4,40	—0,20	—0,20	—0,10	—0,05
—CO—	181,10	+13,1	—5,75	—0,40	—0,25	—0,20	—0,08

[а] Базисные сдвиги сигналов метиленовых групп: 29,80 (для кислоты), 29,84 [35, 35а], 29,75 [35б] и 29,65 [35в] (для сложных эфиров). [б] Изменения положения сигналов метиленовых групп.

сигнал в области 29—30 млн$^{-1}$, в котором можно выделить пять дополнительных сигналов. Они возникают из-за дезэкранирующего влияния групп CO_2CH_3 и CH_3.

$$\underset{14,13}{CH_3}-\overset{22,83}{\underset{32,10}{CH_2}}-\overset{}{CH_2}-\overset{29,53}{\underset{29,84}{CH_2}}-(CH_2)_n-\overset{29,64}{\underset{29,45}{CH_2}}-\overset{29,36}{\underset{25,11}{CH_2}}-\overset{34,18}{CH_2}-\overset{51,26}{\underset{174,04}{CO}}-OCH_3 \qquad (26)$$

Наличие кратных связей (или других функциональных групп) в углеродной цепи приводит к появлению дополнительных сигналов, соответствующих этим группам, и сдвигу сигналов насыщенных атомов углерода по отношению к сигналам атомов углерода насыщенных эфиров с той же длиной цепи, что обычно достаточно для установления природы и положения функциональной группы.

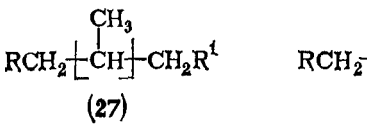
Ненасыщенным атомам углерода, не испытывающим дополнительного дезэкранирующего влияния, соответствуют сигналы при 129,90 (*цис*-алкены), 130,40 (*транс*-алкены) и 80,19 (алкины), которые под влиянием ω-метильной или карбоксиметильной группы часто проявляются в виде двух пиков. Степень такого расщепления часто оказывается достаточной характеристикой для определения положения кратной связи в углеродной цепи. Дезэкранирующее влияние одного ненасыщенного атома углерода на другой атом углерода также должно быть учтено, что дает возможность отнесения всех наблюдаемых сигналов для полиенового сложного эфира (табл. 25.1.6). Для метилового эфира арахидоновой кислоты (**26а**) сделано отнесение всех наблюдаемых сигналов.

$$\underset{14,05}{CH_3}-\overset{22,61}{\underset{31,59}{CH_2}}-\overset{}{CH_2}-\overset{29,39}{\underset{27,28}{CH_2}}-\overset{}{CH_2}-\overset{130,51}{\underset{127,63}{CH}}=\overset{}{CH}-\overset{25,71}{\underset{126,65}{CH_2}}-\overset{}{CH}=\overset{127,97}{\underset{25,71}{CH}}-\overset{}{CH_2}-\overset{128,25}{\overbrace{CH=CH}}-\overset{}{CH_2}-\overset{128,96}{\overbrace{CH=CH}}-\overset{}{CH_2}-\overset{24,89}{\underset{33,50}{CH_2}}-\overset{}{CH_2}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\overset{}{\underset{51,40}{OCH_3}}$$

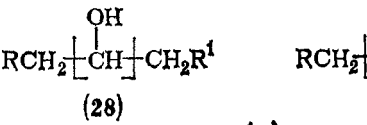
(**26а**)

25.1.6.4. Масс-спектрометрия [36, 37]

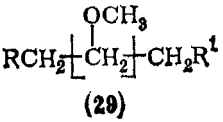
Масс-спектры насыщенных эфиров, таких как метилстеарат, содержат пик молекулярного иона (M^+) и пики при m/e 74 $[CH_2=C(OH)OCH_3]^+$, $M-31$, $59+14n$ [из $(CH_2)_nCO_2CH_3$] и $15+14n$ [из $CH_3(CH_2)_n$]. Несмотря на некоторую селективность расщепления оно происходит между каждой парой метиленовых групп. При наличии метильной группы в боковой цепи, как в (27), или кислородсодержащего заместителя, как в (28)—(31), доминирует α-расщепление; по характеру образующихся при этом ионов можно судить о природе и положении дополнительной функциональной группы. В случае кетонов α-расщепление сопровождается β-расщеплением с перегруппировкой Мак-Лафферти. От фрагментов, содержащих сложноэфирную группировку, далее часто отщепляется фрагмент с массовым числом 32 (CH_3OH). Сложные оксоэфиры обычно исследуют без предварительной модификации, гидроксиэфиры превращают в триметилсилиловые эфиры, что улучшает их летучесть при ГЖХ, эпоксиэфиры превращают в простые эфиры нескольких типов (см. схему 28).



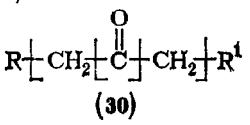
(27)



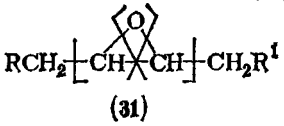
(28)



(29)

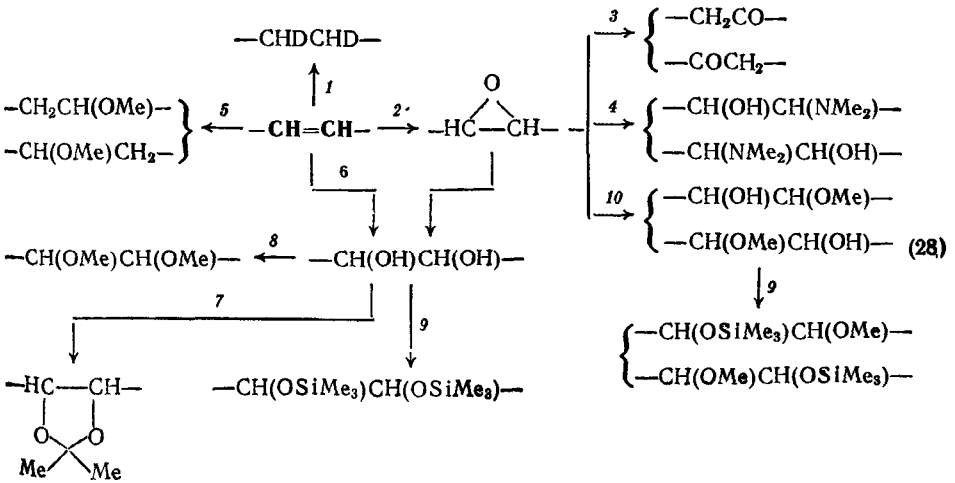


(30)



(31)

$R=CH_3(CH_2)_n$ $R^1=(CH_2)_mCO_2CH_3$



(28)

1—D_2, катализатор; *2*—RCO_3H; *3*—NaI; *4*—Me_2NH; *5*—$Hg(OAc)_2$, MeOH; $NaBH_4$; *6*—OsO_4; *7*—$COMe_2$; *8*—MeI; *9*—$(Me_3Si)_2NH$ и Me_3SiCl или $(Me_3Si)_2NAc$; *10*—BF_3, MeOH

Хотя метилолеат, метиллинолеат и метиллиноленат дают разные масс-спектры, их трудно отличить от изомерных моно-, ди- и триеновых эфиров из-за высокой лабильности двойных связей в условиях электронного удара. Следовательно, необходима «фиксация» положения двойной связи (см. схему 28); при этом в ряде случаев образуются смеси двух продуктов, что обычно приемлемо для моноеновых производных, но часто менее удобно для полиеновых эфиров: более сложная картина фрагментации может привести к неоднозначной расшифровке. Для полиеновых кислот обычно рекомендуют исчерпывающее гидроксилирование тетраоксидом осмия с последующим получением поли(триметилсилиловых) эфиров, а также оксимеркурирование — демеркурирование (схема 28, реакция 5) одной двойной связи и гидрирование остальных двойных связей. Метиллиноленат превращается таким образом в смесь шести метоксистеаратов (метоксигруппа в положении 9, 10, 12, 13, 15 или 16). Положение метоксигруппы можно определить по масс-спектру, что позволяет установить положение исходных двойных связей [38].

Следует отметить, что наблюдаемая для таких метиловых эфиров миграция двойной связи заметно снижается при получении *N*-ацилпирролидидов. Спектры октадеценилпирролидидов содержат группы пиков, которые соответствуют фрагментам из 18, 17, 16 и т. д. атомов углерода, присоединенным к остатку пирролидида. Основные пики в каждой группе отличаются на 14 массовых единиц, за исключением пиков, соответствующих фрагментации молекулы в области двойной связи, где один основной пик отличается от ближайшего соседнего пика лишь на 12 массовых единиц, что связано с положением двойной связи [39, 40].

25.1.7. КАТАЛИТИЧЕСКОЕ ГИДРИРОВАНИЕ И ХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ

25.1.7.1. Каталитическое гидрирование [41, 42]

При комнатной температуре природные глицериды являются твердыми или жидкими веществами. Более высок спрос на твердые жиры, однако жидкие жиры (растительные, рыбий жир) более доступны. Важным способом, посредством которого природные жидкие жиры могут быть превращены в твердые с требуемой температурой плавления, является гидрирование. Продукты гидрирования высокопитательны, более устойчивы к окислению кислородом воздуха и, следовательно, менее склонны приобретать нежелательный привкус.

Гидрирование идет в присутствии ряда гетерогенных и гомогенных металлических катализаторов (Pt, Pd, Ni, Cu, Co), из которых только никель широко применяется в промышленности. Механизмы процессов, происходящих при частичном гидрировании природных ненасыщенных глицеридов, выяснены путем тщательного изу-

чения гидрирования и дейтерирования таких сложных эфиров, как метилолеат, метиллинолеат и метиллиноленат.

Частичное гидрирование протекает селективно и сопровождается миграцией двойной связи и стерическими изменениями, приводящими к образованию *транс*-соединений, плавящихся при более высокой температуре, чем *цис*-изомеры. Селективностью процесса обусловлено преимущественное восстановление триена до диена или диена до моноена или образование только высокоплавких насыщенных и *транс*-моноеновых эфиров, а не *цис*-изомеров.

При исчерпывающем гидрировании метилолеата образуется исключительно метилстеарат, тогда как продуктами частичного гидрирования являются метилстеарат, исходный метилолеат и «метилизоолеат» (смесь изомеров, содержащих двойную связь в других, чем у олеиновой кислоты, положениях и в основном *транс*-конфигурации) (схема 29). В зависимости от условий эксперимента двойная связь в изоолеате может находиться практически в любом положении углеродной цепи молекулы. Гидрирование метилолеата (18 : 1 9*c*) и метилэлаидата (18 : 1 9*t*) протекает с одинаковой скоростью, однако двойная связь быстрее мигрирует в *транс*-изомере.



(29)

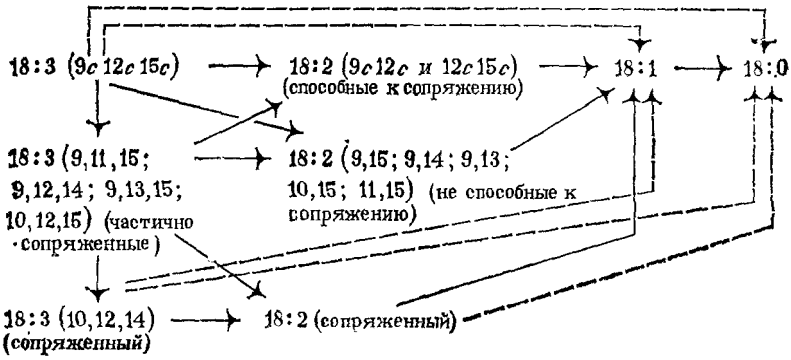
(30)

Возможные направления процессов изомеризации и восстановления при гидрировании метиллинолеата приведены на схеме (30). Наиболее простым процессом должно было быть восстановление до эфиров 18 : 1 (9*c* и 12*c*) и далее до стеарата, однако конкурирующие реакции изомеризации приводят к нескольким диенам (сопряженным и несопряженным) и моноенам. Изомеры образуются в результате миграции двойной связи и изменения стереохимии молекулы. Состав продуктов частичного восстановления зависит от катализатора, температуры, давления и других факторов, влияющих на степень доступности атомов водорода на поверхности катализатора. Важное значение имеют также способность различных сложных эфиров адсорбироваться на поверхности катализатора и десорбироваться с нее и скорость их гидрирования. При гидрировании смеси эфиров относительная легкость адсорбции может

иметь большее значение, чем скорость гидрирования адсорбированных частиц. От степени насыщения поверхности катализатора атомами водорода зависит возможность гидрирования адсорбированной частицы или ее изомеризации.

Образование сопряженных диенов (в основном 9*c*11*t* и 10*t*12*c*) имеет особенно важное значение, так как гидрирование в присутствии катализаторов типа хромита меди дает только сопряженные диены, образующиеся из метиленразделенных изомеров; несопряженные диены и моноены не восстанавливаются в присутствии этого катализатора. При использовании никелевых катализаторов кроме этой реакции возможны и другие процессы. Высокой скоростью превращения через сопряженные изомеры объясняют повышенную реакционную способность метиленразделенных полиенов по сравнению с моноенами и несопряженными полиенами. Возможно также непосредственное восстановление диенового эфира в стеарат, т. е. обе стадии гидрирования идут без промежуточной десорбции.

Реакции с метиллиноленатом протекают значительно сложнее (схема 31). Прямое гидрирование приводит последовательно к ряду метиленразделенных (способных к сопряжению) диенов, моноенов и, наконец, к стеарату. В результате миграции двойных связей сначала образуются частично сопряженные триены, а затем сопряженный триен. Сопряженные соединения обычно восстанавливаются быстрее, чем их несопряженные изомеры. В качестве промежуточных соединений образуются диены трех типов: 1) с сопряженными кратными связями, 2) с метиленразделенными двойными связями, легко переходящие в сопряженные диены, и 3) с двойными связями, разделенными таким образом (например, 18:2 9*c*15*c*), что сопряжение невозможно. Диены первых двух типов гидрируются быстро, тогда как диены последнего типа, подобно моноенам, гидрируются медленнее и накапливаются при частичном гидрировании. У всех ненасыщенных промежуточных соединений могут мигрировать двойные связи и изменяться стереохимия молекулы (до или вместо гидрирования), и поэтому помимо приведенных в схеме (31) изомеров в реакционной смеси обычно присутствуют и многие

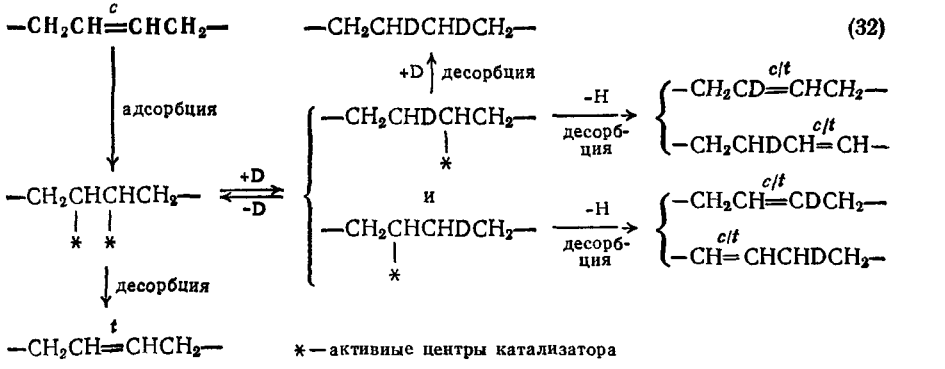


(31)

другие. За один акт адсорбции на катализаторе в молекуле могут быть восстановлены одна, две и даже три двойные связи. Направление реакции зависит от катализатора и других условий эксперимента.

α-Линоленовая кислота, содержащаяся в соевом масле и имеющая ω3-двойную связь, в результате окисления приобретает неприятный вкус; поскольку линолевая кислота имеет сходную с ней пищевую ценность, был предпринят ряд попыток получить катализаторы для высокоселективного превращения линоленовой кислоты в линолевую. Некоторый успех был достигнут при применении хромита меди.

Конкурирующие процессы миграции двойной связи и гидрирования (или дейтерирования) объясняют образованием полугидрированных частиц, из которых при отщеплении атома водорода могут образоваться исходные ненасыщенные соединения или их изомеры, а при присоединении атома водорода — восстановленные соединения (схема 32). Альтернативный путь может включать промежуточное образование π-аллильных комплексов. Эти идеи были развиты для простой реакции моноена с дейтерием, приводящей к насыщенному дидейтеросоединению, исходному алкену и ряду монодейтероизомеров. Все моноены могут быть повторно введены в сходный реакционный цикл. Дейтерированием олеата был получен метилстеарат, содержащий до 30 атомов дейтерия [43].



25.1.7.2. Химическое восстановление

Превращение ненасыщенной кислоты или ее эфира в пергидропроизводное (иногда важная стадия при идентификации новых жирных кислот) легко осуществляется путем каталитического гидрирования в присутствии платинового, палладиевого или никелевого катализатора. Частичное и стереоспецифическое восстановление алкинов до *цис*-алкенов чаще всего проводят в присутствии катализатора Линдлара (см. разд. 25.1.4.1).

Удобным методом некаталитического восстановления алкенов является обработка гидразином. Для проведения реакции необхо-

димо присутствие кислорода. По-видимому, реакция включает промежуточное образование диимина (N_2H_2). Процесс стереоспецифичен и протекает без миграции двойной связи и изменения стереохимии молекулы, поэтому частичное восстановление полиена приводит к более простому продукту, чем каталитическое гидрирование. Таким путем осуществлено восстановление линоленовой кислоты (схема 33). Такое *цис*-присоединение представляет собой наилучший путь получения вицинальных дидейтерокислот известного строения (схема 34).

$$\underset{(9c12c15c)\ 26\%}{18:3} \longrightarrow \underset{(9c12c)\ 15\%\quad (12c15c)\ 15\%\quad (9c15c)\ 13\%}{18:2} \longrightarrow \underset{(9c)\ 9\%\quad (12c)\ 9\%\quad (15c)\ 8\%}{18:1} \longrightarrow \underset{5\%}{18:0} \qquad (33)$$

$$\underset{\textit{цис-}\text{ или }\textit{транс-}}{-CH{=}CH-} \xrightarrow{N_2D_4} \underset{\textit{эритро-}\text{ или }\textit{трео-}}{-CHDCHD-} \qquad (34)$$

25.1.7.3. Биохимическое восстановление

Давно известно, что микроорганизмы, содержащиеся в рубце жвачных животных, способны восстанавливать поступающие с пищей полиненасыщенные 18 : 2- и 18 : 3-кислоты до стеариновой кислоты и ненасыщенных кислот, содержащих двойную связь в необычных положениях и, в основном, *транс*-конфигурации [44]. Так, например, бактерии *Butyrivibrio fibrosolvens* содержат изомеразу и редуктазу, превращающие линолевую кислоту в вакценовую (схема 35). Бактерии другого вида промотируют восстановление олеиновой и линолевой кислот до стеариновой кислоты и восстановление линоленовой кислоты — до 18 : 1 15*c*-кислоты. Чтобы избежать этого, кормление животных осуществляют по специальному режиму.

$$18:2\ \ 9c12c \longrightarrow 18:2\ \ 9c11t \longrightarrow 18:1\ \ 11t \qquad (35)$$

25.1.8. ОКИСЛЕНИЕ КИСЛОРОДОМ

Окисление олефиновых соединений атмосферным кислородом является причиной прогоркания и ухудшения вкуса пищевых жиров и иногда способствует полимеризации высоконенасыщенных (высыхающих) масел. Протекающие при этом процессы изучены на примере окисления метилолеата, метиллинолеата и метиллинолената.

Для взаимодействия ненасыщенного субстрата с кислородом, как полагают, необходима активация алкена или кислорода, причем направление дальнейших превращений зависит от того, что

именно активируется. Первыми продуктами реакции, которые можно выделить, являются ненасыщенные гидропероксиды; они подвергаются дальнейшим превращениям с образованием более окисленных производных исходного алкена, более низкомолекулярных соединений (за счет разрыва углеродной цепи) и соединений с большей молекулярной массой (димеров и полимеров).

25.1.8.1. «Аутоокисление» [45]

Основным неферментативным процессом окисления является радикальная цепная реакция, включающая стадии инициирования (образование радикалов R• и RO_2•), развития цепи (схема 36; RH — алкен) и обрыва цепи. Механизм реакции инициирования до сих пор не установлен; известно, что гидропероксиды, однажды возникнув, вызывают образование дополнительных инициирующих радикалов и что взаимодействие алкенов с синглетным кислородом (см. разд. 25.1.8.2) и образование гидропероксидов могут играть ключевую роль в инициировании аутоокисления. Стадия развития включает образование радикала R• из алкена RH и его последующую реакцию с кислородом. Радикал, образующийся при реакции по аллильному углероду, резонансно стабилизирован; это влияет на строение продукта реакции. Процессы обрыва цепи изучены недостаточно.

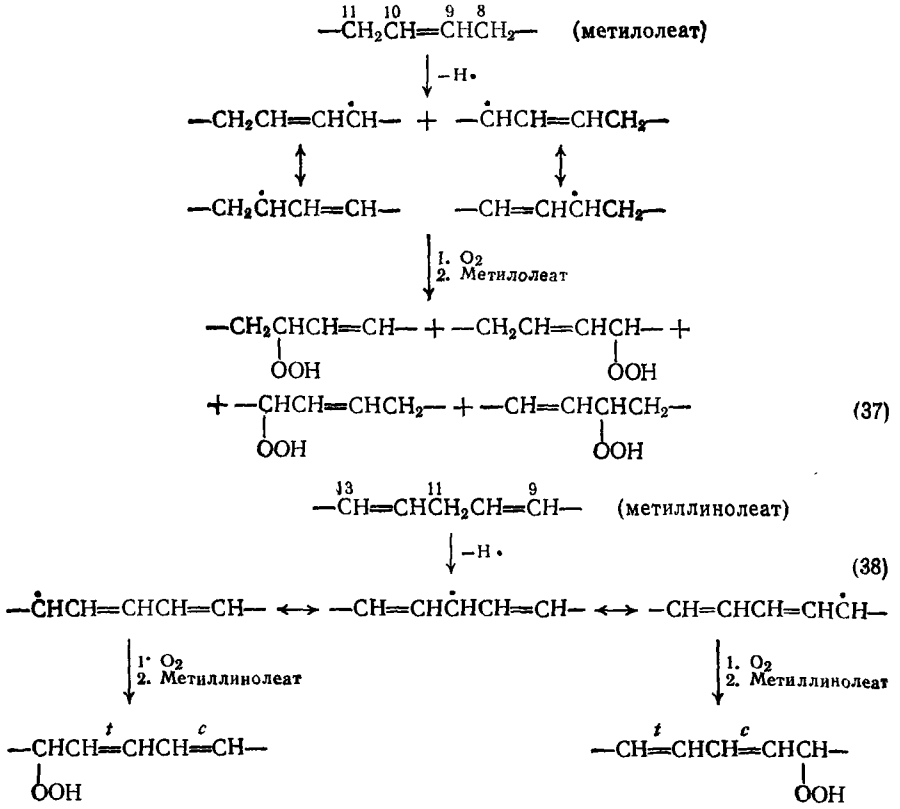
$$R\bullet \xrightarrow{O_2} \dot{R}O_2 \xrightarrow{RH} RO_2H + R\bullet \qquad (36)$$

Предотвратить (или уменьшить) процесс аутоокисления можно добавлением фенолов (антиоксидантов), которые реагируют с радикалами с образованием частиц, не способных поддерживать реакцию.

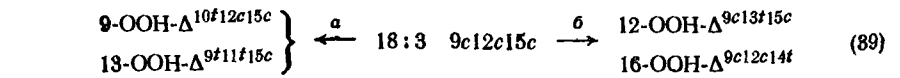
Аутоокисление чистого метилолеата при 20 °С идет медленно, после продолжительного индукционного периода. Эта реакция может быть ускорена прибавлением донора радикалов, облучением или повышением температуры. Реакция олеата, содержащего примесь линолеата, имеет более короткий индукционный период, т. е. более легко образующиеся продукты окисления линолеата индуцируют окисление олеата. Из метилолеата образуется смесь *цис*- и *транс*-изомеров 8-гидроперокси-Δ^9-, 9-гидроперокси-Δ^{10}-, 10-гидроперокси-Δ^8- и 11-гидроперокси-Δ^9-октадеценоатов. Образование этих соединений протекает через два промежуточных резонансно стабилизированных аллильных радикала (схема 37).

Метиллинолеат реагирует в 10—40 раз быстрее вследствие повышенной реакционной способности С-11-метиленовой группы, расположенной между двумя двойными связями. Продукт реакции содержит в основном (или только) смесь 9- и 13-гидропероксиоктадекадиеноатов; образование 11-гидропероксидиена не доказано. Сопряженные *цис, транс*-диены, образующиеся при 0 °С, при комнат-

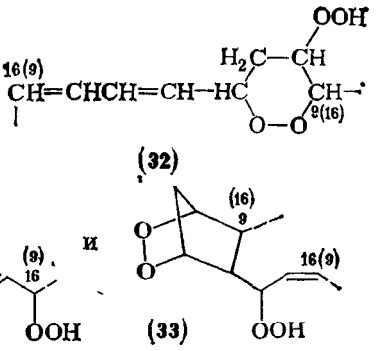
ной и более высокой температурах легко изомеризуются, превращаясь в *транс, транс*-изомеры (схема 38).



Метиллиноленат окисляется по положениям 9,12 (*а*) или 12,15 (*б*); первоначально образуются четыре гидропероксида с тремя двойными связями, включая сопряженный диен (схема 39).



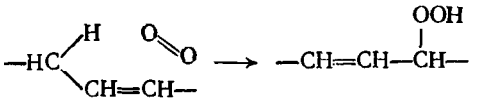
Доказано, что в метиленразделенных полиенах, содержащих три и более двойные связи, происходит внутримолекулярная реакция между пероксирадикалами и двойной связью, приводящая к *эндо*-пероксидам (32) и (33).



(32) и (33)

25.1.8.2. Реакции с синглетным кислородом

В процессе аутоокисления (см. разд. 25.1.8.1) алкены активируются путем образования радикала. Это возможно при фотолизе, обычно в присутствии соответствующего сенсибилизатора, например хлорофилла или эритрозина, для перевода кислорода в более активное синглетное состояние (другие фотолитические реакции в присутствии сенсибилизатора, например рибофлавина, приводят к алкенильным радикалам, из которых образуются те же продукты, что и при прямом аутоокислении). Синглетный кислород взаимодействует с алкенами по согласованному механизму, не включающему образование радикалов, но сопровождающемуся миграцией двойной связи (схема 40).



(40)

Относительные скорости реакций олеата, линолеата и линолената с синглетным кислородом (1 : 1,3 : 2,3) зависят от числа двойных связей в молекулах этих эфиров и резко отличаются от относительных скоростей аутоокисления (1 : 27 : 77 при 37 °С). Гидропероксиды, образующиеся из олеата (исключительно 9-ООН-Δ^{10}- и 10-ООН-Δ^{8}-), линолеата (9-ООН-$\Delta^{10, 12}$-; 10-ООН-$\Delta^{8, 12}$; 12-ООН-$\Delta^{9, 13}$-; 13-ООН-$\Delta^{9, 11}$-) и линолената (9-ООН-$\Delta^{10, 12, 15}$; 10-ООН-$\Delta^{8, 12, 15}$; 12-ООН-$\Delta^{9, 13, 15}$; 13-ООН-$\Delta^{9, 11, 15}$; 15-ООН-$\Delta^{9, 12, 16}$ и 16-ООН-$\Delta^{9, 12, 14}$) отличаются от гидропероксидов, полученных при аутоокислении.

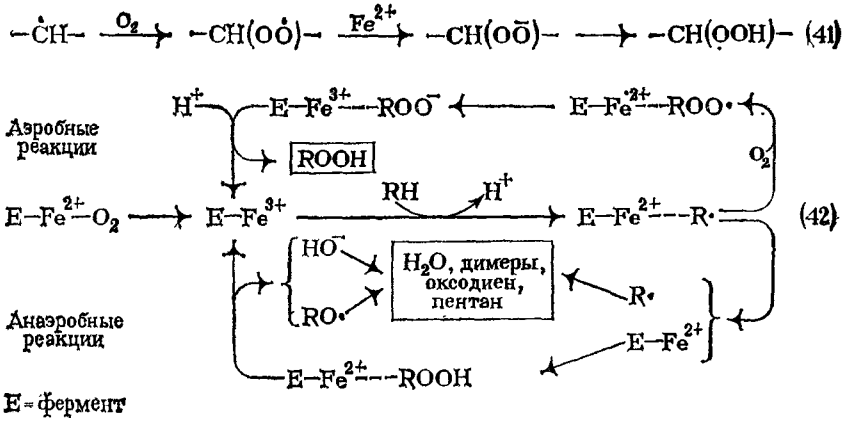
25.1.8.3. Образование гидропероксидов, катализируемое ферментами

Фермент липоксигеназа катализирует реакцию кислорода с линолевой кислотой (или некоторыми другими полиеновыми кислотами). Такие ферменты широко распространены в растительном

мире, существуют они и у животных. Наиболее изучен ферментный препарат из бобов сои (липоксигеназа I).

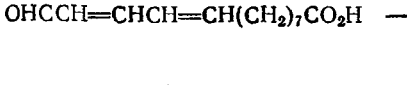
В присутствии липоксигеназы I линолевая кислота окисляется до 13(*S*)-гидроперокси-Δ^{9c11t}-кислоты, другие ферментные препараты катализируют образование 9(*R*)-гидроперокси-Δ^{10t12t}-кислоты или смеси этих двух оптически активных гидропероксидов, тогда как при аутоокислении образуется рацемическая смесь. Кислоты ряда линолевой превращаются в соответствующие ω6- или ω10-гидропероксикислоты. Из всего семейства 18:2-кислот (от 2*c*5*c* до 14*c*17*c*) только 9*c*12*c*- и 13*c*16*c*-изомеры способны окисляться под действием липоксигеназы. $\Delta^{13,16}$-Кислота образует 17(*S*)-гидропероксид наряду с небольшим количеством 13-изомера. В молекуле этого фермента содержится один атом железа; фермент существует в трех состояниях: бесцветный (нативный), желтый и пурпурный ферменты. Он промотирует как аэробные, так и анаэробные реакции.

Аэробная реакция начинается с отщепления атома водорода при С-11. Элиминирование 11(*S*)-атома водорода сопровождается присоединением кислорода по С-13, а удаление 11(*R*)-атома — присоединением кислорода по С-9. Полагают, что эта реакция включает процессы, показанные на схеме (41). Аналогичные процессы идут при катализируемом липоксигеназой окислении линолевой кислоты в аэробных условиях (схема 42).

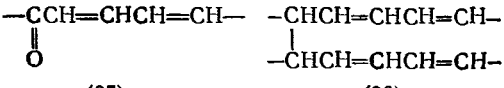


При недостатке кислорода реакция протекает по другому механизму (см. схему 42). Линолевая кислота взаимодействует с образовавшимся 13-гидропероксидом, давая сложную смесь продуктов, содержащую пентан, C_{13}-альдегиды (**34**; $\Delta^{9c(t)11t}$), C_{18}-оксодиен (**35**; 13-оксо-Δ^{9t11t}), димеры (**36**), образующиеся из двух молекул линолевой кислоты (С-13 — С′-13, С-13 — С′-11, С-13 — С′-9 и

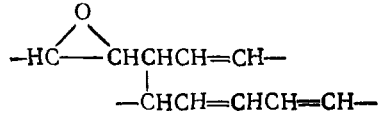
C-11 — C′-9), и димеры (37а, б), получающиеся из молекулы линолевой кислоты и молекулы гидропероксида [(37а; C-11 — C′-13; Δ^{9t}) и (37б; C-9 — C′-13) соответственно]. Такой состав продуктов реакции можно объяснить образованием и взаимодействием радикалов из линолевой кислоты и алкоксильных радикалов из гидропероксида.



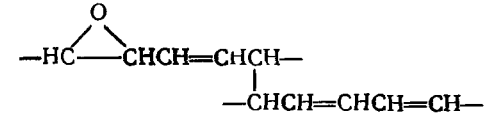
(34)



(35) (36)



(37а)

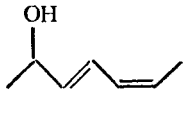


(37б)

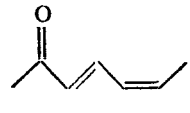
Продукты первичного окисления подвергаются дальнейшим превращениям (см. следующий раздел).

25.1.8.4. Реакции гидропероксидов

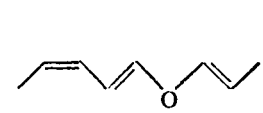
Ненасыщенные гидропероксиды легко подвергаются дальнейшим превращениям в присутствии ферментов или без их участия [47]. Продукты, образующиеся из 13-ООН-Δ^{9c11t}- или 9-ООН-Δ^{10t12c}-соединений или их смеси, обычно являются сложными смесями оксигенированных кислот. Среди них идентифицированы соединения (38)—(54) (для каждого из которых приведен C_8 — C_{14}-фрагмент). Изомерные соединения образуются из обоих субстратов; так, формулой (38) представлена как 13-гидрокси-Δ^{9c11t}-, так и 9-гидрокси-Δ^{10t12c}-кислота. Во всех случаях стереохимия молекул детально не подтверждена.



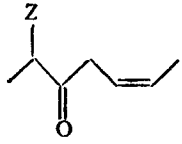
(38)



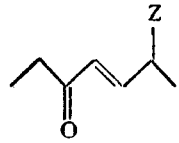
(39) *ct* (*tt*)



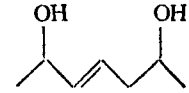
(40) (C-6—C-13)



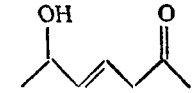
(41)



(42)

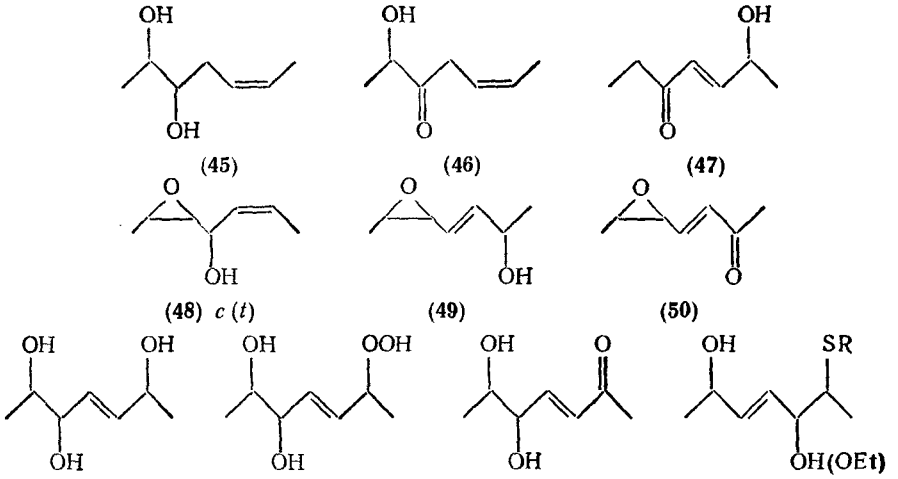


(43)



(44)

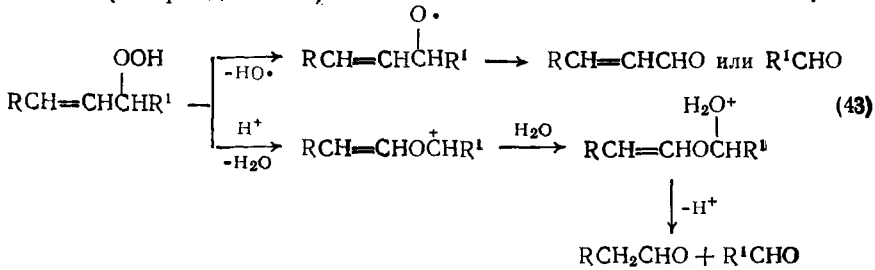
Z = OH, OMe, SEt, OCOR



Виниловый эфир (40) образуется только из 9-гидропероксиΔ^{10t12c}- и -Δ^{10t12c15c}-кислот под действием фермента из картофеля при pH > 7. Оказалось, что 13-гидропероксиизомер не является субстратом для этого фермента. Соединения (41) и(или) (42) (Z = OH) образуются под действием фермента в водной среде. Модифицированные соединения образуются в присутствии таких нуклеофилов, как метанол, меркаптоэтанол, олеиновая или линолевая кислота. Карбонильный атом кислорода происходит из гидропероксигруппы, а второй атом кислорода — из молекулы растворителя.

При разрыве C_{18}-цепи образуются насыщенные или ненасыщенные спирты, альдегиды, кетоны, кислоты, сложные эфиры и лактоны [48]. Среди альдегидов обнаружены алканали, алкенали (Δ^{2t}, Δ^{3c}, Δ^{4c}), алкадиенали (Δ^{2t4c}, Δ^{2t5c}, Δ^{2t6c}) и алкатриенали (Δ^{2t4c7c}), каждый из которых может сообщать маслу тот или иной привкус. Порог органолептического восприятия («пороговая» концентрация) многих из этих соединений составляет несколько частей на миллион или миллиард, так что очень малые их количества могут оказывать заметное влияние на вкус. Образование многих из этих соединений может быть легко объяснено исходя из строения исходного гидропероксида и основных путей его распада; однако в некоторых случаях не ясно, образуются ли они из иных субстратов или путем неизвестных направлений распада. Гидропероксиды непредвиденного строения могут образовываться из соответствующих кислот при необычном протекании процесса окисления или путем стандартного окисления минорной жирной кислоты, до сих пор не обнаруженной в субстрате. Рыбий жир и растительные масла могут содержать следы неидентифицированных кислот с двойными свя-

зями в неожиданных положениях, что приводит к дополнительным осложнениям помимо возникающих в процессе частичного гидрирования (см. разд. 25.1.7).



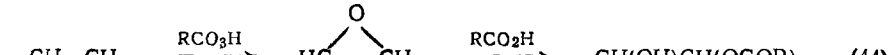
(43)

Гомо- или гетеролитическое расщепление гидропероксидов приводит к различным продуктам (схема 43). Гомолитическим разрывом 13- и 9-гидропероксипроизводных эфира линолевой кислоты можно объяснить образование 6:0- и 10:2 *2t4c*-альдегидов. Последние придают вкус «сильно поджаренного» при пороговой концентрации $5 \cdot 10^{-10}$. Другие альдегиды могут образовываться из 10-, 11- и 12-гидропероксипроизводных. Четыре гидропероксипроизводных олеиновой кислоты (см. схему 37) превращаются в 8:0, 9:0, 10:1 *2t* и 11:1 *2t*-альдегиды. Более сложная картина наблюдается в случае линолевой кислоты и частично гидрированных жиров.

25.1.9. ДРУГИЕ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ

25.1.9.1. Эпоксидирование

Алкены гладко эпоксидируются рядом пероксикислот (схема 44). Низшие алифатические пероксикислоты (RCO_3H, R = H, CH_3, CF_3) обычно образуют ацилированные диолы путем раскрытия эпоксидного цикла, а при действии пероксилауриновой, монопероксиянтарной, пероксифталевой и пербензойной кислот гладко образуются эпоксиды. Широко используется коммерчески доступная *м*-хлорпербензойная кислота. Реакция протекает как *цис*-присоединение, так что из *цис*- и *транс*-алкенов образуются соответственно *цис*- и *транс*-эпоксиды. Пероксикислоты гораздо труднее взаимодействуют с алкинами, поэтому ими можно избирательно эпоксидировать енины (схема 45).



(44)



(45)

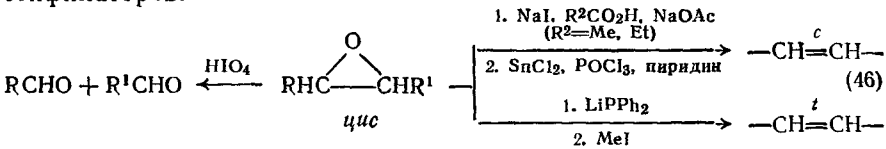
18:2 *9c12a*

Эфиры моноеновых кислот легко превращаются в эпоксиды вышеуказанного строения; все изомерные эпоксиоктадеканоаты

были получены из соответствующих октадеканоатов. Молекулы этих моноэпоксидов имеют два хиральных центра. Синтетические продукты являются рацемическими соединениями, тогда как природные эпоксикислоты (см. разд. 25.1.2.9) обычно оптически активны. Температуры плавления изомерных *цис*-эпоксистеариновых кислот чередуются, однако в случае *транс*-изомеров это явление не обнаруживается.

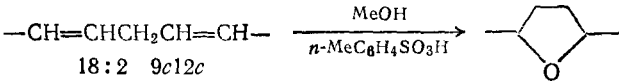
У полиеновых кислот и их эфиров число изомерных эпоксидов больше. Метиллинолеат образует два изомерных *цис,цис*-бисэпоксида, и соответствующие кислоты, плавящиеся при 78 и 41 °С, можно разделить кристаллизацией.

Эпоксиды являются реакционноспособными соединениями и могут служить ценными полупродуктами (см. разд. 25.1.6.4, 25.1.9.2) [49]. Информацию об их строении можно получить методом масс-спектрометрии или расщеплением до альдегидов метаиодной кислотой. Из эпоксидов могут быть регенерированы алкены (схема 46). Частично эпоксидированные жиры или сложные эфиры получают в промышленном масштабе; их применяют в качестве пластификаторов.



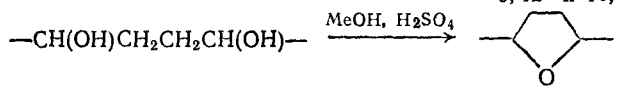
(46)

Описанные выше соединения являются 1,2-эпоксидами. Эпоксиды с бо́льшим размером цикла (1,4- и 1,5-эпоксиды) получают из диенов или сложных гидроксиэфиров различными способами; типичными являются методы, представленные схемами (47) и (48).



(47)

9, 12- и 10, 13-эпоксиды

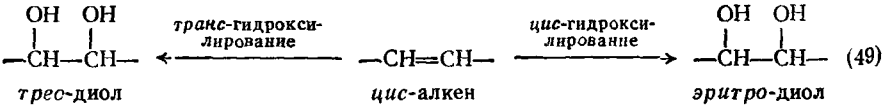


(48)

9, 12-ди-OH-18 : 0 9, 12-эпоксид

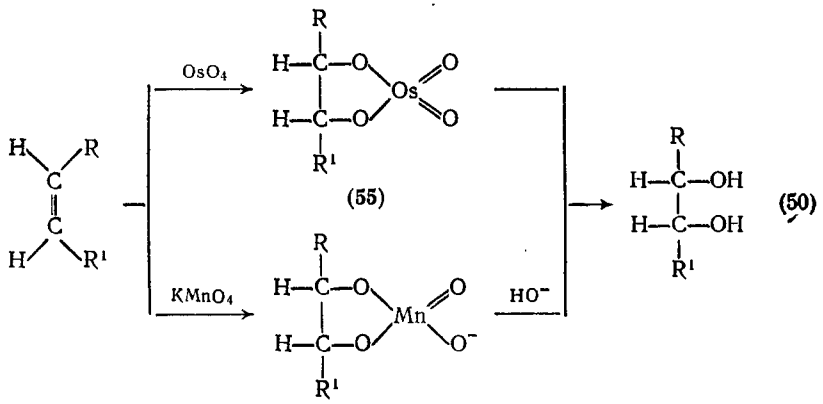
25.1.9.2. Гидроксилирование [51]

Превращение алкена в диол (гидроксилирование) можно осуществить с помощью нескольких реагентов; путем *цис-* или *транс*-гидроксилирования получают *трео-* или *эритро*-диолы (схема 49).

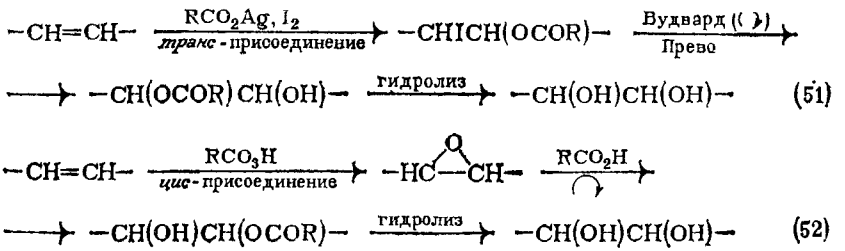


(49)

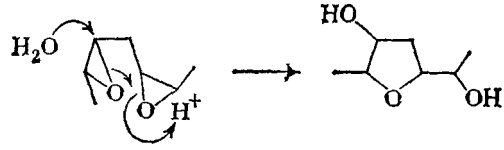
С помощью перманганата калия и тетраоксида осмия осуществляют *цис*-гидроксилирование; эти реакции, как полагают, протекают через сходные циклические промежуточные соединения (55) и (56) (схема 50). Осмат затем разлагают сульфатом натрия, формальдегидом, сероводородом или избытком маннита. Эта реакция протекает с высоким выходом и проста в исполнении, но неудобна из-за дороговизны и токсичности тетраоксида осмия. В усовершенствованной методике тетраоксид осмия используют только в каталитических количествах в присутствии окислителя для непрерывной его регенерации. В качестве окислителя успешно применялись хлораты металлов, смесь пероксида водорода и *трет*-бутилового спирта, *трет*-бутилгидропероксид и *N*-оксид *N*-метилморфолина.



цис- и *транс*-Гидроксилирование проводят в присутствии галогенов и солей металлов. *цис*-Гидроксилирование (метод Вудварда) осуществляют реакцией алкена с иодом и ацетатом серебра в водной уксусной кислоте (схема 51); лучшие результаты получены при применении вместо ацетата серебра солей меди(II) или калия. С помощью реакции Прево, в которой используется иод и бензоат серебра в безводных условиях, осуществляют *транс*-гидроксилирование (схема 51).



транс-Гидроксилирование обычно осуществляют с помощью пероксикислот. При этом образуются эпоксиды (см. разд. 25.1.9.1), которые могут быть подвергнуты катализируемой кислотами гидратации, причем реакция протекает с инверсией конфигурации (схема 52). Этот процесс удобно осуществлять «в одном сосуде» с помощью низших алифатических пероксикислот, таких как пермуравьиная или перуксусная, получаемых *in situ* смешением карбоновой кислоты с пероксидом водорода в присутствии кислотного катализатора. Как и обычное эпоксидирование, эта реакция может быть использована для избирательного гидроксилирования по двойной связи в ениновой системе. Моноэпоксисоединения гладко гидратируются с образованием вицинальных диолов, тогда как в случае диэпоксисоединений реакция идет более сложно с преимущественным образованием 1,4- или 1,5-эпоксида, а не требуемого тетраола; возможно, что при этом протекает внутримолекулярная реакция типа (53). Образование нежелательного продукта может быть сведено к минимуму, если проводить раскрытие цикла в безводных условиях.



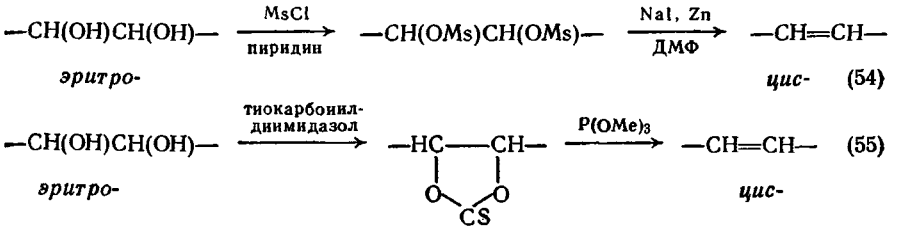
(53)

метил-9,10;12,13-диэпоксистеарат — метил-9,12-дигидрокси-10,13-эпоксистеарат

Сложные эфиры дигидроксикислот содержат два хиральных центра; продукты описанных выше реакций гидроксилирования обычно являются рацемическими соединениями *трео-* или *эритро*-конфигурации (см. схему 49). *эритро*-Изомер обычно (но не всегда) имеет более высокую температуру плавления. Из линолевой кислоты образуется 9,10,12,13-тетрагидроксистеариновая кислота, которая может существовать в виде восьми рацемических форм. Две из них (т. пл. 174 и 164 °С) образуются в результате *цис*-гидроксилирования линолевой кислоты, а две другие (т. пл. 148 и 126 °С) — путем *транс*-гидроксилирования. Эти четыре кислоты можно получить из линэлаидиновой кислоты (18:2 9*t*12*t*), остальные — из 9*c*12*t*- или 9*t*12*c*-изомеров. Из природной 12(*S*),13(*R*)-эпоксиолеиновой кислоты получены восемь из шестнадцати возможных энантиомерных форм. Рицинолевая (12-гидроксиолеиновая) кислота с хиральным С-12-атомом превращается в четыре энантиомерные 9,10,12-тригидроксистеариновые кислоты, каждая из которых выделена и охарактеризована.

Вицинальные диолы расщепляются метаиодной кислотой (до альдегидов) или перманганатом (до кислот). После превращения в соответствующие производные они могут быть разделены газожидкостной хроматографией и идентифицированы масс-спектро-

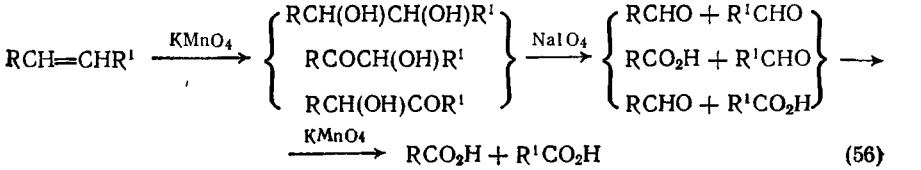
метрически (см. разд. 25.1.6.4). Из диолов могут быть регенерированы алкены (схемы 54, 55).



25.1.9.3. Окислительное расщепление [52]

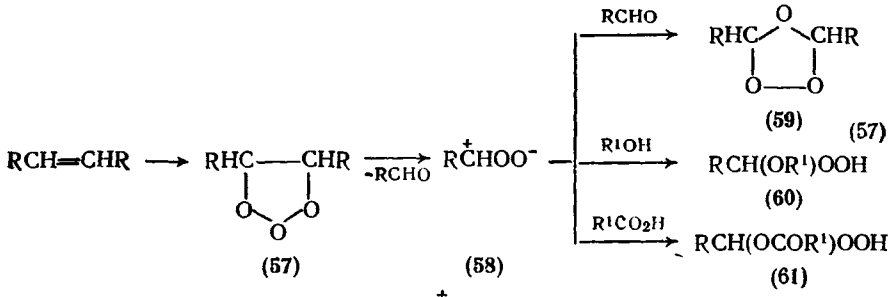
Окислительное расщепление ненасыщенных кислот идет по атомам углерода, связанным кратной связью. Однозначные результаты получают при использовании минимальных количеств кислоты. Широко применяются только два метода: окисление по Рудлофу и озонолиз. Полное окисление полиеновой кислоты не всегда приводит к однозначному установлению структуры даже при идентификации всех продуктов окисления. Эти трудности можно обычно обойти, применяя ступенчатое окисление (см. разд. 25.1.3.5 и 25.1.6.4). Окислительное расщепление применяется в качестве препаративного метода в лабораториях, а также в промышленности.

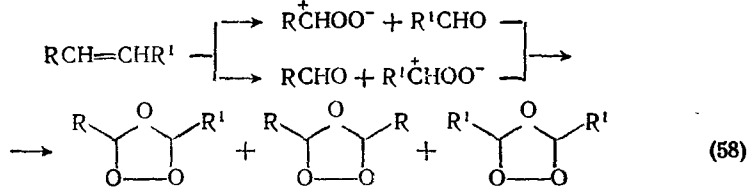
Энергичное окисление перманганатом калия приводит к переокислению; для избежания этого проводят окисление по Рудлофу, используя в качестве окислителя смесь перманганата калия и метапериодата натрия (1 : 39) в условиях, при которых перманганат содержится в количестве чуть выше каталитического. Реакцию проводят в водном растворе щелочи или в водном *трет*-бутиловом спирте при 20 °C в течение 6—24 ч (схема 56). Избыток метапериодата непрерывно регенерируется перманганатом, так что последний присутствует в низкой концентрации в течение всего процесса.



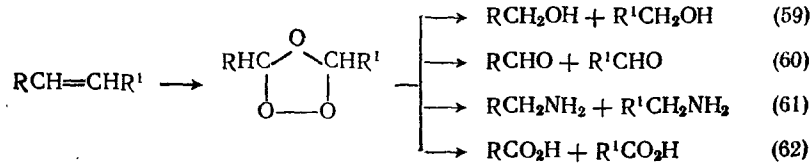
В настоящее время как для аналитических, так и для препаративных целей чаще используют озонолиз [53—55]. Предполагают, что реакция протекает через лабильный продукт присоединения озона, который, вероятно, имеет структуру (57) и образуется в результате 1,3-диполярного циклоприсоединения. Этот продукт распадается на карбонильное соединение и цвиттер-ион Криге (58); последний реагирует с карбонильным соединением с образованием

озонида (59), а также со спиртами или кислотами, применяемыми в качестве растворителей, давая алкоксигидропероксиды (60) или ацилоксигидропероксиды (61) (схема 57). Согласно современным представлениям, при озонолизе несимметричного алкена образуются шесть различных озонидов (схема 58), так как циклический озонид может существовать в *цис-* и *транс*-форме; кроме того, возможно протекание перекрестных реакций.





Большую практическую ценность представляют продукты, возникающие при дальнейших превращениях озонида, — спирты, альдегиды, кетоны, кислоты и даже амины. Спирты образуются при восстановлении озонида гидридами металлов (алюмогидридом лития или борогидридом натрия) или при каталитическом гидрировании в присутствии никелевого или платинового катализатора (схема 59). Альдегиды получают при более мягких условиях восстановления; для этой цели обычно используют цинк в кислоте, трифенилфосфин, диметилсульфид или катализатор Линдлара (схема 60). Алкины превращаются в карбоновые кислоты в условиях превращения алкенов в альдегиды. Амины образуются при восстановлении озонидов в присутствии никеля Ренея и аммиака (схема 61) или восстановлением оксимов. Кислоты образуются при действии различных окислителей, например пероксикислот или оксида серебра (схема 62).



По одной из методик для проведения озонолиза олефины, растворенные в пентане при —65 ÷ —75 °С, смешивают с раствором озона (0,03*М*) в пентане при той же температуре. Реакция протекает за несколько минут; образующийся озонид разлагают водородом при 0 °С в присутствии катализатора Линдлара. По другому способу озонирование ведут при 0 °С в метанольном растворе, а образующийся алкоксигидропероксид восстанавливают цинком в уксусной кислоте или гидрируют над палладием на угле при 20—25 °С. Эти методики применимы для макро- и микроколичеств; их обычно используют для озонирования кислот или их эфиров.

Озонолиз олеиновой кислоты до азелаиновой (нонандиовой) кислоты является промышленным методом. Озонолиз других ненасыщенных кислот или глицеридов приводит к интересным бифункциональным производным, включая гидроксиэфиры, альдегидоэфиры и ненасыщенные двухосновные кислоты (схемы 63—65)

$$RCH{=}CH(CH_2)_nCO_2H \longrightarrow HO_2C(CH_2)_nCO_2H \qquad (63)$$

18 : 1 9*c*; 11 : 1 10*e*; 21 : 1 13*c* $n = 7, 8, 10, 11, 13$

18 : 1 (9*c*; 12*c* и 15*c*)

$$RCH{=}CH(CH_2)_nCO_2Me \longrightarrow R^1(CH_2)_nCO_2Me \qquad (64)$$

$R^1 = OHC, HOCH_2$

$$CH_3(CH_2)_{10}CH{=}CH(CH_2)_4CO_2H \longrightarrow$$

$$\longrightarrow CH_3(CH_2)_{10}CH_2NH_2 + H_2NCH_2(CH_2)_4CO_2H \qquad (65)$$

25.1.10. ПРОЧИЕ РЕАКЦИИ ПРИСОЕДИНЕНИЯ

25.1.10.1. Галогенирование

Галогенирование является полярным *транс*-присоединением; так, например, бромирование олеиновой и элаидиновой кислот приводит к *трео-* (т. пл. 28,5—29 °С) и *эритро-* (т. пл. 29,5—30 °С) изомерам 9,10-дибромстеариновой кислоты, соответственно. При бромировании линолевой кислоты должны образовываться две *трео,трео*-тетрабромстеариновые кислоты, причем кристаллический продукт (т. пл. 115 °С), по-видимому, является (*R*/*S*)-9,(*R*/*S*)-10,(*R*/*S*)-12,(*R*/*S*)-13-рацематом, а жидкое соединение — (*R*/*S*)-9,(*R*/*S*)-10,(*S*/*R*)-12,(*S*/*R*)-13-изомером. Линэлаидиновая кислота (18 : 2 9*t*12*t*) превращается в тетрабромид (п. пл. 78 °С), а линоленовая кислота образует только кристаллический гексабромид (т. пл. 185 °С). При хлорировании олеиновой, линолевой и линолеиновой кислот образуются хлориды с т. пл. 37, 123 и 189 °С, соответственно.

Полибромированные кислоты могут быть легко дебромированы реакцией с цинком или иодид-ионом, причем последний способ более стереоспецифичен. *Поскольку эта реакция представляет собой транс*-элиминирование, образующийся алкен сохраняет конфигурацию алкена, из которого был получен бромид; поэтому бромирование с последующим дебромированием является способом защиты двойных связей.

Дегидрогалогенирование вицинальных дигалогенпроизводных с помощью основания в ряде случаев приводит к алкинам. Эта реакция является *транс*-элиминированием, и первая ее стадия протекает гладко как с *трео*-, так и с *эритро*-дигалогенидами с образованием (*Z*)- и (*E*)-винилгалогенидов, соответственно. На второй стадии элиминирования (*Z*)-изомер образует только алкин (схема 66), а более устойчивый (*E*)-изомер превращается в смесь алкенов и изомерных алкинов, целиком или частично образующихся в результате алленовой перегруппировки (схема 67). (*Z*)- и (*E*)-Изомеры 9(10)-бромоктадецен-9-овой кислоты плавятся при 37 и 8 °С, соответственно.

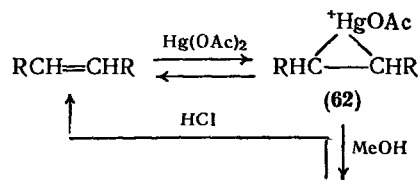
$$\underset{\textit{цис}}{\text{—CH=CH—}} \longrightarrow \underset{\textit{трео}}{\text{—CHXCHX—}} \longrightarrow \text{—CH=CX—} \longrightarrow \text{—C≡C—} \qquad (66)$$

$$\underset{\textit{транс}}{\text{—CH}_2\text{CH=CH—}} \longrightarrow \underset{\textit{эритро}}{\text{—CH}_2\text{CHXCHX—}} \longrightarrow$$

$$\longrightarrow \underset{E}{\text{—CH}_2\text{CX=CH—}} \longrightarrow \text{—CH=C=CH—} \qquad (67)$$

25.1.10.2. Оксимеркурирование

Алкены реагируют с ацетатом ртути(II) и метанолом с образованием ацетоксимеркурметоксипроизводного (*транс*-присоединение). При обработке его хлороводородной кислотой регенерируется исходный алкен в той же стереоизомерной форме, при бромировании ацетоксимеркургруппа замещается на бром, при радикальном восстановлении борогидридом натрия — на водород (схема 68).



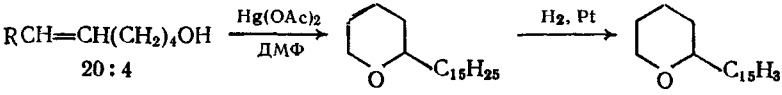
(68)

$$\text{RCH(OMe)CHBrR} \xleftarrow{Br_2} \text{RCH(OMe)CH(HgOAc)R} \xrightarrow{NaBH_4} \text{RCH(OMe)CH}_2\text{R}$$

Эти реакции протекают в мягких условиях с высоким выходом. Другие соли ртути (нитрат, трифторацетат) иногда дают лучшие результаты, чем ацетат. Полагают, что в этих реакциях образуется промежуточное соединение (62); вместо метанола можно использовать другие реагенты (в скобках показаны вводимые при этом заместители): этанол (OEt), уксусную кислоту (OAc), воду (OH), пероксид водорода (OOH), *трет*-бутилгидропероксид (OOBu-*трет*), ацетонитрил (NHAc). Оксимеркурирование может быть использовано при установлении положения двойной связи методом масс-спектрометрии (см. разд. 25.1.6.4).

При наличии подходящих заместителей с описанными выше межмолекулярными реакциями промежуточных соединений (62) могут конкурировать внутримолекулярные реакции. Это наблю-

дается, когда в качестве исходных соединений используют гидроксиалкены (например, арахидониловый спирт) (схема 69) или при гидратации метиллинолеата.

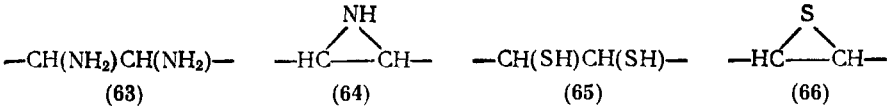


(69)

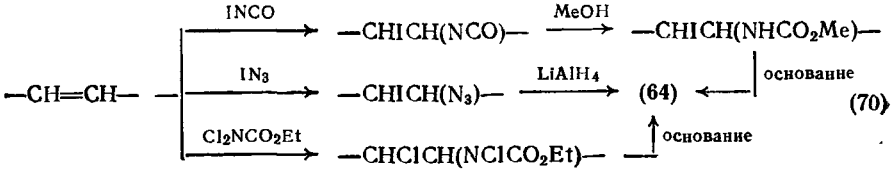
Производные ацетилена также взаимодействуют с ацетатом ртути(II) и метанолом. Обработка ртутьорганических соединений кислотой дает кетоны, при восстановлении которых борогидридом образуются спирты.

25.1.10.3. Получение производных, содержащих азот и серу [56]

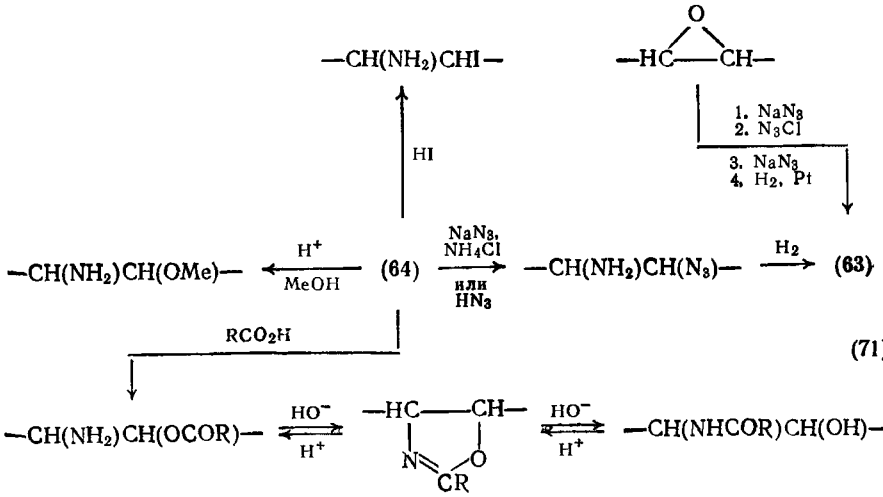
Этот раздел посвящен диаминам (63), азиридинам, или эпиминопроизводным (64), тиолам (меркаптопроизводным) (65) и тиираном (эпитиопроизводным) (66).



Азиридины (64) могут быть получены присоединением к алкенам иодизоцианата, азида иода или этилдихлоркарбамата (*N*,*N*-дихлоруретана) (схема 70). Азиридины, подобно эпоксидам, — реак-



(70)



(71)

ционноспособные соединения, способные образовывать многочисленные производные (схема 71), в том числе вицинальные диамины (**63**), которые могут быть получены также из эпоксидов. *трео-* и *эритро*-9,10-Диаминостеариновые кислоты плавятся при 98 и 123 °С, соответственно.

При взаимодействии алкенов с нитрилом в присутствии сильной кислоты (реакция Риттера) образуются амиды (схема 72). За исключением формиламинопроизводного, образующиеся амиды устойчивы к гидролизу. Первоначально в результате протонирования из алкена образуется карбениевый ион, который может в результате перегруппировки дать сложную смесь продуктов.

$$-CH{=}CH- \xrightarrow{H^+} [-CH_2\overset{+}{C}H-] \xrightarrow{RCN} -CH_2CH(NHCOR)- \qquad (72)$$

$R = H,\ CH_3,\ CH_2CH{=}CH_2$

Эпитиосоединения (**66**) образуются при взаимодействии эпоксидов с серусодержащими соединениями [тиомочевиной, тиоцианатом, $(SCN)_2$, метилксантогенатом калия] с последующей обработкой основанием или при реакции с 3-метилбензотиазолоном-2 и трифторуксусной кислотой. *цис*-9,10-Эпитиостеариновая кислота плавится при 58 °С, а ее *транс*-изомер — при 64 °С.

Многие тиолы вступают в реакцию радикального присоединения к двойной связи при облучении и(или) в присутствии инициатора радикальной реакции. При этом, например, метилолеат дает смесь 9- и 10-замещенных (схема 73). Ацетилтиопроизводные легко гидролизуются до тиолов в кислой или щелочной среде. С более высоким выходом тиолы образуются при реакции алкена с сероводородом в полярном растворителе в присутствии трифторида бора при —70 °С.

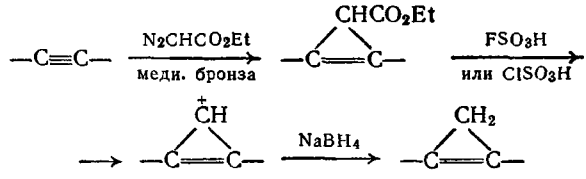
$$-CH{=}CH- \begin{cases} \xrightarrow{H_2S} -CH_2CH(SH)- \\ \xrightarrow{AcSH} -CH_2CH(SAc)- \\ \xrightarrow{HSCH_2CO_2H} -CH_2CH(SCH_2CO_2H)- \end{cases} \xleftarrow{\text{гидролиз}} \qquad (73)$$

Сложные гидроксиэфиры, например метилрицинолеат, превращаются в индивидуальные сложные меркапто- и ацетилтиоэфиры при реакции их мезилатов с гидросульфидом натрия или тиоацетатом калия в диметилформамиде (схема 74). Из соответствующих исходных веществ можно получить 1,4-эпитио-, 1,3-эпидитио- и 1,4-эпидитиосоединения.

$$-CH(OH)- \xrightarrow{MsCl} -CH(OMs)- \begin{cases} \xrightarrow{NaSH} -CH(SH)- \\ \xrightarrow{KSAc} -CH(SAc)- \end{cases} \xleftarrow{\text{гидролиз}} \qquad (74)$$

25.1.10.4. Превращение алкенов (алкинов) в циклопропаны (циклопропены)

Синтетические аналоги природных циклопропил- и циклопропенилсодержащих жирных кислот получают присоединением одноуглеродного фрагмента к соответствующим алкенам и алкинам [13]. Производные циклопропана легко образуются из алкенов реакцией Симмонса — Смита [57], включающей в оригинальном варианте взаимодействие дииодметана с цинк-медной парой. В модифицированных методиках используют диэтилцинк, магниевые или цинковые стружки, порошкообразный цинк и хлорид меди(I), цинк-серебряную пару и дииодметан или бензилмеркуриметилиодид ($PhCH_2HgCH_2I$). Диметилсульфонийметилид $Me_2\overset{+}{S}(O)-\overset{-}{C}H_2$ эффективен при реакции со сложными Δ^2-эфирами, которые в обычных условиях довольно инертны. Производные циклопропана получают также перегруппировкой β-замещенных алкенов, способных образовывать гомоаллильный карбениевый ион [50]. Циклопропены можно получать из алкинов (схема 75).



(75)

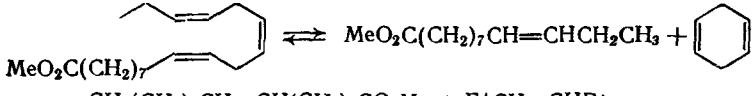
25.1.10.5. Реакции метатезиса [59, 60]

Реакции метатезиса олефинов (схема 76) могут промотироваться как гомогенными (металлоорганические соединения или кислоты Льюиса), так и гетерогенными (оксид молибдена или вольфрама на оксиде алюминия или кремния) катализаторами. При использовании в качестве катализатора гексахлорида вольфрама или тетрахлорида олова метилолеат превращается в углеводород и диэфир (схема 77), тогда как из метиллинолената образуется циклогексадиен-1,4 и эфир 12 : 1-кислоты (схема 78). Реакция ненасыщенного сложного эфира с алкеном приводит к продуктам с различной длиной цепи (схема 79). Новые ненасыщенные центры имеют *цис*- и *транс*-конфигурацию.

$$RCH{=}CHR + R^1CH{=}CHR^1 \rightleftharpoons 2RCH{=}CHR^1 \qquad (76)$$

$$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7CO_2Me \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7CH_3 + MeO_2C(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7CO_2Me \qquad (77)$$



$$\rightleftharpoons MeO_2C(CH_2)_7CH{=}CHCH_2CH_3 + \qquad (78)$$

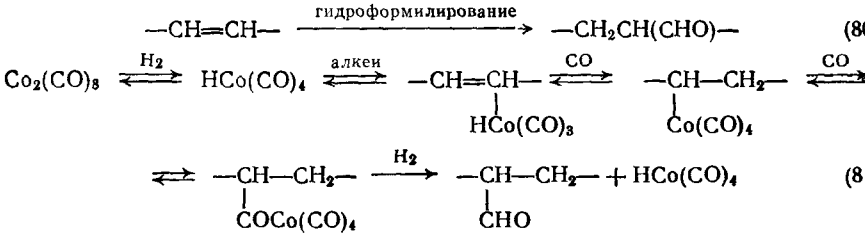
$$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7CO_2Me + EtCH{=}CHEt \longrightarrow$$

$$\longrightarrow \text{Углеводороды (18 : 1 и 12 : 1)} + \text{Диэфир (18 : 1)} + \text{Моноэфир (12 : 1 } \Delta^9) \qquad (79)$$

25.1.10.6. Другие реакции по двойным связям

В катализируемых кислотами реакциях присоединения новый заместитель редко вводится только по месту двойной связи, и реакция часто сопровождается миграцией двойной связи (или миграция предшествует реакции) и изменением стереохимии молекулы. Так, обычная реакция Фриделя — Крафтса между олеиновой кислотой (или ее эфиром, или нитрилом, или олеиловым спиртом) и бензолом или другим ароматическим соединением в присутствии хлорида алюминия приводит к смеси от 5- до 17-фенилоктадекановых кислот.

Реакции, включающие присоединение монооксида углерода к алкенам, приводят к формилзамещенным соединениям и их аналогам. Наиболее известна реакция гидроформилирования (оксосинтез) соединений типа олеиновой кислоты синтез-газом ($H_2 + CO$) при 3,43 — 13,73 МПа в присутствии карбонила кобальта. Реакция протекает при ~100 °С и приводит к смеси формилстеариновых кислот (схема 80) и некоторому количеству гидроксиметилстеариновых кислот. В присутствии родиевого катализатора и трифенилфосфина изомеризация незначительна, и продукт почти целиком состоит из 9(10)-формилстеариновой кнслоты (схема 81).



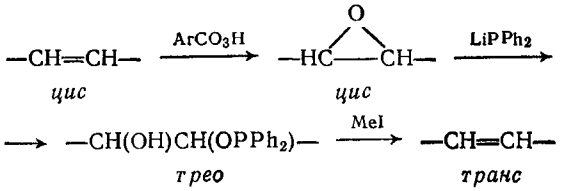
Метилолеат превращается непосредственно в карбоксистеараты при реакции с монооксидом углерода и водой в присутствии ряда катализаторов, содержащих концентрированную серную кислоту (реакция Коха), фтороводород, карбонил никеля или смесь хлорида палладия и трифенилфосфина.

25.1.11. *цис, транс*-ИЗОМЕРИЗАЦИЯ, МИГРАЦИЯ ДВОЙНОЙ СВЯЗИ И ЦИКЛИЗАЦИЯ, ДИЕНОВЫЙ СИНТЕЗ И ДИМЕРИЗАЦИЯ

25.1.11.1. *цис,транс*-Изомеризация

цис- и *транс*-Изомеры могут быть превращены друг в друга с помощью ряда стереоспецифических реакций. При этом обычно образуется только один продукт (схема 82; см. также [61]). Однако при нагревании алкена с селеном при ~200 °С, с азотистой кислотой, 3-меркаптопропановой кислотой или другим серусодержащим соединением получают равновесную смесь *цис-* и *транс-*

изомеров. Реакцию с селеном в настоящее время не применяют, так как селен промотирует миграцию двойной связи и перенос водорода с образованием более насыщенных соединений.

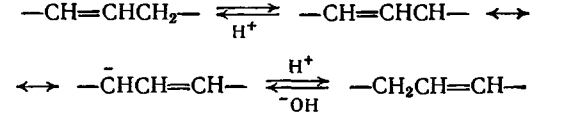


(82)

В моноенах и несопряженных полиенах степень превращения *цис*-двойных связей в *транс*-связи составляет 75—80 %. *транс*-Изомеры моноеновых кислот обычно менее растворимы и могут быть очищены кристаллизацией. Смесь, образующаяся из полиеновой кислоты, более сложна, и, хотя полный *транс*-изомер иногда может быть выделен кристаллизацией, чаще для разделения применяют хроматографию в присутствии ионов серебра. Сопряженные полиены изомеризуются легче и продукт изомеризации содержит больше полностью *транс*-изомера. Такое превращение обычно стимулируется действием света и иода [8].

25.1.11.2. Миграция двойной связи и циклизация

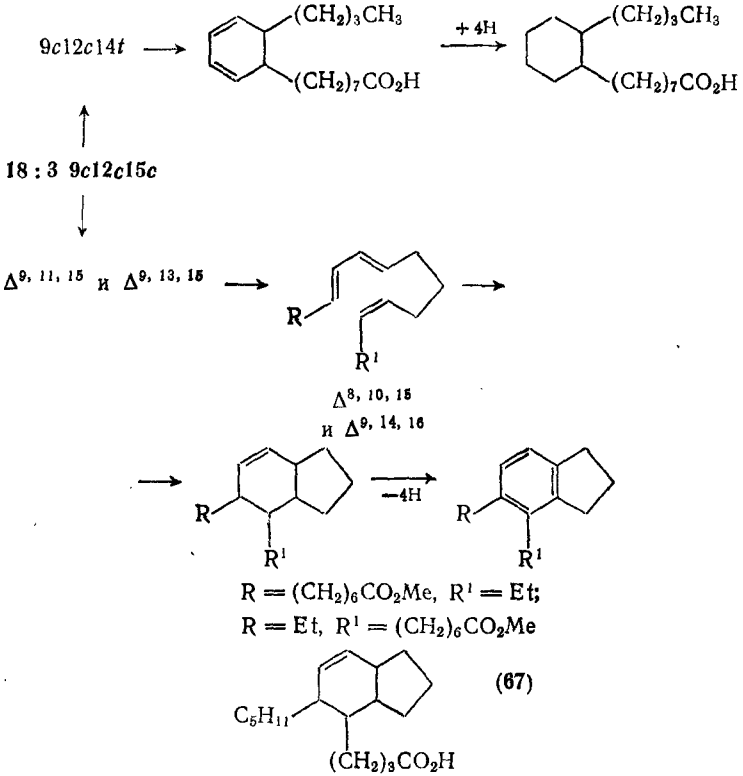
Под действием сильного основания двойная связь может мигрировать через ряд последовательных стадий (схема 83). Реакции метиленразделенных полиенов протекают в более мягких условиях и приводят к сопряженным полиенам. Например, из линолевой кислоты образуются 9*c*11*t*- и 10*t*12*c*-октадекадиеновые кислоты, причем при увеличении продолжительности реакции могут быть получены другие соединения. Из линолевой кислоты первоначально образуется смесь триеновых кислот с двумя или тремя сопряженными двойными связями. Индивидуальные кислоты иногда можно выделить из реакционной смеси кристаллизацией или хроматографией в присутствии ионов серебра.



(83)

Изомеризация линоленовой и других триеновых кислот в щелочной среде приводит также к моно- и бициклическим C_{18}-кислотам вследствие более глубокого изменения структуры молекулы. Из линоленовой кислоты (и масла семян льна, содержащего значительное количество этой кислоты) при обработке щелочью в атмосфере азота при 220—295 °C образуются производные циклогексана и индана (схема 84). Соединения ряда индана образуются,

по-видимому, путем внутримолекулярного диенового синтеза, для которого необходимо наличие 1,3,8-триенового звена. Оба типа циклических кислот легко восстанавливаются до пергидрокислот или дегидрируются до ароматических соединений (см. схему 84).



(84)

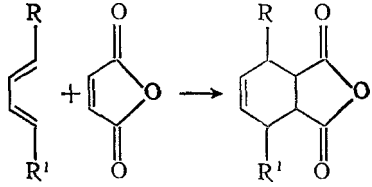
(67)

Аналогичные соединения образуются из тунгового масла, которое содержит сопряженную триеновую кислоту (18 : 3 9*c*11*t*13*t*). В данном случае присутствия щелочи не требуется; в присутствии серы, которая, вероятно, способствует *цис,транс*-изомеризации, реакцию можно проводить при более низкой температуре. Бициклические кислоты типа (67), содержащиеся в талловом масле, образуются из $\Delta^{5,9,12}$-кислоты через 5,10,12-изомер при щелочном способе получения древесной пульпы.

25.1.11.3. Диеновый синтез [62]

Классический вариант диенового синтеза (реакция Дильса—Альдера) имеет ограниченное применение для получения ненасыщенных жирных кислот. В качестве диенового компонента используют природные диеновые кислоты с сопряженными связями, изо-

меризованные в щелочных условиях полиеновые кислоты и дегидратированное касторовое масло. Поскольку эта реакция идет только с *транс,транс*-сопряженными диенами, ее можно использовать для определения конфигурации сопряженных полиенов. Например, из α-элеостеариновой кислоты (9*c*11*t*13*t*) только полностью *транс*(11*t*13*t*)-фрагмент образует продукт присоединения (схема 85).



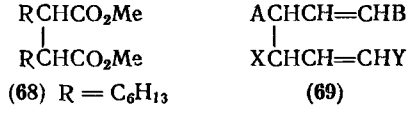
(85)

$R = (CH_2)_3CH_3$; $R^1 = CH{=}CH(CH_2)_7CO_2Me$

В качестве диенофила используют малеиновый ангидрид, тетрацианэтилен, акриловую кислоту, пропиоловую кислоту или ацетилендикарбоксилат. При реакции с акриловой кислотой образуется циклическая двухосновная кислота. В более жестких условиях диенофилами могут служить также этилен, пропилен и бутен-1.

25.1.11.4. Димеризация

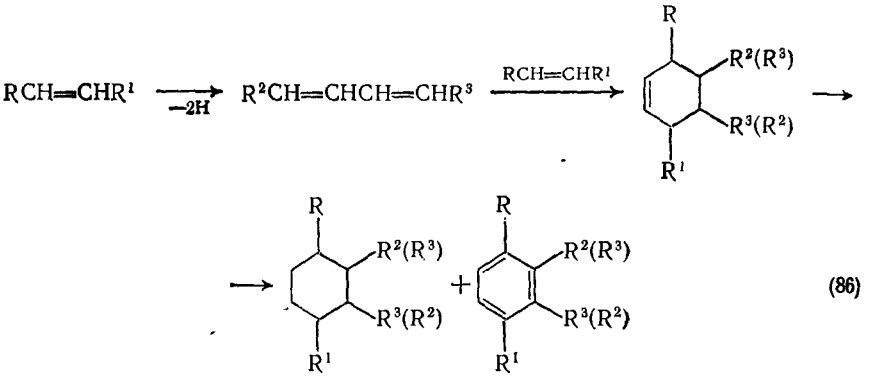
Производные димерных кислот остаются жидкими при очень низких температурах и могут быть использованы в качестве поверхностно-активных веществ, ингибиторов коррозии, смазочных материалов и исходных веществ для получения алкидных смол с улучшенными свойствами. При действии на сложные эфиры веществ, являющихся источниками свободных радикалов, например ди-*трет*-бутилпероксида, образуются ациклические димеры, в которых сохранены все исходные двойные связи. Из стеарата и других насыщенных эфиров образуется 2,2′-димер (68), тогда как из метилолеата получаются смешанные димеры типа (69), содержащие новые двойные связи на участках С-8 — С-11 обеих молекул; эти двойные связи имеют в основном *транс*-конфигурацию. Линолеат и линоленат образуют сходные ациклические димеры с четырьмя и шестью двойными связями, соответственно.



(68) $R = C_6H_{13}$ (69)

Термическая полимеризация полиеновых сложных эфиров приводит к ациклическим, моно- или полициклическим димерам, причем этот процесс включает миграцию двойной связи, диеновый синтез и радикальное присоединение. В условиях этой реакции возможна ароматизация циклогексеновых ядер.

В катализируемых глиной реакциях даже олеат образует циклический димер наряду со смесью насыщенных и ненасыщенных (в основном *транс*-) C_{18}-соединений нормального или изостроения, образующихся в результате переноса водорода и перегруппировки. Димер, по-видимому, возникает в результате реакции диена (образующегося из моноена путем переноса водорода) и моноена. При дальнейшем переносе водорода образующееся производное циклогексена превращается в соединения ряда циклогексана и бензола (схема 86).



25.1.12. РЕАКЦИИ ПО КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППЕ

25.1.12.1. Гидролиз

В лабораторных условиях сложные эфиры или глицериды удобнее всего гидролизовать раствором щелочи в этаноле. При подкислении гидролизата выделяются свободные жирные кислоты, которые могут быть экстрагированы эфиром или другим органическим растворителем. Некислотные компоненты (углеводороды, длинноцепочечные спирты, стерины или простые эфиры глицерина) также переходят в органический экстракт, в то время как выделившийся в ходе реакции глицерин остается в водной фазе.

Щелочной гидролиз (омыление) жиров обычно проводят при ~100 °С. Натриевые и калиевые соли жирных кислот применяют как мыла, соли других металлов — для ускорения полимеризации высыхающих масел, при получении консистентных смазок и смазочных материалов и в качестве компонентов пластмасс [63].

Жиры могут быть гидролизованы до свободных кислот водой; при этом, как полагают, происходит гомогенная реакция между жиром и водой, растворенной в масляной фазе. Реакцию проводят в присутствии сульфированных длинноцепочечных алкилбензолов (24—28 ч, ~100 °С) или оксидов цинка, магния или кальция (2—3 ч, 250 °С, 3,43 МПа).

25.1.12.2. Этерификация, алкоголиз, ацидолиз и переэтерификация [64, 65]

Сложные эфиры могут быть получены реакцией карбоновой кислоты или другого ацильного производного со спиртом или подобным соединением (этерификация), реакцией сложного эфира со спиртом (алкоголиз), кислотой (ацидолиз) или другим сложным эфиром (переэтерификация). Для каждого процесса обычно необходим кислотный или основной катализатор.

(1) Этерификация *

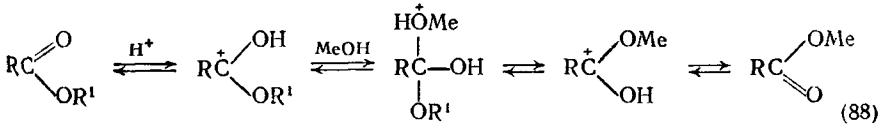
Метиловые эфиры получают реакцией с метанолом, содержащим серную кислоту (1—2 %), хлороводород (5 %) или трифторид бора (12—14 %) в качестве катализатора, или реакцией с диазометаном. Эти катализируемые кислотой реакции неприменимы для кислот, содержащих циклопропильные, циклопропенильные или эпоксидные группы, и для сопряженных полимеров или кислот, имеющих гидроксигруппу, смежную с двойной связью. Такие кислоты, однако, можно этерифицировать диазометаном или в условиях щелочного катализа.

(2) Алкоголиз

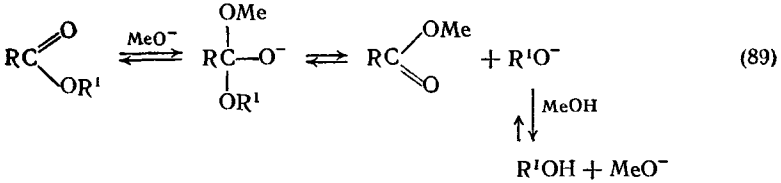
Алкоголиз (схема 87) широко применяется для превращения жирных кислот, входящих в состав липидов, в метиловые эфиры, минуя стадию образования свободных кислот, и для получения частично этерифицированных глицеридов реакцией триглицерида с глицерином.

$$RCOOR^1 + R^2OH \underset{}{\overset{\text{катализатор}}{\rightleftharpoons}} RCOOR^2 + R^1OH \qquad (87)$$

Для проведения метанолиза глицерид растворяют в избытке метанола, содержащего кислотный (серную кислоту, хлороводород, трифторид бора) (схема 88) или щелочной (0,5*M* раствор метоксида натрия) (схема 89) катализатор, обычно в среде бензола или дихлорметана в качестве дополнительного растворителя.



(88)



(89)

* Ацилирование глицерина с образованием глицеридов или фосфоглицеридов рассмотрено в разд. 25.2.3.

При нагревании смеси триглицерида и глицерина в присутствии гидроксида натрия образуется равновесная смесь (схема 90); эта реакция является важным методом получения ди- и моноацилглицеринов. Состав равновесной смеси зависит от относительных количеств триглицерида и глицерина, причем учитывается только глицерин, растворенный в реакционной массе.

$$\text{Триглицерид} + \text{Глицерин} \rightleftarrows \text{Моноглицерид} + \text{Диглицерид} \qquad (90)$$

(3) Ацидолиз

Этот процесс заключается во взаимодействии сложного эфира с кислотой в присутствии серной кислоты, оксида цинка или оксида кальция (схема 91). При реакции природных глицеридов, например, с лауриновой кислотой остатки C_{16}- и C_{18}-кислот замещаются остатком C_{12}-кислоты.

$$R^1COOR + R^2COOH \rightleftarrows R^2COOR + R^1COOH \qquad (91)$$

(4) Переэтерификация [66]

Натуральный жир или масло является смесью триацилглицериов, в которых остатки жирных кислот распределены определенным образом (см. разд. 25.2.2.4). Под действием основного катализатора (гидроксид или метоксид натрия или сплав натрия и калия) при ~80 °С ацильные группы перераспределяются произвольным образом; одновременно изменяются физические свойства смеси. Так, температура плавления соевого масла после такой обработки может повыситься от —7 до +6 °С, а хлопкового масла — от 10 до 34 °С.

Обработка смеси эфиров и масел приводит к статистическому распределению остатков жирных кислот во всей смеси. Это позволяет вводить остатки насыщенных жирных кислот в преимущественно ненасыщенные глицериды, и наоборот.

Несколько иной результат получается при проведении переэтерификации при такой температуре (10—40 °С), когда полностью насыщенные глицериды (S_3) выкристаллизовываются из реакционной смеси (направленная переэтерификация). Это смещает равновесие реакции (схема 92); образуется дополнительное количество S_3, которое вновь отделяется; в результате образуется смесь с повышенным содержанием S_3, повышенным содержанием полностью ненасыщенного глицерида (U_3) и уменьшенным содержанием глицеридов, в состав которых входят остатки как насыщенных, так ненасыщенных кислот. Это приводит к повышению температуры плавления жира.

$$U_3 \rightleftarrows U_2S \rightleftarrows US_2 \rightleftarrows S_3 \qquad (92)$$

Такие процессы применяют в промышленности для улучшения физических свойств топленого свиного жира, получения заменителя кокосового масла из более доступных масел и получения жиров, содержащих остатки уксусной кислоты.

При изомеризации моно- и диглицеридов происходит аналогичная миграция ацильных остатков; 1- и 2-моноглицериды при изомеризации в присутствии кислоты или основания или при нагревании образуют смесь состава 9 : 1. Этот процесс происходит также при хроматографии; следует отметить, что степень такой изомеризации уменьшается, если адсорбент пропитать борной кислотой. Диглицериды ведут себя подобным же образом. Состав образующейся смеси (40 % 1,2- и 60 % 1,3-изомера) несколько меняется при изменении температуры.

25.1.12.3. Получение хлорангидридов и ангидридов

Хлорангидриды образуются при реакции жирных кислот с трихлоридом или пентахлоридом фосфора, оксид-трихлоридом фосфора (фосфорилхлоридом), фосгеном, оксалилхлоридом или трифенилфосфином и четыреххлористым углеродом. Трихлорид фосфора является, по-видимому, наиболее экономически выгодным реагентом; однако в наиболее распространенном лабораторном способе кислоту выдерживают при комнатной температуре в течение 3—5 дней в смеси с тионилхлоридом (1,4 моль) в случае насыщенных кислот и оксалилхлоридом (0,8 моль) для ненасыщенных кислот.

Ангидриды кислот [67] получают реакцией жирных кислот с уксусным ангидридом (схема 93) при температуре кипения реакционной смеси или с дициклогексилкарбодиимидом при комнатной температуре (схема 94). Смешанные ангидриды, например метансульфоностеариновый или *п*-толуолсульфоностеариновый (схемы 95, 96), являются эффективными ацилирующими агентами.

$$2RCO_2H + (MeCO)_2O \rightleftharpoons (RCO)_2O + 2MeCO_2H \quad (93)$$

$$2RCO_2H + C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11} \longrightarrow (RCO)_2O + (C_6H_{11}NH)_2CO \quad (94)$$

$$RCOOC(CH_3){=}CH_2 + MeSO_3H \longrightarrow RCOOSO_2Me + (CH_3)_2CO \quad (95)$$

$$RCOCl + AgOSO_2C_6H_4Me \longrightarrow RCOOSO_2C_6H_4Me + AgCl \quad (96)$$

25.1.12.4. Получение азотсодержащих производных [68, 69]

Этот раздел посвящен производным длинноцепочечных азотсодержащих соединений, применяемым для получения пластмасс, в качестве смазочных материалов, детергентов и пенообразователей в процессе флотации.

Амиды $RCONH_2$ в промышленности получают реакцией жирных кислот с аммиаком (или другим амином) при ~200 °С. Нитрилы RCN, используемые в основном для получения аминов, образуются при термической деструкции амидов или прямой реакцией кислот с аммиаком в присутствии катализаторов дегидратации, например оксида алюминия. Первичные амины RCH_2NH_2 наиболее часто получают в промышленном масштабе каталитиче-

ским восстановлением нитрилов в присутствии никеля Ренея и аммиака. В других условиях в качестве основного продукта образуются вторичные амины.

25.1.12.5. Получение производных, содержащих серу [70, 71]

При реакции с серной кислотой, триоксидом серы или сульфаминовой кислотой длинноцепочечные спирты превращаются в сульфаты. Метансульфонаты (или *n*-толуолсульфонаты), часто более удобные для получения и более реакционноспособные, чем алкилгалогениды, легко превращаются в углеводороды, алкилгалогениды, нитрилы, малонаты, сложные эфиры, гидропероксиды и альдегиды.

25.1.12.6. Получение и реакции α-анионов карбоновых кислот [72]

Насыщенные и моноеновые карбоновые кислоты реагируют с диизопропиламидом лития с образованием дианионов ($R\bar{C}HCO_2^-$), которые являются ценными промежуточными соединениями для получения α-алкил, α-гидрокси, α-гидропероксии- и α-иодкислот, а также альдегидов и нитросоединений, образующихся в результате сопутствующего декарбоксилирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *F. D. Gunstone*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1977, **15**, 75.
2. *C. Hitchcock and B. W. Nichols*, 'Plant Lipid Biochemistry', Academic Press, London, 1971, p. 3
3. *C. R. Smith, Jr.*, Topics Lipid Chem., 1970, **1**, 277.
4. *L. A. Witting* in 'Modification of Lipid Metabolism', ed. E. G. Perkins and L. A. Witting, Academic Press, New York, 1975, p. 19.
5. *H. Schlenk*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1970, **9**, 587.
6. *G. F. Spencer, S. F. Herb, and P. J. Gormisky*, J. Amer. Oil Chemists' Soc., 1976, **53**, 94.
7. *E. W. Horton*, Chem. Soc. Rev., 1975, **4**, 589.
8. *C. Y. Hopkins*, Topics Lipid Chem., 1972, **3**, 37.
9. *C. R. Smith Jr.*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1970, **11**, 137.
10. *N. Polgar*, Topics Lipid Chem., 1971, **2**, 207.
11. *A. K. Lough*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1975, **14**, 1.
12. *J. S. Buckner and P. E. Kolattukudy*, in 'Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes', ed. P. E. Kolattukudy, Elsevier. Amsterdam, 1976, p. 148.
13. *W. W. Christie*, Topics Lipid Chem., 1970, **1**, 1.
14. *D. T. Domning*, Rev. Pure App. Chem., 1961, **11**, 196.
15. *C. Hitchcock and B. W. Nichols*, Ref. 2, p. 22.
16. 'Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids', ed. T. Galliard and E. I. Mercer, Academic Press, London, 1975.
17. *C. Hitchcock*, см. сс. 16, p. 1.
18. *P. E. Kolattukudy*, см. сс. 16, p. 203; *P. E. Kolattukudy and T. J. Walton*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1972, **13**, 119.
19. F. D. Gunstone, Ref. 16, p. 21.

20 *G. R. Jamieson*, Topics Lipid Chem., 1970, **1**, 107; J. Chromatog. Sci., 1975, **13**, 491.
21 *J. M. Osbond*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1966, **9**, 119.
22 *W. H. Kunau*, Chem. Phys. Lipids, 1973, **11**, 154.
23 *C. Hitchcock and B. W. Nichols*, см. сс. 2, p. 96.
24 *S. J. Wakil*, in 'Lipid Metabolism', ed. S. J. Wakil, Academic Press, London, 1970, p. 1.
25 *J. L. Harwood*, см. сс. 16, p. 44
26 *P. K. Stumpf*, см. сс. 16, p. 95.
27 *D. Chapman*, 'The Structure of Lipids by Spectroscopic and X-Ray Techniques:, Methuen, London, 1965.
28 *W. G. de Ruig*. 'Infrared Spectra of Monoacid Triglycerides', Agricultural Research Report 759, Wageningen, 1971.
29 *J. S. Showell*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1965, **8**, 253.
30 *I. Fischmeister*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1975, **14**, 91; *R. N. Jones*, Canad. J. Chem., 1962, **40**, 301.
31 *I. A. Wolff and T. K. Miwa*, J. Amer. Oil Chemists' Soc., 1965, **42**, 208.
32 *J. E. D. Davies et al.*, J. C. S. Perkin II, 1972, 1557; Chem. Phys. Lipids, 1975, **15**, 48, 157.
33 *C. Y. Hopkins*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1965, **8**, 213.
34 *D. J. Frost and F. D. Gunstone*, see references in Table 5.
34a *D. J. Frost and F. D. Gunstone*, Chem. Phys. Lipids, 1975, **15**, 53
34б *D. J. Frost, Ph. D. Thesis*, University of Amsterdam, цитируется по: *F. D. Gunston and H. R. Schler*, Chem. Phys. Lipids, 1975, **15**, 189.
35 *F. D. Gunstone, M. R. Poland, C. M. Scrimgeour, N. W. Gilman, and B. C. Holland*, Chem. Phys. Lipids, 1976, **17**, 1.
35a *F. D. Gunstone, M. R. Pollard. M. Scrimgeour, and H. S. Vedanayagam*, Chem. Phys. Lipids, 1977, **18**, 115.
35б *A. P. Tulloch and M. Mazurek*, Lipids, 1976, **11**, 228.
35в *J. Bus, I. Sies, and M S. F Lie Ken Jie*, Chem. Phys. Lipids, 1976, **17**, 501, ibid., 1977, **18**, 130.
36 *J. A. McCloskey*, Topics Lipid Chem., 1970, **1**, 369.
37 *A. Zeman and H. Scharman*, Fette Seifen Anstrichm, 1972, **74**, 509; 1973, **75**, 32.
38 *R. D. Plattner, G. F. Spencer, and R. Kleiman*, Lipids, 1976, **11**, 222.
39 *B. A. Andersson and R. T. Holman*, Lipids, 1974, **9**, 185; *B. A. Andersson. W. H. Heimermann, and R. T. Holman*, ibid., 1974, **9**, 443.
40 *B. A. Andersson. W. W. Christie, and R. T. Holman*, Lipids, 1975, **10**, 215; *B. A. Andersson, and R. T. Holman*, ibid., 1975, **10**, 716.
41 *H. J. Dutton*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1968, **9**, 349.
42 *E. N. Frankel and H. J. Dutton*, Topics Lipid Chem., 1970, **1**, 161.
43 *P. van der Plank and H. J. van Oosten*, J. Catalysis, 1975, **38**, 223.
44 *R. Viniani*, Adv. Lipid Res., 1970, **8**, 267.
45 *W. O. Lundberg and P. Järvi*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1968, **9**, 377.
46 *G. A. Veldink, J. F. G. Viegenthart, and J. Boldingh*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1975, **15**, 131.
47 *H. W. Gardner*, J. Agric. Food Chem., 1975, 23, 129.
48 *D. A. Forss*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1972, **13**, 177.
49 *D. Swern*, J. Amer. Oil Chemists' Soc., 1970, 47, 424.
50 *F. D. Gunstone*, Accounts Chem. Res., 1976, **9**, 34.
51 *F. D. Gunstone*, Adv. Org. Chem., 1960, **1**, 103.
52 *O. S. Privett*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1966, **9**, 91.
53 *R. G. Kadesch*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1963, **6**, 291.
54 *E. H. Pryde and J. C. Cowan*, Topics Lipid Chem., 1971, **2**, 1.
55 *R. Criegee*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1975, **14**, 745.
56 *C. Maerker*, Topics Lipid Chem., 1971, **2**, 159.
57 *H. E. Simmons, T. L. Cairns, S. A. Vladuchik, and C. M. Hoiness*, Org. Reactions, 1973, **20**, 1.
58 *J. L. Williams, and D. S. Sgoutas*, J. Org. Chem., 1971, **36**, 3064; Chem. Phys. Lipids, 1972, **9**, 295.

59. *R. J. Haines and G. J. Leigh*, Chem. Soc. Rev., 1975, **4**, 155.
60. *P. B. van Dam, M. C. Mittelmeijer, and C. Boelhouwer*, J. Amer. Oil Chemists' Soc., 1974, 51, 389.
61. *P. E. Sonnet and J. E. Oliver*, J. Org. Chem., 1976, 41, 3279, 3284.
62. *H. P. Kaufmann*, Fette Seifen Anstrichm., 1962, **64**, 1115.
63. *N. Pilpel*, Chem. Rev., 1963, **63**, 221.
64. *W. W. Christie*, Topics Lipid Chem., 1972, **3**, 171.
65. *W. W. Christie*, 'Lipid Analysis', Pergamon, Oxford, 1973.
66. *H. H. Hustedt*, J. Amer. Oil Chemists' Soc., 1976, **53**, 390.
67. *N. O. V. Sonntag, J. R. Trowbridge, and I. J. Krems*, J. Amer. Oil Chemists' Soc., 1954, **31**, 151.
68. *N. O. V. Sonntag*, in 'Fatty Acids', ed. K. S. Markley, 2nd edn. vol. **3**, p. 1551.
69. *S. H. Shapiro*, in 'Fatty Acids and their Industrial Applications', ed. E. S. Pattison, 2nd edn., Arnold, London, 1968, p. 77.
70. *K. S. Markley*, in 'Fatty Acids', ed. K. S. Markley, 2nd edn., vol. 3, p. 1717.
71. *F. Spener*, Chem. Phys. Lipids, 1973, **11**, 229.
72. *F. D. Gunstone*, Rev. franc. Corps Gras, 1976, **23**, 539.

25.2. ЛИПИДЫ

Ф. Д. ГАНСТОН (University of St. Andrews)

25.2.1. СТРОЕНИЕ ЛИПИДОВ

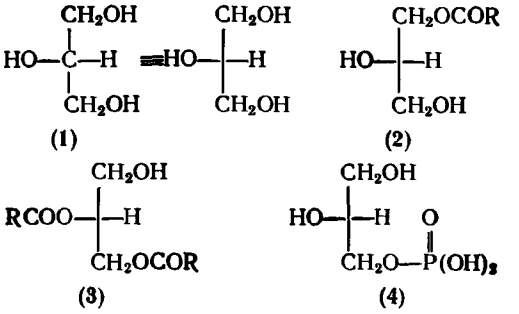
25.2.1.1. Введение

По химическому строению липиды можно разделить на *сложные эфиры* высших жирных кислот и (обычно, но не всегда) глицерина (пропантриола-1,2,3), и *амиды* жирных кислот — производные длинноцепочечных аминов. По другой классификации различают простые, или нейтральные, липиды (триацилглицерины, некоторые липиды с простой эфирной связью, сложные эфиры холестерина, воска) и сложные, или полярные, липиды (фосфоглицериды, гликозилдиацилглицерины, сфинголипиды), в основном в соответствии с их хроматографическим поведением.

Липиды, содержащие остатки сахаров, называют *гликолипидами*; липиды, содержащие остаток фосфорной кислоты, — *фосфолипидами*; липиды, содержащие сульфогруппу,— *сульфолипидами*.

Соответствующие производные глицерина содержат хиральный центр и могут существовать в двух энантиомерных формах. Для их обозначения используют *D/L*- или *R/S*-системы номенклатуры. Обе эти системы, однако, не свободны от недостатков, и в настоящее время обычно применяется новая система обозначений, основанная на стереохимической нумерации. Если в проекции Фишера (1) гидроксильная группа при С-2 глицерина расположена слева, то атому углерода, находящемуся над ним, присваивается номер 1, а нижнему атому — номер 3. Использование стереоспецифической нумерации обозначается символом «*sn*». Так, например, соединение (2) называют 1-*O*-ацил-*sn*-глицерином, (3) — 2,3-ди-*O*-ацил-*sn*-глицерином, (4) — 3-фосфатом *sn*-глицерина (*sn*-глицеро-3-фосфатом, или, правильнее, *sn*-глицеро-3-дигидрофосфатом).

Группировки, присоединенные по первичной и вторичной гидроксильным группам, иногда обозначают символами α или β, соответственно.



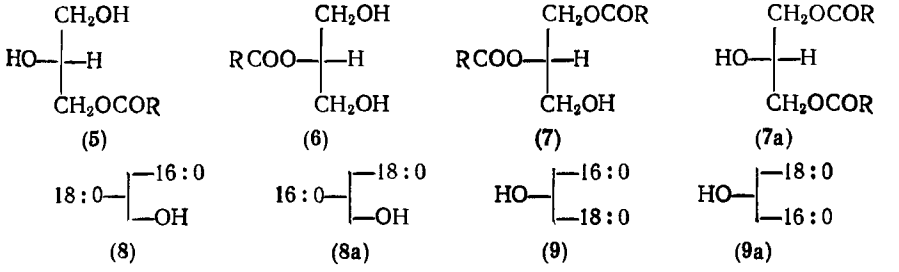
(1) (2) (3) (4)

25.2.1.2. Ацилглицерины

Наиболее широко известными липидами являются *O*-ацильные производные глицерина: моноацилглицерины (моноглицериды), диацилглицерины (диглицериды) или триацилглицерины (триглицериды). Твердые при обычной температуре триглицериды называют жирами, жидкие — маслами.

Моноацилглицерины существуют в виде 1(3)-*O*-ацилглицеринов [α-моноглицериды; (2) и (5), соответственно] и 2-*O*-ацилглицеринов [β-моноглицериды; (6)]; 1- и 3-изомеры являются энантиомерами, дающими рацемический α-глицерид. Диацилглицерины существуют в виде 1,2- и 2,3-ди-*O*-ацилглицеринов [α,β-диглицериды; (7) и (3), соответственно] и 1,3-ди-*O*-ацилглицеринов (α,α'-диглицериды; (7а)].

Для изображения ацилглицеринов используют также способ, показанный на примере 1(2)-*O*-пальмитоил-2(1)-*O*-стеароил-*sn*-глицеринов (8) и (8а) и 1-*O*-пальмитоил-3-*O*-стеароил-*sn*-глицерина (9) и его энантиомера (9а)



(5) (6) (7) (7а) (8) (8а) (9) (9а)

Природные масла и жиры в основном состоят из триацилглицеринов и являются важнейшим классом резервных липидов у растений и большинства животных, что, впрочем, необязательно для морских организмов. Природные триацилглицерины обычно содержат остатки двух или трех различных жирных кислот. Число возможных типов соединений быстро возрастает с увеличением

числа доступных ацильных групп, особенно учитывая возможность образования энантиомеров (см. разд. 25.2.2.1.). Так, существуют восемь триацилглицериинов с остатками только пальмитиновой и(или) олеиновой кислот: PPP, PPO, POP, OPP, POO, OPO, OOP и OOO (где P и O — пальмитоил и олеил, присоединеиные к остаткам глицерина в положения 1, 2 и 3, соответственно; PPO и OPP, POO и OOP — пáры эиантиомеров). При наличии трех разных ацильных остатков существуют 27 различных соединений, в том числе девять пар энантиомеров.

При гидролизе ацилглицеринов водными растворами щелочи или кислоты образуются глицерин и кислоты, входящие в состав глицерида. Более избирательно протекает ферментативиый гидролиз. Под действием липазы, присутствующей в организмах животных, высших растениях и микроорганизмах, обычно отщепляются остатки кислот только от первичных гидроксигрупп с образованием 2-*O*-ацилглицерина, который может быть дезацилирован только после изомеризации в 1-*O*-ацилглицерии. Такая избирательность имеет существенное значение при переваривании потребляемого с пищей жира и используется при исследовании распределения ацильных групп в триацилглицеринах (см. разд. 25.2.2.4.).

25.2.1.3. Ацильные производные других спиртов (воска, кутины и суберины, диольные липиды, цианолипиды, сложные эфиры стероидов)

Восками [2, 3] иногда называют длиноцепочечные соединения, которые обладают свойством придавать поверхности, которую они покрывают, характерный блеск и водоотталкивающие свойства. Последнее важно для сохранения воды внутри организма и создания барьера между организмом и окружающей средой. В узко химическом смысле восками называют эфиры длинноцепочечных жирных кислот и длинноцепочечных спиртов (сложноэфирные воска); в этом смысле это слово будет употребляться при дальнейшем изложении материала.

Воска широко распространены в природе и входят в состав защитного покрытия листьев растений, имеются в кожуре фруктов, птичьих перьях [4], у насекомых, а иногда входят в состав внутренних резервных липидов, в частности у морских организмов. Воска обычно являются сложными эфирами одноатомных длинноцепочечных спиртов и одноатомных длинноцепочечных кислот (общее число атомов углерода 30—60), диэфирами длиноцепочечных алкандиолов-1,2 (или -1,3) или производными гидроксикислот. Эти кислоты и спирты могут быть насыщенными или ненасыщенными, и часто содержат одну или несколько боковых цепей.

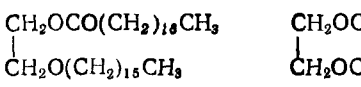
Воск карнаубы (восконосной пальмы) является типичным представителем растительных восков и содержит около 36 % слож-

ных эфиров. Это C_{46} — C_{64}-соединения, в осиовном C_{54}- (13 %), C_{56}- (27 %), C_{58}- (16 %) и C_{60}- (17 %) сложные эфиры — производные спиртов C_{30} (16 %), C_{32} (60 %) и C_{34} (17 %) и соответствующих жирных кислот.

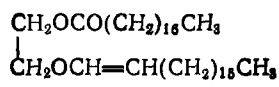
Кутины и *суберины* образуют защитные слои на листьях и других растительных тканях и являются в основном полимерами — производными гидроксикислот. Кутины образуются из C_{16}- и C_{18}-гидроксикислот (см. разд. 25.1.2.9), тогда как суберины являются производными C_{16} — C_{22}-моно- и полигидроксикислот и в качестве основного компонента содержат фенольные вещества [5].

Хотя большинство липидов являются производными глицерина, липиды из ряда источников, включая дрожжи, масла семян, яйца и печень, содержат в качестве минорных (а иногда и основных) компонентов ацилированные короткоцепочечные диолы — этан-, пропан- и бутандиолы. Эти *диольные липиды* являются аналогами глицеридов и фосфоглицеридов. Например, так называемые триацилглицерины, выделенные из морской звезды (*Distolasterias nipon*), содержат до 35% производных этандиола и являются насыщенными и ненасыщенными липидами с простой эфирной связью **(10)** и **(11)** [6].

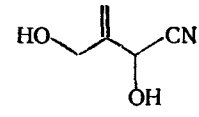
К другому классу необычных липидов относятся моно- и диацильные производные циансодержащих C_5-спиртов **(12)**—**(15)**.



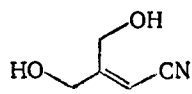
(10)



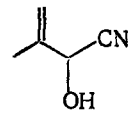
(11)



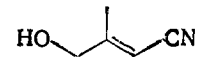
(12)



(13)



(14)



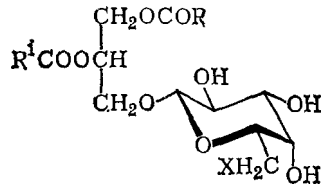
(15)

В большей части образцов экстрагированных липидов содержится некоторое количество стеринов (холестерин из животных источников, стигмастерин, β-ситостерин и эргостерин из растительных источников), а также их ацилпроизводные.

25.2.1.4. Гликозилдиацилглицерины [7, 8]

Эти гликолипиды представляют собой 1,2-диацилглицерины с присоединенным по положению 3 гликозидной связью остатком моно-, ди- или трисахарида. Гликолипиды высших растений и водорослей, в частности гликолипиды, входящие в состав хлоропластов, содержат остатки галактозы, галактозилгалактозы или 6-сульфохиновозы [9] и остатки высоконенасыщенных жирных кислот. Так, например, гликолипид **(16)** представляет собой

моногалактозилдиглицерид {1,2-ди-*O*-ацил[β-*D*-галактопиранозил-(1′→3)]-*sn*-глицерин}, а сульфолипид (**17**), выделенный из растений, является сульфохиновозилдиглицеридом {1,2-ди-*O*-ацил[6′-сульфо-α,*D*-хиновопиранозил-(1′→3)]-*sn*-глицерином}.

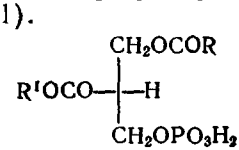


(**16**) X= OH
(**17**) X= SO_3H

В состав гликолипидов бактерий входят остатки разветвленных жирных кислот, а вместо остатков галактозы — остатки глюкозы или маннозы.

25.2.1.5. Фосфоглицериды

Фосфоглицериды являются производными глицерофосфата (**4**); они широко распространены в растительном и животном мире, в частности, входят в состав биологических мембран, которые не только создают барьер, отделяющий клетки и субклеточные структуры от окружающей среды, но и участвуют в жизненно важных процессах. Эти соединения регулируют также транспорт метаболитов (см. разд. 25.3.1).

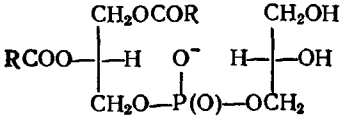


(**18**)

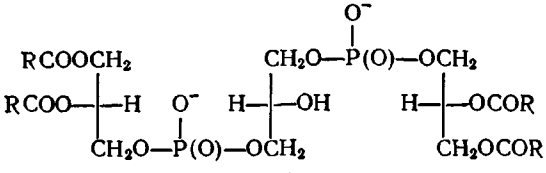
Фосфатидные кислоты (1,2-ди-*O*-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфаты) (**18**) представляют собой диацилированные производные *sn*-глицеро-3-фосфата (**4**) и являются важными структурными звеньями других соединений и промежуточными веществами в биохимических процессах. Сложноэфирная связь между глицерином и фосфорной кислотой более устойчива к гидролизу (особенно щелочному), чем связи остатков жирных кислот с глицерином, так что при мягком гидролизе фосфатидных кислот образуются жирные кислоты и смесь 3- и 2- (α- и β-) изомеров глицерофосфата. Остаток фосфатидной кислоты носит название фосфатидил.

К липидам, при полном гидролизе которых образуются только глицерин, фосфорная кислота и жирные кислоты, относятся: *фосфатидилглицерин* [**19**; 1-*O*-(*sn*-фосфатидил-3′)-*sn*-глицерин] — важный компонент фотосинтезирующих тканей, где он частично ассоциирован с 16 : 1 3*t*-кислотой, и *дифосфатидилглицерин* [**20**; 1,3-ди-*O*-(*sn*-фосфатидил-3′)-*sn*-глицерин, кардиолипин], который обычно в основном содержит остатки линолевой кислоты и является основным липидным компонентом митохондрий. Эти со-

единения существуют в частично ацилированных формах, играющих важную роль в метаболизме.



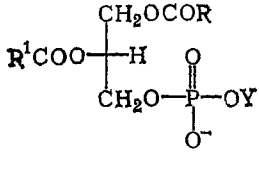
(19)



(20)

Важнейшими фосфоглицеридами являются сложные эфиры фосфатидных кислот (*фосфатидиловые эфиры*) [7]. Подобно фосфатидилглицеринам они представляют собой фосфодиэфиры (моногидрофосфаты), однако спиртовым компонентом обычно является холин, этаноламин, серин или инозит. К ним относятся: 3-*sn*-фосфатидилхолин (**21**), 3-*sn*-фосфатидилэтаноламин (**22**), 3-*sn*-фосфатидилсерин (**23**) и 3-(*sn*-фосфатидил-1′)миоинозит (**24**), существующий также в виде 4-фосфата и 4,5-дифосфата.

В качестве спиртового компонента могут выступать также *N*-метил- и *N*,*N*-диметилэтаноламины и карнитин (3-гидрокси-4-триметиламинобутановая кислота). Фосфатидилхолин раньше называли лецитином, а термин «кефалин» служил для обозначения смеси фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилсеринов. В этих фосфолипидах остатки ненасыщенных жирных кислот обычно находятся при С-2, а насыщенных — при С-1. В случае фосфатидилинозитов в остатке инозита могут присутствовать дополнительные фосфатные группы или остатки сахара. Все природные фосфатидиловые эфиры являются производными *sn*-глицеро-3-фосфата.

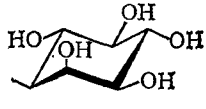


(**21**) Y = $CH_2CH_2\overset{+}{N}Me_3$

(**22**) Y = $CH_2CH_2\overset{+}{N}H_3$

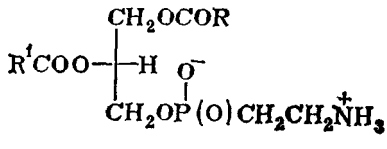
(**23**) Y = $CH_2CH(\overset{+}{N}H_3)CO_2H$

(**24**) Y =

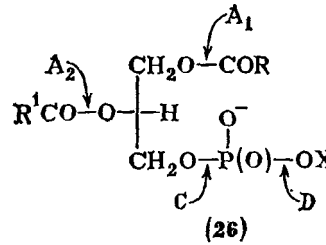


К другим структурным модификациям относятся производные фосфоглицеридов с простой эфирной связью (см. разд. 25.2.1.6) и фосфонолипиды типа (**25**), которые скорее являются произ-

водными гипотетической двухосновной фосфоновой кислоты [$HPO(OH)_2$], чем трехосновной фосфорной кислоты $PO(OH)_3$. Они были обнаружены в виде производных этаноламина в морских беспозвоночных и простейших.



(25)



(26)

Полный гидролиз фосфатидиловых эфиров легко осуществляется в кислой среде. В щелочных условиях быстро удаляются ацильные группы и образующийся, например, глицерофосфорилхолин медленно превращается в холин и смесь α- и β-глицерофосфорных кислот. Ферменты специфично гидролизуют большинство фосфоглицеридов, избирательно расщепляя одну из четырех сложноэфирных связей [см. (26)].

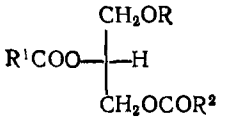
Соединения, подвергнувшиеся однократному деацилированию с отщеплением только одного остатка жирной кислоты, называют лизофосфатидиловыми эфирами. Фосфолипазы A_1 и A_2 вызывают удаление одной ацильной группы с образованием лизофосфатидилового эфира. Препарат фосфолипазы B содержит оба эти фермента. Под действием фосфолипазы C из фосфоглицерида образуется диацилглицерин и эфир фосфорной кислоты, а под действием фосфолипазы D — фосфатидная кислота и соответствующий спирт.

25.2.1.6. Липиды с простой эфирной связью [10, 11]

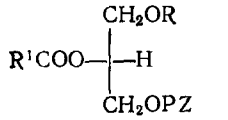
Липиды с простой эфирной связью являются глицеридами, у которых в положении 1 вместо ацильной группы находится алкильная или алкен-1-ильная и, следовательно, вместо сложноэфирной присутствует простая эфирная связь. Такие липиды (27)—(30) являются аналогами триглицеридов или фосфоглицеридов.

Если группа при C-1 является насыщенной или содержит двойную связь не в положении 1′ (обычно в положении 9′), соединение ведет себя как типичный простой эфир. Оно устойчиво к щелочному гидролизу и восстановлению алюмогидридом лития и расщепляется только при жестком кислотном гидролизе. Алкилдиацилглицерины содержатся в липидах морских организмов; типичными продуктами их гидролиза являются гексадецилглицерин (химиловый спирт), октадецилглицерин (батиловый спирт) и окта-

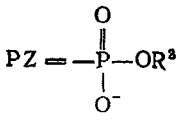
децен-9-илглицерин (селахиловый спирт) (31).



(27) R = алкил
(28) R = алкен-1-ил



(29) R = алкил
(30) R = алкен-1-ил



R^3 = остаток этаноламина, холина и т. п.

$$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_8OCH_2CH(OH)CH_2OH \quad (31)$$

Аналогичны по строению, но обладают другими свойствами липиды, содержащие *цис*-алкен-1′-ильную группу и остатки холина или этаноламина. Такие липиды широко распространены в растительном и животном мире [12]. Подобные эфиры устойчивы к щелочному гидролизу и действию алюмогидрида лития, но легко гидролизуются разбавленной кислотой, образуя альдегиды помимо других ожидаемых продуктов гидролиза (схема 1).

$$RCH{=}CHOCH_2R^1 + H_2O \xrightarrow{H^+} RCH_2CHO \quad (1)$$

25.2.1.7. Сфинголипиды [13]

Сфинголипидами называют амиды, образованные жирными кислотами и длинноцепочечными аминами, например сфингенином. Ацилированные сфингенины (*церамиды*) (32) существуют в основном в виде производных, у которых первичный гидроксил связан с остатком сахара или с остатками эфира фосфорной кислоты. Сфинголипиды сходны по строению с фосфоглицеридами: имеют две длинные гидрофобные цепочки и гидрофильную «головку».

Природные длинноцепочечные основания являются C_{12} — C_{22}-соединениями двух типов [14, 15]. Ненасыщенные молекулы с тремя функциональными группами (33) в основном имеют животное происхождение, а насыщенные соединения с четырьмя функциональными группами (34) — растительное. Все хиральные центры в таких соединениях имеют *D*-конфигурацию. C_{18}-Основания (33) и (34) называют сфингозином и фитосфингозином, соответственно. По новой полусистематической номенклатуре сфингозин называют *транс*-4-сфингенином, а его дигидропроизводное — сфинганином; C_{20}-соединение (34) называют гидроксиэйкозасфинганином.

$$CH_3(CH_2)_{12}\overset{t}{C}H{=}CHCH(OH)CH(NHCOR)CH_2OH \quad (32)$$

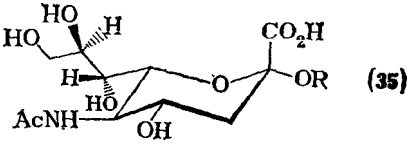
$$RCH\overset{t}{=}CHCH(OH)CH(NH_2)CH_2OH \quad (33)$$

$$RCH_2CH(OH)CH(OH)CH(NH_2)CH_2OH \quad (34)$$

В одной из разновидностей сфинголипидов — *гликозилцерамидах* (гликосфинголипидах) [16—19] церамид связан по первичной спиртовой группе с остатком сахара. *Цереброзиды* (моногликозилцерамиды) содержат один углеводный остаток; известны также более сложные гликозилцерамиды. Впервые эти соединения были выделены из мозга; они широко распространены в растительном и животном мире. В их состав входят в основном остатки насыщенных или 2-*D*-гидроксиалкановых кислот.

Типичными представителями моногликозилцерамидов (цереброзидов) являются Cer-Gal, Cer-Glc, а также Cer-Gal-3-сульфат (сульфаты цереброзидов, сульфатиды) [9]; к дигликозилцерамидам относятся: Cer-Glc-(4←1)-Gal (лактозилцерамид, цитолипии H), Cer-Gal-(4←1)-Gal (дигалактозилцерамид) (Cer — остаток церамида, Gal — остаток галактозы, Glc — остаток глюкозы).

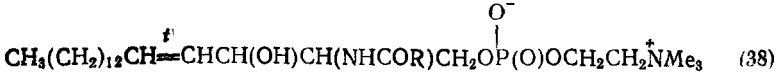
В составе липидов мозга, мембран эритроцитов и других тканей, а также в клетках нервных узлов центральной нервной системы обнаружены *гангліозиды* [20—23]. Они представляют собой гликозилцерамиды, в молекулы которых входят также остатки (один или более) сиаловой (*N*-ацетилнейраминовой, NANA) кислоты (35), связанные с остатками галактозы. Типичными примерами таких соединений являются моносиалоганглиозид (36) и дисиалоганглиозид (37).

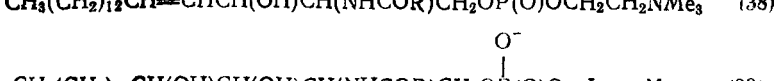


(35)

Cer-Glc-(4←1)-Gal-(4←1)-Gal*N*Ac-(3←1)-Gal
NANA (36)

(37) Cer-Glc-(4←1)-Gal-(4←1)-Gal*N*Ac-(3←1)-Gal
NANA NANA


(38)


(39)

Ino — остаток инозита

Gal, Ara, Fuc — GlcA — GlcN

Сфинголипиды другого типа — *фосфосфинголипиды* и *сфингомиелины* — являются диэфирами фосфорной кислоты и содержат остатки холина или этаноламина; реже они являются эфирами фосфоновой кислоты. Типичными представителями животных и растительных фосфосфинголипидов являются соединения (38) и (39), соответственно.

25.2.2. АНАЛИЗ ЛИПИДОВ

25.2.2.1. Введение

Ранее можно было исследовать только такие свойства образца липида, как средняя степень ненасыщенности, средняя молекулярная масса входящих в его состав жирных кислот или общее содержание азота, фосфора или серы. В настоящее время анализ липидов проводят на гораздо более высоком техническом уровне, в основном за счет использования различных видов хроматографии и методов избирательного деацилирования.

При исследовании образца липида можно определить (качественно и количественно) природу жирных кислот (или спиртов, или альдегидов), содержащихся во всем исследуемом образце или в его отдельных фракциях. Кроме того, с помощью ферментов можно определить жирные кислоты, содержащиеся в каждом положении триглицерида или фосфоглицерида, и, наконец, путем сочетания хроматографического разделения с ферментативным деацилированием иногда можно идентифицировать индивидуальные соединения.

Анализ осложняется из-за большого числа возможных сочетаний компонентов, входящих в состав молекул липидов. Например, в состав природного сложноэфирного воска входят, как минимум, шесть спиртов и шесть кислот, способных образовывать смесь 36 различных сложных эфиров. Каждая молекула фосфоглицерида содержит две ацильные группы, и, если в состав липида входят 10 жирных кислот, возможно около 100 различных липидиых молекул. С триглицеридами ситуация еще более сложная; число возможных соединений, содержащих остатки n жирных кислот, равно: n^3 с учетом всех изомеров, включая энантиомеры; $(n^3 + n^2)/2$ — без учета оптических изомеров и $(n^3 + 3n^2 + 2n)/6$ — без учета изомеров. Если число остатков жирных кислот составляет 5, 10 или 20, то эти значения равны соответственно: 125, 75, 35; 1000, 550, 220 и 8000, 4200 и 1540. В состав растительных масел входят обычно 5—10 различных жирных кислот; животные жиры часто включают 10—40 жирных кислот.

При изучении жирнокислотного состава липидов получены интересные результаты. Показано, например, что жирные кислоты распределены не статистически: имеется определенная закономерность в присоединении тех или иных ацильных групп к каждой гидроксильной группе.

25.2.2.2. Определение кислот, спиртов и альдегидов [24, 26]

Длинноцепочечные кислоты, спирты или альдегиды, выделяемые из природных липидов, отличаются в основном длиной цепи и степенью ненасыщенности, однако смеси таких соединений могут содержать соединения с разветвленным углеродным скелетом, циклические остатки или дополнительные функциональные группы. После перевода в соответствующие производные такие смеси количественно анализируют методом газовой хроматографии. В случае очень сложных смесей или если требуется более тонкий анализ, газожидкостную хроматографию проводят на нескольких фазах или в сочетании с другими методами разделения, например с хроматографией в присутствии ионов серебра или распределительной хроматографией.

Методом ГЖХ жирные кислоты обычно исследуют в виде метиловых эфиров, спирты — в виде ацетатов, трифторацетатов или триметилсилильных эфиров; 1,2-диолы — в виде бис(триметилсилильных) эфиров, изопропилиденовых производных или *н*-бутилборонатов; 1,3-диолы — в виде *н*-бутилборонатов; альдегиды — в виде диметилацеталей или после превращения в спирты или кислоты; амины — в виде триметилсилильных производных или в виде альдегидов после окисления метаиодатом натрия (схема 2).

$$RCH{=}CHCH(OH)CH(NH_2)CH_2OH \longrightarrow RCH{=}CHCHO \qquad (2)$$

25.2.2.3. Определение липидов [27—29]

Определение типов липидов в смеси и их количественное определение осуществляют в основном методами хроматографии.

Фосфолипиды можно отделить от нейтральных липидов, используя их нерастворимость (особенно в солевой форме) в холодном ацетоне, содержащем небольшое количество хлорида магния. Нерастворимый остаток содержит фосфолипиды (95 %) и следовые количества нейтральных липидов.

Наиболее широко используемым методом является, однако, адсорбционная хроматография (колоночная или тонкослойная) на оксиде кремния или промытом кислотой флорисиле. Для количественной оценки используют гравиметрию или газожидкостную хроматографию входящих в состав анализируемого образца жирных кислот (после введения внутреннего стандарта); при анализе с помощью тонкослойной хроматографии применяют также денситометрию или флуориметрию. Нейтральные липиды элюируют с колонки хлороформом, гликолипиды — ацетоном, фосфолипиды — метанолом. Нейтральные липиды затем разделяют на второй колонке с оксидом кремния: углеводороды элюируют чистым гексаном; сложные эфиры холестерина — гексаном, содержащим 2 % эфира; триацилглицерины — гексаном с 5 % эфира; холестерин и диацилглицерины — гексаном с 15 % эфира; моноацилглицерины — чистым эфиром. Аналогичное разделение возможно методом

тонкослойной хроматографии в системе гексан (70—90 %) — эфир (10—30 %), к которой обычно добавляют муравьиную или уксусную кислоту (1—2 %).

Сложные липиды разделяют на колонке, элюируя смесью хлороформа с возрастающими количествами метанола, или в тонком слое в таких системах растворителей, как хлороформ — метанол — вода (65 : 35 : 5 или 25 : 10 : 1) или в случае растительных липидов диизобутилкетон — уксусная кислота — вода (40 : 25 : 3,7). Смесью хлороформ — метанол кислые и нейтральные сложные липиды элюируются в следующем порядке (в пределах каждой группы липиды элюируются в постоянной последовательности, но области их перекрывания могут варьировать):

кислые липиды: 1) кардиолипин; 2) фосфатидная кислота; 3) сульфат цереброзида; 4) фосфатидилглицерин; 5) фосфатидилсерин; 6) фосфатидилинозит; 7) ди- и трифосфоинозитиды;

нейтральные сложные липиды: 1) церамид; 2) церамидмоногексозид и гликозилдиглицериды; 3) фосфатидилэтаноламин; 4) фосфатидилхолин, лизофосфатидилэтаноламин и церамиддигексозиды; 5) сфингомиелин; 6) лизофосфатидилхолин.

Усовершенствование метода газовой хроматографии сделало возможным отделение более летучих липидов после превращения в соответствующие производные (см. разд. 25.2.2.5).

25.2.2.4. Ферментативное деацилирование липидов [30—32]

(*1*) *Гидролиз с помощью панкреатической липазы* [*33*]

Панкреатическая липаза свиньи промотирует гидролиз остатков жирных кислот, присоединенных к обеим первичным гидроксигруппам глицерина, так что конечным продуктом реакции является 2-*О*-ацилглицерин и жирные кислоты, первоначально находившиеся в положениях 1 и 3 (схема 3). 2-*О*-Ацилглицерины могут быть гидролизованы этим ферментом только после перегруппировки в 1- (или 3)-*О*-ацилглицерин. Эфиры жирных кислот с разветвленным углеродным скелетом или кратными связями по соседству с карбоксильной группой (например, 16 : 1 3*t* и C_{20}- и C_{22}-полиеновые кислоты с кратной связью в положении 4 или 5) гидролизуются медленнее, чем эфиры обычных жирных кислот, а сложные эфиры короткоцепочечных кислот гидролизуются быстрее. Этот метод применим для большинства природных триглицеридов за исключением рыбьего жира, богатого C_{20}—C_{22}-полиеновыми кислотами, и жиров молока, содержащих много короткоцепочечных кислот.

Триацилглицерины $\rightleftarrows$ 1,2- и 2,3-Диацилглицерины + Жирные кислоты $\rightleftarrows$ 2-Ацилглицерины + Жирные кислоты (3)

Гидролиз протекает на 50—60 % в буферном растворе (pH 8,5) при 37 °С в присутствии солей желчных кислот и ионов кальция;

Таблица 25.2.1. Жирнокислотный состав триглицеридов (TG) некоторых растительных и животных жиров и β-моноглицеридов (MG), образующихся при липолизе этих жиров [33а]

Природный источник	Глицерид	Содержание кислоты, %				
		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
Миндаль	TG	7	—	2	70	21
	MG	1	—	0	64	34
Мак	TG	10	—	2	11	76
	MG	1	—	0	9	89
Пальма	TG	44	—	6	39	9
	MG	11	—	2	65	22
Капуста [а]	TG	3	—	2	22	15
	MG	1	—	0	37	37
Свинья	TG	28	3	15	42	9
	MG	72	4	4	12	3
Овца	TG	27	3	27	35	2
	MG	14	5	9	58	6

[а] Обнаружены также кислоты 18:3 (14, 23), 20:1 (15, 0) и 22:1 (28, 1); цифры в скобках означают содержание кислоты (в %) в триглицериде и β-моноглицериде, соответственно.

2-*О*-ацилглицерины выделяют хроматографически, а составляющие их кислоты определяют газожидкостной хроматографией. Природу ацильных групп в положениях 1 и 3 устанавливают сравнением жирнокислотного состава исходных три-*О*-ацилглицеринов и полученных 2-*О*-ацилглицеринов.

Этот ферментативный метод был применен для анализа триглицеридов; было показано, что ацильные группы, присоединенные к вторичной гидроксигруппе, заметно отличаются от групп, присоединенных к первичным гидроксигруппам. Таким методом невозможно различать ацильные группы при С-1 и С-3.

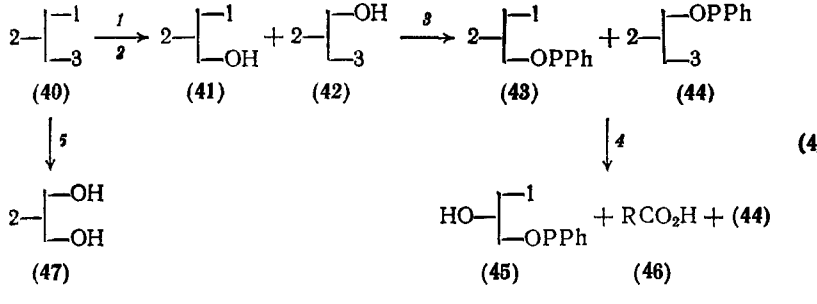
В растительных жирах в положении 2 находится остаток ненасыщенной C_{18}-кислоты, а остатки насыщенных и длинноцепочечных ненасыщенных кислот (20:1, 22:1) находятся в положении 1 и(или) 3 и лишь изредка в положении 2 (см. табл. 25.2.1).

При изучении состава животных жиров и рыбьего жира картина не столь ясна. В молекулах триацилглицеринов жира свиньи и дикого кабана в положении 2 находится, в основном, остаток пальмитиновой кислоты. В жире других животных в положении 2 находятся преимущественно остатки олеиновой или гексадеценовой кислоты, а в положениях 1 и 3 — остатки стеариновой кислоты. У триглицеридов рыбьего жира в положении 2 находятся остатки полиеновых (22:6, 20:5) и насыщенных (14:0, 16:0) кислот, а в положении 1(3) — остатки моноеновых кислот (в частности, 20:1 и 22:1).

(2) Регио- и стереоспецифический анализ триглицеридов [34]

Ряд методов анализа жирных кислот, входящих в состав триглицеридов, разработан Брокерхофом (схема 4).

Триглицериды (40) в течение 1 мин обрабатывают этилмагнийбромидом, который статистически реагирует со сложноэфирными связями. α,β-Диглицериды [1,2(2,3)-диглицериды] (41) и (42) отделяют тонкослойной хроматографией от α,α′-диглицеридов и третичных спиртов и вводят в реакцию с фенилдихлорфосфатом. При этом образуются фосфатидилфенолы (43) и (44); лишь один из них гидролизуется фосфолипазой А и продукт реакции содержит непревращенный фосфатидилфенол (44), свободную кислоту (46), отщепившуюся из положения 2, и лизофосфатидилфенол (45), содержащий ацильный остаток в положении 1. Остаток жирной кислоты в положении 2 определяют также после гидролиза панкреатической липазой. Несмотря на то что этот метод включает две стадии синтеза, две стадии ферментативного гидролиза, две стадии разделения методом тонкослойной хроматографии, пять стадий переэтерификации и пять анализов методом ГЖХ, он дает четкие и надежные результаты. Жирные кислоты, остатки которых содержатся при С-1, определяют при исследовании лизофосфатидилфенола (45), при С-2 — при исследовании 2-*О*-ацилглицерина (47), а при С-3 — путем сравнения жирнокислотного состава соединений (40), (45) и (47) или (44) и (47) (кислоты при С-3 = 3(40) — (45) — (47) или 2(44) — (47), где символами (40), (44), (45) и (47) обозначены жирные кислоты, входящие в состав этих соединений).



PPh = —P(O)OPh; цифрами 1, 2, 3 обозначены ацильные группы в соответствующих положениях *sn*-глицерина; *1* — EtMgBr; *2* — ТСХ; *3* — $PhOP(O)Cl_2$; *4* — фосфолипаза А; *5* — панкреатическая липаза

Результаты, полученные этим и сходными методами, показывают, что в большинстве случаев, хотя и не всегда, смеси природных триглицеридов в каждом положении молекулы глицерина содержат остатки различных жирных кислот. Однако с помощью данных, полученных этим способом, нельзя идентифицировать входящие в эти смеси индивидуальные триглицериды, и их состав

Таблица 25.2.2. Жирнокислотный состав некоторых природных жиров (стереоспецифический анализ) [30]

Природный источник	Положение ацильного остатка	Содержание кислоты, %				Другие кислоты [a]
		16:0	18:0	18:1	18:2	
Растительные масла						
Соя	1	14	6	23	48	18:3 (9, 7, 8)
	2	1	Следы	22	70	
	3	13	6	28	45	
Кокосовый орех	1	34	50	12	1	20:0 (1, 0, 2)
	2	2	2	87	9	
	3	37	53	9	Следы	
Капуста	1	4	2	23	11	18:3 (6, 20, 3); 20:1 (16, 2, 17); 22:1 (35, 4, 51)
	2	1	0	37	36	
	3	4	3	17	4	
Животные жиры						
Человек	1	39	10	33	3	14:0 (4, 11, 1); 16:1 (5, 11, 4)
	2	10	2	50	9	
	3	25	9	51	5	
Свинья	1	16	21	44	12	14:0 (2, 4, следы); 16:1 (3, 4, 3)
	2	59	3	17	8	
	3	2	10	65	24	
Бык	1	41	17	20	4	14:0 (4, 9, 11); 16:1 (6, 6, 6)
	2	17	9	41	5	
	3	22	24	37	6	
Коровье молоко	1	36	15	21	1	4:0 (5, 3, 43); 6:0 (3, 5, 11); 8:0 (1, 2, 2); 10:0 (3, 6, 4); 12:0 (3, 6, 4); 14:0 (11, 20, 7); 16:1 (3, 2, 1)
	2	33	6	14	3	
	3	10	4	15	0	
Цыпленок	1	25	6	33	14	16:1 (12, 7, 12)
	2	15	4	43	23	
	3	24	6	35	14	
Серебристая чайка	1	22	13	41	7	16:1 (4, 3, 5); 20:1 (7, 6, 7); 22:1 (3, 4, 5)
	2	15	9	48	11	
	3	17	7	46	9	
Треска	1	15	6	28	2	14:0 (6, 8, 4); 16:1 (14, 12, 14); 20:1 (12, 7, 17); 22:1 (6, 5, 7); 20:5 (2, 12, 13); 22:5 (1, 3, 1); 22:6 (1, 20, 6)
	2	16	1	9	2	
	3	7	1	23	2	

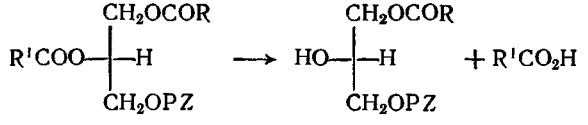
[a] Цифры в скобках означают содержание данной кислоты в положениях 1, 2 и 3, соответственно.

может быть вычислен только при допущении, что ацильные остатки каждого типа распределены в молекуле статистически.

Результаты этих исследований обобщены в работах Брокерхофа [34] и Литчфилда [31]. Некоторые типичные результаты приведены в табл. 25.2.2. На основании этих данных выявлены следующие общие закономерности: 1) более вероятно, что во всех жирах остатки необычных жирных кислот находятся в положении 3; 2) в глицеридах растений остатки насыщенных и длинноцепочечных ненасыщенных кислот находятся в положениях 1 и 3, а насыщенных — в положении 2, остатки необычных кислот (например, уксусной кислоты) обычно находятся в положении 3; 3) во многих животных жирах насыщенные кислоты преимущественно находятся при С-1, короткоцепочечные и ненасыщенные кислоты — при С-2 и длинноцепочечные ненасыщенные кислоты — при С-3. В жире свиньи и родственных животных и в жире рыб, однако, при С-2 содержатся остатки пальмитиновой кислоты. В жире птиц в положениях 1 и 3, по-видимому, находятся остатки таких же жирных кислот; для жиров молока жвачных животных при С-3 характерно наличие короткоцепочечных кислот, а для жиров прочих млекопитающих — остатки полиеновых C_{20}- и C_{22}-кислот.

(3) Стереоспецифический анализ фосфоглицеридов

Фосфолипаза A_2 из змеиного яда избирательно деацилирует практически все фосфоглицериды за исключением полифосфоинозитидов. Природные производные *sn*-3-фосфатидной кислоты превращаются при этом в лизофосфоглицериды с одновременным высвобождением из положения 2 жирной кислоты (схема 5). Анализ образовавшихся соединений дает информацию о природе ацильных остатков в положениях 1 и 2. Показано, что при С-1 находятся, в основном, остатки насыщенных кислот, а при С-2 — ненасыщенных, хотя известны фосфоглицериды только с ненасыщенными или только с насыщенными жирными кислотами. В бактериальных липидах остатки насыщенных циклопропановых кислот, как и их моноеновых предшественников, находятся преимущественно в положении 2.



$PZ = -P(O)OR$, где R — остатки этаноламина, холина и т. д.

На основании результатов гидролиза фосфолипазой можно вычислить состав фосфоглицеридов только при допущении, что ацильные остатки распределены статистически, хотя это не доказано. Некоторые типичные результаты представлены в табл. 25.2.3.

Таблица 25.2.3 Жирнокислотный состав некоторых фосфатидилхолинов (%) [336]

Природный источник	Положение ацильного остатка	Содержание кислоты, %					Другие кислоты [a]
		16:0	18:0	18:1	18:2	20:4	
Лосось	1	37	3	8	—	—	20:5 (14, 17); 22:6 (33, 46)
	2	10	0	23	—	—	
Яйцо	1	61	25	10	2	0	—
	2	5	2	59	26	6	
Печень быка	1	19	46	19	3	2	22:1 (12, 15); 22:4 (1, 7); 22:5 (2, 10); 22:6 (0, 6)
	2	1	0	17	16	18	
Коровье молоко	1	47	20	23	3	—	14:0 (0, 5)
	2	35	3	32	11	—	
Сыворотка крови человека	1	66	26	6	1	0	20:3 (0, 5); 22:6 (0, 6)
	2	3	0	22	47	12	

[a] Цифры в скобках означают содержание данной кислоты в положениях 1 и 2, соответственно.

25.2.2.5. Выделение индивидуальных липидов [30, 31, 35—38]

Этот раздел посвящен выделению индивидуальных липидов или получению достаточно простых смесей, анализ которых дает достоверные результаты. Хорошие результаты получают при разделении триглицеридов тонкослойной хроматографией в присутствии ионов серебра, тонкослойной распределительной хроматографией и газожидкостной хроматографией. Аналогично можно анализировать сложноэфирные воска, моно- и диглицериды, а также фосфоглицериды.

Хроматография на силикагеле, импрегнированном нитратом серебра, которая позволяет разделять соединения по степени их ненасыщенности, может быть успешно применена для разделения триглицеридов и диглицеридов (после ацетилирования). Распределительная обращенно-фазовая хроматография позволяет разделять триглицериды в соответствии с их коэффициентами распределения. Дополнительная двойная связь оказывает действие, приблизительно равное удалению двух атомов углерода из молекулы; так, например, три-*О*-пальмитоилглицерин и три-*О*-олеоилглицерин ведут себя одинаково. Распределительную хроматографию проводят на бумаге или в тонком слое, используя в качестве неполярной стационарной фазы углеводород или силиконовое масло, а в качестве подвижной фазы — смесь ацетона с ацетонитрилом, метанолом или уксусной кислотой.

Глицериды, содержащие до 90 атомов углерода, могут быть разделены газожидкостной хроматографией на короткой колонке (длиной 15 см) с низким содержанием (1—3 %) неполярной стационарной фазы, например метилсилоксанов SE-30, JXR или OV-1,

обычно с программированным изменением температуры в интервале 250—350 °С. В этих условиях ненасыщенные глицериды не отделяются от их насыщенных аналогов, но можно легко разделить глицериды, различающиеся на два углеродных атома. Иногда удается даже разделить глицериды, различающиеся всего на один атом углерода. Новые жидкие силоксановые фазы с повышенной полярностью и умеренной термостабильностью позволяют разделять смеси нейтральных липидов по их молекулярной массе и степени ненасыщенности.

Такие методы могут успешно применяться для разделения сложных эфиров холестерина, моно- и диглицеридов после превращения в соответствующие производные, триглицеридов, сложноэфирных восков, а также фосфоглицеридов, гликозилдиглицеридов и сфинголипидов после соответствующей модификации. Рекомендуется предварительно разделять α- и β-моноглицериды, а также α,β- и α,α′-диглицериды на оксиде кремния, импрегнированном борной кислотой.

Частично ацилированные глицериды до хроматографического разделения должны быть превращены в менее полярные и более устойчивые производные. Для разделения в тонком слое используют главным образом ацетаты, для газовой хроматографии — триметилсилильные эфиры. Ацетилдиацилглицерины при хроматографии в присутствии ионов серебра элюируются в следующем порядке: $00 > 01 > 11 > 02 > 12 > 22 > 03 > 13 > 04 > 14 > 24 > 05 > 06$ (две цифры означают число двойных связей в двух длинных ацильных группах).

Триглицериды, содержащие остатки необычных кислот, например триацилглицерины, входящие в состав жира молока и содержащие остатки короткоцепочечных кислот, или триацилглицерины растительных масел, содержащие менее распространенные оксигенированные кислоты, могут иногда быть отделены тонкослойной хроматографией на оксиде кремния, однако разделение лучше проводить в присутствии ионов серебра; последний способ был успешно использован для разделения глицеридов растительных масел с ацильными группами, содержащими 0—9 двойных связей, и глицеридов жира рыб с ацильными группами, содержащими 0—6 двойных связей. Порядок элюирования компонентов масел из семян (содержащих в основном остатки C_{18}-кислоты) следующий (три цифры означают число двойных связей в каждом из трех ацильных радикалов): $000 > 001 > 011 > 002 > 111 > 012 > 112 > 022 > 003 > 122 > 013 > 113 > 222 > 023 > 123 > 223 > 033 > 133 > 233 > 333$.

В табл. 25.2.4 и 25.2.5 приведены результаты разделения триглицеридов хроматографией в присутствии ионов серебра с последующим анализом методом ГЖХ сложноэфирных компонентов каждой полученной фракции.

Для проведения анализа указанными методами фосфоглицериды предварительно превращают в ацетилдиацилглицерины или

Таблица 25.2.4. Глицеридный состав растительных масел (по данным хроматографии в присутствии ионов серебра) [38а]

Источник	Содержание триглицерида, %										
	322 [а]	321	320	222	221	220	211	210	200	111	110
Соя [б]	7	5	4	15	16	13	8	12	4	2	5
Арахис [в]	—	—	—	—	5	—	23	14	4	26	23

[а] Обозначение 322 относится ко всем триглицеридам, содержащим один остаток линоленовой кислоты (3 — три двойные связи) и два остатка линолевой кислоты (2 — две двойные связи). Остальные сочетания из трех цифр интерпретируются сходным образом. [б] Содержит также глицериды 332 (1%), 320 (1%), 311 (2%), 310 (3%), 300 (2%). [в] Содержит также глицерид 100 (5%).

Таблица 25.2.5. Распределение триацилглицеринов с различным числом атомов углерода и различной степенью ненасыщенности для резервного жира овцы [30]

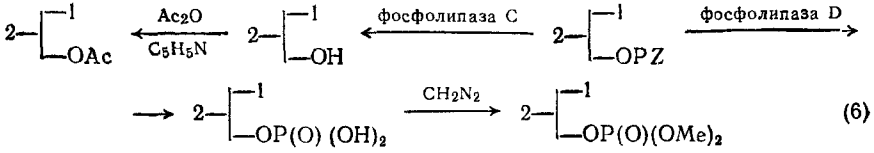
Число атомов углерода [а]	Содержание триглицеридов в смеси, %					Общее содержание, %
	насыщенные	моноеновые	диеновые	триеновые	тетраеновые	
44	1,7	0,3	—	—	—	0,4
46	6,7	1,3	0,2	0,3	1,0	2,3
48	17,6	6,5	1,3	2,3	2,9	7,5
50	29,5	21,3	8,7	7,8	11,2	18,5
52	29,8	38,7	41,3	30,5	33,1	37,5
54	14,3	31,1	47,9	57,7	49,9	32,9
56	0,2	0,6	0,6	1,4	1,9	0,8
Общее содержание	31,3	45,8	19,4	2,6	0,8	~ 100

[а] Общее число атомов углерода в трех ацильных остатках (не включая углеродные атомы глицерина).

Таблица 25.2.6. Сравнение основных фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов из печени крысы [30]

Ацильные остатки в положениях		Содержание липидов в смеси, %	
1	2	фосфатидилхолины	фосфатидилэтаноламины
16 : 0	18 : 1	6,4	0,9
16 : 0	18 : 2	15,7	7,2
18 : 0	18 : 2	9,0	5,3
16 : 0	20 : 4	18,9	14,2
18 : 0	20 : 4	20,9	35,0
18 : 1	20 : 4	3,6	4,1
16 : 0	22 : 6	4,8	12,4
18 : 0	22 : 6	5,6	8,8

диметилфосфатидные кислоты (схема 6). Результаты одного из таких анализов приведены в табл. 25.2.6.



(6)

Легко доступных ферментов, способных превращать гликозилдиацилглицерины в диацилглицерины, нет. Поэтому гликозилдиацилглицерины хроматографируют в присутствии ионов серебра в нативной форме или после ацетилирования, а триметилсилильные эфиры этих соединений разделяют методом газожидкостной хроматографии.

Сфингомиелины, содержащие остатки 2-гидроксикислот, легко отделяются от сфингомиелинов, не содержащих 2-гидроксикислот, хроматографией на оксиде кремния. Сфинголипиды с помощью фосфолипазы С превращают в церамиды, которые далее разделяют по числу содержащихся в молекуле гидроксигрупп (2, 3 или 4) на силикагеле, импрегнированном арсенитом натрия. Церамиды могут быть разделены после их ацетилирования тонкослойной хроматографией в присутствии ионов серебра или газожидкостной хроматографией в виде ацетатов или триметилсилильных эфиров.

25.2.3. СИНТЕЗ ЛИПИДОВ

Природные липиды обычно являются смесями, и выделение чистых индивидуальных соединений — задача трудная, поэтому чистые липиды часто получают химическим путем.

25.2.3.1. Синтез моно-, ди- и триглицеридов [39, 40]

(1) Введение

Положения ацильных групп, присоединенных к глицерину, обозначены далее цифрами 1, 2 и 3; в тех случаях, когда нет обозначения *sn* (см. разд. 25.2.1.1), речь идет о рацемических соединениях.

Наибольшие затруднения при синтезе чистых глицеридов связаны с легкостью миграции ацильного остатка в моно- и диглицеридах к соседней свободной гидроксигруппе путем переэтерификации, катализируемой кислотой или основанием или вызываемой нагреванием. Как α-, так и β-моноглицериды легко образуют рацемическую смесь, содержащую 10 % β-моноглицерида, а α,β- и α,α′-диглицериды — смесь, содержащую 60—80 % α,α′-диглицерида.

Ди- и триглицериды, содержащие более одного типа ацильных групп, можно синтезировать, защитив соответствующую гидрокси-

группу таким образом, чтобы защитную группировку можно было удалить в условиях, не вызывающих ацильной миграции. При использовании методов, основанных на большей реакционной способности первичной гидроксигруппы по сравнению со вторичной, введение защитной группировки не обязательно.

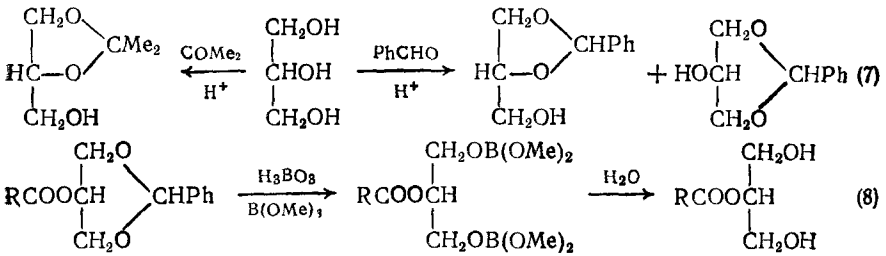
Индивидуальные соединения обычно очищают кристаллизацией или хроматографически. Степень чистоты синтетического глицерида может быть определена методом газожидкостной хроматографии входящих в его состав кислот, тонкослойной хроматографии и ферментативно (см. разд. 25.2.2.4).

(2) Ацилирование

Ацилирование обычно проводят в среде хлороформа небольшим избытком ацилгалогенида и эквивалентным количеством пиридина или другого третичного основания. Ацилхлориды получают реакцией с избытком тионилхлорида (в случае насыщенных кислот) или оксалилхлорида (в случае ненасыщенных кислот).

(3) Защитные группы

В присутствии кислотного катализатора (*п*-толуолсульфокислоты) глицерин реагирует с ацетоном, образуя 1,2-ацеталь, и с бензальдегидом, образуя смесь 1,2- и 1,3-ацеталей, которые могут быть разделены кристаллизацией (схема 7). Эти защитные группы после ацилирования легко удаляются при обработке разбавленной кислотой, что, однако, может вызывать ацильную миграцию. Бензилиденовая группировка может быть удалена также гидрогенолизом, однако это возможно лишь при наличии насыщенной ацильной группы. Эти трудности можно обойти путем мягкой обработки ацеталя борной кислотой в триметил- или триэтилборате; при этом образуется эфир борной кислоты, легко гидролизуемый водой при комнатной температуре (схема 8).



1- и 2-*О*-Бензилглицерины получают бензилированием 1,2-*О*-изопропилиденглицерина и 1,3-*О*-бензилиденглицерина, соответственно, с последующим удалением ацетальной защитной группы. Бензильную группу можно затем удалить гидрогенолизом.

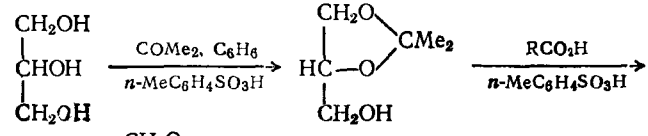
Обработка глицерина тритилхлоридом и пиридином при комнатной температуре приводит к 1-*О*-тритил- и 1,3-ди-*О*-тритилгли-

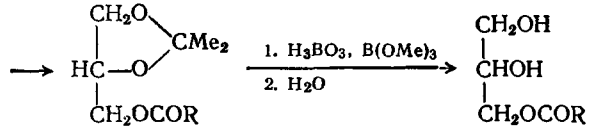
церинам. Тритильная группа может быть удалена обработкой бромоводородом в уксусной кислоте или хлороводородом в эфире или петролейном эфире, гидрогенолизом или пропусканием через колонку с влажным оксидом кремния.

Карбонат глицерина, который получают реакцией с фосгеном, разлагают мягким щелочным гидролизом; 2,2,2-трихлорэтоксикарбонильную защитную группу удаляют цинком в уксусной кислоте.

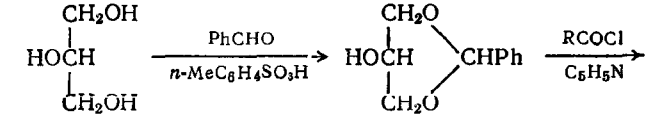
(4) Получение 1- и 2-О-ацилглицеринов

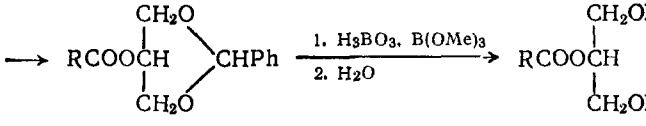
Эти соединения получают из 1,2-*О*-изопропилиденглицерина (схема 9) или 1,3-*О*-бензилиденглицерина (схема 10), соответственно.





(9)

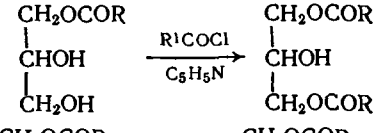




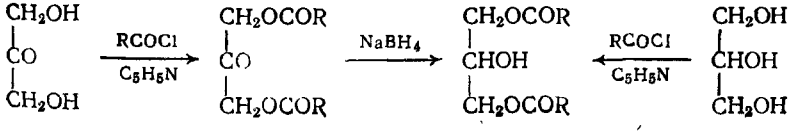
(10)

(5) Получение 1,3-диглицеридов

1,3-Ди-*О*-ацилглицерины синтезируют прямым ацилированием соответствующего 1-*О*-ацилглицерина, из дигидроксиацетона или прямым ацилированием глицерина (схемы 11, 12). Последний метод основан на большей реакционной способности первичных гидроксигрупп и легкости очистки продукта реакции кристаллизацией.



(11)

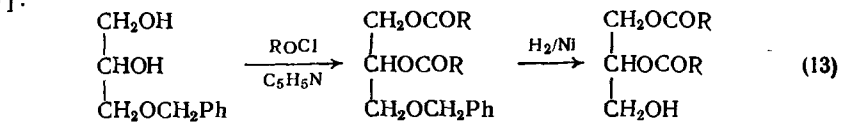


(12)

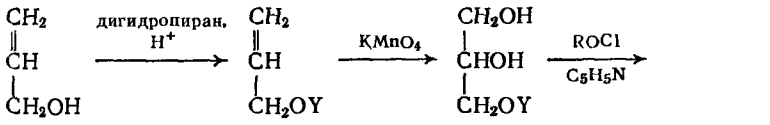
(6) Получение 1,2-ди-О-ацилглицеринов

Эти соединения труднее получить, чем 1,3-изомеры, так как они быстро подвергаются ацильной миграции и не так легко кристаллизуются.

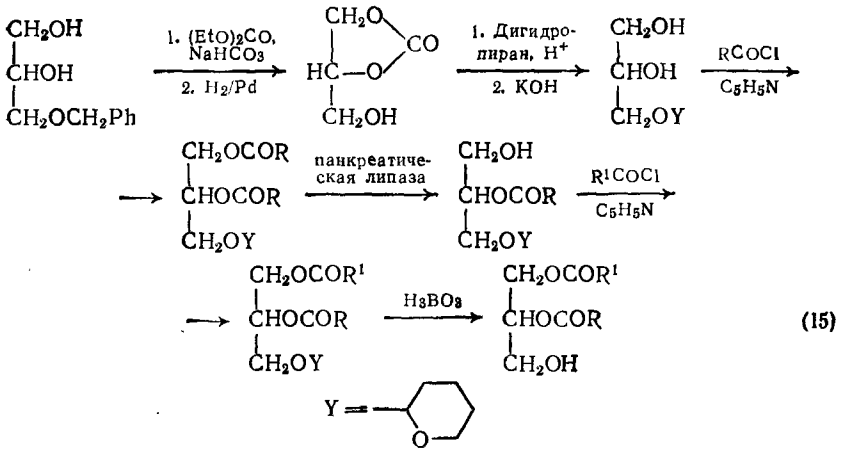
Путь через 1-*О*-бензилглицерин (схема 13) пригоден для синтеза насыщенных соединений. В альтернативных схемах синтеза используют тетрагидропиранильный эфир глицерина, получаемый из аллилового спирта (схема 14) или глицеро-1,2-карбоната (схема 15). При этом обычно образуются однокислотные диэфиры, однако ацильная группа в положении 1 может быть удалена обработкой панкреатической липазой и вместо нее может быть введен остаток требуемой кислоты (см. схему 15). Другие методы получения 1,2-ди-*О*-ацилглицеринов приведены ниже [см. разд. 25.2.3.1 (8)].



(13)



(14)



(15)

(7) Получение триглицеридов

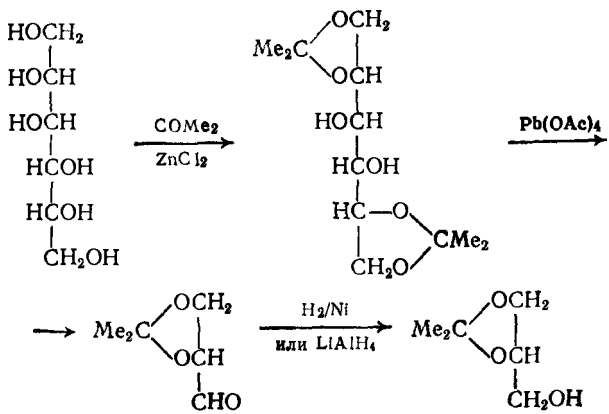
Однокислотные триглицериды могут быть легко получены прямым ацилированием глицерина свободными кислотами, их анги-

дридами или хлорангидридами. Разнокислотные триглицериды получают методами, аналогичными описанным для моно- и диацилглицеринов. Триглицериды с двумя типами ацильных групп обычно синтезируют ацилированием 1- или 2-*О*-ацилглицеринов избытком ангидрида или хлорангидрида кислоты или (если возможно) ацилированием 1,3-ди-*О*-ацилглицерина. Триглицериды с тремя различными ацильными группами получают ацилированием соответствующего 1,3-ди-*О*-ацилглицерина.

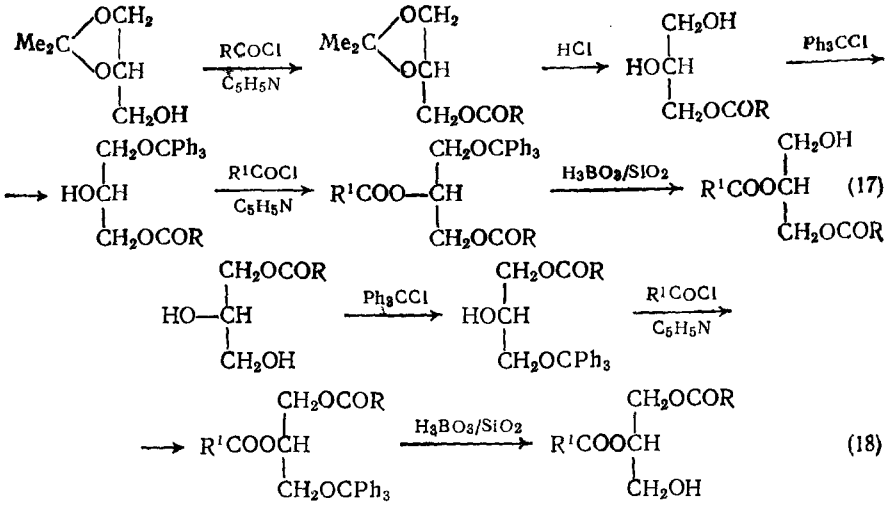
(8) Получение оптически активных глицеридов

Описанные выше методы позволяют получать только рацемические глицериды; синтез энантиомерных производных глицерина требует специальных методов. В реакциях, приводящих к энантиомерным триацилглицеринам с остатками длинноцепочечных жирных кислот, обычно образуются продукты, практически не обладающие оптическим вращением, поэтому их стереохимическую чистоту определяют другими способами, например ферментативным гидролизом (см. разд. 25.2.2.4) или спектроскопией ЯМР.

Синтез энантиомерных глицеридов основан на получении 1,2-*О*-изопропилиден-*sn*-глицерина из *D*-(+)-маннита (схема 16) или, если необходимо, на получении 2,3-*О*-изопропилиден-*sn*-глицерина из менее доступного *L*-(—)-маннита. Из этих энантиомерных производных глицерина получают соответствующие глицериды, используя методы, разработанные для рацемических соединений. Так, из 1,2-*О*-изопропилиден-*sn*-глицерина получают 2,3-ди-*О*-ацил-*sn*-глицерин (схема 17). Особый интерес представляет синтез 1,2-ди-*О*-ацил-*sn*-глицеринов (схема 18), так как эти соединения необходимы для получения соединений, идентичных природным фосфоглицеридам (см. разд. 25.2.3.2); исходный 1-*О*-ацил-*sn*-глицерин может быть легко получен из 2,3-изопропилиден-*sn*-глицерина или, несколько более длинным путем, из 1,2-*О*-изопропилиден-*sn*-глицерина.



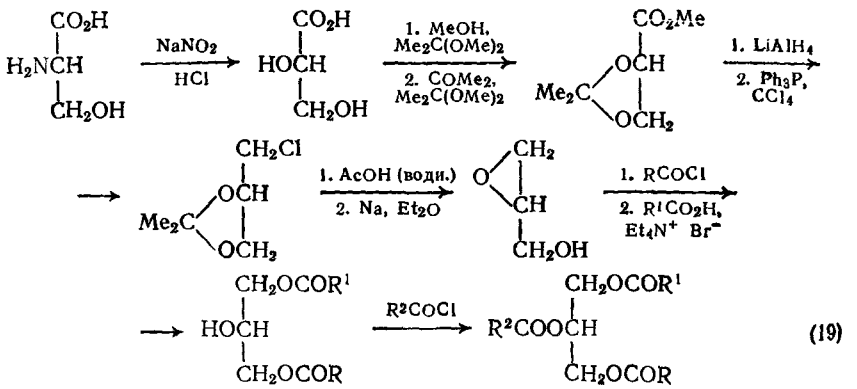
(16)



(17)

(18)

Для синтеза хиральных глицеридов используют также метод, основанный на получении *D*- или *L*-глицидола (2,3-эпоксипропанола) из *L*- или *D*-серина (2-амино-3-гидроксипропановой кислоты); преимуществом метода является легкая доступность исходных соединений [41]. Так, из *L*-серина получают 1,3-ди-*O*-ацил- и 1,2,3-три-*O*-ацил-*sn*-глицерины (схема 19).



(19)

25.2.3.2. Синтез эфиров фосфатидной кислоты

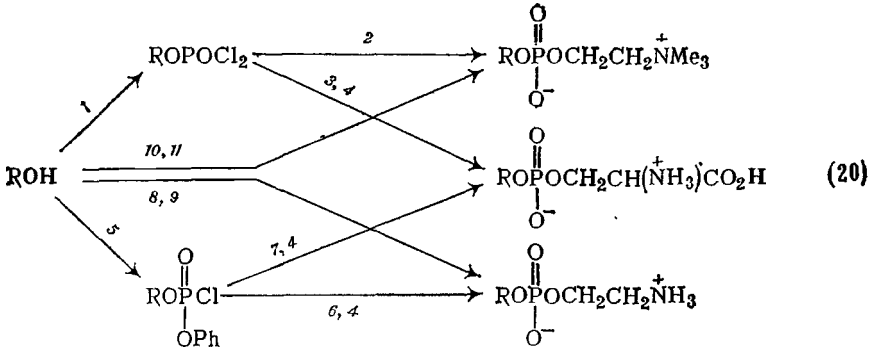
(1) Введение

Эфиры фосфатидной кислоты содержат четыре сложноэфирные связи и выбор способа получения зависит от порядка расположения этих связей. В качестве исходных соединений обычно используют 1,2-диацилглицерины или соответствующие иоддезоксисоединения, глицерофосфатидилхолин и родственные ему соединения

(GPZ) или фосфатидную кислоту. В реакциях по гидроксигруппе в остатке Z дополнительные функциональные группы (амино- и карбоксигруппу) защищают. Исходя из соответствующих энантиомеров могут быть получены оптически активные соединения; наиболее простой путь получения разнокислотных фосфатидиловых эфиров часто включает ферментативное деацилирование и повторное химическое ацилирование. Продукты реакции очищают кристаллизацией и(или) колоночной хроматографией; степень их чистоты устанавливают тонкослойной хроматографией, гидролизом фосфолипазой А, определением общего состава жирных кислот, удельного вращения и отношения содержания фосфора и азота.

(2) Получение из 1,2-ди-О-ацилглицеринов

1,2-Диацилглицерины превращают в эфиры фосфатидной кислоты обработкой фосфорилхлоридом или фенилдихлорфосфатом и последующей реакцией с хлоридом или иодидом холина или соответствующим образом защищенным этаноламином или серином. Защитные группы затем удаляют, часто гидрогенолизом, однако при наличии ненасыщенных ацильных остатков этот метод непригоден. Альтернативный подход включает непосредственную реакцию диацилглицерина с соответствующим фосфатным производным (схема 20).



(20)

ROH = 1,2-диацилглицерин; *1*–$POCl_3$; *2*–$HOCH_2CH_2\overset{+}{N}Me_3\ Cl^-$;
3–$HOCH_2CH(NHCO_2CH_2Ph)CO_2Bu$-*трет*; *4*–$H_2$, Pd; *5*–$PhOPOCl_2$;
6–$HOCH_2CH_2NHCO_2CH_2Ph$; *7*–$HOCH_2CH(NHCO_2CH_2Ph)CO_2CH_2Ph$;
8–$Cl_2OPOCH_2CH_2N(CO)_2C_6H_4$; *9*–$N_2H_4$; *10*–$Cl_2OPOCH_2CH_2Br$; *11*–$\overset{+}{N}Me_3$

(3) Получение из 1,2-ди-О-ацил-3-иод-3-дезоксиглицерина

Такое иодпроизводное, легко образующееся из глицерина через *п*-толуолсульфонат, является лучшим исходным веществом, чем гидроксисоединение, и при реакции с солями серебра превращается после соответствующей обработки в фосфодиэфир. Так, реакция

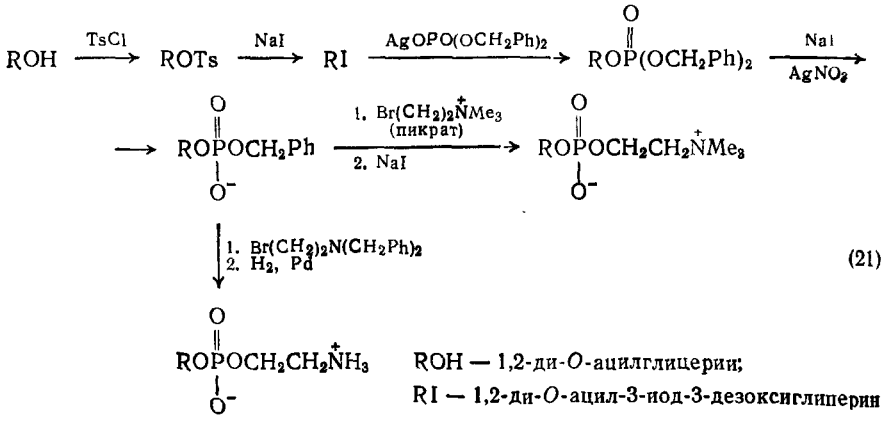
с $AgOP(O)(OCH_2Ph)_2$ приводит к фосфатидилэтаноламину или фосфатидилхолину (схема 21). Для синтеза фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и фосфатидилинозита используют соответственно следующие соли:

$AgOP(O)(OCH_2C_6H_4NO_2\text{-}n)O(CH_2)_2Cl$

$AgOP(O)(OY)O(CH_2)_2NHX$ [Y = Bu-*трет*, Ph, CH_2Ph;
X = $(CO)_2C_6H_4$, CO_2CH_2Ph, CPh_3]

$AgOP(O)(OY)OCH_2CH(NHCO_2Bu\text{-}трет)CO_2Bu\text{-}трет$

$AgOP(O)(OY)OPh$ (Y = остаток 1,3,4,5,6-пентаацетилмиоинозита)



(21)

(4) Ацилирование глицерофосфохолина и родственных соединений

Глицерофосфохолин может быть получен из фосфатидилхолина, выделенного из яичного желтка, деацилированием тетрабутиламмонийгидроксидом. Затем глицерофосфохолин или его комплекс с хлоридом кадмия ацилируют при 80 °С в течение 4 ч смесью ангидрида соответствующей кислоты и ее калиевой соли.

Менее распространенный в природных источниках глицерофосфоэтаноламин был выделен из фосфолипидов сои и яичного желтка. Перед ацилированием его аминогруппу защищают фталоильной или тритильной группировками. Защищенные формы глицерофосфоэтаноламина и глицерофосфосерина синтезируют реакцией 1,2-изопропилиден-*sn*-глицерина с фосфорилхлоридом и далее с защищенным спиртом (см. схему 20).

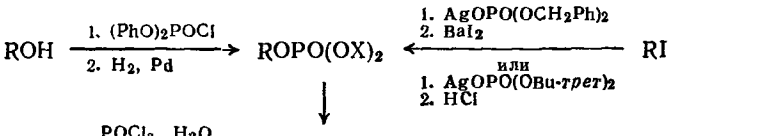
(5) Получение фосфатидных кислот и их эфиров

Фосфатидные кислоты, полученные из диацилглицеринов или иоддезоксисоединений (схема 22), превращают в фосфодиэфиры реакцией с соответствующими спиртами в присутствии 2,4,6-трииз-

пропилбензолсульфонилхлорида. Так, фосфатидихолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидил-*N*-метил- и -*N*,*N*-диметилэтаноламины и фосфатидилсерин образуются соответственно при взаимодействии со спиртами:

$HOCH_2CH_2\overset{+}{N}Me_3\ \bar{O}Ac$, $HOCH_2CH_2NHCPh_3$, $HOCH_2CH_2N(Me)CO_2CH_2Ph$, $HOCH_2CH_2NMe_2$, $HOCH_2CH(NHCO_2CH_2Ph)CO_2CH_2Ph$

При необходимости защитную группу удаляют гидрогенолизом.



(22)

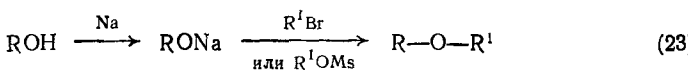
ROH — ди-*O*-ацилглицерин, RI — его иоддезоксипроизводное

(6) Получение фосфонатных аналогов

Для получения фосфонатов применяют сходные методы, используя соответствующие производные фосфоновой кислоты, например $Cl_2P(O)CH_2CH_2N(CO)_2C_6H_4$.

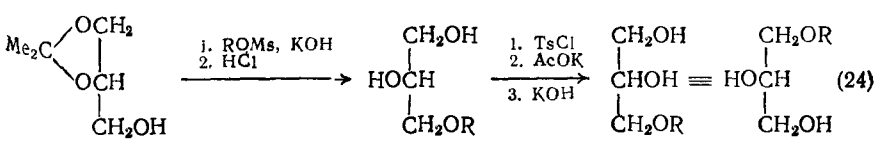
25.2.3.3. Синтез липидов с простой эфирной связью [45]

Липиды алкильного типа обычно получают реакцией глицерина или его соответствующим образом защищенного производного (ROH) с алкилбромидом или алкилметансульфонатом в присутствии натрия или калия (схема 23). Эту реакцию в сочетании с ацилированием и фосфорилированием используют для получения алкилацилглицеринов и алкилацилфосфоглицеридов.



(23)

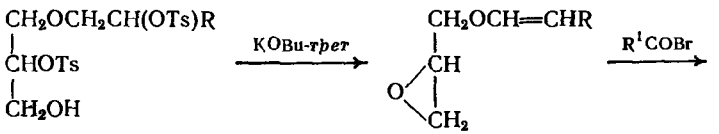
1-*O*-Алкил-*sn*-глицерин получают из 1,2-*O*-изопропилиденглицерина. Легкодоступный 1,2-*O*-изопропилиденглицерин может быть превращен в 3-*O*-алкил-*sn*-глицерин (48). Изомерный 1-*O*-алкил-*sn*-глицерин (49) можно получить из менее доступного ацеталя или из 3-*O*-алкил-*sn*-глицерина путем вальденовского обращения с помощью реакций, приведенных на схеме (24). 2-*O*-Алкилглицерины получают из 1,3-*O*-бензилиденглицерина.

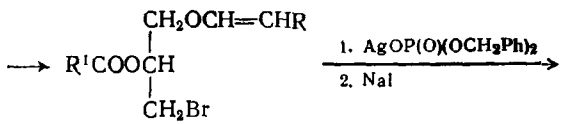


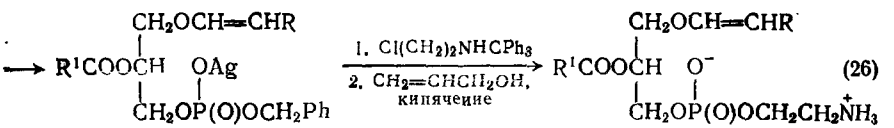
(24)

Синтез алкен-1-иловых простых эфиров обычно включает отщепление фрагмента HX (X = OEt, OTs, Cl, I) из 1- или 2-замещенного простого эфира (схема 25). Продуктом реакции является смесь *цис*- и *транс*-изомеров, которые разделяют хроматографией в присутствии ионов серебра. Природные соединения имеют *цис*-конфигурацию двойной связи. В качестве типичного примера приведен синтез 1-*O*-(*цис*-гексадецен-1′-ил)-2-*O*-стеароил-*sn*-глицерофосфоэтаноламина (схема 26).

$$ROCHXCH_2R^1 \longrightarrow ROCH{=}CHR^1 \longleftarrow ROCH_2CHXR^1 \qquad (25)$$







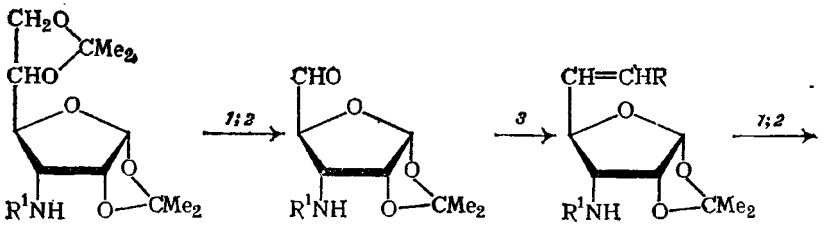
(26)

25.2.3.4. Синтез сфинголипидов [46]

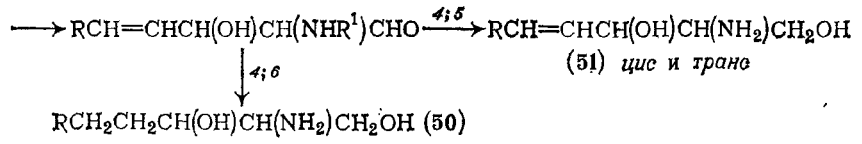
Полный синтез сфинголипидов включает получение длинноцепочечного основания, его *N*-ацилирование и присоединение к первичной гидроксигруппе остатка требуемого сахара или фосфата с образованием глико- или фосфосфинголипида.

(1) транс-4-Сфингенин и родственные соединения

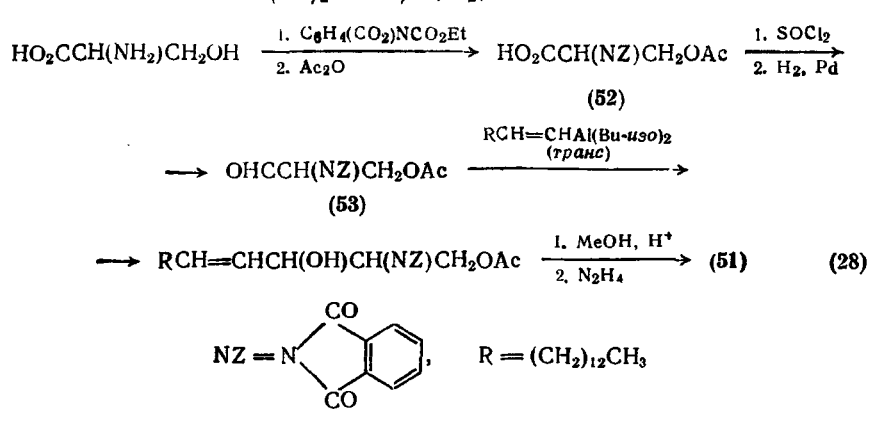
Сфинганин (**50**) и его 4-*цис*- и 4-*транс*-ненасыщенные производные (**51**) получают исходя из производного сахара с подходящей стереохимией (схема 27). *L*-Серин также может служить исходным соединением для получения *D*-*трео*-сфинганина (**50**) и *D*-*эритро*-*транс*-4-сфингенина (**51**) (схемы 28, 29). Успех синтеза зависит от стереоспецифичной реакции кетона (**54**) с $LiAlH(OBu\text{-}трет)_3$ или реакции альдегида (**53**) с диизобутил(пентадецен-2-ил)алюминием.



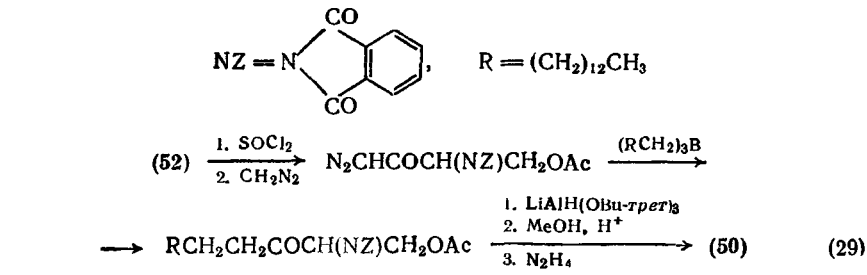
R^1 = Ac или $PhCH_2OCO$ (27)



1-води. AcOH; *2*-$NaIO_4$; *3*-$RCH_2\overset{+}{P}Ph_3\ \overline{Br}$ (R = $C_{13}H_{27}$), PhLi; *4*-$NaBH_4$; *5*-$Ba(OH)_2$; *6*-Pd/C, H_2, AcOH



(28)

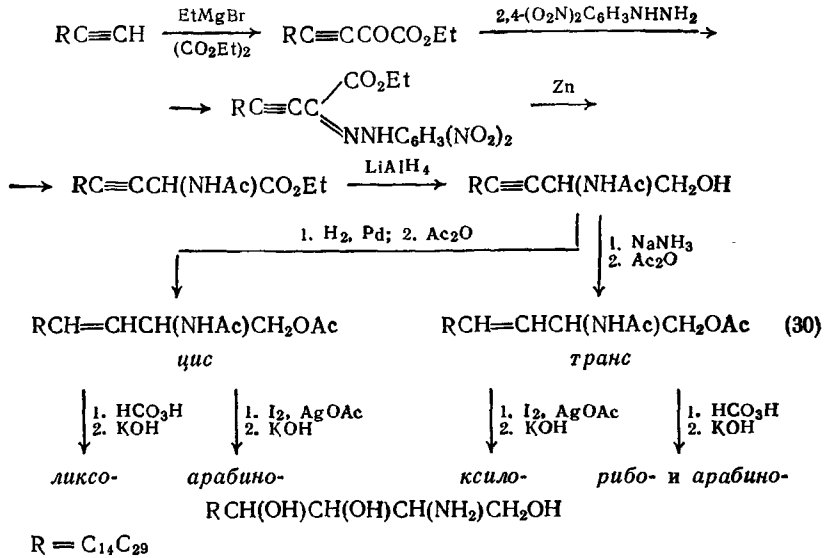


(29)

(2) *4-Гидроксисфинганин*

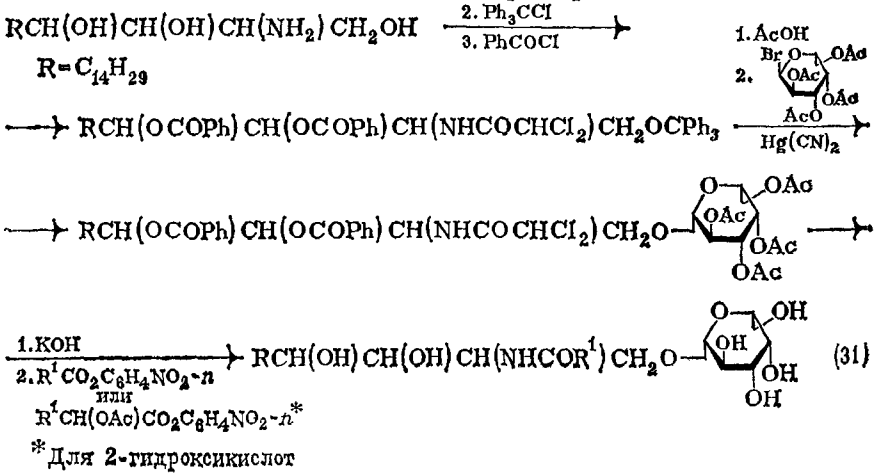
Синтез рацематов четырех изомеров 4-гидроксисфинганина из 2-ацетиламинооктадецин-3-ола (схема 30) основан на стереоспецифичном гидроксилировании *цис*- и *транс*-алкенов, образующихся при частичном восстановлении тройной связи. В каждом случае продуктом реакции должна быть смесь двух рацематов, однако образуется лишь один; это объясняется влиянием стерических

факторов в процессе гидроксилирования, а также различной растворимостью рацематов при выделении.

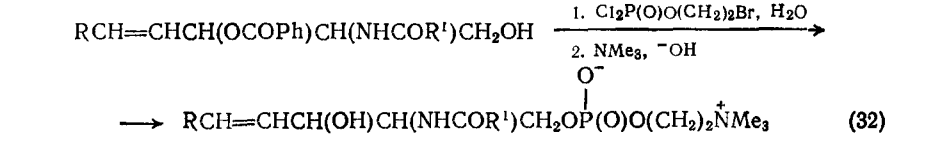


(3) Глико- и фосфосфинголипиды

Синтез гликосфинголипида был осуществлен исходя из природного 4-гидроксисфинганина (схема 31). После защиты вторичной гидроксигруппы к первичной гидроксигруппе присоединяют соответствующее производное галактозы и в итоге получают галактозилцерамид — производное 4-гидроксисфинганина.



Фосфосфинголипиды получают из церамидов [с защищенным вторичным гидроксилом (или гидроксилами)] обработкой соответствующим фосфорилирующим реагентом. Так, из синтетического рацемата был получен церамидфосфохолин (схема 32).



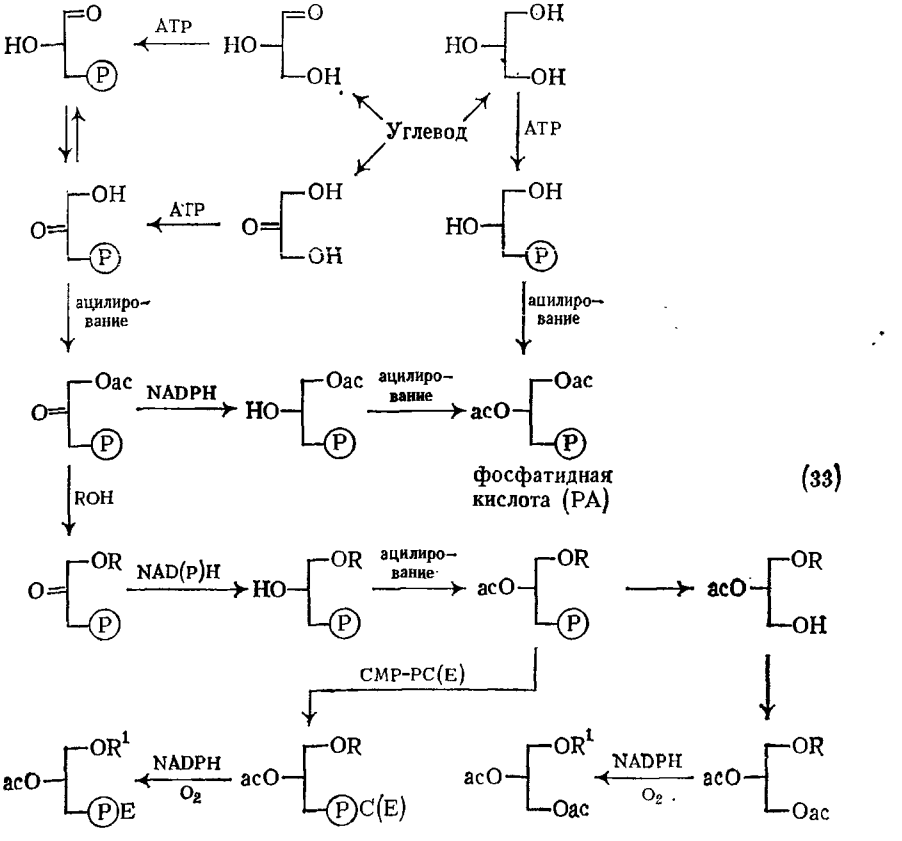
(32)

$R = C_{13}H_{27}$; R^1CO = остаток карбоновой кислоты или ее 2-ацетоксипроизводного

25.2.4. БИОСИНТЕЗ ЛИПИДОВ

25.2.4.1. Введение [47—49]

В разных биологических системах биосинтез липидов протекает различными путями (схемы 33, 33а). Прежде чем переходить к



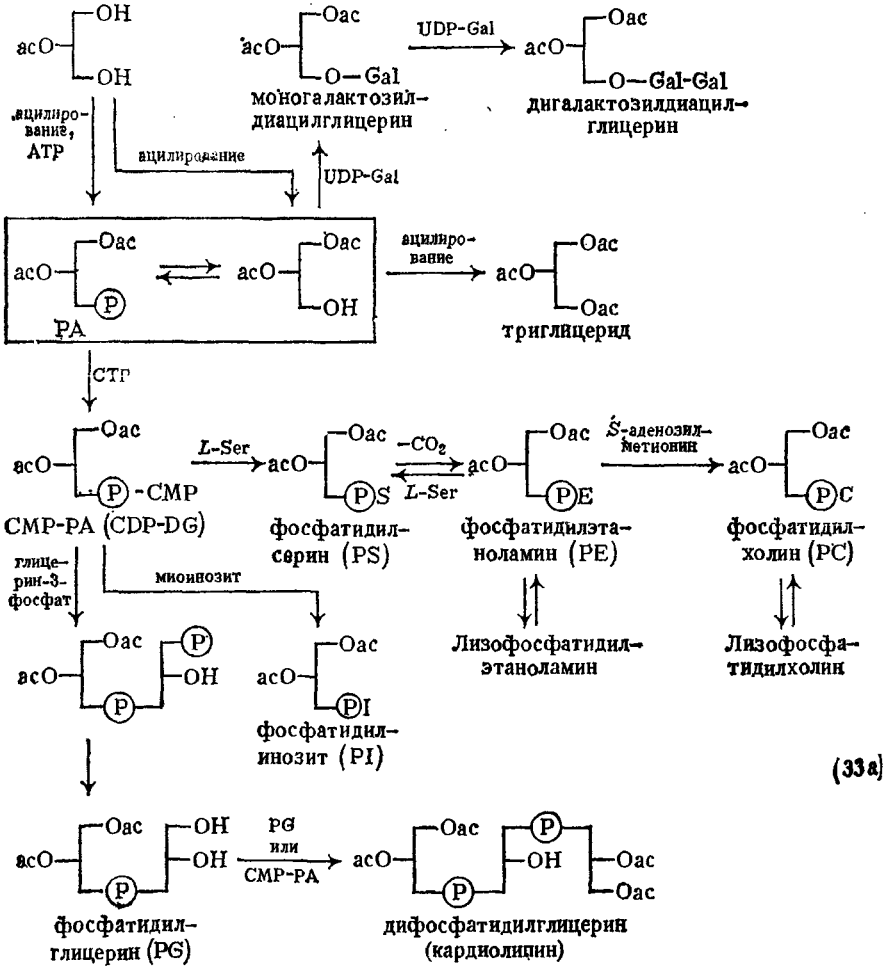
(33)

ATP–аденозинтрифосфат; ac–ацил; CMP–цитидиннмонофосфат

обсуждению биосинтеза различных классов липидов, можно сделать несколько обобщений.

1) Углеродные атомы глицерина, присутствующие во всех липидах, за исключением восков и сфинголипидов, происходят из глицерина (пропантриола-1,2,3), глицеральдегида (2,3-дигидроксипропаналя) или дигидроксиацетона (1,3-дигидроксипропанона-2), образующихся в процессе метаболизма углеводов.

2) Биосинтез каждого липида может осуществляться несколькими путями, и в конкретной биологической системе реализуется по крайней мере один из таких способов.



UDP-Gal—уридиндифосфатгалактоза; CTP—цитидинтрифосфат

3) За исключением липидов с простой эфирной связью все глицеролипиды образуются из фосфатидных кислот или диацилглицеринов, причем эти соединения способны превращаться друг в друга.

4) Структурные звенья, подлежащие присоединению к фосфатидным кислотам или диацилглицеринам, участвуют в биосинтезе в модифицированном виде (связаны с нуклеотидом, например цитидин- или уридинфосфатом).

5) Ацилирование производится кислотой, присоединенной к коферменту А (KoASH), или с помощью некоторых других ферментных систем (схема 34).

$$RCO_2H + KoASH + ATP \longrightarrow RCOSKoA + ADP + H_3PO_4 \qquad (34)$$

6) В молекулах большинства липидов с каждой гидроксигруппой связаны остатки разных жирных кислот (см. разд. 25.2.2.4), и липиды, выделенные из одного и того же источника, часто резко различаются по жирнокислотному составу. Такое различие может объясняться: а) избирательностью действия фермента по отношению к кислоте, используемой для ацилирования, или к субстрату, подлежащему ацилированию; б) избирательностью по отношению к кислоте, вступающей в процесс ацилирования, в зависимости от состава пула жирных кислот; в) химической модификацией ацильной группы в первоначально образующемся липиде; реакция может быть специфичной по отношению к определенной ацильной группе, месту присоединения ацильной группы в молекуле липида и природе полярной головки (наиболее известным примером может служить превращение алкенильной группы в циклопропановую систему под действием *S*-аденозилметионина, которое наблюдается только в случае определенных алкенильных цепей в положении 1 фосфатидилэтаноламина); г) модификацией остатков жирных кислот в первоначально образующемся липиде путем переацилирования, которое может быть специфично по отношению к входящей или уходящей ацильной группе, замещаемому положению и природе полярной головки липида.

25.2.4.2. Биосиитез фосфатидных кислот и диглицеридов

Фосфатидные кислоты и 1,2-ди-*O*-ацил-*sn*-глицериины являются промежуточными соединениями при биосинтезе всех глицеролипидов за исключением липидов с простой эфирной связью; эти два типа соединений легко превращаются друг в друга путем фосфорилирования и дефосфорилирования. Диацилглицерины образуются путем ацилирования 2-*O*-ацил-*sn*-глицеринов, являющихся продуктами метаболизма поступающих с пищей триглицеридов; фосфатидные кислоты образуются из глицерина, глицеральдегида, дигидроксиацетона или 2-*O*-ацил-*sn*-глицеринов путем фосфорилирования, ацилирования и, в случае необходимости, восстановления.

25.2.4.3. Биосинтез триглицеридов

Биосинтез триглицеридов из глицерина (или глицеральдегида, или дигидроксиацетона) включает стадию образования фосфатидных кислот и α,β-диглицеридов. Каждая стадия ацилирования протекает под действием отдельного фермента. Альтернативный путь, включающий переацилирование 2-*O*-ацилглицерина, который образуется путем липолиза триглицеридов, в значительной степени осуществляется у животных, получающих в корме жиры.

25.2.4.4. Биосинтез гликозилдиацилглицеринов [50]

Моно- и дигалактозилдиацилглицерины образуются из 1,2-ди-*O*-ацил-*sn*-глицеринов путем последовательного гликозилирования уридиндифосфатгалактозой.

25.2.4.5. Биосинтез фосфоглицеридов

Фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин получаются при взаимодействии 1,2-ди-*O*-ацил-*sn*-глицерина с цитидиндифосфатхолином (или -этаноламином). Эти фосфатидиловые эфиры могут превращаться в частично деацилированные (*лизо*-) производные. Фосфатидилэтаноламин может быть переведен в фосфатидилхолин последующим метилированием с помощью *S*-аденозилметионина. Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин могут превращаться друг в друга (реакция с *L*-серином и декарбоксилирование), но это не единственный путь биосинтеза фосфатидилсерина.

Остальные фосфоглицериды образуются из цитидинмонофосфатфосфатидной кислоты (CMP-PA) (цитидиндифосфатдиацилглицерин; CDP-DG), которая получается из фосфатидной кислоты и цитидинтрифосфата. При взаимодействии этого соединения с миоинозитом или серином образуется соответственно фосфатидилинозит или фосфатидилсерин; реакция с глицерофосфатом приводит, с отщеплением фосфата, к фосфатидилглицерину, который может быть превращен в дифосфатидилглицерин (кардиолипин) путем взаимодействия со второй молекулой фосфатидилглицерина или цитидинмонофосфатфосфатидной кислоты.

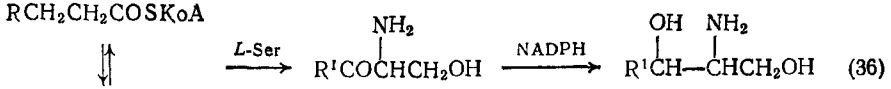
25.2.4.6. Биосинтез липидов с простой эфирной связью [51]

Спирты, необходимые для образования липидов с простой эфирной связью, получаются при восстановлении ацил-КоА с помощью NADH или NADPH (схема 35). Затем спирт взаимодействует с ацильным производным фосфата дигидроксиацетона с образованием соединения, которое после восстановления, ацилирования и дефосфорилирования служит предшественником липидов с простой эфирной связью, родственных триацилглицеринам и фосфоглицеридам.

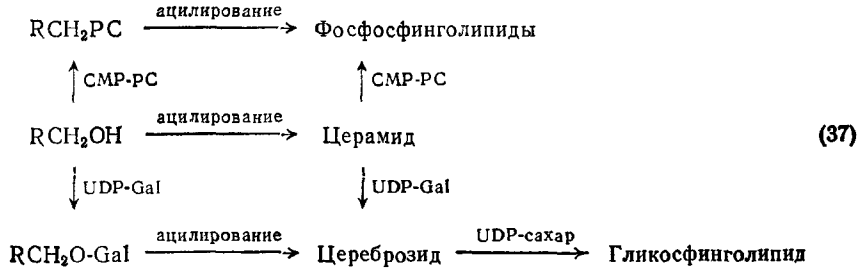
$$RCOSKoA \longrightarrow RCHO \longrightarrow RCH_2OH \qquad (35)$$

25.2.4.7. Биосинтез сфинголипидов [52, 53]

Длинноцепочечные основания, входящие в состав сфинголипидов, образуются при взаимодействии молекул ацил-CoA и *L*-серина, приводящем к 3-оксопроизводному, которое может быть восстановлено до сфинганина (схема 36). По-видимому, насыщенная кислота может превращаться в ее Δ^{2t}-производное, которое служит предшественником сфингенина, хотя имеются также сообщения о том, что дегидрированию подвергается *N*-ацилсфинганин. Путь биосинтеза 4-гидроксисфинганинов не выяснен. Длинноцепочечные основания (RCH_2OH) превращаются в гликосфинголипиды и фосфосфинголипиды (схема 37).



$R = C_{13}H_{25}$, $R^1 = C_{15}H_{31}$ или $C_{15}H_{29}$



ЛИТЕРАТУРА

1. European J. Biochem., 1967, 2, 127; Biochem. Biophys. Acta, 1968, **152**, 1; Chem. Phys. Lipids, 1968, 2, 156.
2. *S. Hamilton and R. J. Hamilton*, Topics Lipid Chem., 1972, 3, 199.
3. 'Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes', ed. P. E. Kolattukudy, Elsevier, Amsterdam, 1976.
4. *G. Odham and E. Stenhagen*, Accounts Chem. Res., 1971, 4, 121.
5. *P. E. Kolattukudy and T. J. Walton*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1972, **13**, 119; in 'Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids', ed. T. Galliard and E. I. Mercer, Academic Press, London, 1975, p. 203.
6. *L. D. Bergelson*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1969, **10**, 229; Fette Seifen Anstrichm., 1973, **75**, 89.
7. *M. Kates*, Adv. Lipid Res., 1970, 8, 225.
8. *P. S. Sastry*, Adv. Lipid Res., 1974, 12, 251.
9. *T. H. Haines*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1971, **11**, 297.
10. *F. Snyder*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1969, **10**, 287.
11. *F. Snyder*, 'Ether Lipids: Chemistry and Biology', Academic Press, New York, 1972.
12. *E. Klenk and H. Debuch*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1963, **6**, 1.
13. *D. Shapiro*, 'Chemistry of Sphingolipids', Hermann, Paris, 1969.

14. *K. A. Karlsson*, Lipids, 1970, **5**, 878; Chem. Phys. Lipids, **1970, 5, 6.**
15. *W. Stoffel*, Chem. Phys. Lipids, 1973, **11**, 318.
16. *E. Martensson*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1970, **10**, 365.
17. *N. S. Radin*, Chem. Phys. Lipids, 1970, **5**, 178.
18. *H. Wiegandt*, Adv. Lipid Res., 1971, **9**, 249.
19. *J. Kiss*, 'Carbohydrate Chemistry and Biochemistry', ed. L. Wolfram, R. S. Tipson, and D. Horton, Academic Press, New York, 1970, vol. 24.
20. *H. Wiegandt*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1968, **7**, 87.
21. *D. Shapiro*, Chem. Phys. Lipids, 1970, **5**, 80.
22. *R. Ledeen*, Chem. Phys. Lipids, 1970, 5, 205.
23. *R. H. McCluer*, Chem. Phys. Lipids, 1970, **5**, 220.
24. *R. G. Ackman*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1972, **12**, 165.
25. 'Analysis of Lipids and Lipoproteins', ed. E. G. Perkins, American Oil Chemists', Society, 1975.
26. *N. Pelick* and *V. Mahadevan*, in Ref. 25, p. 23.
27. *M. Kates*, 'Techniques in Lipidology: Isolation, Analysis, and Identification of Lipids', North Nolland, Amsterdam, 1972 [*M. Кейтс.* Техника липидологии. Выделение, анализ и интенсификация липидов. — Пер. с англ. М.: Мир, 1975].
28. *W. W. Christie*, 'Lipid Analysis', Pergamon, Oxford, 1973.
29. *M. L. Blank* and *F. Snyder*, см. сс. 25, p. 68; G. J. Nelson, in Ref. 25, p. 70; *L. A. Witting*, см. сс. 25, p. 90.
30. *A. Kuksis*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1972, **12**, 1.
31. *C. Litchfield*, 'Analysis of Triglycerides', Academic Press, New York, 1972.
32. *B. L. Walker*, см. сс. 25, p. 108.
33. *R. G. Jensen*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1971, **11**, 347.
33a. *F. D. Gunstone*, 'An Introduction to the Chemistry and Biochemistry of Fatty Acids and their Glycerides', 2nd edn., Chapman and Hall, London, 1967, p. 165.
33б. Там же, p. 173.
34. *H. Brockerhoff*, Lipids, 1971, 6, 942.
35. *D. C. Malins*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1966, **8**, 301.
36. *J. G. Hamilton*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1966, 8, 359.
37. *R. A. Stein* and *V. Slawson*, Prog. Chem. Fats Lipids, 1966, 8, 373.
38. *A. Kuksis*, см. сс. 25, p. 36.
38a. *F. D. Gunstone and M. I. Qureshi*, J. Amer. Oil Chemists' Soc., 1965, **42**, 957, 961.
39. *R. G. Jensen*, Topics Lipid Chem., 1972, **3**, 1.
40. *R. G. Jensen*, and *R. E. Pitas*, Adv. Lipid Res., 1976, **14**, 213.
41. *C. M. Lok, J. P. Ward*, and D. A. van Dorp, Chem. Phys. Lipids, 1976, **16**, 115.
42. *A. J. Slotboom and P. P. M. Bonsen*, Chem. Phys. Lipids, 1970, **5**, 301.
43. *R. G. Jensen and D. T. Gordon*, Lipids, 1972, **7**, 611.
44. *A. J. Slotboom, H. M. Verheij, and G. H. de Haas*, Chem. Phys. Lipids, 1973, **11**, 295.
45. *F. Paltauf*, Chem. Phys. Lipids, 1973, **11**, 270.
46. *W. Stoffel*, Chem. Phys. Lipids, 1973, **11**, 318.
47. *M. Kates and M. O. Marshall* in 'Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids', ed. T. Galliard and E. I. Mercer, Academic Press, London, 1975, p. 115.
48. *J. B. Mudd and R. E. Garcia*, см. сс. 47, p. 161.
49. *M. I. Gurr and A. T. James*, 'Lipid Biochemistry, An Introduction', 2nd edn., Chapman and Hall, London, 1975.
50. *H. C. van Hummel*, Prog. Org. Nat. Products, 1975, 32, 267.
51. *F. Snyder*, Adv. Lipid Res., 1972, **10**, 233.
52. *E. E. Snell, S. J. Dimari, and R. N. Brady*, Chem. Phys. Lipids, 1970, **5**, 116.
53. *W. Stoffel*, Chem. Phys. Lipids, **1970, 5, 139.**

25.3. МЕМБРАНЫ И ЛИПОПРОТЕИНЫ

П. Ф. НОУЛС (University of Leeds)

25.3.1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ МЕМБРАН И СЛОЖНОСТЬ ИХ ОРГАНИЗАЦИИ

Согласно традиционному представлению, мембраны разделяют пространство между клетками или внутри клетки. Такова, действительно, роль миелина, окружающего нервные клетки и изолирующего их от соседних клеток. Липидные компоненты мембран хорошо приспособлены к этой роли; содержание липидов в миелине выше, чем содержание другого основного компонента мембраны — белка (см. табл. 25.3.1).

Большинство других биологических мембран имеет более высокое содержание белка (50—60 %) и в их состав входят углеводы (0—10 %). Вследствие более высокого содержания белка такие мембраны, сохраняя разделяющую способность, обладают большей проницаемостью для различных метаболитов. Мембраны обладают избирательной проницаемостью по отношению к отдельным метаболитам; некоторые мембраны способны осуществлять перенос против градиента концентрации (его называют «активным» в противоположность обычному — «пассивному»). Для обеспечения специфической проницаемости мембран необходимо наличие широкого спектра белков.

Обнаруженные в мембранах белки обычно являются ферментами [1]. За исключением ферментов, участвующих в процессах переноса, локализация ферментов в мембране способствует их каталитической функции; так, на ферменты, катализирующие окислительные процессы или сборку определенных макромолекул, оказывает благотворное влияние неполярное окружение, существующее

Таблица 25.3.1. Состав типичных биологических мембран

Биологический источник	Содержание компонентов в мембране, %		
	белки	углеводы [а]	липиды [б]
Миелин человека	18	3	79
Митохондрии клеток печени морской свинки [в]	74	2	24
Сыворотка крови человека, липопротеин 2 высокой плотности	41	—	59
Хлоропласты шпината	50	—	50
Эндоплазматический ретикулум клеток печени быка	55	—	45
Эритроциты человека	49	8	43
B. megaterium [в]	75	—	25
E. coli [в]	68	—	32

[а] Олигосахариды гликопротеинов. [б] В том числе гликолипиды. [в] Внутренняя мембрана.

внутри мембраны. Мембраны в свою очередь обеспечивают необходимые пространственные взаимоотношения между ферментами, в результате чего продукт катализируемой одним ферментом реакции становится субстратом расположенного по соседству другого фермента. Кроме того, продукт (или продукты) реакции, катализируемой ферментом (например, цитохромоксидазой [2]), могут находиться на стороне мембраны, противоположной месту присоединения субстрата, при условии, что фермент пронизывает мембрану. В мембране не только белки, но и составляющие ее липиды расположены асимметрично; асимметричность мембран и ее биологическое значение подробнее обсуждены в разд. 25.3.3.3.

Активность ферментов мембран, как и других ферментов, регулируется путем изменения их конформации в результате непосредственного взаимодействия с эффекторами. Кроме того, активность ферментов в мембранах может регулироваться путем взаимодействий, в которых участвуют мембранные липиды. Таким образом достигается очень тонкое регулирование активности ферментов.

На внутриклеточном уровне большую роль в регулировании процессов метаболизма играют гормоны. Связывание гормонов с их рецепторами сходно с взаимодействием фермента и его субстрата. Важной, но не единственной группой рецепторов гормонов являются гликопротеины, расположенные в мембранах. Предполагают [3], что расположение рецепторов в мембранах должно быть таким, чтобы гормоны могли достичь рецепторов-мишеней путем двухмерной диффузии вдоль мембраны, а не с помощью менее эффективной трехмерной диффузии.

Образование комплексов фермент—субстрат и гормон—рецептор предполагает «узнавание» молекулами друг друга. На более высоком уровне организации такой способностью обладают клетки. Так, лейкоциты в токе крови узнают и разрушают чужеродные клетки, например бактериальные, но не нападают на собственные клетки крови. Узнавание проявляется и в контактном ингибировании: некоторые клетки высших организмов (например, клетки мышечной ткани) в питательной среде продолжают делиться до тех пор, пока не придут в контакт с другими клетками, после чего их рост прекращается. Раковые клетки в тех же условиях продолжают делиться. В этих двух примерах клеточного узнавания, имеющего важное значение в медицине, участвуют поверхностные антигены. Уникальность специфических типов клеток указывает на большое разнообразие их поверхностных антигенов, что дополнительно усложняет строение биологических мембран. Процессы клеточного узнавания зависят от подвижности компонентов мембраны, которая, по-видимому, регулируется с помощью микротрубочек*, имеющихся в цитоплазме [4].

---

* Микротрубочки участвуют в клеточном делении и в других биологических процессах [5]; по-видимому, они образуют в цитоплазме структуру, с помощью которой происходит обмен информации между органеллами.

Из приведенного краткого обзора ясно, что биологические мембраны выполняют множество различных функций вследствие сложности их строения и разнообразия входящих в них компонентов, что затрудняет их исследование.

25.3.2. СОСТАВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Как видно из приведенных в табл. 25.3.1 данных, в миелине отношение липид : белок выше, чем в других мембранах; это соответствует специфической функциональной роли миелина. Напротив, для протекания высокоэффективных процессов окисления во внутренней мембране митохондрий необходимо присутствие нескольких ферментов и отношение липид : белок у нее ниже. В мембране эритроцитов содержится относительно большое количество углеводов. Основной гликопротеин мембраны эритроцитов, гликофорин, как было показано [6], ориентирован на поверхности мембраны так, что *N*-концевая часть его полипептидной цепи, несущая все ковалентно связанные остатки углеводов, выступает во внешнюю среду; такими поверхностными олигосахаридами являются некоторые групповые антигены крови и рецепторы, включая рецептор вируса гриппа. Схематическое изображение возможного расположения белков, липидов и углеводов в биологической мембране, приведенное на рис. 25.3.1, основано на «жидкомозаичной» модели [7]. Полярные молекулы липидов образуют бимолекулярный слой (см. разд. 25.3.3), тогда как белки могут быть или связаны с поверхностью (так называемые внешние белки), или внедрены в бислой (так называемые внутренние или интегральные белки). В некоторых случаях белок может пронизывать бислой. Жидкомозаичная модель завоевала всеобщее признание; предполагают, что мембрана в физиологических условиях является текучей, а не статичной. Так, липидные и белковые компоненты в изолированных

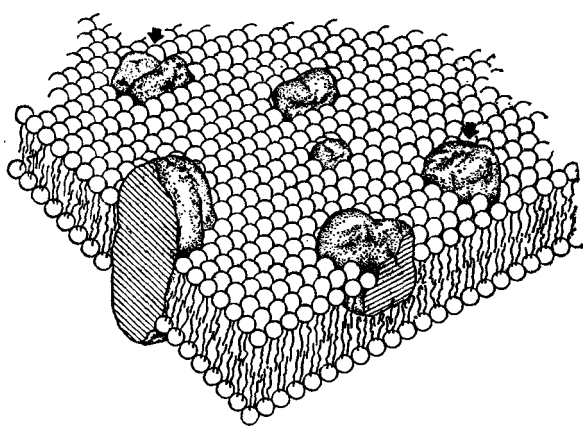


Рис. 25.3.1. Схематическое изображение «жидкомозаичной» модели биологических мембран [7]

Таблица 25.3.2. Липидный состав типичных биологических мембран (в %)

PC — фосфатидилхолин; PE — фосфатидилэтаноламин; PG — фосфатидилглицерин; PS — фосфатидилсерин; Sph — сфингомиелин

Биологический источник	Фосфолипиды							Гликолипиды	Триглицериды	Холестерин и его эфиры	Прочие липиды
	общее содержание	PC	PE	PS	PG	Sph	прочие				
Миелин человека	38	11	14	7	—	6	—	37	—	25	—
Митохондрии клеток печени морской свинки [а]	100	48	28	2	—	2	20 [б]	—	—	—	—
Сыворотка крови человека, липопротеин 2 высокой плотности	60	—	—	—	—	—	—	—	8	32	—
Хлоропласты шпината	12	—	—	—	—	—	—	80	—	—	8
Эндоплазматический ретикулум клеток печени быка	82	55	18	9	—	—	—	—	—	6	13
Эритроциты человека	72	23	20	11	—	18	—	3	—	25	—
B. megaterium [а]	48	—	—	—	—	—	—	52	—	—	—
E. coli [а]	89	—	82	—	7	—	—	20	—	—	—

[а] Внутренняя мембрана. [б] В основном, дифосфатидилглицерин (кардиолипин).

биологических мембранах поступательно диффундируют в плоскости мембраны со скоростью, определяемой, в частности, эффективной вязкостью липидного матрикса.

Из данных по липидному составу различных биологических мембран, приведенных в табл. 25.3.2, видно, что относительное содержание фосфолипидов и гликолипидов изменяется при переходе от одного вида к другому и различно даже в пределах одного вида для клеток разного типа; варьирует также и количество холестерина и относительное содержание разных классов фосфолипидов.

Текучесть мембраны обеспечивается сложным распределением остатков жирных кислот между молекулами различных фосфолипидов и основана на том, что все липидные бислои представляют собой лиотропные жидкие кристаллы. При температуре, характеристической для отдельных фосфолипидов, совершается фазовый переход жесткий гель — текучее жидкокристаллическое состояние. Более детально текучесть и фазовые переходы рассмотрены в разд. 25.3.3.1.

25.3.3. ЛИПИДНЫЕ КОМПОНЕНТЫ МЕМБРАН

Выше уже отмечалась сложность структурной организации мембран и ее возможные причины (с точки зрения функции). Современные представления о биологических мембранах базируются на изучении определенных липидных и белковых систем; этим во-

Таблица 25.3.3. Жирнокислотный состав основных липидов мембран эритроцитов человека (в %)

Кислота	Общее содержание	PC	PE	Sph	PS
16:0	25	34	29	28	14
18:0	19	13	9	7	36
18:1	16	22	22	6	15
18:2	11	18	6	2	7
20:4	15	6	18	—	21
Остальные	14	7	16	—	7

просам посвящен данный раздел, а также разд. 25.3.4. Жирнокислотный состав основных липидов мембран эритроцитов человека приведен в табл. 25.3.3.

25.3.3.1. Фосфолипиды

(1) Образование бислойных структур

В основном были изучены фосфолипиды, однако небольшое число экспериментов с использованием глико- или сульфолипидов показало, что они ведут себя аналогично. При диспергировании в воде фосфолипиды самопроизвольно образуют бислои, в которых их полярные головки ориентированы в водную среду, а неполярные цепи — к центру бислоя (см. рис. 25.3.1). Существование бислоев в таких дисперсиях доказано различными методами.

(*а*) *Рентгеноструктурный анализ* [8]. Профиль электронной плотности ориентированных образцов дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) характеризуется наличием пиков, отстоящих друг от друга на ~5,0 нм, и глубокой центральной потенциальной ямы. Показано, что пики могут быть удовлетворительно приписаны полярным областям липидов; существование потенциальной ямы может быть предсказано в рамках модели, где терминальные метильные группы алкильных цепей локализованы вблизи центра бислоя. Фазовый переход гель — жидкость — кристалл для дипальмитоилфосфатидилхолина совершается при 42 °С; следовательно, при температуре эксперимента (23 °С) образец должен находиться в гелеобразном состоянии. В случае фосфатидилхолина из яичного желтка, который находится в жидкокристаллическом состоянии при 23 °С, профиль электронной плотности качественно аналогичен профилю для дипальмитоилфосфатидилхолина; однако расстояние между пиками составляет 3,6 нм и впадина между ними уширена. Эти результаты соответствуют утончению бислоя из-за фазового перехода и снижению упорядоченности терминальных метильных групп алкильных цепей вследствие усиления молекулярного движения. Сходные профили электронной плотности найдены для

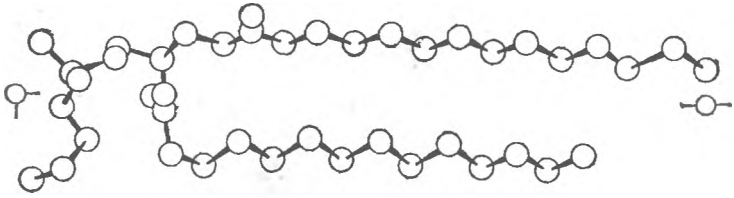


Рис. 25.3.2. Предполагаемое пространственное строение молекулы 1,2-димиристоил-*DL*-фосфатидилэтаноламина внутри бислоя [9]

биологических мембран; это указывает на то, что основу их структуры составляют липидные бислои.

Текучесть фосфолипидных бислоев затрудняла рентгенографическое изучение строения фосфолипидных ансамблей. Однако после того как удалось получить кристаллы дилаурилфосфатидилэтаноламина и определить их структуру [9], стала возможной количественная интерпретация рентгенограмм бислоев фосфатидилэтаноламина (рис. 25.3.2).

(*б*) *Исследования с применением электронной микроскопии.* Электронная микроскопия сверхтонких срезов миелина выявила его характерное строение в виде «трамвайной линии» (рис. 25.3.3). Более детальные исследования показали [10], что основное радиальное звено миелина формируется из двух смежных бимолекулярных слоев липидов толщиной около 6,0 нм. Мультибислойные структуры, подобные образующимся из миелина, наблюдаются при диспергировании фосфолипидов в воде (рис. 25.3.4*а*); это доказывает, что образование бислоя определяется физическими, а не биологическими факторами. При облучении ультразвуком дисперсии фосфолипидов образуются монобислойные везикулы (см. рис. 25.3.4*б*), которые являются удобным объектом для изучения проницаемости по отношению к различным молекулам, содержащимся в растворе.

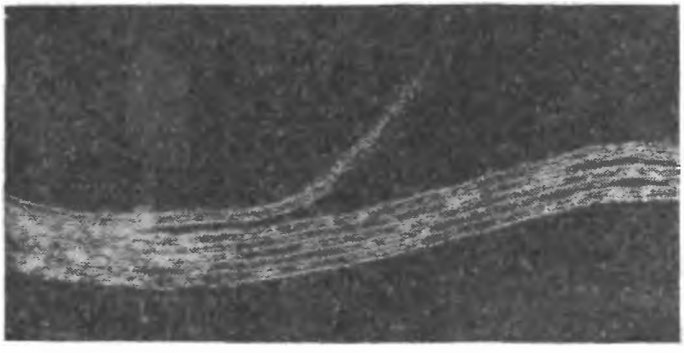


Рис. 25.3.3. Электронная микрофотография миелиновой оболочки

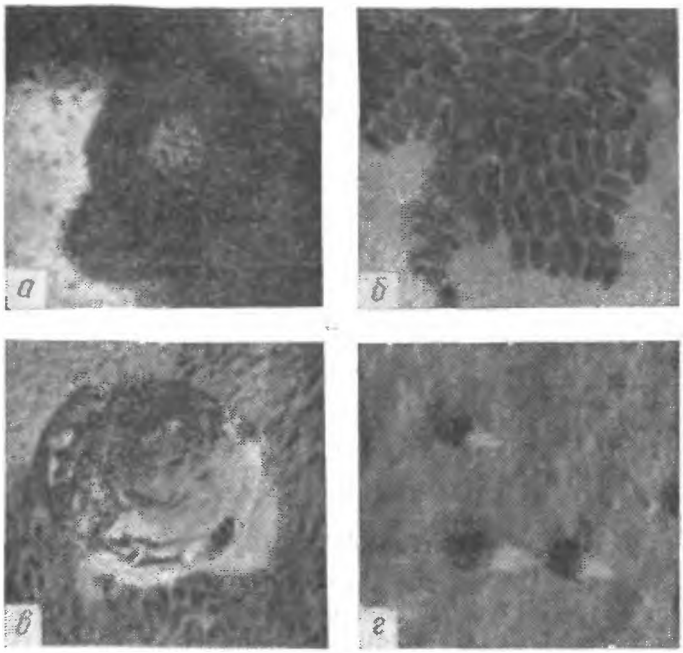


Рис. 25.3.4. Электронные микрофотографии водных дисперсий фосфолипидов (*а*, *в*) и бислойных везикул (*б*, *г*):

а, *б* — негативно контрастированные микрофотографии; *в*, *г* — микрофотографии, полученные методом замораживания — травления

Электронная микроскопия с применением техники замораживания — травления подтверждает тот факт, что структуры, выявляемые с помощью сверхтонких срезов, не возникают в результате химической обработки, применяемой для приготовления образца (рис. 25.3.4*в* и *г*).

(*в*) *Спектроскопические исследования.* Данные спектроскопии ЭПР подтверждают существование бислойной структуры. Ориентированные бислои фосфолипида, содержащего небольшое количество (около 1 %) парамагнитного спин-меченного зонда, строение которого весьма сходно со строением липида-«хозяина» [рис. 25.3.5, см. также разд. 25.3.3.1(4)], могут быть легко сформированы на поверхности стекла. Спектр ЭПР является анизотропным, т. е. зависит от направления, вдоль которого приложено магнитное поле; так, спектр, полученный при приложении поля в плоскости стеклянной поверхности, отличается от такового в случае приложения поля перпендикулярно этой поверхности. Из этих результатов можно легко заключить, что спиновые метки и, следовательно, молекулы фосфолипида-«хозяина» ориентированы так, что их длинные оси перпендикулярны поверхности стекла. Сходные результаты

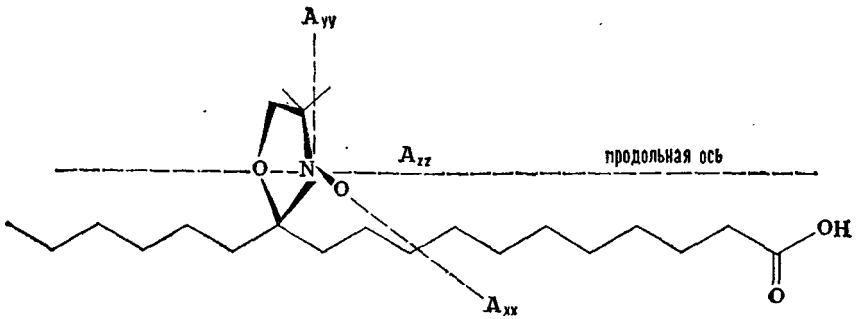


Рис. 25.3.5. Ориентация осей нитроксидной группы в молекуле липида, содержащего спин-меченную стеариновую кислоту [20]

получены с применением других методов спектроскопии [11], что дополнительно подтверждает существование бислоев в модельных и биологических мембранах.

(2) Сравнение модельных и биологических мембран

Как отмечалось ранее, на основании данных рентгеноскопии, электронной микроскопии и спектроскопических методов видно, что структуры в биологических мембранах аналогичны структурам дисперсий фосфолипидов («модельных мембран»). Из табл. 25.3.4 следуст, что эти аналогии распространяются и на другие физические свойства этих двух систем и оправдывают изучение модельных мембран для понимания строения биологических мембран. Основное различие между модельными и биологическими мембранами заключается в их проницаемости (см. табл. 25.3.4). Множество

Таблица 25.3.4. Физические свойства биологических и модельных липидов мембран

Параметр	Биологические мембраны	Модельные мембраны
Толщина (нм), определенная методом		
электронной микроскопии	4—13	6—9
рентгенографии [a]	4—8,5	—
оптическими методами	—	46
Сопротивление электрическое 1 см мембраны (Ом)	10^2—10^5	10^3—10^9
Емкость электрическая 1 см^2 мембраны (мкФ)	0,5—1,3	0,3—1,3
Разность потенциалов в невозмущенном состоянии (мВ)	10—88	0—140
Пробивное напряжение (мВ)	100	100—550
Поверхностное натяжение (10^{-3} Н/м)	0,03—3,0	0,2—6,0
Проницаемость для воды (10^{-4} см/с)	25—28	2,3—24

[a] Для миелина.

Таблица 25.3.5. Температуры фазового перехода различных фосфолипидных бислоев

Фосфолипид	Температура фазового перехода (°С) при наличии алкильных цепей			
	C_{14}	C_{16}	C_{18}	$C_{18:1}$
Фосфатидилхолин	24	41	58	~ -10
Фосфатидилэтаноламин	50	63	—	< 10

фактов свидетельствуют о том, что проницаемость бислоев по отношению к малым молекулам зависит от присутствия в бислое других компонентов — белков, пептидов или антибиотиков [12].

(3) Фазовые переходы гель — жидкий кристалл

Бислои, состоящие из одинаковых фосфолипидных частиц, при характеристической температуре претерпевают хорошо выраженный фазовый переход из относительно жесткого гелеобразного состояния в текучее жидкокристаллическое состояние. Помимо спектроскопических и дифракционных методов (см. выше) для изучения такого фазового перехода применяют калориметрию.

Температура этого перехода зависит от длины цепи, степени ненасыщенности алкильных радикалов и природы полярной головки фосфолипидов (табл. 25.3.5). С помощью калориметрических, спектроскопических и дифракционных методов обнаружен предварительный переход при температурах, на несколько градусов ниже приведенных в таблице; лежащие в его основе структурные и динамические процессы не ясны, хотя данные дифракционных исследований свидетельствуют о том, что на этой стадии алкильные цепи ориентируются перпендикулярно поверхности бислоя [13].

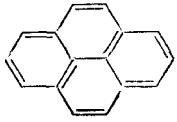
Исследования методами спектроскопии ЯМР ^{31}P и ^{2}H позволили выявить четкие различия в конформации и подвижности полярных головок в процессе фазового перехода липидов (см. библиографию в работе [14]). Особый интерес представляет изучение фосфолипидов с отрицательно заряженной головкой (например, фосфатидилсерин, фосфатидная кислота, фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерин или фосфатидилинозит), поскольку было показано [15], что в таких системах *изотермические* фазовые переходы могут происходить при изменении pH и ионной силы среды; эти изменения, несомненно, имеют физиологическое значение [15, 16].

(4) Динамические свойства липидных бислоев

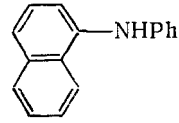
Природа динамических процессов в бислоях, находящихся в жидкокристаллическом состоянии, в настоящее время может быть обсуждена. В разд. 25.3.3.1(1) кратко описано применение спин-

меченных зондов для доказательства существования бислоя. Из спектров ЭПР следует, что молекула зонда быстро вращается вокруг продольной оси, так как происходит усреднение анизотропии в направлениях x и y (см. рис. 25.3.5). Сходные результаты, указывающие на быстрое вращательное движение липидных молекул в бислое, получены при использовании флуоресцентных зондов, причем поляризация флуоресценции также усредняется за счет такого движения. В качестве флуоресцентных зондов применяют пирен (**1**), *N*-фенил-α-нафтиламин (**2**) и 1-анилинонафталин-8-сульфонат (**3**).

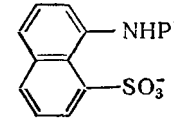
Полученные результаты указывают на то, что внутреннее пространство мембран находится в высокотекучем состоянии и имеет вязкость, сравнимую с вязкостью светлых нефтепродуктов. Следующим должен быть вопрос: одинакова ли текучесть во всех областях внутри бислоя? Подобную информацию могут дать методы ЭПР, ЯМР и флуоресцентные методы.



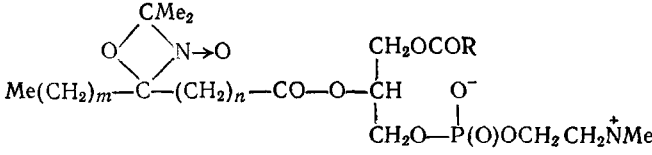
(1)



(2)



(3)



(4)

Синтезирован ряд спин-меченных фосфолипидов (**4**) с нитроксидной группировкой в различных положениях одной из алкильных цепей фосфатидилхолина. Введение таких спин-меченных молекул в бислои позволяет следить за поведением различных областей этих бислоев с помощью ЭПР. Этот метод позволяет различать два других типа движения молекул помимо быстрого вращения вокруг продольной оси [17]. Во-первых, вся молекула липида прецессирует вокруг перпендикуляра к поверхности бислоя как «жесткий стержень» с точкой «заякоривания» на этой поверхности. Амплитуда такого движения зависит от того, в каком состоянии (гелеобразном или жидкокристаллическом) находится липид, из которого состоит слой, а также от наличия других мембранных компонентов; так, например, наличие холестерина снижает амплитуду прецессионного движения [11]. Во-вторых, наблюдается движение сегментов жирнокислотных цепей вокруг углерод-углеродных простых связей за счет быстрых переходов между *гош-* и *транс*-конформациями; такое движение может накапливаться вдоль цепи, т. е. терминальная метильная группа в центре бислоя может быть более подвижна, чем метиленовые группы, примыкающие к

углеродному скелету глицерина; такое явление называют «градиентом текучести». Следует отметить, что по данным спектроскопии ЭПР с применением зондов (4) полярность бислоев снижается в направлении к центру и, следовательно, существует гидрофобный барьер проницаемости для заряженных молекул, содержащихся в растворе.

С помощью методов спектроскопии ЯМР ^{1}H, ^{2}H и ^{13}C показано также наличие градиента гибкости [11, 18]; преимуществом этого метода перед методом ЭПР, основанным на применении парамагнитных зондов, является то, что измеряются параметры самих фосфолипидных молекул. Так, методом спектроскопии ЯМР ^{13}C показано, что скорость молекулярного движения возрастает по направлению от углеродных атомов глицерина к терминальным метильным группам алкильных цепей. Более детальную информацию о движении цепей можно получить с помощью спектроскопии ЯМР ^{2}H, применяя дейтерированные в разных положениях алкильных цепей фосфолипиды; показано, что конформации двух алкильных цепей различны ([13], см. также рис. 25.3.2) и что появление единственной *цис*-двойной связи в одной из алкильных цепей приводит к возникновению локальной жесткости вблизи этой связи, но увеличивает, как ни странно, общую подвижность обеих цепей [19].

Из вышеприведенного обсуждения совершенно ясно, что фосфолипидные бислои в жидкокристаллическом состоянии являются текучими. Вследствие этого компоненты мембраны способны латерально диффундировать в плоскости мембраны («латеральная диффузия»). Для измерения коэффициентов латеральной диффузии ($D_{диф}$) в мембранах разработано несколько методов [11, 20]. Для модельных бислоев и различных изолированных биологических мембран $D_{диф}$ составляют $\sim 10^{-7}$ см^2/с. Такие значения $D_{диф}$ означают, что молекулы липидов могут (если движение совершается по прямой линии) перемещаться на расстояние, равное длине бактериальной клетки ($\sim 10^{-4}$ см), за 2 с. Из значений $D_{диф}$ для молекул липидов можно вычислить $D_{диф}$ для включенных в мембрану белков. Для белка с молекулярной массой 1 000 000 $D_{диф} \approx 3 \cdot 10^{-10}$ см^2/с, что удовлетворительно согласуется со значением, полученным для смешения поверхностных антигенов в процессе образования гибридных клеток путем индуцированной вирусом конъюгации [21]. Следует, однако, заметить, что $D_{диф}$ для некоторых компонентов мембран *in vivo* может быть ниже, чем приведенные значения; действительно, латеральная диффузия в биологических мембранах является, по-видимому, в высокой степени регулируемым процессом. Здесь можно отметить два момента: во-первых, предполагают, что высокая латеральная подвижность компонентов мембран отличает нерегулируемые раковые клетки от нормальных клеток [22] и, во-вторых, что явление «кеппинга», посредством которого комплексы поверхностных антигенов с антителами скапливаются на конце клетки, удаленном от ядра, подтверждает пред-

положение о том, что в нормальных клетках мембранное движение находится под контролем [4].

Другим динамическим процессом является поперечное перемещение фосфолипидных молекул между внутренней и внешней половинами бислоя [11]. В модельных мембранах оно происходит медленно ($t_{1/2} \approx 6{,}5$ ч), однако наличие других компонентов биологических мембран может резко увеличить эту скорость; так, $t_{1/2}$ в клеточных мембранах электрического органа электрического угря составляет 5 мин.

25.3.3.2. Другие классы липидов

(1) Полярные липиды

Строение и подвижность полярных липидов, не относящихся к фосфолипидам, изучены мало, однако выяснено, что они также способны к фазовому переходу типа гель — жидкие кристаллы [8]. Гликолипиды образуют бислои, толщина и площадь которых (в пересчете на молекулу) сходны с таковыми для фосфолипидов. Интересно отметить, что температура фазового перехода экстрагированных из мозга мясного скота цереброзидов составляет около 70 °С из-за преобладания в них 24 : 0- и 24 : 1-алкильных цепей; физиологическое значение такой высокой температуры фазового перехода не очень понятно. Температуры фазового перехода моно- и дигалактозилглицеринов из хлоропластов, напротив, лежат ниже 0 °С и, следовательно, при физиологической температуре эти липиды находятся в жидкокристаллической фазе. Разнообразие остатков, находящихся в области полярных головок гликолипидов, должно влиять на свойства клеточных поверхностей; например, групповая специфичность крови связана с гликопротеинами и гликолипидами мембраны эритроцитов.

(2) Нейтральные липиды

Холестерин оказывает значительное влияние на свойства фосфолипидных бислоев (см. разд. 25.3.3.3). Такие стерины, как стигмастерин и эргостерин, возможно, обладают аналогичным действием соответственно в мембранах клеток растений и простейших эукариот (например, дрожжей).

Хотя нейтральные липиды (например, триглицериды и сложные эфиры холестерина) не входят в значительных количествах в состав биологических мембран, они являются важными компонентами растворимых липопротеиновых комплексов (см. разд. 25.3.4).

25.3.3.3. Смеси липидов

Биологические мембраны являются сложными смесями липидов. Чтобы понять законы, по которым устроены биологические мембраны, необходимо изучить свойства смесей липидов определенного состава.

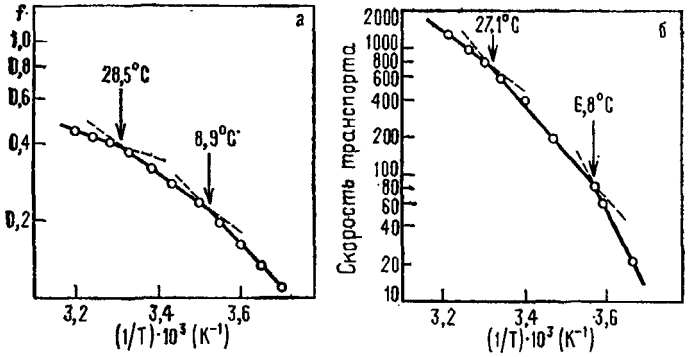


Рис. 25.3.6. Зависимость текучести бислоя (*а*) и скорости транспорта β-глюкозида (*б*) от температуры для внутренней мембраны мутантов *E. coli*, выращиваемых на среде с добавкой линолевой кислоты [23]

(1) Латеральное разделение фаз

Бислои, состоящие из фосфолипидов с различными температурами фазового перехода, не имеют четкого фазового перехода; в этих случаях осуществляется гораздо более плавный переход, при котором жидкие и твердые липиды сосуществуют в равновесии в некотором диапазоне температур. Детальные фазовые диаграммы могут быть построены на основании калориметрических или спектроскопических данных [11]. Показано, что ионы кальция вызывают латеральное разделение фаз в мембранах, состоящих из смесей фосфатидилхолина и фосфатидилсерина; этот результат сравним с влиянием ионной силы в процессе инициирования изотермического разделения фаз в бислоях, состоящих из фосфатидилсерина.

Биологические мембраны, состоящие из сложных смесей различных классов липидов с разными алкильными цепями, при физиологических температурах находятся, по-видимому, в состоянии латерального разделения фаз. Высокая способность к латеральному сжатию, обусловленная одновременным существованием твердой и жидкой фазы, может влиять на активность находящихся внутри мембраны ферментов, что позволяет включаться в мембрану новым компонентам и сказывается на процессах транспорта. Исследованы [23] свойства мембран клеток мутантных штаммов *E. coli*, для роста которых необходимо наличие жирных кислот; состав их внутренней мембраны может быть обогащен определенными алкильными цепями путем прибавления к питательной среде соответствующих жирных кислот. Изменение текучести бислоя и скорости транспорта β-глюкозида для внутренней мембраны *E. coli*, выращиваемой на среде с добавкой линолевой кислоты, в зависимости от температуры показано на рис. 25.3.6. Точки перегиба на графике Аррениуса соответствуют экстремумам латерального разделения фаз. Наблюдается также изменение энергии активации транспорта, которое приблизительно коррелирует с гра-

ницами латерального разделения фаз. При добавлении в питательную среду элаидиновой кислоты неожиданно оказалось, что скорость переноса увеличивается вдвое при понижении температуры на 1 °С при верхнем экстремуме латерального разделения фаз. Это можно объяснить тем, что перенос становится наиболее благоприятным, когда мембрана находится в состоянии латерального разделения фаз.

В общем, можно сказать, что в мембранах липидный состав регулируется таким образом, чтобы при физиологических температурах они находились в состоянии латерального разделения фаз. У микроорганизмов это достигается изменением состава алкильных цепей липидов; у животных сходную роль играет изменение концентрации холестерина.

(2) Асимметрия липидов

Когда водные дисперсии смесей различных классов липидов облучают ультразвуком, образуются отдельные бислойные везикулы (см. рис. 25.3.4). Относительное содержание различных классов липидов во внутренней и внешней областях бислоя может быть определено методом ЯМР или с использованием химических меток. Например, количество фосфатидилэтаноламина во внешней области везикул, полученных смешением фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, можно установить прибавлением к внешней среде 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты.

Из результатов, приведенных в табл. 25.3.6, ясно, что в везикулах из смеси фосфолипидов бислой асимметричен. Было показано [24], что фосфолипиды с ненасыщенными углеводородными цепями предпочтительно оказываются во внешней области бислоя, состоящего только из фосфатидилхолина. Однако в случае смешанных бислоев (из фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина) избирательность по отношению к составу алкильных цепей не наблюдалась: явно преобладала тенденция фосфатидилэтаноламина находиться на внутренней поверхности (см. табл. 25.3.6). Асимметрия в бинарных липидных системах, по-видимому, возникает из-за малого радиуса кривизны бислойных везикул.

Таблица 25.3.6. Соотношение липидов в монобислойных везикулах

PG — фосфатидилглицерин;
PC — фосфатидилхолин;
PE — фосфатидилэтаноламин

Поверхность везикулы	PG/PC [a]	PE/PC [a]	Холестерин/PC [a]
Внутренняя	0,33	3,0	1,3
Внешняя	2,0	0,65	0,89

[a] В везикуле в целом это соотношение равно 1.

Показано, что в мембранах эритроцитов наблюдается аналогичное асимметричное распределение фосфолипидов [25]. Поскольку в мембранах вируса гриппа асимметрия носит качественно иной характер, можно предположить существование связи асимметрии с функциями конкретной

мембраны; интересно также отметить, что предпочтительная локализация холестерина на внутренней поверхности бислоя (см. табл. 25.3.6) не обнаружена для мембран вируса гриппа. Установлено [6], что в мембранах эритроцитов гликолипиды расположены на ее внешней поверхности, однако было бы преждевременно на основании одной системы делать вывод о том, что это общая закономерность для всех биологических мембран.

25.3.4. БЕЛКИ И ГЛИКОПРОТЕИНЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ МЕМБРАН

Как уже упоминалось ранее (см. разд. 25.3.2), белки мембран можно подразделить на внешние, которые свободно закреплены на поверхности мембраны, и внутренние (или интегральные), расположенные внутри мембраны. Наиболее хорошо изученными мембранами являются миелин и мембраны эритроцитов, имеющие относительно простой состав белковых компонентов. Миелин, по-видимому, содержит только три типа полипептидных цепей [26], одна из которых является внешней и может быть удалена из мембраны экстракцией слабыми кислотами, две остальные являются внутренними и обладают необычным свойством — растворимостью в смеси хлороформа и метанола. Аминокислотная последовательность внешнего белка установлена, однако его вторичная и третичная структуры не определены. Бóльшую часть обоих внутренних белков составляют гликопротеины; входящие в их состав аминокислоты на 50 % являются неполярными, это затрудняет их определение, так как содержащие их пептидные фрагменты нерастворимы.

Мембраны эритроцитов содержат около восьми основных полипептидов [6]. Пять из них являются внешними и составляют 40 % общего содержания белка. Основным внутренним белком является гликофорин, один из немногих внутренних белков с установленной аминокислотной последовательностью (рис. 25.3.7) *. В его молекуле несколько аминокислотных остатков связано с олигосахаридными фрагментами, которые в основном определяют антигенные и рецепторные свойства эритроцитов; эти олигосахариды локализованы исключительно в *N*-концевой части аминокислотной последовательности и находятся на внешней поверхности мембраны. Примечательна также высокая концентрация остатков дикарбоновых аминокислот в *C*-концевой последовательности. Однако наибольший интерес представляет участок между *N*- и *C*-концевыми последовательностями, содержащий около двадцати

* На рисунке ромбами обозначены полисахаридные цепи, присоединенные посредством *O*-гликозидной связи, шестиугольником — полисахаридные цепи, присоединенные *N*-гликозидными связями; зачерненными кружками — гидрофобная часть белковой молекулы, которая, как полагают, проходит через бислой. — *Прим. перев.*

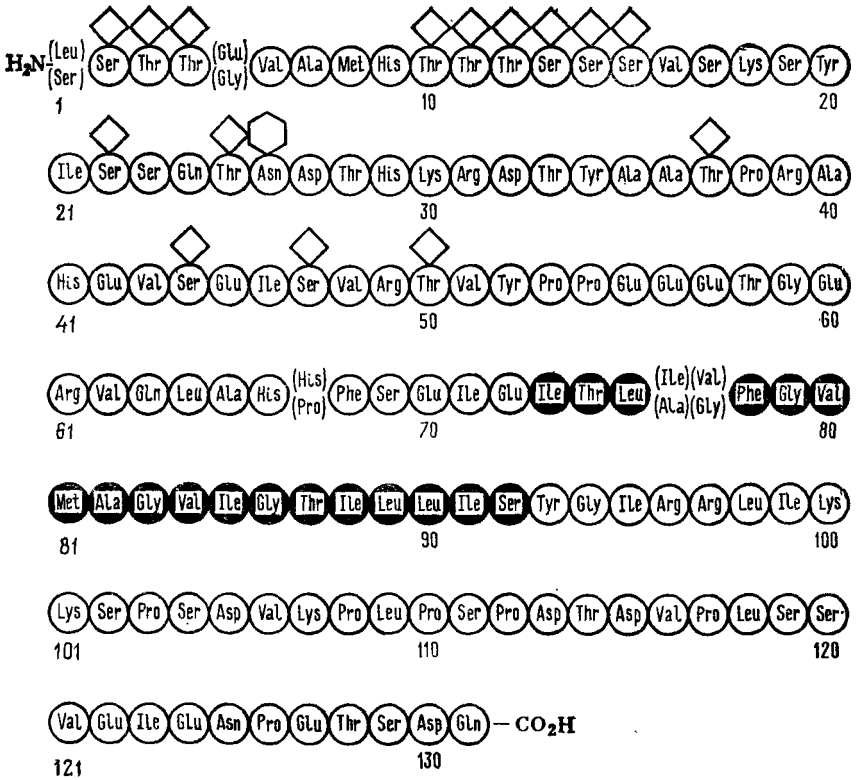


Рис. 25.3.7. Аминокислотная последовательность гликофорина А из мембран эритроцитов

остатков неполярных аминокислот. Пептидный фрагмент, содержащий эту последовательность, выделен из гликофорина; было показано, что в трифторэтаноле он имеет конформацию α-спирали и, вероятно, так же ориентирован в мембране эритроцитов. α-Спираль, состоящая из 20 аминокислотных остатков, должна иметь длину около 3,0 нм, что почти достаточно для пронизывания бислоя.

Единственной в своем роде мембраной является пурпурная мембрана бактерии *Halobacterium halobium*; в ней содержится только один белок — бактериородопсин. Полная аминокислотная последовательность бактериородопсина не определена, однако установлена [27] последовательность аминокислот около места связывания фоторецептора (ретиналя): Gly-Val-Ser-Asp-Pro-Asp-Lys-Lys*-Phe-Tyr-Ala-Ile-Met (звездочкой обозначено место связывания).

Эти аминокислотные остатки полярны и, по-видимому, являются внешними по отношению к бислою. Этот вывод согласуется

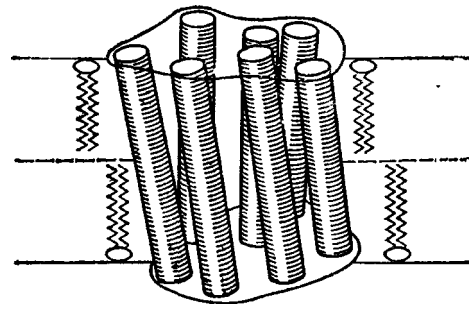


Рис. 25.3.8. Схематическое изображение расположения α-спиралей в бактериородопсине

с результатами изящного исследования, проведенного Хендерсоном и Анвином [28], которые показали, что 70 % вторичной структуры бактериородопсина составляют α-спирали. Эти спирали сгруппированы в семь тесно упакованных сегментов, расположенных приблизительно перпендикулярно плоскости мембраны (рис. 25.3.8). Логично предположить, что область связывания ретиналя расположена на перегибе между двумя фрагментами α-спирали и, следовательно, является внешней по отношению к бислою.

Аминокислотный состав некоторых внутренних мембранных белков приведен в табл. 25.3.7. Наблюдается удивительное сходство аминокислотного состава (по классам) этих белков, хотя значение такого явления до сих пор не ясно. Поскольку известно, что третичные структуры гликофорина и бактериородопсина различны, ясно, что сходство аминокислотного состава не указывает на высокую степень спиральности; тем не менее, возможно, что полипептидные цепи внутри бислоя в основном имеют форму α-спирали.

В этом разделе уместно обсудить также важную группу липопротеинов сыворотки крови, хотя такие белки не являются мембранными в строгом смысле слова. Эти белковые комплексы растворимы в воде, что способствует транспорту липидов в организме. Состав одного из липопротеинов сыворотки крови приведен в табл. 25.3.1; помимо фосфолипидов и белков он содержит сложные эфиры холестерина и триглицериды. Определена аминокислотная последовательность некоторых апопротеинов [29]. Обычно принимают, что липопротеины сыворотки имеют мицеллярную структуру, но детальное расположение белков и различных классов липидов внутри этой структуры до конца не выяснено.

Таблица 25.3.7. Аминокислотный состав некоторых мембранных белков (в %)

Типы аминокислот	Гликофорин человека	Родопсин быка	Бактериородопсин	Протеолипид миелина	АТР-аза саркоплазматического ретикулума
Основные	11,46	8,51	7,44	9,34	11,00
Кислотные и полярные	32,06	32,33	30,99	29,55	34,19
Гидрофобные	49,06	52,34	51,66	50,67	47,34

25.3.5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

25.3.5.1. Локализация белков в мембранах

Асимметрия расположения различных классов липидов в модельных и биологических мембранах обсуждалась в разд. 25.3.3.1. Существует убедительное подтверждение [24] предположения, что углеводные и белковые компоненты в биологических мембранах распределены асимметрично. Так, например, найдено, что олигосахариды, связанные с внутренними мембранными белками, всегда являются внеклеточными; это соответствует месту сборки гликопротеинового комплекса и его функции в качестве центра распознавания клеток [29, 30].

Для исследования расположения белков в мембранах, а также расположения олигомеров в ферментах, состоящих из многих субъединиц, был разработан ряд методов мечения [24, 30] и сшивки [31—34]. Так, для сшивания молекул белков в мембране эритроцитов использовали окисление их внутренних меркаптогрупп [30]; после выделения комплекса образовавшиеся связи могут быть разрушены восстановительным расщеплением, что позволяло идентифицировать составляющие белки. Альтернативный подход [32, 33] заключался в биосинтетическом введении в биологические мембраны жирных кислот, несущих светочувствительную группу; сшивка производного жирной кислоты и смежного белка индуцировалась фотолизом. Сходные методы применяли для сшивки белков [34] в мембранах эритроцитов.

25.3.5.2. Липид-белковые взаимодействия в мембранах

Спектроскопические методы, в частности ЭПР, ЯМР и флуоресцентный все чаще применяются для изучения липид-белковых взаимодействий в мембранах. Внутренние мембранные белки могут быть экстрагированы из мембраны с помощью органических растворителей или (лучше) детергентов и очищены. Неоднократно было успешно продемонстрировано, что для восстановления биологической функции белка его необходимо ввести в мембрану определенного липидного состава.

Для изучения липид-белковых взаимодействий в таких реконструированных системах был применен метод спектроскопии ЭПР [35]. Цитохромоксидаза была очищена и отделена от ассоциированного с нею липида экстракцией растворителем. Путем обратного титрования липидом, содержащим спин-меченный зонд (см. разд. 25.3.5), показано существование слоя липида, прочно связанного с белком (рис. 25.3.9). Кроме того продемонстрировано, что для проявления ферментной активности необходимо существование такого пограничного слоя, состоящего из ~ 50 липидных молекул на молекулу цитохромоксидазы.

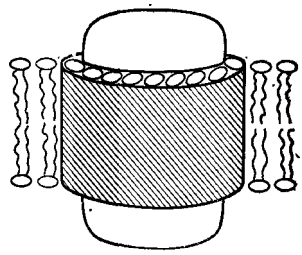


Рис. 25.3.9. Схематическое изображение цитохромоксидазы и ассоциированных с ней фосфолипидов [35]

Биохимические исследования показали, что пограничный липидный слой регулирует также активность кальцийзависимой АТР-азы из саркоплазматического ретикулума; для демонстрации того, что пограничный слой иммобилизован [35], были применены спиновые метки. На основании этих исследований был сделан вывод, что пограничный слой снижает степень нарушения бислоя за счет включения белка и что пограничный слой действует как медиатор, с помощью которого фазовые переходы и фазовые разделения в липидном бислое влияют на функционирование белка.

Метод спектроскопии ЯМР был использован [37] для изучения взаимодействия между белком гликофорином из мембран эритроцитов и дипальмитоилфосфатидилхолином, меченным изотопом ^{13}C по метильным группам холиновой головки. При температурах ниже температуры фазового перехода фосфолипидов в спектре ЯМР ^{13}C наблюдались два сигнала: узкий и широкий. Узкий пик был отнесен к холиновой головке, которая, как полагают, более подвижна в непосредственной близости к белку; этот вывод не исключает возможности иммобилизации алкильных цепей таких пограничных липидов и, следовательно, может не противоречить результатам, полученным при изучении поведения пограничных липидов в цитохромоксидазе и кальцийзависимой АТР-азе.

В рассмотренных до сих пор примерах липид-белкового взаимодействия активность ферментов увеличивалась при увеличении текучести окружающего их бислоя. Однако было показано [38], что активность фосфолипазы A_2, катализирующей гидролиз фосфолипидов, оптимальна во время фазового перехода фосфолипида. Этот результат можно понять, если принять во внимание особые свойства липидов на границе раздела упорядоченных и жидких доменов, существующих во время фазового перехода [39]. Эти данные позволяют предположить, что активность белков в мембранах зависит от наличия как пограничного слоя липидов, ассоциированных с белком, так и границы раздела фаз между различными липидными доменами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *R. Coleman*, Biochim. Biophys. Acta, 1973, 300, 1.
2. *G. D. Eytan, R. C. Carroll, G. Schatz, and E. Racker*, J. Biol. Chem., 1975, 250, 8598.
3. *G. Adam and M. Delbrück in* 'Structural Chemistry and Molecular Biology', ed. N. Davidson and A. Rich, Freeman, San Francisco, 1968, p. 198.
4. *M. S. Bretscher and M. C. Raff*, Nature, 1975, 258, 43.

5. 'The Biology of Cytoplasmic Microtubules', in Ann. New York Acad. Sci., 1975, 253, 1—848.
6. *V. T. Marchesi, H. Furthmayr, and M. Tomita*, Ann. Rev. Biochem., 1976, **45**, 667.
7. *S. J. Singer*, Ann. New York Acad Sci., 1972, **195**, 16
8. *G. G. Shipley*, in 'Biological Membranes', ed. D. Chapman and D. H. F. Wallach, Academic Press, New York, 1973, p. 1.
9. *P. B. Hitchcock, R. Mason, and G. G. Shipley*, J. Mol. Biol., 1975, **94**, 297.
10. *H. Fernandez-Moran*, Ann. New York Acad. Sci., 1972, **195**, 376.
11. *D. Marsh*, Essays Biochem., 1975, **11**, 139.
12. 'Carriers and Channels in Biological Systems', in Ann. New York Acad. Sci., 1975, **264**, 1—485.
13. *R. P. Rand, D. Chapman, and K. Larsson*, Biophys. J., 1975, **15**, 1117.
14. *S. J. Kohler and M. P. Klein*, Biochemistry, 1977, **16**, 519.
15. *H. Trauble and H. Eibl*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, **71**, 214.
16. *D. Chapman*, Quart. Rev. Biophys., 1975, **8**, 185.
17. *W. L. Hubbell and H. M. McConnell*, J. Amer. Chem Soc., 1971, **93**, 314.
18. *A. Seelig and J. Seelig*, Biochem. Biophys. Acta, 1975. **406**, 1.
19. *A. Seelig and J. Seelig*, Biochemistry, 1977, **16**, 45.
20. *P. F. Knowles, D. Marsh, and H. W. E. Rattle*, 'Magnetic Resonance of Biomolecules', Wiley, New York, 1976.
21. *M. Edidin*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1974, **3**, 179.
22. *J. L. Marx*, Science, 1974, 183, 1279.
23. *C. D. Linden, K. L. Wright, H. M. McConnell, and C. F. Fox*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, **70**, 2271.
24. *P. L. Yeagle, W. C. Hutton, R. B. Martin, B. Sears, and C.-H. Huang*, J. Biol. Chem., 1976, **251**, 2110.
25. *J. E. Rothman und J. Lenard*, Science, 1977, **195**, 743.
26. *G. Guidotti*, Ann. Rev. Biochem., 1972, **41**, 731.
27. *J. Bridgen and I. D. Walker*, Biochemistry, 1976, **15**, 792.
28. *R. Henderson and P. N. T. Unwin*, Nature, 1975, **257**, 28.
29. *J. D. Morrisett, R. L. Jackson, and A. M. Gotto*, Ann Rev. Biochem., 1975, **44**, 183.
30. *R. C. Hughes*, Essays Biochem., 1975, **11**, 1.
31. *K. Wang and F. M. Richards*, J. Biol. Chem., 1974, 249, 8005
32. *C. R. Greenberg, P. Chakrabarti, and H. G. Khorana*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73, 86.
33. *W. Stoffel, K. Salm, and U. Körkemeier*, Z. Physiol. Chem., 1976, **357**, 917.
34. *R. B. Mikkelsen and D. F. H. Wallach*, J. Biol. Chem., 1976, **251**, 7413.
35. *P. C. Jost, O. H. Griffith, R. A. Capaldi, and G. Vanderkooi*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, **70**, 480.
36. *T. R. Hesketh, G. A. Smith, M. D. Houslay, K. A. McGill, N. J. M. Birdsall, J. C. Metcalfe, and G. B. Warren*, Biochemistry, 1976, **15**, 4145.
37. *P. Brulet and H. M. McConnell*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, **68**, 363.
38. *J. A. F. Op den Kampf, M. Th. Kauerz, and L. L. M. van Deemen*, Biochim. Biophys Acta, 1975, 406, 169.
39. *D. Marsh, A. Watts, and P. F. Knowles*, Biochemistry, 1976, **15**, 3570.

ЧАСТЬ 26
ХИМИЯ УГЛЕВОДОВ

26.1. МОНОСАХАРИДЫ

Л. ХАФ, А. РИЧАРДСОН (Queen Elizabeth College, University of London)

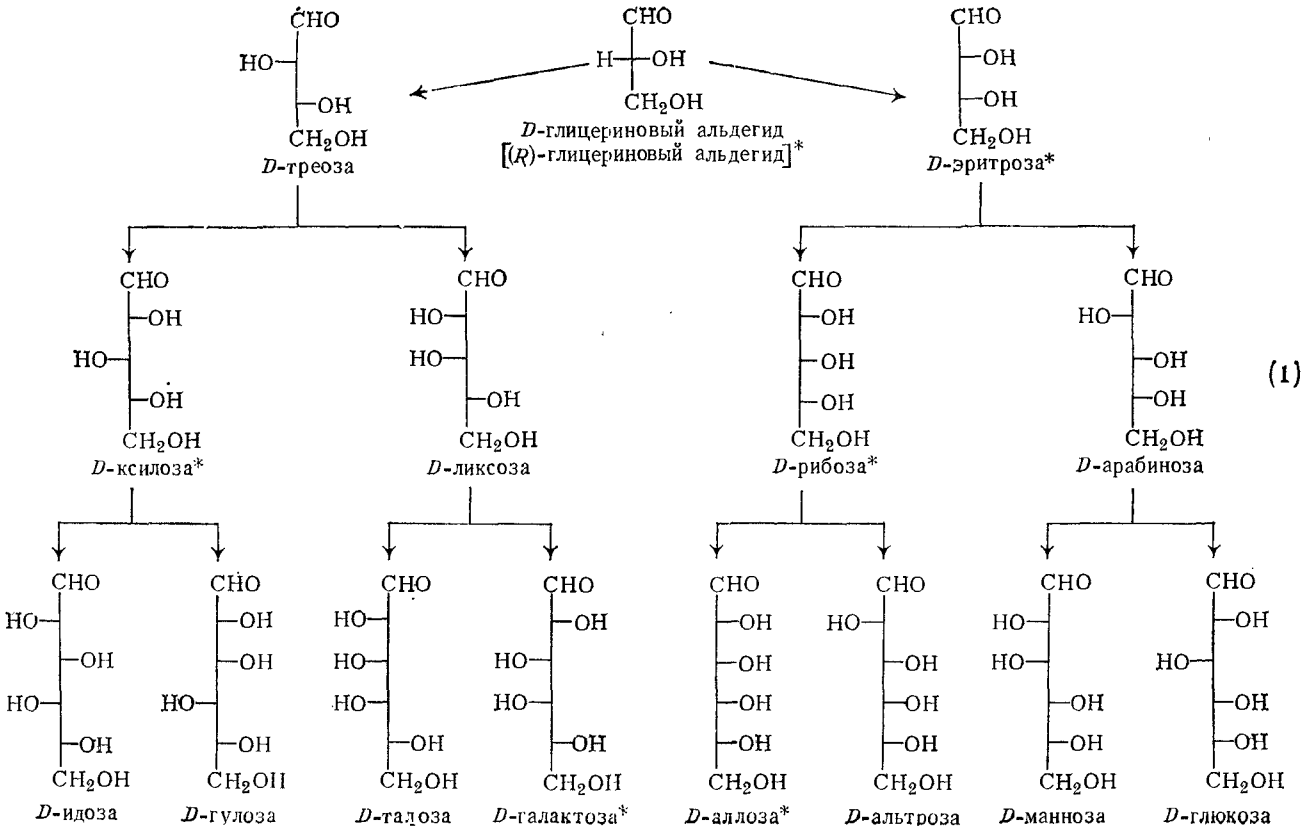
26.1.1. ВВЕДЕНИЕ

Углеводы являются чрезвычайно важным классом природных соединений. Исследование их химических свойств может дать ценную информацию о механизмах реакций и стереохимии. Значительным достижением в настоящее время является применение углеводов в качестве хиральных синтонов и заготовок для стереоспецифического синтеза таких соединений, как простагландины, аминокислоты, гетероциклические производные, липиды и т. д. Для биолога значение углеводов заключается в доминирующей роли, которая отводится им в живых организмах, и в сложности их функций. Углеводы участвуют в большинстве биохимических процессов в виде макромолекулярных частиц, хотя во многих биологических жидкостях содержатся моно- и дисахариды, а большинство растений содержит глюкозу, фруктозу и сахарозу. Только растения способны осуществлять полный синтез углеводов посредством фотосинтеза, в процессе которого атмосферный диоксид углерода превращается в углеводы, причем в качестве источника энергии используется свет (см. гл. 28.2). В результате этого накапливается огромное количество гомополисахаридов — целлюлозы (структурный материал) и крахмала (запасной питательный материал). Некоторые растения, в особенности сахарный тростник и сахарная свекла, накапливают относительно большие количества уникального дисахарида сахарозы (α-*D*-глюкопиранозил-β-*D*-фруктофуранозида), который выделяют в значительных количествах ($82 \cdot 10^6$ т в год). Сахароза — наиболее дешевое, доступное, чистое органическое вещество, запасы которого (в отличие от запасов нефти и продуктов ее переработки) можно восполнять. *D*-Глюкоза известна уже в течение нескольких веков из-за ее способности кристаллизоваться из засахаривающегося меда и винного сусла. В промышленном масштабе ее получают гидролизом крахмала, причем в настоящее время применяют непрерывную схему с использованием ферментов, иммобилизованных на твердом полимерном носителе.

26.1.2. СТРОЕНИЕ МОНОСАХАРИДОВ

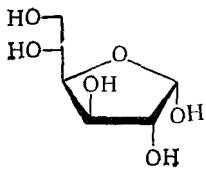
Доказательство строения и стереохимического родства восьми *D*-гексоз и четырех *D*-пентоз (схема 1) было основано на блестящей работе Эмиля Фишера, за которую он был удостоен Нобелевской премии в области химии в 1901 г. [1]. Выводы Фишера были основаны на приведенных ниже наблюдениях. а) Моносахариды, эпимерные по С-2, дают одни и те же фенилозазоны при реакции с фенилгидразином. б) Восстановление альдозы до альдита (см. разд. 26.1.5) или окисление до дикарбоновых (гликаровых) кислот (см. разд. 26.1.6.3) приводят к продуктам, оптическая активность которых зависит от их конфигурации. в) Наращивание углеродного скелета (см. разд. 26.1.4.2) позволяет установить взаимосвязь пентоз с гексозами и т. д. Так, *D*-глюкоза и *D*-маннноза являются эпимерами по С-2, так как они дают один и тот же фенилозазон и должны, следовательно, иметь одинаковые конфигурации при С-3, С-4 и С-5. Кроме того, энантиомеры этих двух гексоз получают с помощью методов удлинения углеродного скелета (см. разд. 26.1.4.2) из пентозы арабинозы (из гуммиарабика). Так как глюкоза, маннноза и арабиноза превращаются в оптически активные альдиты и гликаровые кислоты, была определена конфигурация арабинозы (см. схему 1). Стереохимические особенности строения маннозы и глюкозы установлены на основании того факта, что глюцит (из глюкозы) является энантиомером гулита (из гулозы) (см. разд. 26.1.5). Фишер произвольно приписал абсолютную конфигурацию предпоследнему атому углерода глюкозы, позднее обозначенную согласно правилу Кана — Ингольда — Прелога как *R*; моносахариды с такой конфигурацией этого атома были отнесены к *D*-ряду (см. схему 1; звездочкой отмечены моносахариды, при восстановлении которых образуются оптически неактивные альдиты, а при окислении — оптически неактивные гликаровые кислоты). Оптические антиподы этого ряда получили название *L*-сахаров. Произвольно приписанная конфигурация для С-5 *D*-глюкозы была позднее подтверждена как правильная абсолютная конфигурация [2].

Ациклические структуры альдоз (см. схему 1), однако, не адекватно отражают все химические свойства этих соединений. Например, *D*-глюкоза не дает реакции Шиффа на альдегиды и в зависимости от условий кристаллизуется в двух формах (α- и β-), которые имеют различное начальное оптическое вращение $[\alpha]_D$ + + 111° и +19°, соответственно, постепенно достигающее равновесного значения +53°. Кроме того, при попытке получения диметилацеталей реакцией с метанолом в условиях кислотного катализа присоединяется одна *O*-метильная группа, а не две. При этом образуются два изомерных монометильных производных, называемых метилгликозидами ($[\alpha]_D$ + 159° и —34°, соответственно). Было высказано предположение, что альдозы существуют в виде циклических полуацеталей, например (1)—(4). Такие структуры

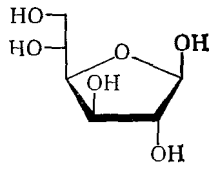

D-глицериновый альдегид
[(R)-глицериновый альдегид]*
D-треоза
D-эритроза*
D-ксилоза*
D-ликсоза
D-рибоза*
D-арабиноза
D-идоза
D-гулоза
D-талоза
D-галактоза*
D-аллоза*
D-альтроза
D-манноза
D-глюкоза

(1)

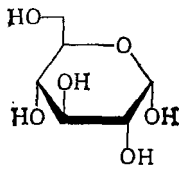
объясняли существование глюкозы в двух формах, так как внутримолекулярное образование полуацеталя приводит к возникновению нового хирального центра. Метилгликозиды сохраняли полуацетальную циклическую форму, однако вместо гидроксигруппы при С-1 они содержат метоксигруппу.



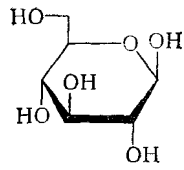
(1)



(2)

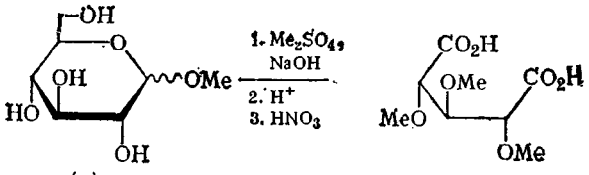


(3)

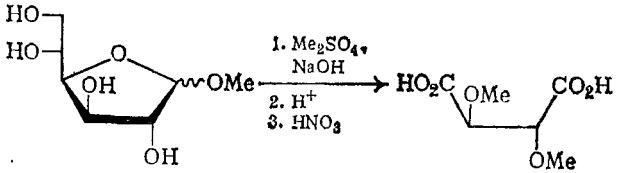


(4)

До 1923 г. считалось, что молекулы моносахаридов существуют преимущественно в пятичленной фуранозной форме (в большинстве случаев на основании косвенных доказательств). Однако позднее Хеуорсом и Херстом было установлено, что для альдоз шестичленная пиранозная форма предпочтительнее, чем пятичленная фуранозная [3]. Например, метилирование обоих термодинамически выгодных метилглюкозидов, полученных из *D*-глюкозы, с последующим кислотным гидролизом приводит к одной и той же тетра-*O*-метилглюкозе, что указывает на общее для них строение цикла [4]. Энергичное окисление тетра-*O*-метилглюкозы приводит к 2,3,4-три-*O*-метилксиларовой кислоте (**6**), которая может образоваться только из пиранозида (**5**) [5]. Соответствующий фуранозид (**7**), который был впоследствии получен в мягких условиях из *D*-глюкозы (см. разд. 26.1.8.1), дает при окислении 2,3-ди-*O*-метил-*L*-винную кислоту (**8**) [6]. Хотя такими способами было успешно доказано циклическое строение метилгликозидов, о циклическом строении самих альдоз можно было сделать вывод лишь по аналогии со строением модифицированных пираноз. Прямое доказательство было получено позднее Хадсоном и др. [7], которые показали, что при окислении альдоз бромной водой в присутствии карбоната бария образуются лактоны, а не альдоновые кислоты, которые должны были бы образовываться при прямом окислении *аль*-форм или при раскрытии цикла лактонов путем гидролиза [8].

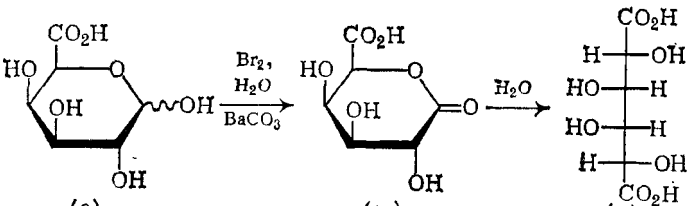


(5) (6) (2)



(7) (8) (3)

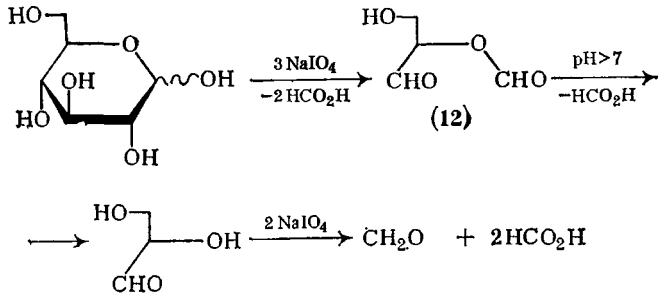
Окисление свежеприготовленных растворов кристаллических α- и β-глюкоз приводит в обоих случаях к 1,5-лактону, из чего следует, что *D*-глюкоза существует в пиранозных формах (3) и (4). Как α-, так и β-галактуроновая кислота (9) образует оптически активную смесь 1,5-лактона (10) и 1,4-лактона [9], тогда как лактоны, образующиеся через ациклическую галактаровую (слизевую) (11) кислоту (которая является *мезо*-соединением), дали бы рацемическую смесь. Этот результат четко показывает, что при окислении не образуется ациклическое промежуточное соединение, и что, поскольку образуются как 1,4-, так и 1,5-лактоны, *D*-галактуроновая кислота существует в виде смеси фуранозной и пиранозной форм.



(9) (10) (11) (4)

Окисление расщепляющими гликольные группировки реагентами (тетраацетат свинца, метаиодная кислота и т. д.) оказалось удобным методом установления циклического строения углеводов (см. разд. 26.1.6.5) [10]. Так, в 1934 г. было показано [11], что при окислении как метил-α-*D*-, так и метил-β-*D*-глюкопиранозида расходуется 2 моль окислителя и выделяется 1 моль муравьиной кислоты, что соответствует структуре пиранозида; при окислении фуранозида расходуется 2 моль окислителя и выделяется 1 моль формальдегида. Окислением метаиодной кислотой восстанавливающих сахаров в водных растворах показано, что они также существуют в пиранозной форме. Так, окисление *D*-глюкозы при

pH 3,7, когда промежуточно образующийся 2-*O*-формилглицериновый альдегид (**12**) устойчив, приводит к быстрому поглощению 3 моль окислителя и выделению 2 моль муравьиной кислоты. Соединение (**12**) медленно гидролизуется до глицеринового альдегида, который затем окисляется; при этом расходуются 2 моль окислителя и образуются муравьиная кислота (2 моль) и формальдегид (1 моль) [12]. В случае фуранозной формы на первой стадии реакции выделялся бы формальдегид в результате разрыва связи в положении 5,6.



(5)

Описанные выше химические методы определения строения в настоящее время сильно потеснены физическими методами, в особенности спектроскопией ЯМР ^{1}H и ^{13}C [13], масс-спектрометрией [14] и рентгеноструктурным анализом [15], которые дают информацию не только о первичной структуре, но и о форме или конформации молекулы.

Таблица 26.1.1. Равновесный состав водных растворов альдоз при 40 °С, определенный методом ГЖХ [16]

Альдоза	Содержание в смеси, %			
	α-пиранозная форма	β-пиранозная форма	α-фуранозная форма	β-фуранозная форма
Рибоза	20	56	6	18
Арабиноза	63	34	3 [а]	
Ксилоза	33	67	< 1 [а]	
Ликсоза	71	29	< 1 [а]	
Аллоза	18	70	5	7
Альтроза	27	40	20	13
Глюкоза	36	64	< 1 [а]	
Манноза	67	33	< 1 [а]	
Гулоза	< 22	> 78	< 1 [а]	
Идоза [б]	31	37	16	16
Галактоза	27	73	< 1 [а]	
Талоза	40	29	20	11

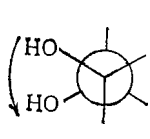
[а] Суммарное содержание α- и β-фуранозных форм. [б] При 60 °С.

Считают, что в растворе моносахариды существуют в виде равновесной смеси всех возможных форм, включая ациклические *аль*-формы и, возможно, семичленную септанозную форму. Преобладающей формой является наиболее термодинамически устойчивая, в большинстве случаев — пиранозная, хотя это зависит от применяемого растворителя. Состав равновесных водных растворов моносахаридов определен методом газожидкостной хроматографии после триметилсилилирования [16], причем оказалось, что только в случаях рибозы, альтрозы, идозы и талозы присутствуют значительные количества фуранозных форм (см. разд. 26.1.3). Состав смесей, образующихся в результате мутаротации альдоз, приведен в табл. 26.1.1.

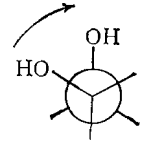
Несмотря на то что ациклическая, септанозная и фуранозная формы в равновесной смеси присутствуют в очень небольших количествах, моносахариды часто реагируют в одной из этих форм, образуя продукты соответствующих превращений.

26.1.3. КОНФОРМАЦИЯ МОНОСАХАРИДОВ

Термин «конформация» был первоначально введен Хеуорсом [3] для обозначения трехмерной структуры молекулы; он предсказал преимущественную конформацию кресла для пиранозных циклов. Первое экспериментальное подтверждение того, что пиранозные формы моносахаридов существуют в растворе только в виде конформации кресла, было получено Ривзом [17] при изучении образования комплексов пираноидных производных с ионом тетраамминмеди(II) $[Cu(NH_3)_4]^{2+}$. Было показано, что такие ионы образуют комплексы только с вицинальными диолами, расстояние между атомами кислорода которых равно или меньше 286 пм. Следовательно, только вицинальные диолы с торсионным углом 60° или менее вступают в комплексообразование. Для подтверждения образования комплекса используют два параметра: увеличение удельной электропроводности раствора и изменение удельного вращения хиральных соединений. Первый параметр характеризует устойчивость комплекса, второй относится к пространственному расположению диольной группировки [17]. Например, если торсионный угол между двумя гидроксигруппами положительный (поворот против часовой стрелки), наблюдается положительный вклад в значение оптического вращения, в случае отрицательного торсионного угла этот вклад отрицательный.



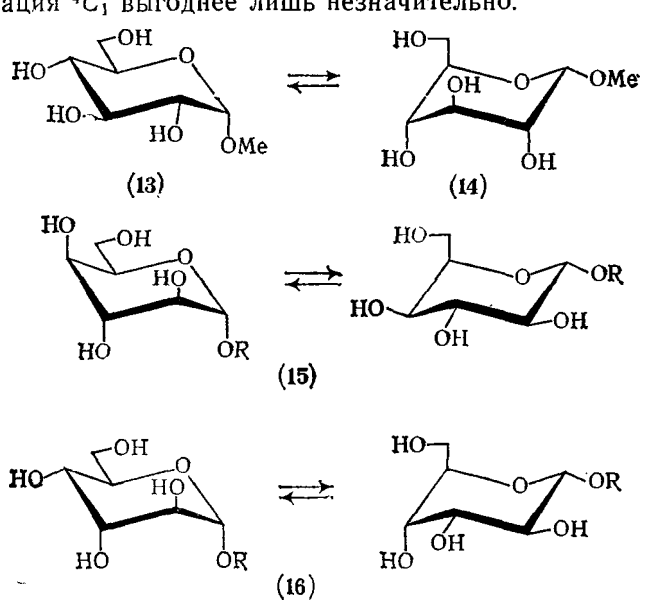
$\phi = +60°$



$\phi = -60°$

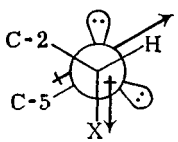
В случае метил-α-*D*-глюкопиранозида образование комплекса с ионом тетраамминмеди(II) протекает без заметного изменения молекулярного вращения, так как в предпочтительной конформации $^4C_1$ (13) 2,3- и 3,4-диольные группировки должны вносить соответственно отрицательный (*laevo*) и положительный (*dextro*) вклады в значение оптического вращения, и, следовательно, их влияние взаимно компенсируется. В пользу этого вывода говорит тот факт, что 4-*O*-метиловый эфир образует (—)-комплекс, тогда как из 2-*O*-метилового эфира получается (+)-производное, а 3-*O*-метиловый эфир не образует комплексного соединения. Ривз предположил, что метил-α-*D*-глюкопиранозид и его простые производные существуют в конформации $^4C_1$ (13), так как в альтернативной конформации $^1C_4$ все гидроксильные группы находятся в аксиальных положениях и комплекс с ионом тетраамминмеди(II) образоваться не может.

С помощью этого метода Ривз сумел показать, что гликозиды наиболее распространенных гексоз (глюкозы, маннозы и галактозы) и многих других находятся в конформации $^4C_1$, в которой большинство гидроксигрупп экваториально, однако α-*D*-идозиды (15) и α-*D*-альтрозиды (16) отличаются конформационной нестабильностью и существуют в виде смеси двух возможных конформаций. Такое нестандартное поведение было затем подтверждено методом спектроскопии ЯМР, с помощью которого было показано, что для производных α-*D*-идопиранозы [18] и α-*D*-альтропиранозы конформация $^4C_1$ выгоднее лишь незначительно.

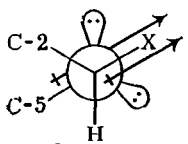


Эдвард [20] установил, что агликон при аномерном атоме углерода (С-1) пиранозного цикла обычно находится предпочтительно

в аксиальном положении, особенно в менее полярных растворителях. Это явление известно как *аномерный эффект* и вызывается стереоэлектронными факторами, возникающими из-за более благоприятного взаимодействия между диполем неподеленной электронной пары кислородного атома цикла и диполем связи С-1—заместитель в аксиальном положении [21]. Так, из ньюменовской проекции молекулы β-аномера вдоль связи С-1—О-5 можно видеть, что диполь связи С-1—Х параллелен диполю кислородного атома цикла, вследствие чего отталкивание между этими диполями сильнее, чем в случае α-аномера.



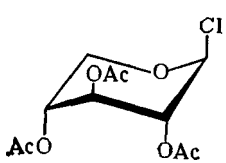
α-аномер
(X аксиален)



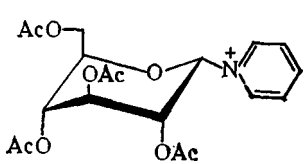
β-аномер
(X экваториален)

Аномерный эффект зависит от природы группы X и растворителя; например, когда X — гидроксигруппа, в водном растворе аномерный эффект ослабляется из-за сольватации, которая снижает дипольные моменты, поэтому в состоянии равновесия *D*-глюкоза содержит лишь 36 % α-аномера. Однако при растворении как метил-α-*D*-глюкопиранозида (**13**), так и его β-аномера в подкисленном метаноле при 35 °С образуется равновесная смесь, в которой преобладает α-аномер (66 %). Более электроотрицательные заместители при С-1 должны вызывать больший аномерный эффект. Например, когда X — фтор или хлор, то требование аксиального расположения заместителя возрастает настолько, что конформация углеводного цикла может измениться с полностью экваториальной на полностью аксиальную. Так, методом ЯМР было показано, что 2,3,4-три-*O*-ацетил-β-*D*-ксилопиранозилхлорид в дейтерохлороформе существует в невыгодной на первый взгляд $^1C_4$-конформации (**17**) [22].

Если заместитель при аномерном центре более электроположителен, чем углерод, ситуация меняется и более выгодным становится экваториальный β-аномер (обратный аномерный эффект). Например, *N*-гликозилпиридиниевые соли типа (**18**) существуют в менее стабильной конформации $^1C_4$ [23].



(17)



(18)

Таблица 26.1.2. Факторы неустойчивости для пираноз в водном растворе [24]

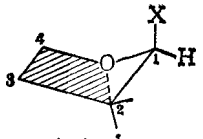
Факторы неустойчивости [а]	Энергия дестабилизации, кДж/моль	Факторы неустойчивости [а]	Энергия дестабилизации, кДж/моль
Диаксиальные взаимодействия		Аномерный эффект [б]	
O_a/H_a	1,88	при *e*-2-OH	2,30
C_a/H_a	3,77	при *a*-2-OH	4,18
O_a/O_a	6,28	при *a*-2-OH, *a*-3-OH	3,56
O_a/C_a	10,46	при отсутствии 2- и 3-OH	3,56
Вицинальные взаимодействия			
O_a/O_e (O_e/O_e)	1,46		
C_a/O_e (C_e/O_e)	1,88		

[а] *a* — аксиальный, *e* — экваториальный. [б] Учитывается, если 1-OH является экваториальным.

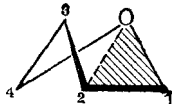
Первоначально Ривз [17] предложил концепцию «факторов неустойчивости», которые нужно суммировать для каждой возможной конформации: наименьшая сумма соответствует наиболее стабильной конформации. Позже эта система была усовершенствована Энджиэлом [24], который определил энергии дестабилизации для различных 1,2-вицинальных и 1,3-аксиальных взаимодействий (табл. 26.1.2). Энергии дестабилизации для каждой конформации кресла суммируют и, если они отличаются на 3 кДж/моль или более (что соответствует равновесному соотношению обеих конформаций кресла, равному 3 : 1), то может быть предсказан предпочтительный конформер. Если же разница меньше указанного значения, то в равновесной смеси присутствуют значительные количества обоих конформеров. Применяя этот эмпирический метод, который обычно хорошо согласуется с экспериментальными данными, можно предсказать не только предпочтительную конформацию, но и предпочтительный аномер. Например, вычисленная разница энергий $^4C_1$-конформеров β- и α-*D*-глюкопиранозы [(4) и (3) соответственно] составляет 1,46 кДж/моль, что соответствует содержанию в равновесной смеси 36 % α-аномера. Это значение хорошо совпадает со значением, полученным на основании измерения оптического вращения равновесной смеси при мутаротации *D*-глюкозы (36,2 %). Аналогично, рассчитанное содержание α-аномера *D*-маннозы составляет 68 %, а путем измерения оптического вращения получено значение 68,8 %.

Конформации фуранозных циклов определить труднее, однако известно, что они изогнуты и существуют в форме конверта [*E* (от *envelope*); один из атомов углерода вне плоскости цикла] (19) или в скрученной форме [*T* (от *twist*); два вицинальных атома углерода вне плоскости] (20) [13]. Разница в энергии между различными *E*- и *T*-конформациями, по-видимому, невелика, однако

объемистые заместители находятся предпочтительно в *квази*-экваториальных положениях. Электроотрицательные заместители при С-1, напротив, являются предпочтительно *квази*-аксиальными вследствие аномерного эффекта, как, например, в (19). Обычно вицинальное *цис*-расположение не осуществляется, поэтому в фуранозах предпочтительным является 1,2-*транс*-аномер (см. табл. 26.1.1).



(19) E^1



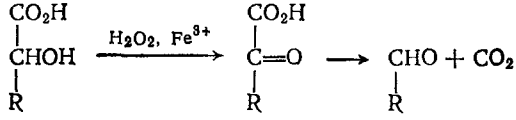
(20) $^3T_4$

26.1.4. СИНТЕЗ МОНОСАХАРИДОВ [25]

Моносахариды, легко выделяемые из природных источников (например, *D*-глюкоза, *D*-галактоза, *D*-манноза и т. д.), обычно используют для получения менее доступных сахаров. Полный синтез многих углеводородов осуществляется из неуглеводных исходных соединений, однако недостатком такого пути является необходимость разделения оптических изомеров на некоторых стадиях синтеза.

26.1.4.1. Укорочение углеродной цепи

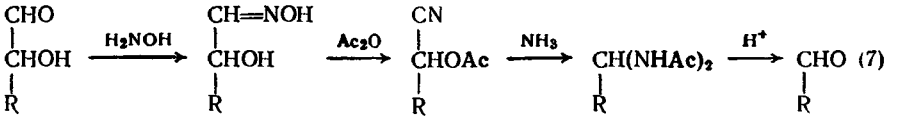
Элиминирование одного из терминальных атомов углерода в моносахариде может быть осуществлено различными способами и приводит к образованию низшей альдозы. Одним из классических методов является *распад по Руффу*, при котором окисление производного альдоновой кислоты (см. разд. 26.1.6.6) пероксидом водорода в присутствии ионов железа(III) приводит к низшей альдозе через промежуточную 2-кетоальдоновую кислоту (схема 6). Эта реакция протекает обычно с низкими выходами; выходы повышаются при использовании ионообменных смол. Например, выход *D*-ликсозы из *D*-галактозы был улучшен таким образом с 17 до 41 % [26].



(6)

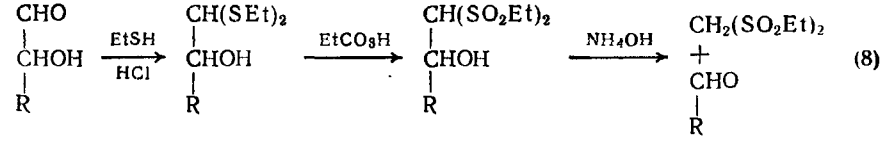
Распад по Волю (схема 7) включает дегидратацию оксима альдозы при действии уксусного ангидрида до *O*-ацетилированного нитрила с последующим элиминированием циановодорода под действием аммиака и *O*-дезацетилированием с образованием 1,1-бис(ацетамидо)производного (образуется из аминированного альдегида путем миграции ацетила от атома кислорода к атому

азота). После мягкого кислотного гидролиза этого производного получается низшая альдоза.



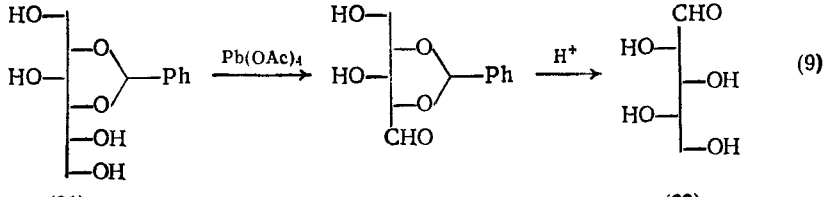
(7)

Наиболее мягким методом, протекающим с наиболее высокими выходами, является *расщепление дисульфонов*, разработанное Фишером [27] и затем Хафом и др. [28]. По этой методике альдозу сначала превращают в диалкилдитиоацеталь (меркапталь) реакцией с соответствующим алкантиолом и окисляют далее пероксипропионовой кислотой, в результате чего образуется дисульфон. Такие дисульфоны либо существуют в ациклической форме (схема 8), либо подвергаются дегидратации с образованием циклической пиранозной или фуранозной формы [28]. Независимо от строения дисульфона под действием разбавленного раствора аммиака разрывается связь С-1—С-2 и образуется бис(алкилсульфонил)метан и альдоза с числом атомов углерода, меньшим на единицу. Вследствие высоких выходов и чистоты конечного продукта этот метод является лучшим методом укорочения углеродной цепи углеводов.



(8)

Если доступны подходящим образом защищенные производные, в которых имеется терминальная диольная группировка, то укорочение цепи может быть произведено в одну стадию с помощью расщепляющих гликоли реагентов. Например, при расщеплении 5,6-диольной группировки 2,4-*О*-*б*ензилиден-*D*-глюцита (**21**) тетраацетатом свинца образуется формальдегид и ацеталь альдопентозы, который после мягкого кислотного гидролиза превращается в *L*-ксилозу (**22**) [29]. Аналогично, 3-*О*-бензил-*D*-глюкоза, которая реагирует преимущественно в пиранозной форме, образует (после гидролиза формильного эфира) 2-*О*-бензил-*D*-арабинозу [30].

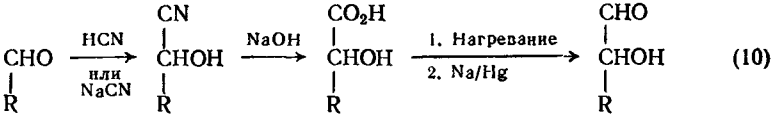


(9)

(**21**) (**22**)

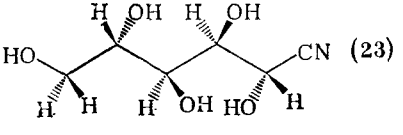
26.1.4.2. Наращивание углеродной цепи

Два очень широко распространенных метода применяются для получения из одной альдозы смеси двух эпимерных высших альдоз путем присоединения «углеродного нуклеофила» к потенциальной альдегидной группе моносахарида. Классический метод — *цианогидриновый синтез по Фишеру — Килиани* [31] — включает присоединение циановодорода по двойной связи карбонильной группы (в результате чего возникает новый хиральный центр при С-2) с последующим гидролизом нитрила, лактонизацией образующейся кислоты и восстановлением до альдоз (схема 10). Эпимеры обычно разделяют на стадии образования альдоновых кислот или их лактонов.



(10)

Первоначальное присоединение циановодорода к карбонильной группе часто протекает стереоспецифично; по-видимому, это зависит от условий реакции. Например, реакция *L*-арабинозы с цианидами щелочных металлов при pH 9,0—9,1 быстро протекает до конца с образованием в основном *L*-глюконовой кислоты [32], тогда как в кислой среде превращение происходит не полностью и образуется в основном *L*-манноновая кислота. Согласно правилу Крама [33], должна преобладать *L*-глюконовая кислота; это означает, что в щелочной среде реакция может быть кинетически контролируемой, тогда как в кислой среде она может контролироваться термодинамически, и, следовательно, может преобладать 2,4-*трео*-конфигурация, в которой гидроксигруппы при С-2 и С-4 максимально удалены друг от друга (правило Молтби). В зигзагообразной конформации ациклических соединений 1,3-*эритро*-взаимодействия являются дестабилизирующими и, следовательно, не осуществляются [34]. Такая конформация, в частности, должна преобладать в случае *L*-маннононитрила (**23**), так как он не содержит 1,3-*эритро*-группировки, и это, возможно, является причиной преимущественного образования этого соединения в кислой среде, когда определяющим является термодинамический контроль.

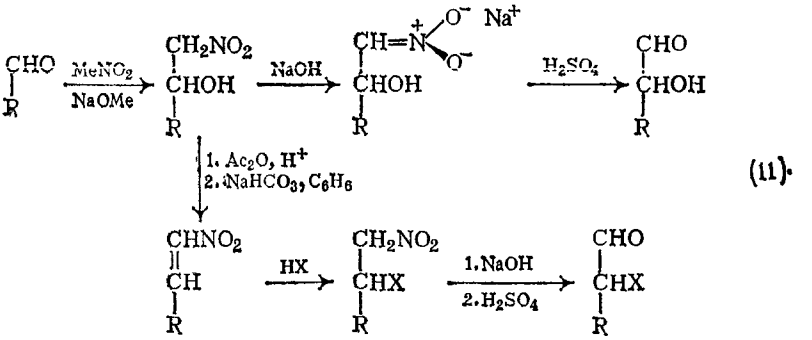


(23)

При восстановлении лактонов альдоновых кислот до альдоз необходимо тщательно контролировать условия реакции, чтобы исключить перевосстановление до альдита. В оригинальной

методике была использована амальгама натрия и pH выдерживали строго в интервале 3,0—3,5. Позднее было найдено, что те же результаты дает восстановление борогидридом натрия при 0 °C и pH 3—4 [35]. Альтернативным методом является прямое восстановление цианогидрина до альдозы каталитическим гидрированием [36].

Легкодоступными «углеродными нуклеофилами» являются нитроалканы. Элегантным методом увеличения длины углеродной цепи альдоз является реакция с нитрометаном (схема 11) [37]. Первичными продуктами реакции являются два диастереомерных 1-дезокси-1-нитроальдита, которые обычно могут быть разделены на этой стадии фракционной кристаллизацией. Так как реакция протекает несомненно под термодинамическим контролем, обычно преобладает нитроальдит с 2,4-*трео*-конфигурацией. Нитроальдиты по реакции Нефа (последовательная обработка основанием и кислотой) превращают в альдозы (см. схему 11). Возможности этой реакции могут быть расширены путем превращения нитроальдита в 1-нитро-1-ен; последний в результате нуклеофильного присоединения по двойной связи образует ряд 2-замещенных 1-нитроальдитов, которые служат предшественниками соответствующих альдоз (см. схему 11).



(11)

Другими «углеродными нуклеофилами», применяемыми для наращивания углеродной цепи сахаров, являются диазометан [38], реактивы Гриньяра [39], малоновые эфиры [40], реактивы Виттига [41] и др.

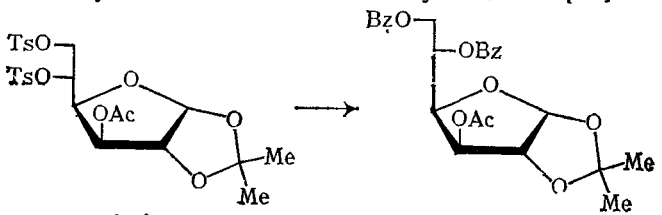
26.1.4.3. Изменение конфигурации

Для получения некоторых редких сахаров используют обращение конфигурации при одном или более хиральных центрах легкодоступных стереоизомеров. Например, *D*-галактоза, в отличие от ее эпимера по C-2, *D*-талозы, легко доступна. Катализируемая основанием эпимеризация по C-2 производного *D*-галактоновой кислоты приводит к *D*-талоновой кислоте, которую после лактонизации восстанавливают в *D*-талозу. Однако выходы при этом очень

малы, и данный метод может быть применен лишь при наличии больших количеств исходного соединения. Эпимеризацию свободных сахаров обычно не проводят, так как в этих условиях они часто подвергаются многочисленным перегруппировкам (см. разд. 26.1.7).

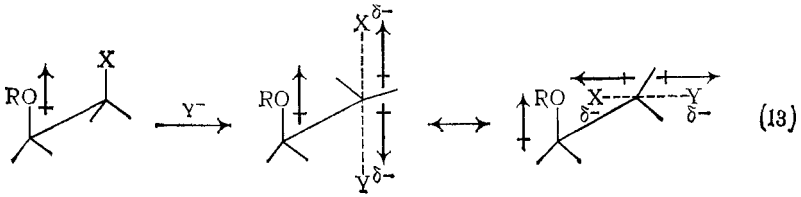
Сульфонилоксигруппы или любые другие хорошо уходящие группы, соответствующим образом расположенные в молекуле моносахарида, подвергаются бимолекулярному нуклеофильному замещению (S_N2) кислородсодержащими нуклеофилами, такими как бензоат или ацетат, в биполярных апротонных растворителях (например, в *N*,*N*-диметилформамиде) [42]. По месту замещения наблюдается обращение конфигурации (в случае хирального центра). Реакционная способность при таком замещении по механизму S_N2 зависит от природы моносахарида и места замещения. Ричардсон [43] сформулировал правило, основанное на стереоэлектронных факторах в переходном состоянии, с помощью которых можно предсказать относительную реакционную способность сульфонилоксигрупп, присоединенных к пиранозному циклу.

Сульфонилоксигруппы, присоединенные к экзоциклическим атомам углерода, обычно легко подвергаются нуклеофильному замещению. Так, 5,6-дитозилат глюкофуранозы (24) при обработке бензоатом натрия в *N*,*N*-диметилформамиде дает 1,2-*O*-изопропилиден-β-*L*-идофуранозу в форме триэфира (25) с обращением конфигурации при C-5; таким образом, эта реакция представляет собой удобный подход к синтезу *L*-идозы [44].



(24) (25) (12)

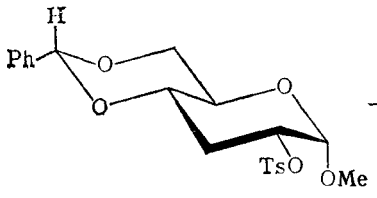
Переходное состояние при реакции по механизму S_N2 включает образование двух промежуточных диполей; легкость возникновения диполей обусловливается их взаимодействием с постоянными диполями, имеющимися в молекуле. Так, диполи заместителей, смежных с местом замещения, должны оказывать заметное влияние; в большинстве случаев они препятствуют появлению промежуточных диполей и, следовательно, затрудняют реакцию (схема 13).



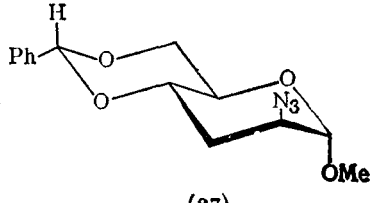
(13)

Кроме того, существует зависимость силы взаимодействия от торсионного угла между противоположно направленными диполями, которая будет максимальной, когда диполи параллельны, и минимальной, когда они перпендикулярны.

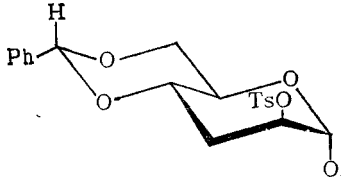
В тех случаях, когда имеются три и более вицинальных постоянных диполя, нуклеофильное замещение затрудняется настолько, что реакция обычно становится невозможной, если нуклеофильными частицами являются анионы. Поэтому попытки провести нуклеофильное замещение при вторичном атоме углерода, смежном с аномерным центром, редко увенчиваются успехом в случае заряженных нуклеофилов из-за противодействия трех постоянных диполей (двух диполей заместителей при С-1 и одного диполя заместителя при С-3). Однако при использовании нейтральных нуклеофилов, таких как аммиак или гидразин, замещение возможно, так как они обращают полярность одного из промежуточных диполей и приводят к притяжению диполей. Можно было бы ожидать, что при отсутствии полярного заместителя у С-3, как в 3-дезокси-2-тозилате (26), замещение будет протекать легче и приведет (в случае азид-аниона) к 2-азиду (27) [45]. Однако в случае родственного 2-аксиального тозилата (28) идет главным образом элиминирование и образуется 2-ен [46], по-видимому, вследствие того что 2-тозилоксигруппа расположена антиперипланарно к одному из атомов водорода при С-3, что сильно облегчает *E*2-элиминирование.



(26)



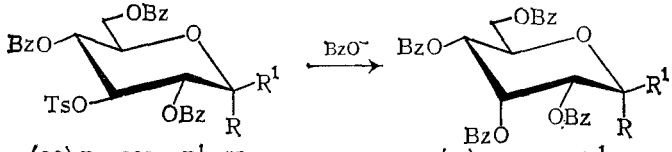
(27)



(28)

На замещение в других положениях пиранозного цикла влияет ориентация вицинальных заместителей и расположение заместителей в β-положении. Если группа, отличная от водорода, находится в β-*транс*-аксиальном положении к уходящей группе, то нуклеофильное замещение будет сильно осложнено из-за стерической затрудненности подхода нуклеофила [42]. Так, реакция метил-2,4,6-три-*О*-бензоил-3-*О*-тозил-α-*D*-глюкопиранозида (29) с бен-

зоат-анионом протекает гораздо медленнее реакции β-аномера (30) [47]. В обоих случаях образуются соответствующие аллопиранозиды (31) и (32); эта реакция представляет собой удобный метод синтеза метилаллопиранозидов. Аналогично, метил-2,3-ди-*О*-изопропилиден-4-*О*-тозил-α-*D*-маннопиранозид не подвергается в заметной степени прямому нуклеофильному замещению; обычно преимущественно наблюдается сужение цикла [48].



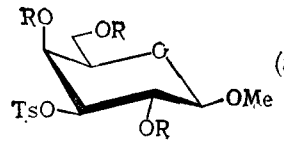
(14)

(29) R= OMe, R^1= H
(30) R= H, R^1= OMe
(31) R= OMe, R^1= H
(32) R= H, R^1= OMe

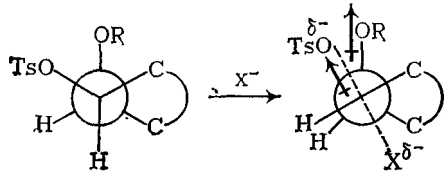
Наличие вицинального аксиального заместителя также затрудняет нуклеофильное замещение из-за неблагоприятного взаимодействия диполей в переходном состоянии. Например, 3-сульфонаты производных глюкопиранозы легко вступают в реакцию нуклеофильного замещения, когда аномерный центр имеет β-конфигурацию (как в **30**), тогда как соответствующее производное галактопиранозы [например, (**33**)] не реагирует из-за наличия аксиального заместителя при С-4 [43]. Нагляднее всего это видно в проекциях Ньюмена вдоль связи С-3—С-4 основного (**34**) и переходного (**35**) состояний (схема 15). Можно видеть, что промежуточные диполи в переходном состоянии располагаются почти на одной прямой с постоянным диполем связи С-4—заместитель, что приводит к максимальному их отталкиванию. Действительно, показано [49], что замещение бензоат-анионом в положение 2 метил-3,4,6-три-*О*-метил-2-*О*-тозил-β-*D*-глюкопиранозида (1-ОМе экваториален) может протекать с хорошим выходом при длительном проведении реакции, тогда как α-аномер (1-ОМе аксиален) не вступает в эту реакцию из-за наличия вицинального аксиального полярного заместителя при С-1.

С помощью реакции нуклеофильного замещения может быть легко заменена сульфонилоксигруппа при С-4 в α- и β-глюко-, галакто-, ксило- и арабинопиранозидах и (как результат изменения конформации) в альтропиранозиде, а также группа при С-3 в β-глюко- и β-ксилопиранозидах и, по-видимому, в β-аллопиранозиде.

Еще одним примером использования эфиров сульфокислот служит их превращение в эпоксиды в случае, когда вицинальная гидроксигруппа имеет *транс*-конфигурацию [42, 50]. Реакция протекает в присутствии основания, обычно с высоким выходом. Например, 2- и 3-тозилаты [(**36**) и (**37**), соответственно] метил-4,6-*О*-бензилидеи-α-*D*-глюкопиранозида дают 2,3-ангидриды с *манно*- (**38**) и *алло*-конфигурацией (**39**). Взаимодействие этих эпоксидов



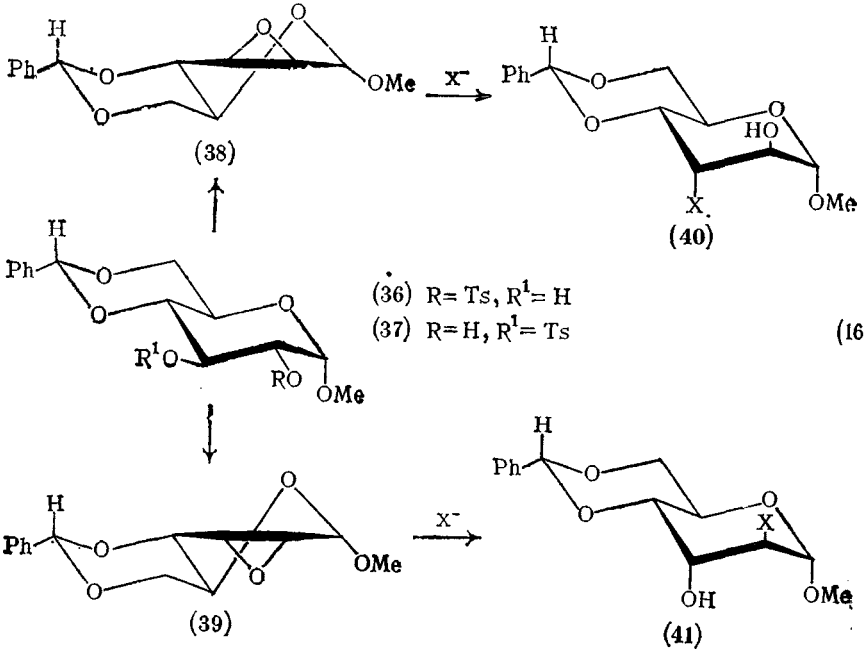
(33)



(34) (35)

(15)

с нуклеофилами в щелочных или нейтральных условиях приводит к образованию продуктов с антиперипланарным расположением заместителей в положениях 2 и 3, как в соединениях (40) и (41). Так, реакция одного из эпоксидов с гидроксидом натрия приводит с высоким выходом к альтропиранозиду (40; X = OH), из которого после удаления защитных групп получают *D*-альтрозу (схема 16).

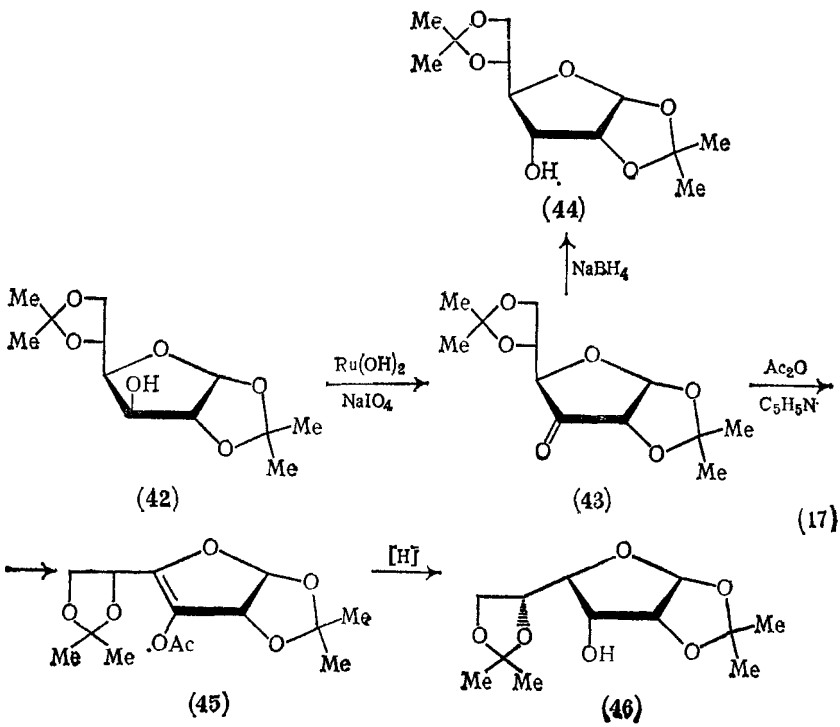


(16)

Нуклеофильная атака терминального эпоксидного цикла идет преимущественно по первичному атому углерода в соответствии

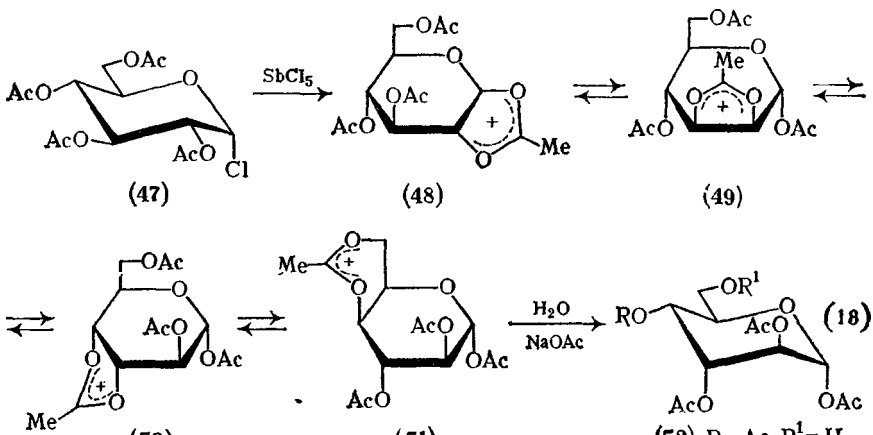
с S_N2-механизмом. Эпоксиды, не присоединенные к жесткой конденсированной циклической структуре, могут давать смеси продуктов вследствие протекания реакции через два переходных состояния, обусловленных двумя конформациями кресла пиранозного цикла (см. разд. 26.1.8.2).

С появлением избирательных и высокоэффективных реагентов, окисляющих гидроксигруппы до карбонильных групп [51] (таких как диметилсульфоксид в сочетании с рядом ангидридов кислот и карбодиимидов и т. д., тетраоксид рутения и др.), стало возможным окисление отдельной гидроксигруппы (см. разд. 26.1.6.4); последующее восстановление кетогруппы вновь до гидроксигруппы идет с полным обращением конфигурации. Поскольку при восстановлении борогидридом натрия реагент подходит к карбонильной группе с наименее пространственно затрудненной стороны, обычно можно ожидать обращения конфигурации; если ожидается полное сохранение конфигурации, то применяют альтернативные способы восстановления. Так, последовательное окисление и восстановление 1,2 : 5,6-ди-*O*-изопропилиден-α-*D*-глюкофуранозы (**42**) приводит к соответствующей аллофуранозе (**44**), поскольку для атаки снизу 3-кетона (**43**) требуется подход атакующей частицы с *эндо*-стороны, тогда как атака сверху осуществляется по менее простран-



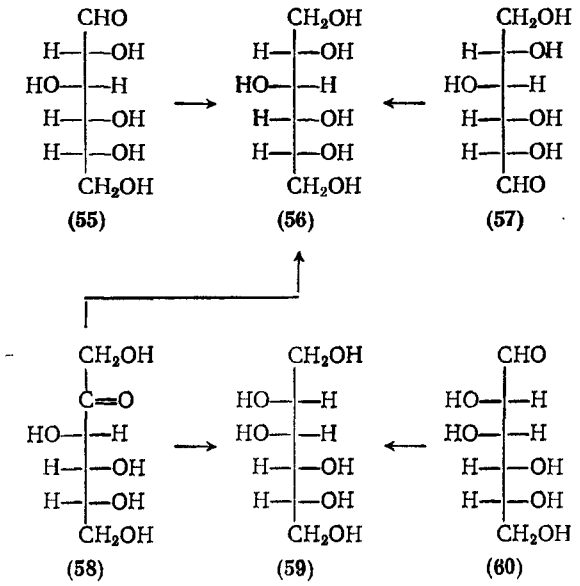
ственно затрудненному *экзо*-направлению [52]. Промежуточные кетопроизводные типа (43) часто используют для обращения конфигурации при соседних хиральных центрах. Например, ацетилирование соединения (43) приводит к енолацетату (45), последующее каталитическое восстановление которого дает 1,2:5,6-ди-*O*-изопропилиден-α-*D*-гулофуранозу (46) [53]. Направление восстановления 2-кетопроизводных пиранозидов определяется конфигурацией аномерного центра. α-Аномер дает глюкозид, так как аксиальный заместитель при С-1 затрудняет атаку с экваториальной стороны, тогда как в случае β-аномера экваториальная атака более предпочтительна и образуется маннопиранозид [54].

При действии на полные ацетаты сахаров или гликозилгалогенидов кислотных, но слабо нуклеофильных реагентов, например безводного фтороводорода или пентахлорида сурьмы [55], часто происходит инверсия по крайней мере одного хирального центра (а часто нескольких). Особого внимания заслуживает превращение 2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-α-*D*-глюкопиранозилхлорида (47) под действием пентахлорида сурьмы непосредственно в смесь тетраацетатов α-*D*-идопиранозы (52) и (53) [56]. Реакционная смесь представляет собой по существу равновесную смесь ацетоксониевых ионов (48)—(51). Соответствующий *идо*-ион (51) наименее термодинамически выгоден, однако он наименее растворим в дихлорметане и при использовании этого растворителя выкристаллизовывается из реакционной смеси с хорошим выходом. Разложение иона (51) водой приводит к смеси тетраацетатов идозы (52) и (53), из которых легко могут быть получены пентаацетат α-*D*-идопиранозы (54) и *D*-идоза (схема 18).



26.1.5. ВОССТАНОВЛЕНИЕ МОНОСАХАРИДОВ

Восстановление потенциальной альдегидной группы альдоз приводит к образованию многоатомных спиртов — альдитов [57]; так, из *D*-глюкозы (55) образуется *D*-глюцит (56). Некоторые альдиты являются *мезо*-соединениями, иногда один и тот же альдит может образоваться из двух различных альдоз. Например, как *D*-глюкоза (55), так и *L*-гулоза (57) превращаются в *D*-глюцит, который можно назвать и *L*-гулитом (термин употребляется реже). Такая конфигурационная взаимосвязь между альдитами была использована Фишером для определения стереохимии глюкозы и других моносахаридов (см. разд. 26.1.2). Кетозы, например *D*-фруктоза (58), при восстановлении дают смесь альдитов. Так, соединение (58) превращается в смесь *D*-глюцита (56) и *D*-маннита (59); (59) образуется также из *D*-маннозы (60) (схема 19).



(19)

В лабораторных условиях для восстановления альдоз до альдитов наиболее широко применяют борогидрид натрия (этот метод в настоящее время вытесняет классический метод восстановления с помощью амальгамы натрия). Восстановление происходит очень быстро за исключением случая, когда альдоза содержит в положении 3 заместитель, затрудняющий подход этого реагента [58]. Главным препятствием для использования борогидрида натрия является необходимость последующего удаления неорганических соединений, что иногда затрудняет обработку реакционной смеси. Напротив, при успешно протекающем восстановлении альдоз

никелем Ренея в кипящем этаноле обработка реакционной смеси очень проста [59]. Поскольку некоторые альдиты представляют промышленный интерес, восстановление альдоз в больших количествах проводят либо каталитическим гидрированием, либо электролитически в щелочной среде. В последнем случае еще до восстановления наблюдается значительная эпимеризация альдоз и обычно получается смесь альдитов. Действительно, этим способом из *D*-глюкозы (**55**) получают *D*-маннит (**59**).

Альдиты встречаются в природе в основном в растениях. Глицерин (1,2,3-тригидроксипропан) входит в состав липидов и, следовательно, широко распространен в природе. *D*-Глюцит содержится в плодах растений семейств *Rosaceae*, *Pyrus*, *Sorbus*, *Photinia*, *Grataegus*, *Pyracantha* и *Cotoneaster*. *D*-Маннит часто встречается в растениях и морских водорослях в свободной или связанной форме. Некоторые злаки содержат большие количества *D*-маннита (30—90 %), который путем кристаллизации легко может быть выделен в чистом виде.

D-Глюцит (**56**), называемый также сорбитом, — нетоксичное, слегка сладкое, умеренно гигроскопичное вещество, благодаря чему его применяют в качестве увлажнителя в косметических и фармацевтических составах.

26.1.6. ОКИСЛЕНИЕ МОНОСАХАРИДОВ

Альдозы вследствие их полифункциональности окисляются поразному при действии различных окислителей [51]. При этом может быть окислен восстанавливающий конец, оба конца углеродной цепи, отдельные гидроксигруппы или расщеплена С—С-связь.

26.1.6.1. Получение альдоновых кислот

Эти кислоты образуются при мягком окислении альдоз; так, галогены (хлор, бром или иод) при pH 5 окисляют альдозы до соответствующих лактонов, которые затем медленно гидролизуются с образованием свободных кислот. Механизм окисления альдоз бромом не выяснен, однако тот факт, что β-*D*-глюкопираноза окисляется в 250 раз быстрее, чем ее α-аномер, свидетельствует о том, что первоначально может атаковаться полуацетальная гидроксигруппа, поскольку ее экваториальное расположение в случае β-аномера должно приводить к увеличению реакционной способности [8]. Эфиры альдоновых кислот получают прямым окислением алкил-β-глюкозидов озоном; α-аномеры в этих условиях не реагируют [60].

Свободные альдоновые кислоты иногда трудно выделить, так как они способны дегидратироваться с образованием смеси лактонов; их обычно выделяют в виде солей, амидов или фенилгидразидов. Упаривание водных растворов альдоновых кислот, как пра-

вило, приводит к образованию пятичленных γ-(1→4)-лактонов, а не шестичленных δ-(1→5)-лактонов; этим поведение альдоновых кислот отличается от поведения соответствующих альдоз при образовании циклической полуацетальной структуры. Наиболее вероятной причиной такого предпочтения является полярное взаимодействие диполей атома кислорода лактонного цикла и атома кислорода карбонильной группы, которые параллельны и отталкиваются в (1→5)-лактоне, в то время как (1→4)-лактон способен принять энергетически выгодную конформацию, в которой это взаимодействие ослаблено.

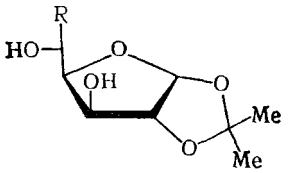
26.1.6.2. Получение альдуроновых кислот

Альдуроновые кислоты содержат терминальную карбоксигруппу на конце цепи, противоположном восстанавливающей группе. Они широко распространены в природе; *D*-глюкуроновая кислота играет важную роль в процессах метаболизма у животных, способствуя выведению фенолов, стероидов и ароматических карбоновых кислот, которые удаляются из организма в виде глюкуронидов [61]. *D*-Галактуроновая кислота является компонентом пектина фруктов, из которого может быть легко выделена после ферментативного гидролиза. *D*-Маннуроновая и *L*-гулуроновая кислоты содержатся в связанном виде в различных морских водорослях. *L*-Идуроновая кислота входит в состав гепарина и других полисахаридов. Выделение этих кислот из природных источников является непростой задачей, так как они легко декарбоксилируются и разрушаются в жестких условиях, необходимых для расщепления глюкуронидов. Тем не менее отмечено [62], что наличие неионизированной карбоксигруппы повышает устойчивость гликозидной связи, а ионизированная карбоксигруппа оказывает противоположное действие. Так, в 1 *M* HCl (нафтил-2)глюкуронид гидролизуется в 45 раз медленнее, чем метил-β-*D*-глюкопиранозид, тогда как при pH 4,79, когда карбоксильная группа ионизирована в гораздо большей степени, этот глюкуронид гидролизуется в 35 раз быстрее глюкозида.

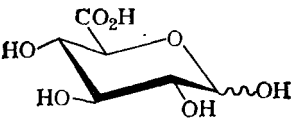
Чаще всего альдуроновые кислоты получают окислением альдоз или их гликозидов в присутствии платины в качестве катализатора [63]. Например, каталитическое окисление 1,2-*O*-изопропилиден-α-*D*-глюкофуранозы (**61**) и последующий кислотный гидролиз приводят с хорошим выходом к *D*-глюкуроновой кислоте (**63**) через ее 1,2-*O*-изопропилиденовое производное (**62**) [64]. Защищенные производные углеводов, у которых свободна лишь первичная гидроксигруппа, могут быть окислены перманганатом калия.

Альдуроновые кислоты обычно существуют в виде лактонов; так, *D*-глюкуроновая кислота образует (6→3)-лактон фуранозной формы, называемый глюкуроном (**64**); в случае *D*-галактуроновой кислоты образование аналогичного лактона привело бы к *транс*-

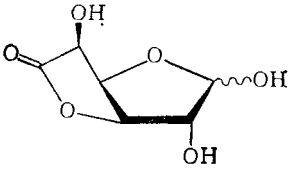
расположению двух пятичленных циклов, поэтому *D*-галактуроновая кислота дает (6→3)-лактон пиранозной формы (65).



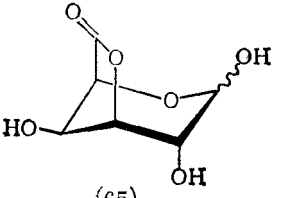
(61) R= CH_2OH
(62) R= CO_2H



(63)



(64)



(65)

26.1.6.3. Полученне альдаровых кислот

Дикарбоновые кислоты, образующиеся путем окисления обоих концов углеродного скелета альдоз, называют альдаровыми. Их получают окислением альдоз азотной кислотой. Галактаровая (слизевая) кислота, которая является *мезо*-соединением, может быть легко выделена вследствие ее ограниченной растворимости в воде (0,3 %); на этом основан гравиметрический метод определения галактозы. При окислении кетоз в тех же условиях происходит разрыв 1,2-связи. Так, из *D*-фруктозы образуется *D*-арабинаровая кислота, которая получается также из *D*-арабинозы и *D*-ликсозы. При окислении 6-дезоксигексоз разрывается 5,6-связь, так что 6-дезокси-*L*-галактоза (*L*-фукоза) превращается в *D*-арабинаровую кислоту.

26.1.6.4. Получение кетопроизводных моносахаридов

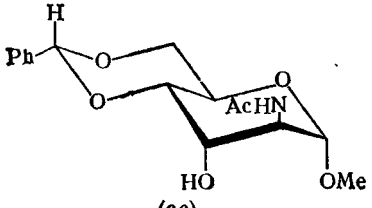
Кетопроизводные моносахаридов (альдозулозы) получают окислением вторичных гидроксигрупп свободных сахаров, которое не всегда идет с высоким выходом. Однако этот метод дает хорошие результаты в случае соответствующим образом защищенных производных. В этом случае редко удается выделить свободную альдозулозу, однако такие производные широко используют в качестве полупродуктов. Еще одной сложностью является то, что свободные альдозулозы обычно не кристаллизуются из-за большого числа циклических форм, в которых они могут существовать. 2-Альдозулозы (озоны) известны уже давно и могут быть полу-

чены либо из фенилозазонов, либо прямым окислением альдоз ионами Cu^{2+} [65], однако их трудно очистить и образуются они с низкими выходами.

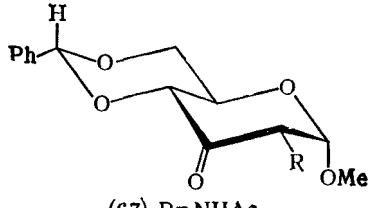
Хорошие результаты дает окисление вторичных гидроксигрупп защищенных сахаров окислителями на основе диметилсульфоксида, впервые описанными Моффатом и Пфитцнером [66]. Применяют также триоксид хрома в пиридине, однако при этом для получения заметных выходов необходима повторная обработка реакционной смеси [67]. На основе диметилсульфоксида (ДМСО) [51] помимо реагента Пфитцнера — Моффата [66], состоящего из диметилсульфоксида, дициклогексилкарбодиимида и фосфорной кислоты, применяли смесь диметилсульфоксида с уксусным ангидридом [68], пентаоксидом фосфора [69] или триоксидом серы и триэтиламином [70]. Во многих случаях, однако, образуются побочные продукты, которые снижают выход и затрудняют выделение требуемого продукта. При использовании смеси ДМСО — Ac_2O образуется ацетат, иногда в значительных количествах, и во всех случаях образуется некоторое количество метилтиометилового эфира $ROCH_2SCH_3$.

Наилучшие результаты дает окисление тетраоксидом рутения [71] и комплексом триоксида хрома с бипиридилом [72]. Окисление тетраоксидом рутения широко применяется, идет обычно с хорошими выходами и часто проводится смесью каталитических количеств гидратированного диоксида рутения и периодата натрия, который служит для генерирования тетраоксида из диоксида [73].

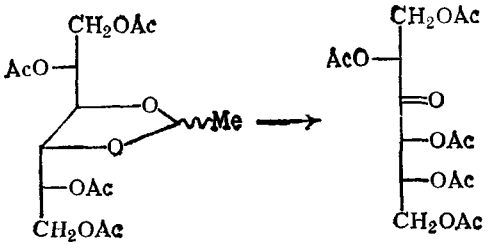
При окислении вторичной или первичной гидроксигруппы, которые расположены по соседству с хиральным центром, возможно обращение конфигурации в этом положении. Например, окисление 2-ацетамидоальтрозида (**66**) приводит к 3-улозе (**67**) с обращенной конфигурацией при С-2, причем образуется термодинамически более предпочтительный 2-экваториальный изомер (**67**) [74]. Такие кетопроизводные можно использовать для избирательного дейтерирования или тритирования в положения, смежные с кетогруппой [75]. Например, обработка 2-азидо-3-улозы (**68**) оксидом дейтерия в мягких кислотных условиях избирательно приводит к его 2-дейтеропроизводному.



(66)

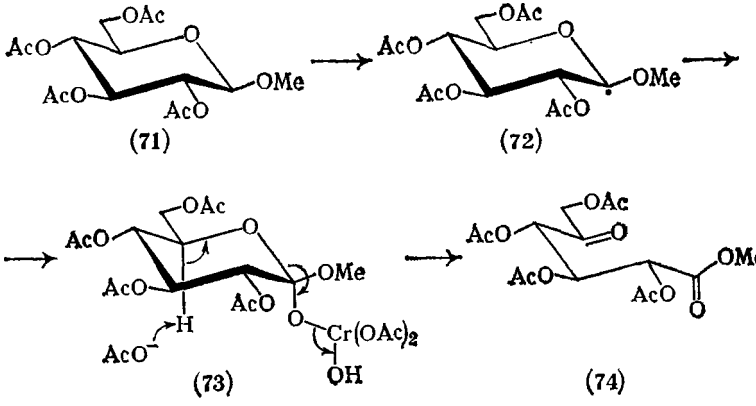


(67) R = NHAc
(68) R = N_3

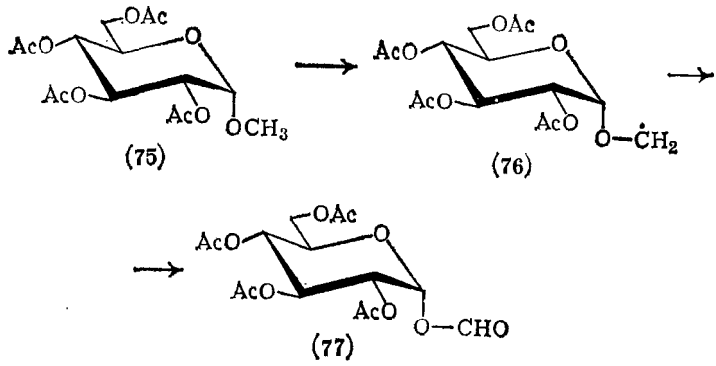


(20)

С высоким выходом протекает окисление ацеталей с помощью триоксида хрома в уксусной кислоте [76]. Так, окисление тетраацетата 3,4-*O*-этилиден-*D*-маннита (**69**) приводит с высоким выходом к пентаацетату *D-арабино*-3-гексулозы (**70**); этот метод является прекрасным методом синтеза труднодоступных 3-гексулоз. Метилгликозиды, которые являются циклическими полуацеталями, окисляют аналогичным образом, однако в этом случае определяющим фактором является конфигурация аномерного центра. В случае β-гликозидов, например тетраацетата метил-β-*D*-глюкопиранозида (**71**), окисление протекает через С-1-радикал (**72**) и соответствующий хром(IV)содержащий сложный эфир (**73**), и приводит к эфиру кетоальдоновой кислоты (**74**). Из соответствующего α-аномера (**75**) образуется *O*-метиленовый радикал (**76**), который сходным образом дает 1-формильный эфир (**77**). Следовательно, при окислении этих двух гликозидов отщепляются разные атомы водорода [77].



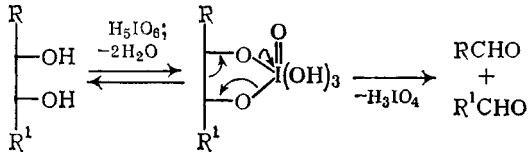
(21)



(22)

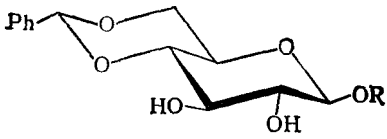
26.1.6.5. Окисление гликольной группировки

Реагенты, приводящие к окислению диольной группировки, особенно иодные кислоты и их соли, а также тетраацетат свинца, имеют очень большое значение в химии углеводов [10, 78]. Их используют не только при изучении структуры (см. разд. 26.1.2), но и для синтетических целей (см. разд. 26.1.4.1). Такие реагенты избирательно окисляют α,β-диольные группировки с расщеплением углерод-углеродной связи. Промежуточными соединениями в этой реакции являются, как полагают, циклические диэфиры (схема 23).

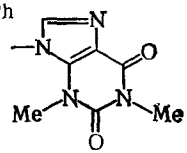


(23)

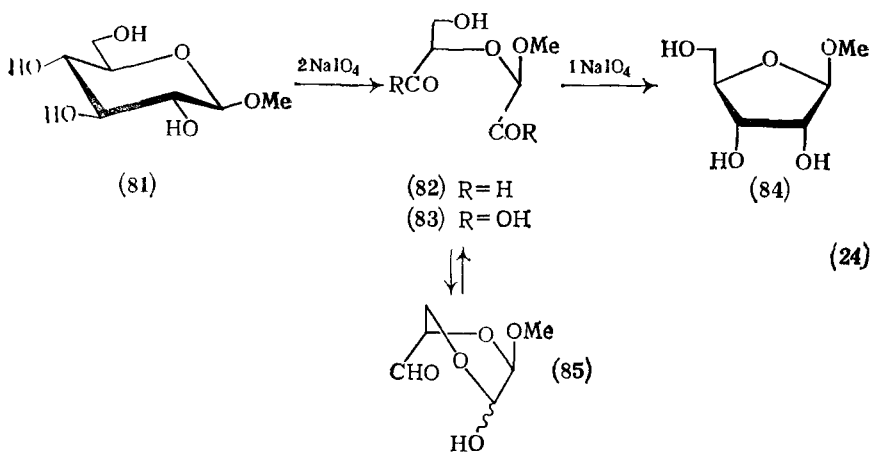
Поскольку для образования таких циклических эфиров необходимо определенное пространственное расположение, взаимная ориентация гликольных гидроксигрупп значительно влияет на скорость окисления. Так, *цис*-диольные группировки в циклических соединениях окисляются быстрее, чем *транс*-диольные группировки. В пиранозных циклах антиперипланарные (диаксиальные) диольные группировки (как, например, в метил-4,6-*O*-бензилиден-α-*D*-альтропиранозиде) окисляются очень медленно или вообще не окисляются. Следовательно, хотя окисление соединений расщепляющими гликоли реагентами и служит указанием на наличие гликольной группировки, из этого правила имеются исключения. Окисление может ингибироваться при наличии объемистой вицинальной группы. Например, метил-4,6-*O*-бензилиден-β-*D*-глюкопиранозид (78) поглощает 1 моль окислителя медленно, фенилгликозид (79) — очень медленно, а пространственно затрудненное теофиллилсодержащее соединение (80) вовсе не окисляется [79].



(78) R = Me
(79) R = Ph
(80) R =



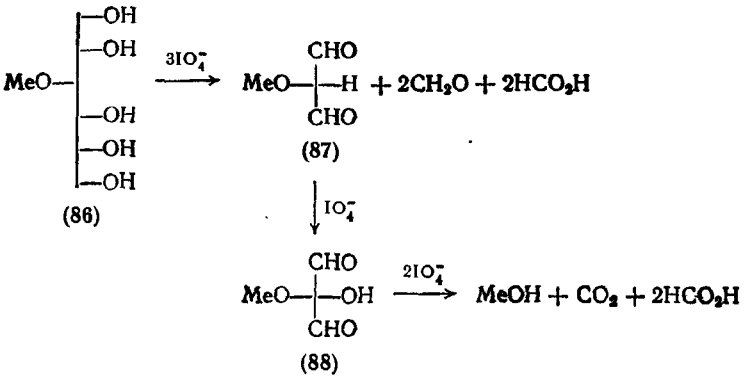
Одной из областей применения периодатного окисления является определение конфигурации аномерного центра гликозидов. Например, окисление метил-β-*D*-глюкопиранозида (81) и метил-β-*D*-рибофуранозида (84) дает один и тот же диальдегид (82); это подтверждает их одинаковую хиральность при С-1 (схема 24). Диальдегиды типа (82) обычно существуют в виде смеси полуацеталей типа (85) и редко могут быть выделены в кристаллической форме; поэтому их часто окисляют далее бромной водой до соответствующих дикарбоновых кислот (83) и выделяют в виде кристаллических солей [78].



(81) (82) R = H (83) R = OH (84) (85)

(24)

В некоторых случаях получают необычные результаты из-за окисления не по Малапраду. Если в процессе окисления образуется малоновый диальдегид (или родственные соединения) (87), он окисляется далее с образованием гидроксималонового диальдегида (88), который затем поглощает 2 моль окислителя с образованием 2 моль муравьиной кислоты и 1 моль диоксида углерода. Такое явление наблюдается при периодатном окислении 3-*О*-метилглюцита (86) при pH 1, в ходе которого поглощается 7 моль окислителя и выделяется 2 моль формальдегида, 4 моль муравьиной кислоты и 1 моль диоксида углерода [80] (схема 25).

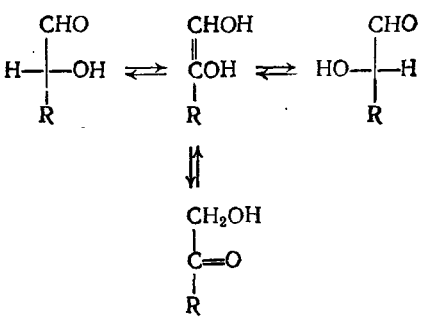


(25)

26.1.7. ДЕЙСТВИЕ КИСЛОТ И ОСНОВАНИЙ

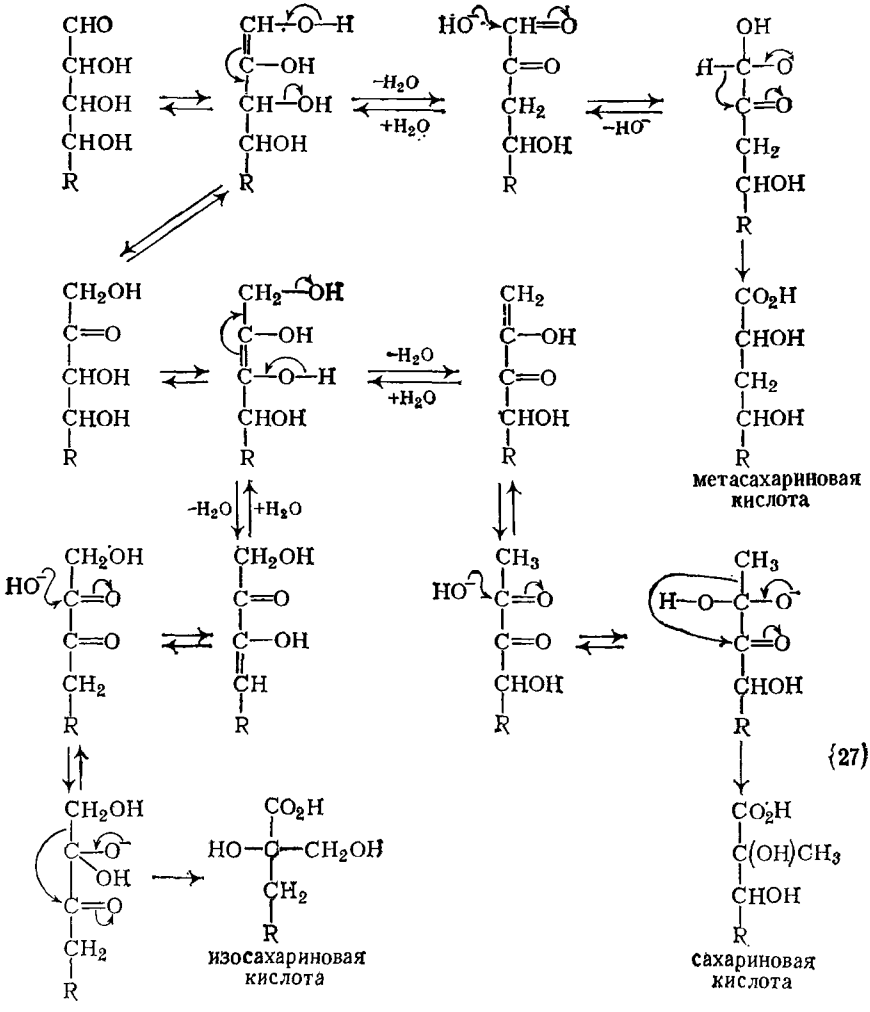
Альдозы и кетозы под действием кислот и оснований изомеризуются и распадаются с образованием различных продуктов. Можно предположить, что за такую неустойчивость ответственна потенциальная карбонильная группа, так как альдиты в этих условиях значительно стабильнее.

В мягких щелочных условиях (часто используются органические основания, например пиридин) наблюдается эпимеризация при атоме углерода, соседнем с карбонильной группой, а также изомеризация типа альдоза ⇄ кетоза. Реакция протекает через образование ендиолов (схема 26) [81]. Так, при выдерживании *D*-глюкозы в растворе гидроксида натрия ($8 \cdot 10^{-3}$ *M*) при 35 °С в течение 4 дней образуется смесь, содержащая *D*-фруктозу (28 %), *D*-маннозу (3 %) и непревращенную *D*-глюкозу. Если 2-гидроксигруппа замещена, изомеризация в кетозу невозможна и наблюдается только эпимеризация по С-2. Так, из 2,4,6-три-*O*-метил-*D*-маннозы путем катализируемой основанием эпимеризации удобно получать 2,4,6-три-*O*-метил-*D*-глюкозу [82].



(26)

В более жестких щелочных условиях происходит более глубокая перегруппировка с образованием сахариновых кислот [83].

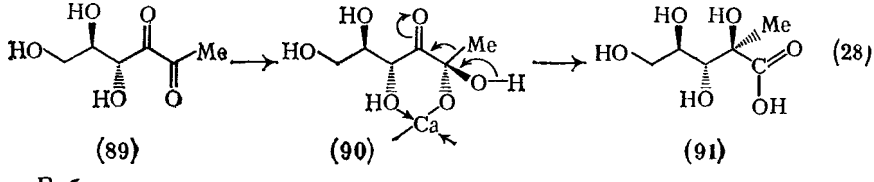


(27)

(схема 27). Так, *D*-глюкоза и ее производные при обработке водным раствором гидроксида кальция (~0,15 *M*) превращаются в 3-дезоксигексоновые (метасахариновые) кислоты, 2-*C*-метилпентоновые (сахариновые) кислоты и 3-дезокси-2-*C*-гидроксиметилпентоновые (изосахариновые) кислоты. Метасахариновые кислоты образуются путем β-элиминирования из свободных альдоз с последующей бензиловой перегруппировкой α-дикарбонильных соединений, сахариновые кислоты — путем образования 2,3-ендиола с последующим β-элиминированием гидроксигруппы при С-1 и бензиловой перегруппировкой 2,3-дикарбонильных производных, изосахариновые кислоты — β-элиминированием гидроксигруппы при

С-4 из 2,3-ендиола с последующей бензиловой перегруппировкой образующихся 2,3-дикарбонильных соединений. В случае *D*-глюкозы скорость этих реакций относительно невелика, так как отщепление гидроксигрупп в щелочной среде протекает медленно, так как некоторые гидроксигруппы существуют в этих условиях в форме сопряженного основания. Отщепление алкоксигрупп гораздо более энергетически выгодно; наличие алкоксигруппы при С-3 должно способствовать образованию метасахариновых кислот, тогда как присутствие 4-*O*-алкильной группы благоприятствует превращению в изосахариновые кислоты. Сахариновые кислоты лучше всего получаются из кетоз или их 1-*O*-алкильных производных.

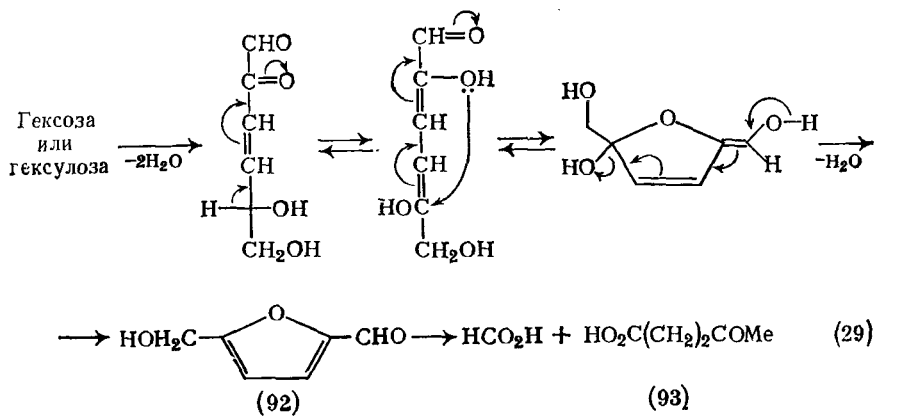
Образование продуктов деградации обычно не происходит стереоспецифично, и, как правило, изосахариновая и метасахариновая кислоты получаются в виде эквимольной смеси двух диастереомеров. Однако сахариновые кислоты образуются, по-видимому, с высокой стереоспецифичностью; например, *D*-фруктоза и ее 1-*O*-бензиловый эфир превращаются исключительно в 2-*C*-метил-*D*-*рибо*-пентоновую кислоту (**91**) [84]. При образовании сахариновой кислоты бензиловая перегруппировка происходит при атоме углерода, смежном с хиральным центром и, следовательно, можно ожидать, что на нее влияет асимметрическая индукция, тогда как при образовании мета- и изосахариновых кислот место перегруппировки более удалено от хирального центра. Высокая стереоспецифичность образования сахариновой кислоты свидетельствует о том, что промежуточное соединение до бензиловой перегруппировки может быть связано в жесткий хелатный комплекс с катионом таким образом, что перенос метильной группы может осуществляться лишь по одному направлению. Например, 4-ОН-группа диулозы (**89**) может оказывать влияние на направление атаки гидроксид-ионом; образуется промежуточное соединение путем присоединения гидроксид-иона со стороны, противоположной 4-гидроксигруппе. Промежуточный алкоксид может образовывать жесткий хелатный комплекс (**90**), в котором перегруппировка с переносом метильной группы должна осуществляться путем атаки молекулы с тыла; таким образом получается *рибо*-изомер (**91**) (схема 28).



(89) (90) (91) (28)

В более жестких щелочных условиях происходят сложные реакции ретроальдольного распада, в результате которых получаются трехуглеродные фрагменты — 2-гидроксипропионовый альдегид, пировиноградная кислота, молочная кислота и другие.

Хотя альдозы более устойчивы к действию кислот, чем к действию щелочей, однако в кислой среде они подвергаются дегидратации, степень которой зависит от условий. Упаривание растворов альдоз в разбавленных минеральных кислотах (10^{-2}—10^{-4} *M*) вызывает реакции межмолекулярной конденсации, сходные с образованием гликозидов (см. разд. 26.1.8.1) и называемые «реверсией», которые приводят к небольшим количествам ди-, три- и высших олигосахаридов. Гексозы и высшие сахара, у которых разница энергий между двумя конформациями кресла невелика, легко подвергаются внутримолекулярной дегидратации до 1,6-ангидро-β-пираноз. Реакция протекает под термодинамическим контролем и количество получающегося ангидрида зависит от стабильности альдозы в $^1C_4$-конформации (см. разд. 26.1.8.2). В более жестких условиях альдозы и кетозы подвергаются более глубокому распаду с образованием производных фурана (схема 29) [85]. В случае гексоз и гексулоз продуктом реакции является 5-гидроксиметилфурфурол (92), который в более жестких условиях путем раскрытия фуранового цикла превращается в левулиновую (93) и муравьиную кислоты. На превращении в тщательно контролируемых условиях в производные фурфурола и последующем взаимодействии с различными фенолами и ароматическими аминами основано колориметрическое определение углеводов. В некоторых случаях с помощью этой реакции можно дифференцировать различные типы сахаров [86].



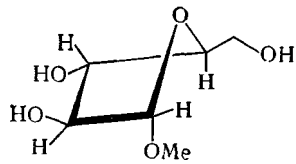
(29)

26.1.8. ПРОИЗВОДНЫЕ МОНОСАХАРИДОВ

Вследствие полифункциональности углеводов возможно получение их производных как по гидроксильным, так и по карбонильным группам. Некоторые из вводимых группировок можно использовать как защитные группировки.

26.1.8.1. Гликозиды

Альдозы и кетозы обычно существуют в виде циклических полуацеталей, поэтому при их взаимодействии с простыми спиртами в условиях кислотного катализа образуются полные ацетали, в которых сохраняется циклическая полуацетальная структура исходного сахара. Эта реакция, известная как синтез гликозидов по Фишеру [87], является термодинамически контролируемой и приводит к шестичленным пиранозидам. *D*-Глюкоза существует в основном в виде β-аномера (64 %), однако термодинамически более выгоден метил-α-*D*-глюкопиранозид (**13**) и его содержание в равновесной смеси аномеров составляет 66 %. Причиной такого различия является то, что аномерный эффект (см. разд. 26.1.3), благоприятствующий образованию α-аномера, ярче выражен в менее полярных растворителях, например в метаноле. Более того, если в случае *D*-арабинозы фуранозная форма является лишь минорным компонентом (3 %) (см. табл. 26.1.1), то для метиларабинозида в равновесной смеси в подкисленном метаноле содержание фуранозной формы составляет 29 %. Причина такого различия не ясна, однако это может быть обусловлено аномерным эффектом для фуранозидов в менее полярном метаноле (аномерный эффект в данном случае как и для *D*-глюкозы менее выражен в воде). β-Фуранозид, являющийся преобладающим аномером (22 %), может существовать в E^{O}-конформации (**94**) или родственной *твист*-конформации, в которой 1-*O*-метильная группа может быть *квази*-аксиальной (вследствие аномерного эффекта), а объемистая гидроксиметильная группа — *квази*-экваториальной. Кроме того, в β-фуранозиде не должно быть вицинальных *цис*-взаимодействий. α-Фуранозид (7 %) не может принимать такую предпочтительную конформацию, и у него 1-*O*-метоксигруппа остается аксиальной. В равновесной смеси в случае метилгалактозидов содержание фуранозной формы составляет 22 %, причем соотношение β- и α-аномеров равно 2,7 : 1 [88].

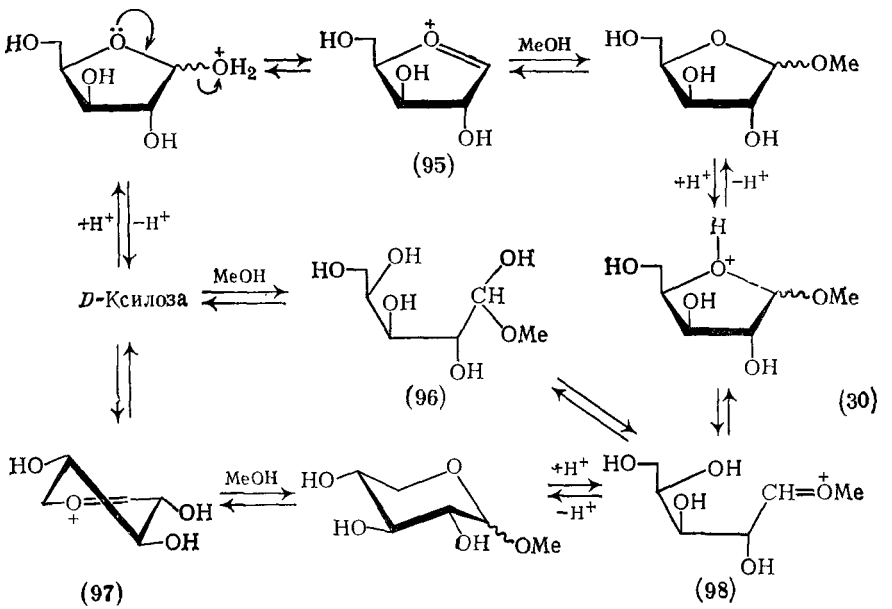


(94)

При дальнейшем изучении было показано, что реакция протекает более сложно. Свободные сахара реагируют относительно быстро с образованием фуранозидов, концентрация которых затем медленно уменьшается, поскольку преобладающими становятся пиранозиды. В случае *D*-ксилозы отношение скоростей этих двух реакций (*D*-ксилоза → фуранозиды → пиранозиды) составляет 60 : 1 [89]; поэтому при проведении реакции в мягких условиях (например, в ~0,01 %-ном растворе хлороводорода в метаноле при комнатной температуре) и остановке реакции до начала накопления

пиранозидов могут быть выделены фуранозиды. Этим способом из *D*-галактозы получают 53 % β- и 14 % α-фуранозидов (продолжительность реакции 6 ч).

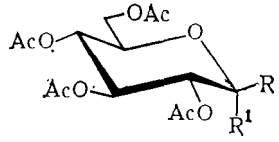
Тонкие детали механизма реакции выяснены не до конца, не ясна структура переходного состояния (схема 30). Наиболее вероятными переходными состояниями являются циклические оксониевые ионы (**95**) и (**97**), так как надежно установлено, что они являются промежуточными частицами при гидролизе гликозидов [89]. По-видимому, фуранозы способны образовывать оксониевый ион (**95**) легче, чем пиранозы. Если бы реакция включала образование ациклического полуацеталя (**96**) или ациклического оксониевого иона (**98**), следовало бы ожидать преимущественного образования пятичленного цикла, что энергетически более выгодно, чем образование шестичленного цикла [89]. Расширение цикла до шестичленного должно протекать путем образования ациклических оксониевых ионов типа (**98**); однако надежно установлено, что аномеризация метилпиранозидов в подкисленном CD_3OH протекает через циклический оксониевый ион (**97**), так как агликон в первоначально образующихся продуктах реакции возникает из растворителя.



Синтез гликозидов по Фишеру применим лишь в случае низших спиртов, обладающих летучестью; поскольку в реакции необходим большой избыток спирта, эти спирты должны быть легко доступны. Гликозилирование менее доступных спиртов обычно проводят методом Кенигса — Кнорра, основанным на реакции соот-

ветствующего гликозилгалогенида со спиртом в присутствии акцептора галогеноводорода, например оксида серебра [90].

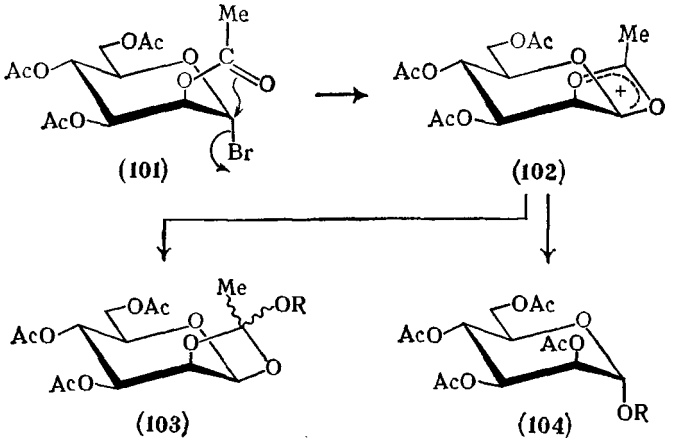
Гликозилгалогениды получают обработкой пер-*О*-ацилальдозы соответствующим галогеноводородом; при этом 1-*О*-ацильная группа замещается атомом галогена. Так, реакция пентаацетата α- или β-*D*-глюкопиранозы (**99**) с бромоводородом в уксусной кислоте приводит с высоким выходом к 2,3,4,6-тетра-*О*-ацетил-α-*D*-глюкопиранозилбромиду (**100**). В условиях этого метода образуются в основном α-производные вследствие мощного аномерного эффекта (см. раздел 26.1.3), хотя в специальных условиях могут быть получены β-аномеры. Относительная реакционная способность гликозилгалогенидов уменьшается в ряду $I > Br > Cl > F$, причем гликозилфториды настолько устойчивы, что на них не действует метоксид-анион, и они могут быть подвергнуты *О*-дезацетилированию без затрагивания атома фтора [91]. Иодиды крайне реакционноспособны, вследствие чего с ними трудно работать, поэтому для синтеза гликозидов используют хлориды или бромиды.



(**99**) R=OAc, R^1= H
(**100**) R=H, R^1= Br

Замещение атома брома в α-положении соединения (**100**) при реакции со спиртом или фенолом протекает с обращением конфигурации и образованием 1,2-*транс*-продукта, несмотря на то что реакция является мономолекулярной. Это происходит вследствие экранирования α-положения уходящим галогенид-анионом; такое явление всегда наблюдается при реакциях галогенидов с 1,2-*цис*-конфигурацией [92]. Если гликозилгалогенид имеет 1,2-*транс*-конфигурацию, например 2,3,4,6-тетра-*О*-ацетил-α-*D*-маннопиранозилбромид (**101**), направление реакции зависит от условий ее проведения. Смежная *транс*-ацетоксигруппа при С-2 принимает участие в элиминировании атома галогена; это приводит к образованию циклического 1,2-ацилоксониевого катиона (**102**), который при атаке молекулой спирта превращается в соответствующий ортоэфир (**103**) или в α-гликозид (**104**). Так, при обработке галогенида (**101**) большим избытком метанола в присутствии карбоната серебра образуется ортоэфир (**103**; R = Me), тогда как при использовании диэтилового эфира основным продуктом является 1,2-*транс*-гликозид (**104**; R = Me), а ортоэфир получается лишь в очень небольшом количестве [93]. Такое явление можно объяснить защитой ацетоксониевого иона (**102**) путем сольватации эфиром, что приводит к преимущественной атаке по С-1 с образованием гликозида. Ортоэфиры типа (**103**) могут быть эффективно использованы в качестве промежуточных соединений в гликозидном синтезе, поскольку они в кислой среде перегруппировываются в 1,2-*транс*-гликозиды [94]. Эту реакцию используют в основном для синтеза

олигосахаридов. В связи с этим были разработаны методы синтеза ортоэфиров как из 1,2-*цис*-, так и из 1,2-*транс*-гликозилгалогенидов [95].



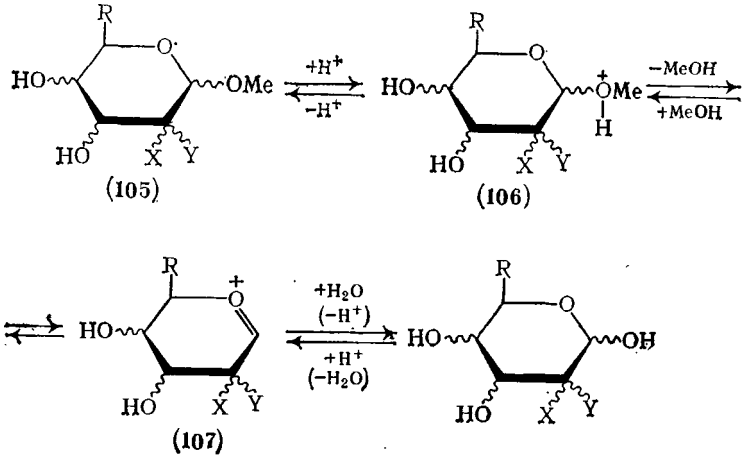
В течение ряда лет не удавалось разработать эффективный метод синтеза 1,2-*цис*-гликозидов. Однако в настоящее время осуществлен синтез α-*D*-глюкопиранозидов, α-*D*-галактопиранозидов и многих других гликозидов. Если при С-2 имеется несоучаствующая группа, например бензилоксигруппа, из β-*D*-гликопиранозилгалогенида при реакции со спиртом в присутствии перхлората серебра и *сим*-коллидина в диэтиловом эфире с хорошим выходом образуется α-гликозид [96]. Поскольку β-гликопиранозилхлориды менее доступны, чем их α-изомеры, Лемье разработал более удобный метод: в качестве исходного соединения может использоваться α-аномер, изомеризующийся в процессе реакции в β-аномер. Для этого реакцию соответствующего α-*D*-гликопиранозилбромида со спиртом проводят в присутствии большого избытка тетраэтиламмонийбромида; при этом превращение α-галогенида в β-аномер происходит быстрее, чем взаимодействие менее реакционноспособного α-бромида со спиртом. При проведении реакции в отсутствие ионов металлов или высокополярных растворителей может быть достигнута высокая степень избирательности. Реакцию обычно проводят в *N*,*N*-диметилформамиде, используя в качестве акцептора кислоты пространственно затрудненное основание, например диизопропилэтиламин [97]. Метод Лемье использован для изящного синтеза некоторых олигосахаридов, являющихся частью антигенных детерминант различных групповых веществ крови и использованных для получения полусинтетических антигенов [98].

Фенилгликозиды [99] получают действием феноксид-аниона на гликозилгалогенид (что обычно приводит к образованию 1,2-*транс*-продукта, если при С-2 имеется соучаствующая группа) или сплавлением полных ацетатов альдоз с фенолом в присутствии кислотного

катализатора. Последний способ обычно приводит к смеси α- и β-гликозидов. Фенилгликозиды содержатся в ряде природных продуктов; их применяют для количественного определения некоторых ферментов. Например, 4-нитрофенил-β-*D*-глюкопиранозид гидролизуется β-гликозидазой с выделением *п*-нитрофенола, который можно определить по его поглощению при ~400 нм после подщелачивания; количество выделившегося фенола прямо пропорционально количеству присутствующего фермента. Превосходными субстратами для этой цели являются 7-метилумбеллиферилгликозиды, поскольку высвобождающийся агликон может быть определен при гораздо меньшей концентрации по его флуоресценции [100].

В ряде случаев фенилглюкурониды выделяют из мочи некоторых млекопитающих (например, кроликов), в пищу которых добавляют соответствующие фенолы. Таким способом можно получать, например, различные нитрофенилглюкурониды [101].

Механизм кислотного гидролиза гликопиранозидов по существу обратен механизму их образования по методу Фишера и включает протонирование гликозидного кислорода и расщепление гликозидной С—О-связи с образованием катиона (**97**), который затем атакуется молекулой воды. Однако не могут быть полностью исключены и другие пути гидролиза, включающие образование ациклических промежуточных продуктов. В случае *трет*-бутилгликозидов преимущественно расщепляется связь кислород — агликон из-за большей стабильности *трет*-бутилкарбениевого иона, что приводит к значительному (более чем в 500 раз) увеличению скорости гидролиза по сравнению с *н*-алкилгликозидами. Можно предсказать, что электронные эффекты, в особенности вызываемые заместителями при С-2 и С-5, будут оказывать заметное влияние на скорость гидролиза. Электроно-акцепторные группы при С-2 и С-5 вызывают снижение скорости гидролиза. Скорость гидролиза замещенных метилпиранозидов (**105**) уменьшается в следующем ряду за-

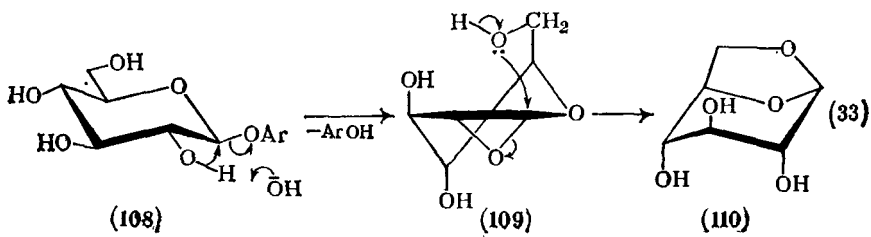


(32)

местителей: Y, X = H, H ≫ H, OH > H, NHAc > H, NH_3^+ > Cl, Cl > > F, F и R = H ≥ CH_3 > CH_2OH > CO_2H. Причиной этого является то, что при наличии электроноакцепторных групп в положениях 2 и 5 уменьшается количество образующейся сопряженной кислоты (**106**) и дестабилизируется оксониевый ион (**107**) [89, 102]. Метил-2-ацетамидо-2-дезокси-β-*D*-глюкопиранозид, в котором *N*-ацетильная группа находится в *транс*-положении к агликону, гидролизуется аномально быстро вследствие анхимерного содействия ацетамидогруппы уходу агликона. В общем случае, β-*D*-гликопиранозиды гидролизуются быстрее их α-аномеров из-за большей степени протонирования стерически более доступного экваториального агликона. Кроме того, образование протонированного агликона вызывает мощный обратный аномерный эффект (см. разд. 26.1.3), стабилизирующий экваториальный аномер.

В отличие от пиранозидов, для которых энтропия гидролиза всегда положительна, фуранозиды не только легче гидролизуются, но и обладают отрицательной энтропией гидролиза. Это, очевидно, указывает на разницу в механизмах гидролиза; фуранозиды, как полагают, реагируют либо с раскрытием цикла, либо путем прямого нуклеофильного замещения протонированного агликона водой [89].

Фенил- и алкенилгликозиды неустойчивы к действию щелочей [103] и в некоторых случаях с высоким выходом образуют 1,6-ангидросахара. Так, арил-β-глюкопиранозиды (**108**), в отличие от α-аномеров, легко превращаются в 1,6-ангидро-β-*D*-глюкозу (**110**). Тот факт, что 2-*O*-метилпроизводные соединения (**108**) не образуют 1,6-ангидроцикла, в то время как 3-*O*-метилпроизводные образуют его, свидетельствует в пользу протекания реакции через 1,2-ангидропроизводное (**109**). По-видимому, реакция фенилгликозидов с основаниями протекает по нескольким направлениям в зависимости от конфигурации гликозида. Например, фенил-α-*D*-галактопиранозид при длительном проведении реакции превращается в 1,6-ангидрид (85 %) несмотря на 1,2-*цис*-конфигурацию, по-видимому путем прямого замещения агликона ионизированной 6-гидроксигруппой. β-Маннопиранозид, который также имеет 1,2-*цис*-конфигурацию, превращается с выходом 57 % в ангидросахар, возможно через 1,4-ангидропроизводное. Тип реакции, по-видимому, определяется относительной конфигурацией и кислотностью различных гидроксигрупп.



(**108**) (**109**) (**110**)

26.1.8.2. Простые эфиры и ангидросахара

Метиловые эфиры широко применялись в классической химии углеводов для установления циклического строения сахаров (см. разд. 26.1.2) и выяснения строения многих олиго- и полисахаридов. Эти эфиры устойчивы в самых различных условиях, однако для синтетических целей это является недостатком из-за отсутствия доступных способов удаления метильных групп.

Классические методы метилирования были разработаны Пурди (метилиодид в присутствии оксида или карбоната серебра) и Хеуорсом (диметилсульфат в водном растворе щелочи). В обоих методах необходимо многократное повторение процесса для достижения полноты метилирования. Недостатком первого метода является плохая растворимость производных сахаров в метилиодиде, вследствие чего конечный результат в значительной степени зависит от гетерогенности реакционной смеси. Это затруднение позднее было преодолено Куном, который рекомендовал применять в качестве растворителя диметилформамид [104]. При использовании диметилформамида метилирование протекает быстро и эффективно, не требует повторного проведения, вместо дорогостоящих соединений серебра в данном случае могут быть использованы оксиды бария или стронция. Особенно хорошие результаты дает предварительное получение алкоксида действием гидрида натрия в диметилформамиде или диметилсульфоксиде и последующая обработка при комнатной температуре метилиодидом или диметилсульфатом [105]. Все эти реакции проводятся в щелочных условиях, при которых ацильные группы могут мигрировать или даже отщепляться. Однако использование диазометана в присутствии трифторида бора позволяет проводить метилирование в условиях, при которых не наблюдается *O*-ацильной миграции [106]. Метилирование метил-2,3,4-три-*O*-ацетил-α-*D*-глюкопиранозида по методу Пурди приводит к триацетату 2-*O*-метил-α-*D*-глюкопиранозида вследствие ацильной миграции [107].

Удаление метильных и, по-видимому, других алкильных групп наилучшим образом может быть проведено действием трифторида бора, хотя оно идет неизбирательно и, кроме того, с расщеплением ацетальных и гликозидных связей. Описаны и другие методы *O*-деметилирования.

Лабильность алкильных групп простых эфиров может быть повышена введением соответствующих заместителей при α-углеродном атоме. Например, бензильные группы [108], которые вводят (подобно метильным) с помощью бензилгалогенидов, могут быть удалены гидрогенолизом и потому используются в качестве защитных группировок чаще, чем метильные. Аллильная группа, которая может быть введена обработкой аллилбромидом, устойчива к действию кислот и может быть удалена после катализируемой основаниями изомеризации в пропен-1-ильную; последняя содержит винильную группировку и способна элиминироваться в условиях

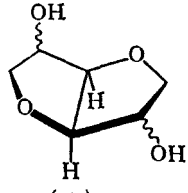
мягкого кислотного гидролиза [109]. Особое место в химии углеводов занимают трифенилметиловые (тритиловые) эфиры. Вследствие больших размеров тритильная группа может быть избирательно введена по первичной гидроксигруппе реакцией тритилхлорида с углеводом в присутствии пиридина. Присоединение по вторичным гидроксигруппам протекает с трудом и в жестких условиях. Кроме того, вследствие устойчивости трифенилметильного карбениевого иона связь О—тритил легко расщепляется в мягких кислотных условиях, так что тритильную группу можно удалить при наличии сложноэфирной и простой эфирной групп и гликозидной связи, а также (если применять гидрогенолиз) и при наличии ацетальных групп.

Триметилсилильные эфиры образуются при взаимодействии сахаров с триметилсилилхлоридом или гексаметилдисилазаном $(Me_3Si)_2NH$ в пиридине. Реакция протекает быстро и количественно; получаемые эфиры анализируют методом ГЖХ [16] или перегоняют в вакууме. Поскольку образование триметилсилильных эфиров происходит быстрее, чем мутаротация сахаров, триметилсилилирование и последующий анализ методом ГЖХ используют для исследования процесса мутаротации углеводов или для определения состава смеси сахаров (см. разд. 26.1.2). Триметилсилильные эфиры легко гидролизуются и потому неудобны для применения в качестве защитных групп при проведении химических синтезов. В отличие от них *трет*-бутилдиметилсилильные группы устойчивы к кислотному и щелочному гидролизу и могут быть легко и избирательно введены по первичному гидроксилу. Так, обработка сахарозы *трет*-бутилдиметилсилилхлоридом в пиридине с высоким выходом приводит к простому 1′,6,6′-триэфиру. Удаление *трет*-бутилдиметилсилильных групп осуществляют обработкой тетрабутиламмонийфторидом [110].

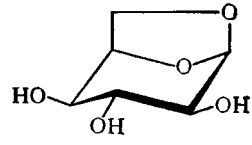
Для защиты гидроксигрупп довольно широко применяют тетрагидропиранильную-2 группировку и подобные ей группы; она устойчива к действию щелочей, но чувствительна к кислотному гидролизу. Ее введение основано на присоединении спирта по двойной связи дигидропирана; поскольку при этой реакции возникает новый хиральный центр, образуется смесь диастереомеров. Это осложнение было обойдено [111] применением 4-метоксидигидро-1*H*-пирана и родственных ему соединений, при реакции которых со спиртами новый хиральный центр не появляется. Образующиеся в результате производные ошибочно называют простыми эфирами, так как на самом деле они представляют собой смешанные ацетали.

Ангидропроизводные альдоз являются внутримолекулярными простыми эфирами и имеют важное значение в синтезе [112]. Некоторые ангидросахара образуются при нагревании альдоз и альдитов, причем альдиты могут дегидратироваться с образованием ангидропроизводных, содержащих устойчивые тетрагидрофурановые или тетрагидропирановые циклы. Например, *D*-глюцит, *D*-маннит и *D*-идит (а также, возможно, и их энантиомеры) при нагре-

вании с кислотой обратимо образуют 1,4 : 3,6-диангидропроизводные (**111**) [113]. Альдозы менее склонны превращаться при нагревании в ангидросахара, поскольку появление дополнительного цикла в молекуле альдозы в циклической форме в большинстве случаев кинетически и термодинамически невыгодно. Однако гексозы и высшие сахара, отличающиеся конформационной неустойчивостью, при нагревании их в растворе кислоты превращаются в 1,6-ангидропроизводные [114]. Поскольку последние представляют собой внутримолекулярные гликозиды, процесс дегидратации обратим. Состав продуктов реакции, следовательно, контролируется термодинамическими факторами; количество образующегося ангидросахара зависит от числа имеющихся в его молекуле экваториальных групп. Так, в случае *D*-глюкозы в равновесной смеси содержится лишь ~0,2 % 1,6-ангидропроизводного, тогда как *D*-идоза превращается на 86 % в 1,6-ангидросоединение (**112**), в котором все три гидроксигруппы экваториальны.



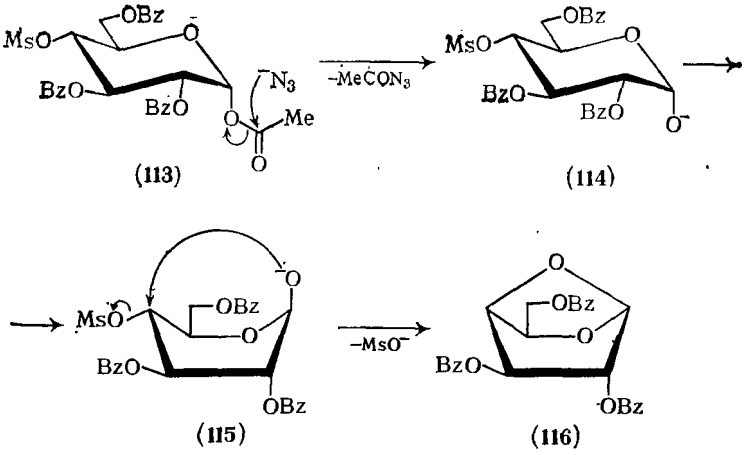
(**111**)



(**112**)

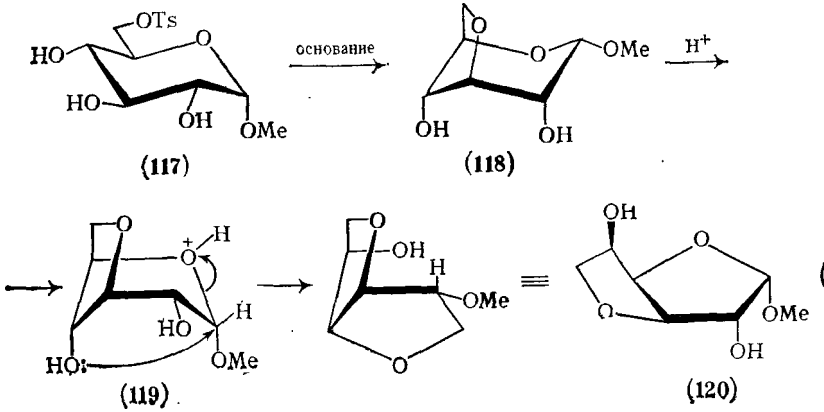
Наиболее важным дестабилизирующим фактором при образовании 1,6-ангидросахаров является, по-видимому, 1,3-диаксиальное взаимодействие между аксиальной гидроксигруппой при С-3 и ангидридным мостиком. Так, 1,6-ангидро-*D*-талоза, у которой аксиальна лишь 3-гидроксигруппа, составляет только 3 % равновесной смеси [115]. 1,6-Ангидросахара, в особенности с *глюко-*, *галакто-* и *манно*-конфигурацией, получают щелочным гидролизом соответствующих фенилгликозидов (см. разд. 26.1.8.1) или термической деполимеризацией соответствующих полисахаридов [114].

Могут быть получены также и 1,2-ангидросахара, однако они чрезвычайно реакционноспособны; 1,3-ангидропиранозы неизвестны, а 1,4-ангидропроизводные получают из 4-*O*-сульфонатов. Например, 1-*O*-ацетил-2,3,6-три-*O*-бензоил-4-*O*-мезил-α-*D*-глюкопираноза (**113**) превращается в 1,4-ангидросоединение (**116**) при обработке нуклеофильными анионами (N_3^- или OBz^-) в диметилформамиде [116]. При этом должна отщепляться 1-ацетильная группа с образованием алкоксид-иона (**114**), который аномеризуется в ион (**115**) и внутримолекулярно атакует 4-сульфонилоксигруппу с образованием ангидропроизводного (**116**) (схема 34). Эта реакция имеет, по-видимому, общий характер, протекает с хорошим выходом и не зависит от относительной конфигурации заместителей при С-1 и С-4.



(34)

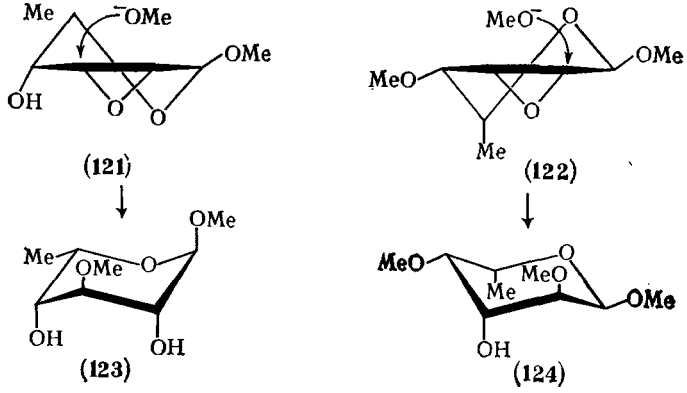
Ангидросахара, в образовании ангидроцикла которых полуацетальный гидроксил не участвует, образуются из соответствующих сульфонатов путем внутримолекулярной атаки подходящим образом расположенной гидроксигруппы. При этом легко образуются трех-, четырех-, пяти- и, возможно, шестичленные ангидроциклы. Например, метил-6-*O*-тозил-α-*D*-глюкопиранозид (**117**) с высоким выходом превращается в щелочных условиях в 3,6-ангидросахар (**118**) несмотря на термодинамически невыгодное изменение конформации $^4C_1$ на $^1C_4$, которое требуется для осуществления этой реакции [117]. При этом образуется очень стабильный тетрагидрофурановый цикл, вследствие чего процесс обычно необратим. Однако присущая диоксабицикло[1.2.3]октановой системе напряженность вызывает быструю катализируемую кислотами перегруппировку соединения (**118**) в более устойчивую фуранозу (**120**) с диоксабицикло[0.3.3]октановой системой; такое поведение дает основание предполагать, что аномерная конфигурация в процессе перегруппировки не меняется; это говорит в пользу согласованного механизма, как указано для соединения (**119**) (схема 35) [118].



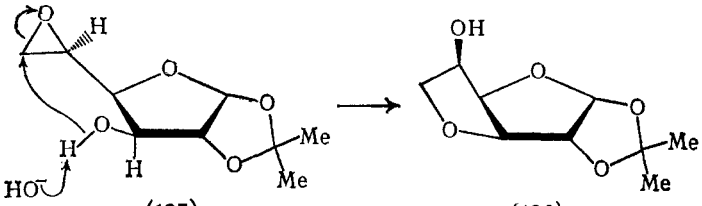
(35)

Оксирановые (эпоксидные) производные углеводов являются чрезвычайно ценными полупродуктами и могут быть легко получены действием основания на вицинальную *транс*-диольную группировку, в которой одна или обе гидроксильные группы этерифицированы сульфокислотой [119]. Например, избирательное тозилирование метил-4,6-*О*-бензилиден-α-*D*-глюкопиранозида приводит с высоким выходом к 2-тозилату (**36**), который в свою очередь почти количественно превращается в 2,3-эпоксид (**38**), имеющий *манно*-конфигурацию. 3-Тозилат (**37**) или 2,3-дитозилат превращаются в 2,3-эпоксид (**39**) с *алло*-конфигурацией. Оксирановый цикл легко раскрывается при нуклеофильной атаке, что позволяет получать различные производные сахаров. Реакции эпоксидов, имеющих жесткую конформацию углеводного цикла, протекают стереоспецифично, поскольку входящие и уходящие группы в переходном состоянии должны стать копланарными, приближаясь к переходному состоянию для S_N2-механизма (правило Фюрста — Платтнера) [119]. Это приводит к 2,3-*транс*-диаксиальным альтропиранозидам (**40**) и (**41**), (где $X = N_3$, NR_2, OR, SR, CN и т. д.).

Предсказать направление раскрытия эпоксидного цикла в нежестких структурах часто трудно, поскольку не всегда возможно точно оценить относительную устойчивость переходных состояний, возникающих из различных конформаций основного состояния. Например, метил-2,3-ангидро-6-дезокси-α-*L*-талопиранозид реагирует с метоксид-анионом через промежуточную HC^5_O-конформацию (**121**) с образованием *L*-идозида (**123**), тогда как его 4-*О*-метиловый эфир должен реагировать через альтернативную конформацию полукресла (**122**), так как при этом образуется галактозид (**124**). Предполагают, что 4-гидроксигруппа может образовывать водородную связь с атомом кислорода цикла, что стабилизирует HC^5_O-конформацию (**121**), тогда как в 4-*О*-метиловом эфире выгоднее экваториальное расположение более объемистой *О*-метильной группы [120].

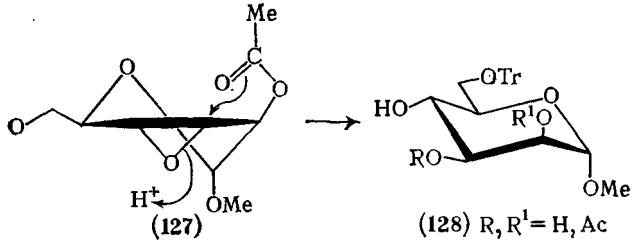


При соответствующем расположении свободных гидроксильных групп эпоксиды могут достаточно легко перегруппировываться в ангидросахара. Так, попытка получения эпоксида из метил-3-*O*-тозил-α-*D*-глюкопиранозида привела к 3,6-ангидропроизводному (**118**) путем раскрытия цикла первоначально образующихся 2,3- и(или) 3,4-эпоксидов при атаке 6-гидроксигруппой. Аналогично, 5,6-ангидро-1,2-*O*-изопропилиден-α-*D*-глюкофураноза (**125**) перегруппировывается в присутствии оснований в 3,6-ангидропроизводное (**126**) и, следовательно, нуклеофильное раскрытие эпоксидного цикла соединения (**125**), которое обычно происходит при первичном атоме углерода (ср. по реакции типа S_N2), может протекать лишь в том случае, если гидроксил при С-3 защищен.

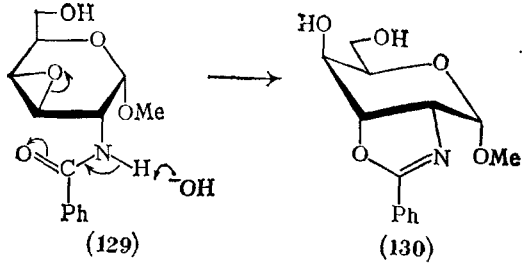


(125) (126) (36)

Стереоспецифичность раскрытия эпоксидного цикла может полностью измениться под влиянием *O*- или *N*-ацильной группы. Так, метил-3,4-ангидро-6-*O*-тритил-α-*D*-альтропиранозид при реакции с водной уксусной кислотой претерпевает *транс*-диаксиальное раскрытие эпоксидного цикла в термодинамически более выгодной $^{O}_{5}HC$-конформации (см. **127**). Однако его 2-*O*-ацетилпроизводное реагирует быстрее за счет соучастия ацетоксигруппы и превращается исключительно в маннозид (**128**) [121]. *N*-Ацильные группы часто являются более энергично соучаствующими группами; так, попытка получить метил-3,4-ангидро-2-бензамидо-2-дезокси-α-*D*-галактозид (**129**) из 4-сульфоната привела с почти количественным выходом к оксазолину (**130**) с *гуло*-конфигурацией, который образуется в результате атаки *N*-бензильной группой промежуточно возникающего эпоксида [122] (схема 38).



(127) (128) R, R¹ = H, Ac (37)



(129) (130) (38)

26.1.8.3. Сложные эфиры

Сложные эфиры карбоновых кислот и углеводов первоначально использовали для характеристики углеводов, так как они обычно хорошо кристаллизуются (особенно ацетаты и бензоаты). Сложноэфирную группу широко применяют в качестве защитной группировки, она легко вводится реакцией с соответствующим хлорангидридом или ангидридом кислоты в присутствии пиридина или другого катализатора. Ацилирование *D*-глюкозы смесью уксусного ангидрида с серной кислотой дает термодинамически более устойчивый α-аномер, поскольку в кислой среде протекает аномеризация α- и β-пентаацетатов. Однако в холодном пиридине ацилирование происходит быстрее, чем мутаротация непревращенного сахара, и, следовательно, соотношение образующихся аномерных ацетатов отражает аномерный состав исходного моносахарида. В горячем уксусном ангидриде в присутствии ацетата натрия (катализатор) мутаротация протекает гораздо быстрее ацетилирования, а так как экваториальный аномер ацилируется с большей скоростью, чем аксиальный, в конечном продукте будет преобладать β-пентаацетат.

Ацетильные группы устойчивы к мягкому кислотному гидролизу и удаляются в щелочных условиях, обычно путем переэтерификации с метанольным раствором метоксида натрия. Однако в слабощелочной среде они способны мигрировать к свободным гидроксильным группам, например при метилировании в присутствии оксида серебра. Бензоильные группы более устойчивы в мягких щелочных условиях, чем ацетильные, и менее склонны мигрировать; они более устойчивы и в кислой среде. Такое поведение бензоильных групп обусловлено, вероятно, пониженной электрофильностью карбонила этой сложноэфирной группы из-за резонанса с бензольным ядром. Как и следовало ожидать, хлорацетильная и трифторацетильная группы более лабильны и поэтому удаляются гораздо легче и избирательнее, чем ацетильная.

Во многих случаях возможно избирательное введение в молекулу углевода ацильной и сульфонильной групп, причем избирательность зависит от применяемого реагента. Так, при моноацетилировании ряда метил-3-ацетамидо-3,6-дидезоксиглюкопиранозидов ацетилхлоридом в основном ацилируется гидроксильная группа

при С-2, при использовании уксусного ангидрида — при С-4 [124]. Часто применяется избирательное бензоилирование бензоилхлоридом в пиридине, которое нередко протекает с хорошим выходом с образованием частично бензоилированных соединений. Например, в случае метил-α-*D*-глюкопиранозида (**13**) гидроксильные группы бензоилируются в следующем порядке: 6 > 2 > 3 > 4, в случае α-маннопиранозида — 6 > 3 > 2 > 4, а для галактозида — 6 > 3 ≈ ≈ 2 > 4 [125]. По-видимому, существует взаимосвязь между реакционной способностью гидроксильных групп и расположением вицинальной группы OR. Например, избирательное бензоилирование или тозилирование метил-4,6-*O*-бензилиден-α-*D*-глюкопиранозида (**136**) соответствующим ацилхлоридом приводит с высоким выходом к 2-*O*-ацильному производному из-за наличия *цис*-*O*-метильной группы при С-1, тогда как в случае β-аномера (**78**) образуются как 2-, так и 3-*O*-ацилпроизводные.

В отличие от эфиров карбоновых кислот сульфонаты [42, 126] более универсальны, так как у них чаще разрывается связь О—алкил, чем О—S, и их используют для синтеза разнообразных производных углеводов (см. разд. 26.1.9). Сульфонаты получают обработкой углеводов соответствующим сульфонилхлоридом в присутствии основания (обычно пиридина). Восстанавливающие сахара при такой обработке превращаются в сульфонилированные гликозилхлориды или продукты их превращения (вследствие легкости нуклеофильного замещения сульфонилоксигруппы при аномерном центре). В качестве сульфонильных групп обычно используют метансульфонильную (мезильную, CH_3SO_2) и *п*-толуолсульфонильную (тозильную, $CH_3C_6H_4SO_2$). В некоторых случаях применяют и другие сульфонильные группы. Например, в реакциях нуклеофильного замещения лучшие результаты дает использование сульфонатов, содержащих электроноакцепторные группировки; особенно полезна для этой цели трифторметансульфонильная (трифлильная) группа. Необходимость избирательного введения сульфонильных групп, особенно по первичному гидроксилу, с целью последующего нуклеофильного замещения привела к использованию «объемистых» сульфонилхлоридов, например мезитиленсульфонилхлорида и *сим*-триизопропилбензолсульфонилхлорида. Так, при обработке сахарозы, содержащей три первичные гидроксильные группы, тозилхлоридом после хроматографического разделения получают с низким выходом 1′,6,6′-тритозилат. При применении же мезитиленсульфонилхлорида 1′,6,6′-трисульфонат получают в кристаллическом виде с хорошим выходом и без хроматографирования. Мезитиленсульфонилирование вторичных гидроксилов также протекает с высокой стереоспецифичностью, поскольку стерические затруднения очень велики и присоединившаяся мезитиленсульфонильная группа блокирует вицинальную гидроксигруппу. Так, обработка метил-4,6-*O*-бензилиден-α-*D*-глюкопиранозида (**136**) даже избытком мезитиленсульфонилхлорида приводит к этерификации лишь 2-гидроксигруппы [127].

При получении эфиров сульфокислот следует иметь в виду, что первичные сульфонилоксигруппы способны замещаться ионом хлора и, возможно, пиридином (с образованием пиридиниевой соли). Последняя реакция легко осуществляется в случае трифторметансульфонатов [128]; полагают, что она является причиной более низких выходов (по сравнению с ожидаемыми) в других случаях сульфонилирования, поскольку образующиеся пиридиниевые соли могли быть потеряны при обработке реакционных смесей водой.

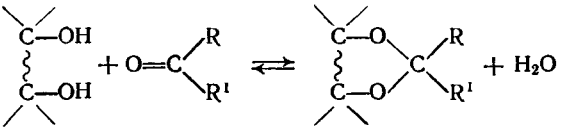
Применение сульфонилоксигрупп в качестве защитных группировок ограничено из-за легкости их замещения по механизму S_N2 и трудности их удаления путем разрыва связи О—алкил [126]. Попытка удалить сульфоэфирную группу в щелочных условиях при наличии соответствующим образом расположенных гидроксильных групп (свободных или потенциальных) приводит к образованию ангидросахара; однако если эти гидроксигруппы защищены устойчивой к действию оснований группировкой (например, простой эфирной), то происходит гладкое расщепление связи О—S с регенерацией спиртовой формы. Спирт может быть регенерирован из сульфоэфира также при обработке никелем Ренея или амальгамой натрия, однако этот процесс может осложняться образованием внутримолекулярного ангидроцикла. Известны два эффективных метода расщепления связи О—алкил в мягких условиях: фотолиз тозилатов в присутствии стехиометрических количеств метоксида натрия, при котором спирт регенерируется без образования ангидроцикла [129], и обработка нафтилнатрием [130], приводящая к избирательному разрыву связи О—S без образования побочных продуктов.

Расщепление эфиров сульфокислот алюмогидридом лития происходит путем нуклеофильного замещения сульфонилоксигруппы «гидрид-ионом» с образованием дезоксипроизводных (см. разд. 26.1.9.3) или путем атаки атома серы с регенерацией исходного спирта. Первый путь наблюдается только в случае первичных сульфонилоксигрупп, причем условия реакции должны строго контролироваться. В случае вторичных сульфонатов всегда наблюдается (хотя и медленная) атака атома серы, если невозможно образование ангидроцикла. Если же в результате внутримолекулярного замещения получается эпоксид, он далее реагирует с восстанавливающим агентом, и продуктом реакции являются дезоксисоединения.

26.1.8.4. Циклические ацетали

Поскольку углеводы являются полиолами, каждая пара соответствующим образом расположенных гидроксильных групп может образовывать циклические ацетали при взаимодействии с альдегидами и кетонами в присутствии кислотных катализаторов [131]. Такие ацетали, получаемые в мягких условиях, устойчивы к действию оснований и легко удаляются с помощью мягкого кислотного гидролиза. Ацетальная группировка имеет наибольшее значение

для одновременной защиты двух гидроксигрупп (схема 39).

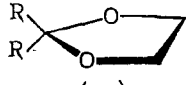


(39)

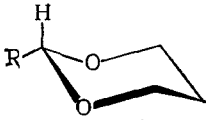
Наиболее широко применяют ацетальдегид, бензальдегид и ацетон, образующие соответственно этилиденовые, бензилиденовые и изопропилиденовые производные, однако могут быть использованы и другие карбонильные соединения. В большинстве случаев карбонильное соединение служит одновременно и растворителем. В качестве катализатора обычно применяют серную кислоту (0,1—5 %), хлороводород (0,2—1 %) и кислоты Льюиса, например хлорид цинка и трифторид бора. При синтезе изопропилиденовых производных действием ацетона к реакционной смеси прибавляют безводный сульфат меди. В более поздних работах в качестве эффективного катализатора применяли катионообменные смолы в H^+-форме в присутствии безводного сульфата кальция.

Поскольку образование ацеталей является обратимым процессом, сходным с образованием гликозидов, продукты образуются под контролем термодинамического фактора, и так как обычно карбонильное соединение берется в огромном избытке, продукт, как правило, замещен в максимально стерически допустимой степени. Кетоны обычно склонны к предпочтительному образованию пятичленных циклических диоксоланов (**131**) и реагируют преимущественно с вицинальными диолами. Если такая диольная группировка входит в состав пяти- или шестичленного цикла, она должна иметь *цис*-конфигурацию. Альдегиды обычно образуют шестичленные 1,3-диоксановые циклы (**132**) при условии, что не возникает мостиковых структур. Причина такого предпочтения заключается в конформационной устойчивости шестичленного ацетального цикла. Если же 1,3-диоксановый цикл образуют кетоны, то одна из алкильных групп должна занимать аксиальное положение, что делает такие структуры менее стабильными, чем 1,3-диоксолановые циклы. В кислой среде альдегиды конденсируются с диолами с образованием производных 1,3-диоксана, в которых объемистый заместитель экваториален, а в случаях, когда они могут образовывать 1,3-диоксоланы, получаются два стереоизомера. Так, *D*-глюкоза при реакции с ацетоном в присутствии кислоты с высоким выходом превращается в 1,2:5,6-ди-*O*-изопропилиден-α-*D*-глюкофуранозу (**133**), тогда как с бензальдегидом (в присутствии в качестве катализатора хлорида цинка) образуется в основном 4,6-*O*-бензилиден-α-*D*-глюкопираноза (**135**) и несколько меньшее количество 1,2:4,6-диацеталя. В случае гексоз ацеталь (**135**) является исключительно энергетически выгодным, так как он имеет циклическую структуру типа *транс*- или *цис*-декалина. Для образования 1,2:5,6-диацеталя (**133**) предпочтительна фуранозная структура,

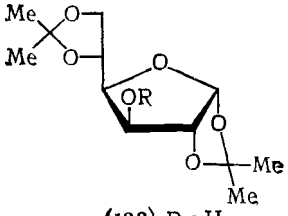
поскольку лишь при этом возможно образование двух ацетальных группировок; α-пираноза содержит только одну диольную группу, способную образовывать ацеталь. α-Пиранозные формы *D*-галактозы и *L*-арабинозы содержат по две вицинальные *цис*-диольные группировки, в результате чего эти сахара при взаимодействии с ацетоном дают 1,2 : 3,4-диацетали (137) и (138), соответственно. Из *D*-галактозы при этом в качестве минорного продукта образуется 1,2 : 5,6-диацеталь, который более легко можно получить инверсией конфигурации при С-4 у производного глюкофуранозы (133) (см. разд. 26.1.4.3). Все остальные гексозы и пентозы реагируют с ацетоном в основном в фуранозной форме и образуют либо 1,2 : 5,6-, либо 2,3 : 5,6-диацетали, за исключением *D*-альтрозы, которая превращается в смесь 1,2 : 5,6- (фураноза) и 1,2 : 3,4-диацеталей (пираноза). Из *D*-ксилозы образуется 1,2 : 3,5-диацеталь (139) с шестичленным ацетальным циклом. Повышенная напряженность



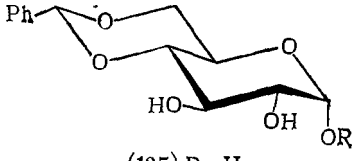
(131)



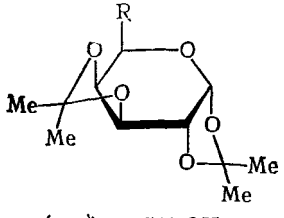
(132)



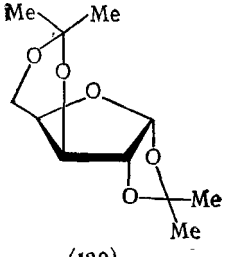
(133) R= H
(134) R= Ts



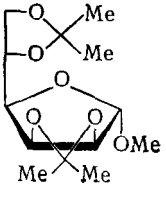
(135) R= H
(136) R= Me



(137) R= CH_2OH
(138) R= H



(139)



(140)

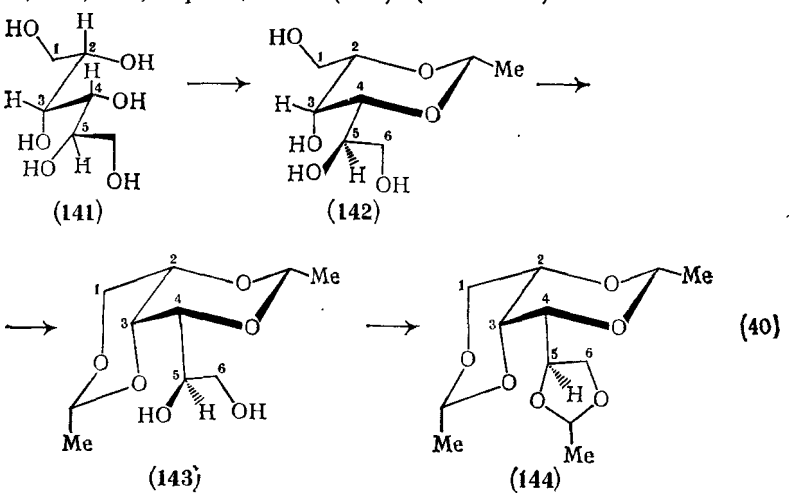
шестичленного цикла в данном случае проявляется легкостью, с которой соединение (**139**) избирательно гидролизуется до 1,2-ацеталя. В некоторых случаях прибавление к реакционной смеси метанола приводит к образованию ацеталя метилгликозида. Например, *L*-гулоза в метанольном растворе ацетона превращается в метил-2,3 : 5,6-ди-*O*-изопропилиден-β-*L*-гулофуранозид (**140**), тогда как в отсутствие спирта образуется 1,2 : 5,6-диацеталь [132].

При конденсации альдегидов с метилгексопиранозидами получаются в основном 4,6-ацетали; если 2,3-диольная группировка имеет *цис*-конфигурацию, далее образуются 2,3 : 4,6-диацетали, обычно в виде смеси диастереомеров, различающихся конфигурацией при С-2 и С-3. Так, метил-α-*D*-глюкопиранозид (**13**) образует 4,6-ацеталь (**136**), тогда как из маннозида получается 2,3: 4,6-диацеталь. 4,6-*O*-Бензилиденовые производные типа (**136**) интересны тем, что имеют жесткую конформацию; их широко использовали в синтезе и для изучения стереохимических закономерностей различных реакций, затрагивающих положения 2 и 3. Такие соединения получают в условиях кинетического контроля с применением бензилиденбромида в присутствии подходящего основания (*трет*-бутоксида калия, пиридина и т. д.); при этом образуются смеси двух диастереомеров [133]. Как и ожидалось, изомер с аксиально расположенной фенильной группой быстро изомеризовался в мягких кислотных условиях в экваториальный изомер.

Пиранозиды при реакции с кетонами образуют пятичленные ацетали по *цис*-диольным группировкам, когда это возможно. Так, галактозиды и арабинозиды превращаются в 3,4-ацетали, тогда как маннозиды и ликсозиды — в 2,3-ацетали. Алло- и рибопиранозиды, содержащие по две пары *цис*-диольных группировок, образуют смеси 2,3- и 3,4-ацеталей. Метил-α-*D*-глюкопиранозид (**13**) не содержит *цис*-диольных группировок и образует 4,6-ацеталь лишь с небольшим выходом. Однако путем переацетализации можно ввести изопропилиденовую группировку не только в положения 4,6, но и связать вицинальные *транс*-диолы в шестичленные циклы. Так, при обработке метил-α-*D*-глюкопиранозида (**13**) 2,2-диметоксипропаном в диметилформамиде в присутствии каталитического количества *п*-толуолсульфокислоты в основном получается 4,6-ацеталь и 2% 2,3 : 4,6-диацеталя [134]. При использовании 1,1-диметоксициклогексана основным продуктом был соответствующий диацеталь [135]. Переацетализация особенно удобна для введения ацетальной защиты в кислотолабильные соединения. Например, до 1974 г. многократно делались попытки получить циклические ацетали сахарозы, однако гликозидная связь не выдерживала необходимой для этой цели кислой среды. Применение же переацетализации привело с высоким выходом к 4,6-ацеталю наряду с некоторым количеством 1′,2 : 4,6-диацеталя — уникальному соединению, в котором одна ацетальная группа связывает два углеводных остатка этого дисахарида [136]. Сходные реакции наблюдаются при использовании простых виниловых эфиров, например 2-ме-

токсипропена. Причина различия в составе продуктов, образующихся при переацетализации и прямом введении ацетальной группы, не ясна, однако переацетализация часто проводится при стехиометрических количествах ацеталя, тогда как для прямого введения этой защитной группы, по-видимому, необходим огромный избыток карбонильного соединения. Это свидетельствует о том, что переацетализация является кинетически контролируемым процессом, тогда как прямое введение ацетальной группировки контролируется термодинамическими факторами.

Образование ацеталей ациклических соединений, например альдитов, управляется несколько иными факторами, но реакция с альдегидами приводит преимущественно к 1,3-диоксановым циклам, а с кетонами — к 1,3-диоксолановым циклам. Однако при реакции *D*-глюцита (**141**) с ацетальдегидом первоначально образуется 2,3-ацеталь (продукт кинетического контроля), который затем перегруппировывается в термодинамически более выгодный 2,4-ацеталь (**142**). Показано, что конформация ацеталя (**142**) наиболее стабильна, так как боковые цепи (C-1 и C-5,6) расположены экваториально относительно шестичленного цикла [137]. Далее из 2,4-ацеталя (**142**) образуются последовательно 1,3 : 2,4-диацеталь (**143**) и 1,3 : 2,4 : 5,6-триацеталь (**144**) (схема 40).

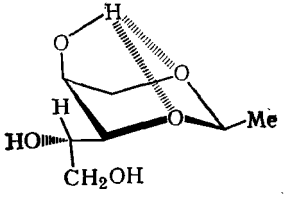


(40)

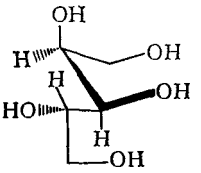
Были сформулированы следующие правила образования ацеталей ациклических соединений из альдегидов. (*а*) Образование шестичленных ацетальных циклов из двух вторичных гидроксильных групп с *эритро*-конфигурацией термодинамически более выгодно, чем образование циклов с участием первичной гидроксильной группы. (*б*) Менее выгодны пятичленные циклы, образованные из терминальных или *трео*-диольных группировок, а также шести- и семичленные ацетали из *трео*-диольных группировок. Относительную стабильность указанных циклических систем предсказать трудно;

она может изменяться в зависимости от условий получения и применяемого альдегида. (*в*) Все другие типы циклических ацеталей термодинамически невыгодны.

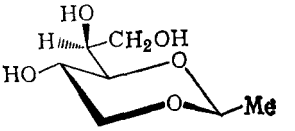
Таким образом, *D*-маннит и *D*-галактит образуют преимущественно 1,3 : 4,6-диацетали; аллит и *D*-идит — 2,4 : 3,5-диацетали. Однако в случае *L*-арабинита (**146**) возможно образование двух моноацеталей (**145**) и (**147**), возникающих из терминальных диольных группировок. Тем не менее образуется преимущественно 1,3-ацеталь (**145**), по-видимому, из-за способности аксиальной 2-гидроксигруппы в соединении (**145**) образовывать водородную связь с кислородными атомами цикла [138].



(145).



(146)



(147)

Взаимодействие альдитов и других ациклических производных с кетонами приводит в основном к ацеталям вицинальных *трео*-диольных или терминальных диольных групп. При образовании ацеталей из α-*трео*-диолов получается 1,3-диоксолан с *транс*-расположением заместителей, тогда как из α-*эритро*-диолов должны образовываться ацетали с *цис*-конфигурацией этих заместителей. Так, *D*-глюцит (**141**) и *D*-маннит, содержащие 3,4-*трео*-диольные группировки, легко образуют 1,2 : 3,4 : 5,6-триацетали, в то время как галактит с его 3,4-*эритро*-диольной группой превращается в смесь 2,3 : 4,5- и 2,3 : 5,6-диацеталей [137].

Ацетали обычно расщепляются кислотой [139]; особенно рекомендовано использование 90 %-ной трифторуксусной кислоты. Скорость разрыва ацетального цикла зависит от его расположения в молекуле и от природы ацетальной группы. Фторированные изопропилиденовые группы и ацетали, полученные из трифторацетальдегида, чрезвычайно устойчивы вследствие электроноакцепторного влияния атомов галогена. В случае бензилиденовых групп устойчивость ацеталей может быть повышена или понижена введением соответствующих заместителей в бензольное ядро.

Легкость удаления циклической ацетальной группы пропорциональна трудности ее прямого введения. Так, избирательный гидролиз 1,3 : 2,4 : 5,6-три-*O*-бензилиден-*D*-глюцита (**144**) приводит в зависимости от условий либо к 1,3 : 2,4-диацеталю, либо к 2,4-ацеталю. Аналогично, изопропилиденовая группировка при фуранозном цикле более предпочтительна из-за наличия в таком случае термодинамически выгодной триоксабицикло[3.3.0]октановой системы; другие изопропилиденовые группы избирательно удаляются

в мягких кислотных условиях. Так, при мягком кислотном гидролизе из 1,2 : 5,6-ди-*O*-изопропилиден-α-*D*-глюкофуранозы (**133**) гладко образуется 1,2-моноацеталь.

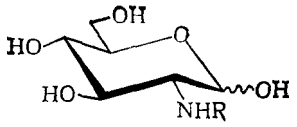
26.1.9. МОНОСАХАРИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ДРУГИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППЫ

Моносахариды, в которых одна или более гидроксильных групп заменены на другие функциональные группы, распространены в природе широко, но редко встречаются в больших количествах. В этом разделе обсуждаются только основные группы таких моносахаридов.

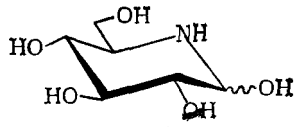
26.1.9.1. Амино- и нитросахара

2-Амино-2-дезокси-*D*-глюкоза (**148**) (глюкозамин) является наиболее доступным аминосахаром и часто входит в виде *N*-ацетильного производного (**149**) в состав полисахаридов и гликопротеинов. Хитин, широко распространенный структурный полисахарид членистоногих и других беспозвоночных, является гомополисахаридом и состоит из остатков 2-ацетамидо-2-дезокси-β-*D*-глюкопиранозы (**149**). 2-Ацетамидо-2-дезокси-*D*-галактоза, -α-*D*-манноза и -*D*-талоза также встречаются в гликопротеинах, но в меньших количествах. Аминосахара [140] редко встречаются в свободном состоянии или в виде простых производных, но почти всегда являются компонентами полисахаридов, олигосахаридов или гликозидов. Однако 5-амино-5-дезокси-*D*-глюкоза (**151**) (нойиримицин) и *N*-(*N'*-метил-*N'*-нитрозокарбамоил)-*D*-глюкозамин (**150**) (стрептозотицин) — антибиотики, продуцируемые некоторыми штаммами *Streptomyces*. В первом из них аминогруппа включена в образование цикла с альдегидной группой, что приводит к пиперидиновой структуре. Особенно богатым источником различных аминосахаров являются плесневые грибы семейства *Streptomyces*, продуцирующие разнообразные антибиотики, содержащие аминосахара [141]. Типичными примерами таких антибиотиков являются канамицин В (**152**), в состав которого входят 2,6-диамино-2,6-дидезокси-*D*-глюкоза и 3-амино-3-дезокси-*D*-глюкоза, и метимицин (**153**), содержащий 3,4,6-тридезокси-3-диметиламино-*D*-*ксило*-гексозу (дезозамин).

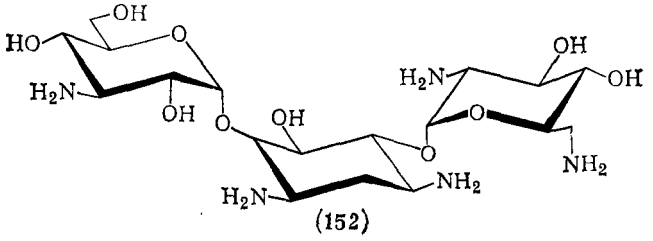
Эфиры сульфокислот (см. разд. 26.1.8.3) наиболее широко используются в качестве промежуточных соединений для синтеза аминосахаров [142]. Сульфонилоксигруппа либо замещается непосредственно аммиаком или гидразином или, если это возможно, азид-ионом (см. разд. 26.1.4.3), либо сначала превращается в эпоксид с последующим раскрытием его цикла аммиаком или азид-ионом. При использовании аммиака первоначально образующийся амин иногда является лучшим нуклеофилом, чем сам аммиак, и потому конкурирует с ним, образуя с исходным соединением вторичные амины в качестве побочных продуктов. Такой проблемы



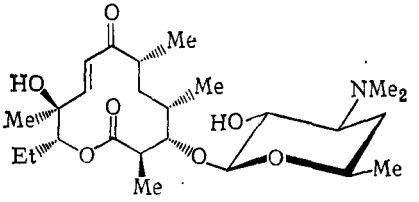
(148) R= H
(149) R= Ac
(150) R= CON(NO)Me



(151)



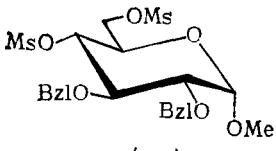
(152)



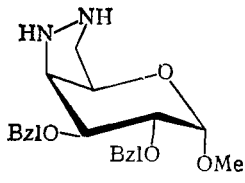
(153)

не возникает при использовании гидразина, который иногда может успешно применяться в качестве бидентатного нуклеофила. Так, метил-2,3-ди-*O*-бензил-4,6-ди-*O*-мезил-α-*D*-глюкопиранозид **(154)** при реакции с гидразином превращается в циклический 4,6-гидразид **(155)**, из которого путем восстановительного расщепления гладко получается 4,6-диамин [143, 144]. Замещение азидами подчиняется правилам, сформулированным Ричардсоном [43] для реакций, идущих по механизму S_N2 (см. разд. 26.1.4.3); тем не менее обычно предпочитают применять именно этот реагент. Промежуточно образующийся азид восстанавливают каталитическим гидрированием, гидразином в присутствии никеля Ренея, боргидридом натрия или алюмогидридом лития и т. п. 3-Амино-3-дезокси-1,2 : 5,6-ди-*O*-изопропилиден-α-*D*-аллофураноза **(156)** синтезирована из соответствующего 3-тозилглюкофуранозида **(134)** с использованием в качестве нуклеофильного реагента аммиака, гидразина или азида в гексаметилентриамидофосфате. Хотя реакция с азидом протекает медленно из-за затрудненности атаки *экзо*-сульфонилоксигруппы азид-ионом с тыла, общий выход амина в этом случае гораздо выше, чем при реакции с аммиаком, и сравним с выходом в случае обработки гидразином, поэтому более выгодно использовать азидный метод [142].

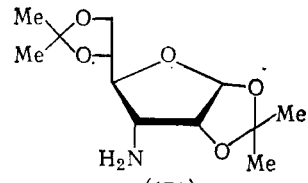
Попытки аммонолиза или гидразинолиза сульфонилоксигрупп в соединениях, содержащих соответствующим образом располо-



(154)

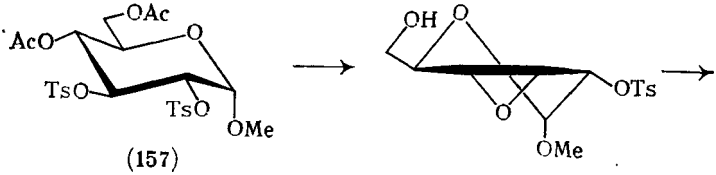


(155)

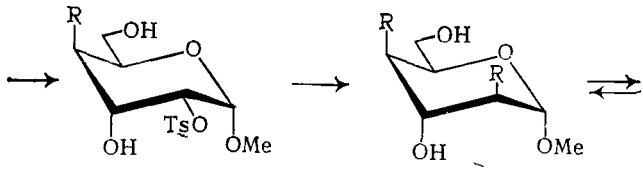


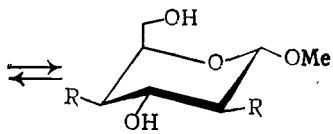
(156)

женные гидроксильные группы (свободные или потенциальные), обычно приводят к получению ангидросахаров или продуктов их дальнейшего превращения. Так, обработка метил-4,6-ди-*O*-ацетил-2,3-ди-*O*-тозил-α-*D*-глюкопиранозида (**157**) или метил-2,6-ди-*O*-бензоил-3,4-ди-*O*-тозил-α-*D*-глюкопиранозида (**158**) гидразином с последующим восстановлением и *N*-ацетилированием приводила в обоих случаях к метил-2,4-диацетамидо-2,4-дидезокси-α-*D*-идопи-



(157)

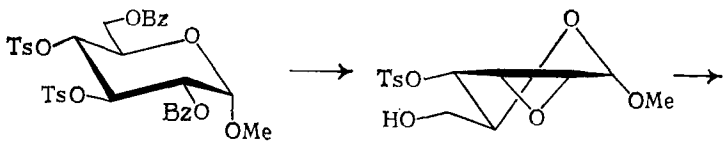


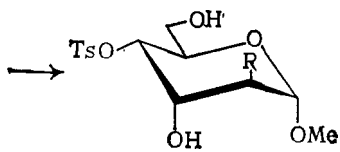


(159) R=NHAc

(41)

(158)



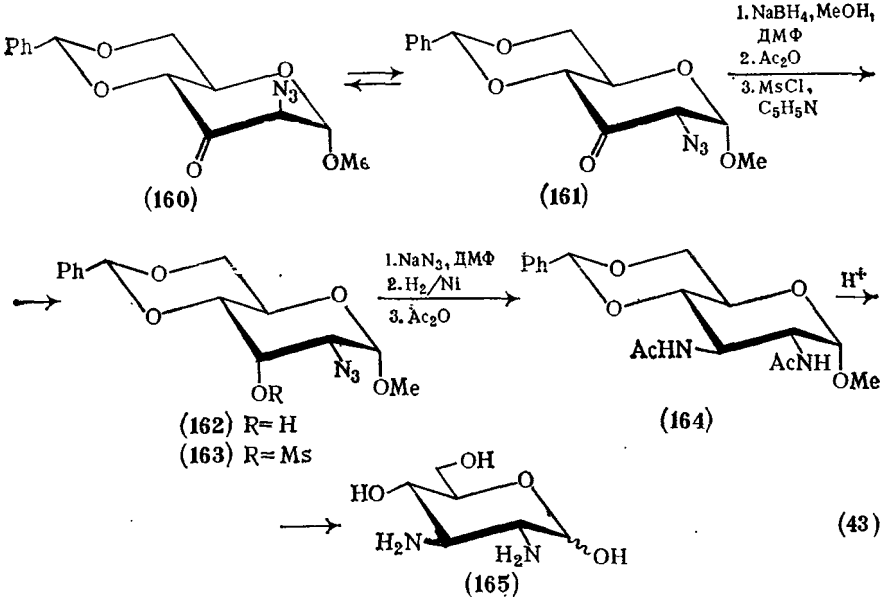


(159)

(42)

ранозиду (**159**; R = NHAc), который образуется, очевидно, через 3,4- и 2,3-эпоксиды (схемы 41, 42).

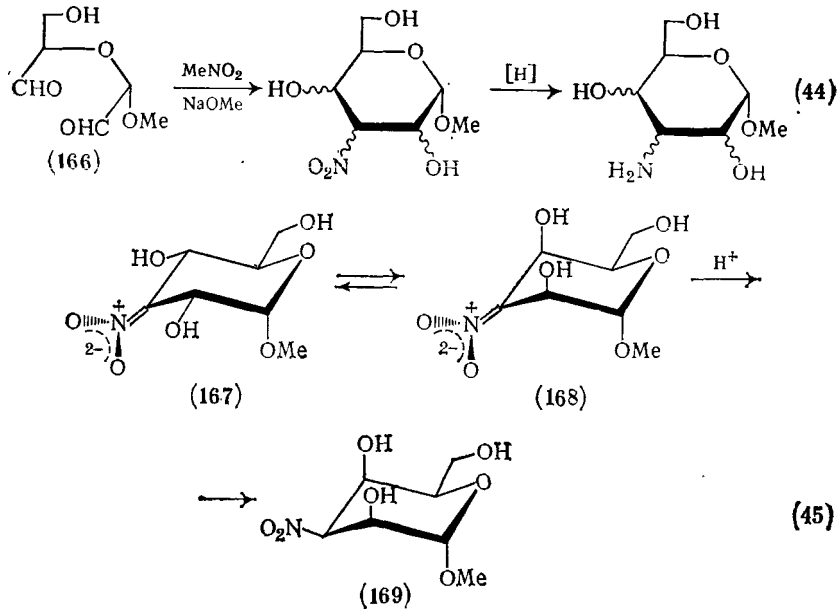
Применение азидов в качестве нуклеофилов для прямого замещения сульфонилоксигрупп и раскрытия эпоксидного цикла хорошо иллюстрируется синтезом 2,3-диамино-2,3-дидезокси-*D*-глюкозы из метил-2,3-ангидро-4,6-*O*-бензилиден-α-*D*-аллопиранозида (**39**). Реакция соединения (**39**) с азидом натрия в этаноле в присутствии хлорида аммония приводит через *транс*-диаксиальное раскрытие эпоксидного цикла к 2-азидоальтрозиду (**41**; X = N_3) с высоким выходом. Окисление азида (**41**) смесью диметилсульфоксида и уксусного ангидрида дает 3-улозу (**160**), а эпимеризация аксиальной 2-азидогруппы соединения (**160**) — 3-улозу (**161**). Одновременное восстановление борогидридом натрия кето- и азидогруппы приводит (после *N*-ацетилирования) к 2-ацетамидоаллозиду (**162**). При мезилировании этого аллозида образуется 3-сульфонат (**163**), обработка которого азидом натрия с последующим восстановлением и ацетилированием дает *глюко*-производное (**164**). Гидролиз соединения (**164**) приводит с высоким общим выходом к требуемому продукту — 2,3-диамино-2,3-дидезокси-*D*-глюкозе (**165**) [145] (схема 43).



(43)

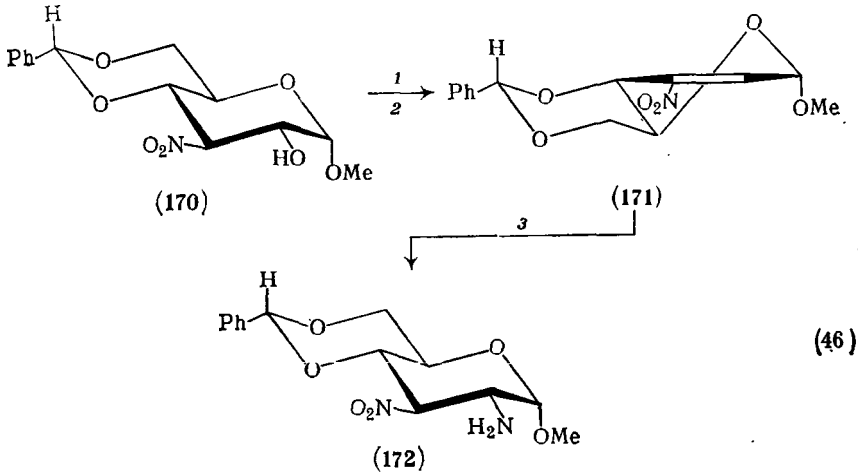
Новым методом синтеза аминосахаров является циклизация диальдегидов, получаемых, например, периодатным окислением гликозидов, с нитрометаном [146]. Так, диальдегид (**166**), образующийся из метил-α-*D*-глюкопиранозида (**13**), в результате двух последовательных альдольных конденсаций с нитрометаном в присутствии основания вновь образует пиранозный цикл, несущий

3-нитрогруппу (схема 44). Поскольку при этом возникают три новых хиральных центра, возможно образование восьми диастереомеров. Нитрогруппа, однако, всегда занимает экваториальное положение, а потому образуются только *глюко-*, *манно-*, *галакто-* и *тало*-изомеры. На ранних стадиях реакции соотношение этих изомеров равно 41 : 42 : 9 : 8, но по мере стояния реакционной смеси вступают в действие термодинамические факторы, и *тало*-изомер становится преобладающим. На первый взгляд это кажется удивительным, так как *тало*-изомер (**169**) имеет две аксиальные гидроксильные группы, однако *аци*-формы нитропиранозидов находятся в состоянии равновесия, а пространственное сближение кислородных атомов *аци*-нитрогруппы и соседних экваториальных заместителей ($\Delta^{1,3}$-эффект) дестабилизирует «*глюко*»-изомер (**167**) и делает выгодным диаксиальный «*тало*»-изомер (**168**). Используя в качестве исходных соединений различные глюкозиды, нуклеозиды, 1,6-ангидропиранозы и т. д., можно получать разнообразные 3-нитропроизводные, а восстановлением последних — соответствующие аминопиранозы.



3-Нитропиранозиды типа (**169**) являются также универсальными промежуточными соединениями в синтезе аминосахаров [147]. 4,6-*О*-Бензилиденовое производное (**170**) метил-3-дезокси-3-нитро-α-*D*-глюкопиранозида в результате последовательного ацетилирования и обработки основанием превращается в 3-нитро-2-ен (**171**) (реакция Шмидта — Руца). Соединение (**171**) вступает в реакцию Михаэля с различными нуклеофильными реагентами и

превращается при этом в 2-замещенные 3-нитропиранозиды. Так, 2-амино-3-нитроглюкозид (**172**) получается при обработке производного (**171**) аммиаком и может быть путем восстановления и гидролиза переведен в 2,3-диамино-2,3-дидезокси-*D*-глюкозу. Такие реакции присоединения, которые обычно осуществляют в щелочных условиях, всегда приводят к 2,3-диэкваториальным продуктам. В мягких кислотных или нейтральных условиях при кинетическом контроле и применении таких реагентов, как, например, HCN и HN_3, с высоким выходом образуется 2-аксиальный продукт [148]. Другие дезоксинитропроизводные сахаров получают окислением оксимов и аминов пероксикислотами.

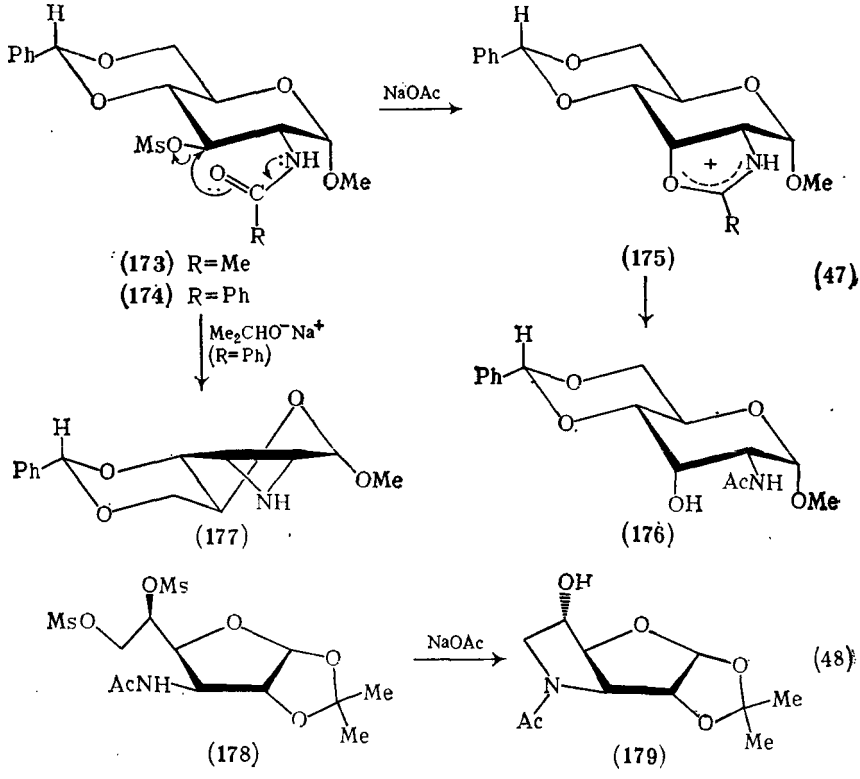


(46)

1-Ac_2O, $BF_3 \cdot Et_2O$; *2*-$NaHCO_3$; *3*-NH_3

Химические превращения легкодоступных аминосахаров, например глюкозамина (**148**), иногда используют для синтеза других аминосахаров; исключительный интерес представляет способность ациламиногруппы соучаствовать в реакциях по соседним с ней положениям [149]. Так, обращение конфигурации *транс*-гидроксигруппы, смежной с ацетамидной, проводится с помощью *O*-мезилирования и последующей обработки ацетатом натрия в водном 2-метоксиэтаноле. При этом метил-2-ацетамидо-4,6-*O*-бензилиден-2-дезокси-3-*O*-мезил-α-*D*-глюкопиранозид (**173**) превращается через оксазолиниевый ион (**175**) в аллопиранозид (**176**) [150]. В отличие от этого обработка соответствующего *N*-бензоильного производного (**174**) сильным основанием приводит в результате соучастия атома азота к образованию трехчленного эпиминового цикла [151]. *N*-Бензоильная группа чрезвычайно чувствительна к действию основания и быстро гидролизуется, что приводит к эпимину (**177**). Такие эпимины в отличие от эпоксидов (см. разд. 26.1.8.2) очень устойчивы к действию оснований и умеренно устойчивы к

действию кислот, что позволяет удалить 4,6-*O*-бензилиденовую группу из (177), не разрушая эпиминового цикла. Соучастие ациламиногруппы может проявляться через несколько атомов углерода. Например, сольволиз 3-ацетамидо-3-дезокси-5,6-ди-*O*-мезил-1,2-*O*-изопропилиден-α-*D*-глюкофуранозы (178) приводит к элиминированию мезилоксигрупп в положении 5 в результате атаки атомом кислорода амидной группы и в положении 6 — за счет атаки атомом азота амидной группы с образованием 3,6-иминопроизводного (179) (схема 48) [152].



(47)

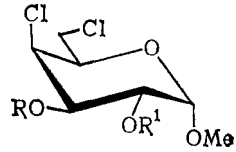
(48)

26.1.9.2. Галогенпроизводные сахаров

Хотя из природных источников выделено лишь одно галогенпроизводное сахара (антибиотик нуклеоцидин), такие соединения представляют для биологии большой интерес [153], так как в случае других классов природных соединений (например, стероидов) введение в молекулу галогена часто приводит к появлению интересных биологических свойств. Особый интерес представляют фтор- и хлорпроизводные; некоторые фторпроизводные являются конкурентными ингибиторами некоторых ферментов.

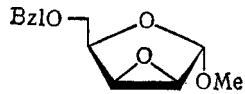
Наиболее распространенным способом введения галогена в молекулу углевода является нуклеофильное замещение сульфонилоксигруппы действием галогенид-иона или нуклеофильное раскрытие эпоксидного цикла. В первом случае легкость замещения убывает в ряду; $I > Br > Cl > F$; реакция идет в том случае, если полярные и стерические факторы благоприятствуют осуществлению S_N2-механизма (см. разд. 26.1.4.3), так что введение галогена по первичным атомам углерода осуществляется обычно достаточно легко, а по вторичным — труднее. Введение фтора во вторичные положения замещением сульфонилоксигрупп затруднено вследствие низкой нуклеофильности и высокой основности фторид-иона, что благоприятствует реакции элиминирования. Тетрабутиламмонийфторид в ацетонитриле — наиболее эффективный реагент для осуществления такого замещения. Так, 3-дезокси-3-фтор-*D*-глюкозу получают обработкой 3-тозилата 1,2 : 5,6-ди-*O*-изопропилиден-α-*D*-аллофуранозы (44) вышеуказанным способом с последующим кислотным гидролизом [154]. Реакция с фторидом протекает с обращением конфигурации, однако при применении других галогенсодержащих реагентов возможно нуклеофильное замещение введенного атома галогена с образованием либо продуктов с полностью сохраненной конфигурацией, либо смеси двух эпимеров. Существует несколько методов непосредственного замещения гидроксигруппы галогеном (без выделения промежуточного сложного эфира) или другой группой. Старейшим из них является метод Гельфериха, в котором сахар обрабатывают сульфурилхлоридом. Первоначально образующийся эфир хлорсульфоновой кислоты затем атакуется выделяющимся ионом хлора при условии, что стерические и полярные эффекты благоприятствуют протеканию реакции по S_N2-механизму. Реакция проводится в очень мягких условиях, и те гидроксильные группы, для которых реакции по S_N2-механизму невыгодны, остаются либо в виде эфира хлорсульфоновой кислоты, либо образуют циклический сульфат с вицинальной гидроксигруппой. Так, реакция метил-α-*D*-глюкопиранозида (13) с сульфурилхлоридом дает в зависимости от условий 4,6-дихлоргалактозид в форме бис(хлорсульфонилокси)производного (180) или циклического сульфата (181). Последующее удаление хлорсульфонильных групп легко осуществляется под действием иодида натрия в метаноле, тогда как циклический сульфат разрушается труднее путем последовательной обработки щелочью и кислотой. К сожалению, эту реакцию нельзя использовать для получения фтор-, бром- и иодсахаров. Для прямой замены гидроксильных групп на галоген используют также мезилхлорид в диметилформамиде, с помощью которого при комнатной температуре можно ввести хлор только к первичному атому углерода, тогда как при повышенной температуре замещаются и вторичные гидроксигруппы [155]. Полагают, что при этом образуется промежуточное соединение $ROCH{=}N^+Me_2$; этот эфир получается и при реакции углевода с хлор- или бромметилендиметиламмонийхлоридом

$Me_2N^+{=}CHX\ Cl^-$. При действии трифенилфосфина и тетрахлорида углерода или *N*-галогенсукцинимида также идет галогенирование (но не фторирование) через промежуточное образование соединения $R{-}OP^+Ph_3$, а при действии метилтрифенилфосфонийиодида (реактив Райдона) или соответствующего дигалогенпроизводного — через эфир $ROP^+(Me)(OPh)_2$.

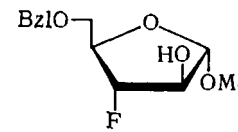


(180) $R = R^1 = SO_2Cl$
(181) $R, R^1 = -SO_2-$
(182) $R = R^1 = H$

Раскрытие эпоксидных циклов галогенид-ионами или галогеноводородами приводит к соответствующему *транс*-галогенгидроксипроизводному. Реакция с галогенид-ионами должна проводиться в буферной среде, поскольку образующийся при реакции алкоксид-ион повышает щелочность среды, что приводит к протеканию побочных реакций и снижению выхода. Поэтому реакцию обычно проводят в присутствии уксусной кислоты и ацетата натрия. Реакция подчиняется правилу Фюрста — Платтнера для ангидропиранозидов и приводит преимущественно к *транс*-диаксиальному изомеру (см. разд. 26.1.8.2), поэтому метил-4,6-*O*-бензилиден-α-*D*-маннопиранозид (38) и -аллопиранозид (39) в ее условиях превращаются в основном в 3-галоген- (40) и 2-галогенальтропиранозиды (41), соответственно. Под действием галогеноводородов эпоксидный цикл раскрывается быстрее, обычно с образованием тех же *транс*-диаксиальных продуктов. Для получения фторидов чаще применяется HKF_2 в этиленгликоле. Например, при обработке этим реагентом метил-2,3-ангидро-6-*O*-бензил-α-*D*-ликсопиранозида (183) образуется 3-фторид (184) с выходом 30 %.



(183)

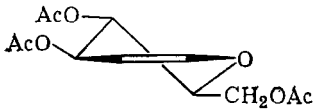


(184)

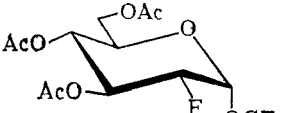
Для получения 6-бром-6-дезоксигексозидов обычно используют реакцию 4,6-*O*-бензилиденовых производных с *N*-бромсукцинимидом в CCl_4. Она протекает путем радикального бромирования по бензильному углероду с последующей ионизацией, образованием бензоксониевой соли и атакой бромид-иона по С-6. Так, 4,6-ацеталь (136) в условиях этого метода количественно превращается в метил-4-*O*-бензоил-6-бром-6-дезокси-α-*D*-глюкопиранозид. Однако из соответствующего β-галактопиранозида помимо ожидаемого 6-бромпроизводного образуется 3-бромгулопиранозид. В этом случае, по-видимому, в значительной степени идет миграция 4,6-бензоксониевого иона в положение 3,4, что приводит к атаке ионом

брома по С-3. Если бензилиденовая группа присоединена по двум вторичным гидроксигруппам, обычно образуется смесь бромидов.

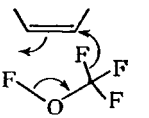
Присоединение брома, хлора и псевдогалогенов (IN_3, IF и т. д.) к ненасыщенным производным сахаров (см. разд. 26.1.9.6) приводит к разнообразным галогенпроизводным, а присоединение псевдогалогена трифторметоксифторида F_3COF к гликалям типа (185) является единственным удобным методом введения фтора по С-2 альдоз. При обработке соединения (185) трифторметоксифторидом образуется смесь четырех продуктов: трифторметил-3,4,6-три-*О*-ацетил-2-дезокси-2-фтор-α-*D*-глюкопиранозида (186) и соответствующего гликозилфторида с общим выходом 60 %, а также β-*манно*-изомеров с общим выходом 14 % [154]. Этот реагент функционирует в виде CF_3O^- F^+ (т. е. содержит электрофильный фтор), и поэтому фтор присоединяется к более нуклеофильному концу двойной связи. Однако 1,2-*цис*-конфигурация продукта реакции свидетельствует о том, что присоединение является согласованным процессом, причем молекула CF_3OF атакует олефины с одного или с другого конца. Происхождение атома фтора при С-1 не ясно, однако предполагают, что такие фториды могут образоваться при распаде трифторметилгликозида с отщеплением F_2CO или через пятицентровое переходное состояние (187).



(185)

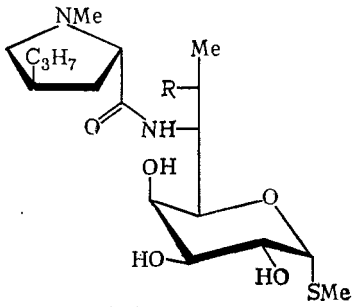


(186)

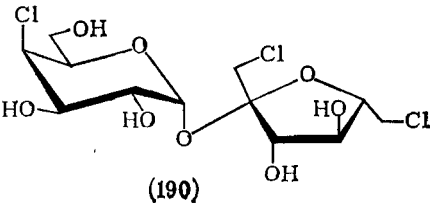


(187)

Замещение 7-гидроксигруппы в антибиотике линкомицине (188) на хлор приводит к гораздо более мощному антибиотику (189), известному под названием клиндамицин. Еще более удивительным является сообщение о том, что замена гидроксильных групп в молекуле сахарозы на хлор приводит к значительному усилению сладкого вкуса [156]; 1′4,6′-трихлорпроизводное (190) в 2000 раз слаще, чем сахароза.



(188) R= OH
(189) R= Cl



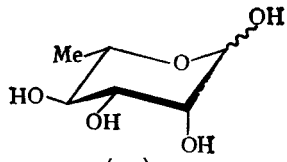
(190)

26.1.9.3. Дезоксисахара

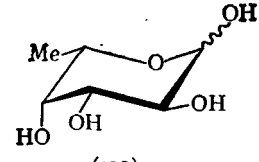
Альдозы, в которых одна или более гидроксильных групп заменены на атом водорода, широко распространены в природе [157], в особенности соединения с терминальной дезоксигруппой, например *L*-рамноза (6-дезокси-*L*-манноза) (**191**) и *L*-фукоза (6-дезокси-*L*-галактоза) (**192**), являющиеся компонентами многих полисахаридов, гликопротеинов и растительных гликозидов. 2-Дезокси-*D*-*эритро*-пентоза (2-дезокси-*D*-рибоза) (**193**) входит в состав ДНК, а многие моно- и дидезоксисахара — в состав антибиотиков [141].

Синтез дезоксисахаров осуществляют восстановительным дегалогенированием соответствующих галогенпроизводных (см. разд. 26.1.9.2). Легкость протекания такого процесса уменьшается в ряду: $I > Br > Cl$, а фтор вообще инертен по отношению к восстанавливающим реагентам. Восстановление иод- и бромпроизводных можно осуществить каталитическим гидрированием в присутствии акцептора кислоты (например, ацетата натрия), хотя вторичные галогенпроизводные иногда устойчивы к такой обработке. Восстановление гидразином в присутствии никеля Ренея весьма эффективно и обладает тем преимуществом, что не требует специального оборудования для гидрирования; с помощью этого метода избирательно восстанавливаются вторичные хлорпроизводные в присутствии атомов галогена у первичного атома углерода. Такая же избирательность наблюдается при гидрировании над никелем Ренея в присутствии триэтиламина, тогда как в присутствии гидроксида калия восстанавливаются как первичные, так и вторичные хлорпроизводные [158]. Аналогичная избирательность наблюдается при восстановлении хлорпроизводных трибутилстаннаном [159]; установлено, что этот реагент действует по радикальному механизму. Поскольку гидрирование в присутствии никеля Ренея и триэтиламина происходит с подобной селективностью, возможно, что оно осуществляется по радикальному механизму, и, вероятно, инициируется путем отрыва атомов водорода от триэтиламина никелем Ренея. Так, при гидрировании над никелем Ренея метил-4,6-дидезокси-4,6-дихлор-α-*D*-галактопиранозид (**182**), полученный реакцией сульфурилхлорида с метил-α-*D*-глюкопиранозидом, превращается в 4,6-дидезоксигликозид в присутствии гидроксида калия и в 4,6-дидезокси-6-хлоргликозид (**194**) в присутствии триэтиламина [158]; соединение (**194**) получается также при восстановлении гидразином в присутствии никеля Ренея или трибутилстаннаном.

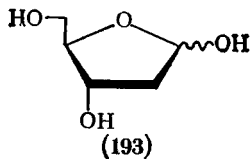
Первичные сульфонилоксигруппы восстанавливают до дезоксигрупп алюмогидридом лития или борогидридом натрия в диметилсульфоксиде. Эти реакции в основном протекают по S_N2-механизму, причем в качестве нуклеофила выступает реальный или потенциальный гидрид-ион. Вторичные сульфонилоксигруппы не превращаются в дезоксизвенья из-за большей затрудненности обра-



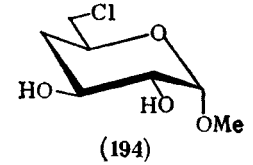
(191)



(192)



(193)



(194)

зования S_N2-переходного состояния при вторичном атоме углерода. В некоторых случаях гидрид атакует атом серы, что приводит к разрыву O—S-связи и регенерации исходного спирта.

Восстановление эпоксидов алюмогидридом лития гладко приводит к «диаксиальному продукту» согласно правилу Фюрста—Платтнера (см. разд. 26.1.8.2). При восстановлении метил-2,3-ангидро-4,6-*O*-бензилиден-α-аллопиранозида (**39**) получен соответствующий 2-дезоксигексопиранозид (**41**; X = H), тогда как соответствующий маннопиранозид (**38**) превращался в этих условиях в 3-дезоксипиранозид (**40**; X = H) с высоким выходом.

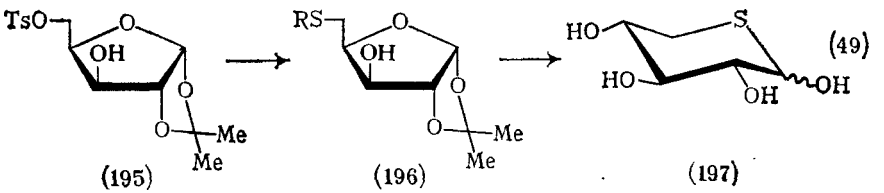
Дезоксисахара получают также десульфуризацией тиосахаров никелем Ренея (см. разд. 26.1.9.4) и восстановлением ненасыщенных производных углеводов (см. разд. 26.1.9.6).

26.1.9.4. Тиосахара

Замещение входящих в состав молекул углеводов атомов кислорода атомами серы приводит к тиосахарам [160]. Единственной группой природных тиосахаров являются тиогликозиды, например синигрин (компонент черной горчицы) и уникальное соединение 5′-метилтиоаденозин (витамин L_2) из дрожжей. В тиогликозидах гликозидный атом кислорода заменен атомом серы; в природе найдено свыше 50 соединений этого типа, они являются важными вкусовыми веществами, известными как гликозиды горчичного масла [160].

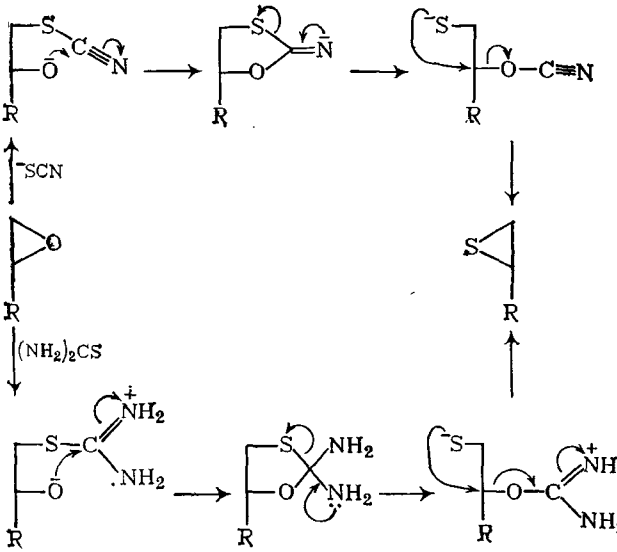
Значительно более высокая нуклеофильность серы по сравнению с кислородом способствует ее введению в молекулы сахаров путем нуклеофильного замещения галогенов или сульфоэфирных групп и раскрытия эпоксидного цикла. Вследствие повышенной нуклеофильности сера успешно конкурирует с гидроксильными группами при образовании циклической формы (тиапиранозной или тиафуранозной). Так, 4-тиоглюкоза существует только в фуранозной форме [161].

В качестве содержащих серу нуклеофильных реагентов применяют тиоцианат калия, тиосульфат натрия, щелочнометаллические соли тиоуксусной и тиобензойной кислот, а также бензилтиолят натрия. Например, реакция 1,2-*O*-изопропилиден-5-*O*-тозил-α-*D*-ксилофуранозы (**195**) с любым из этих реагентов приводит к соответствующему 5-тиоаналогу (**196**; R = CN, SO_3Na, COMe, COPh или CH_2Ph). После удаления заместителя от атома серы обработкой сульфидом, борогидридом или метоксидом натрия или натрием в жидком аммиаке получают 1,2-*O*-изопропилиден-5-тио-α-*D*-ксилофуранозу (**196**, R = H) [162]. При последующем кислотном гидролизе этого соединения образуется ксилотиапираноза (**197**) (схема 49).

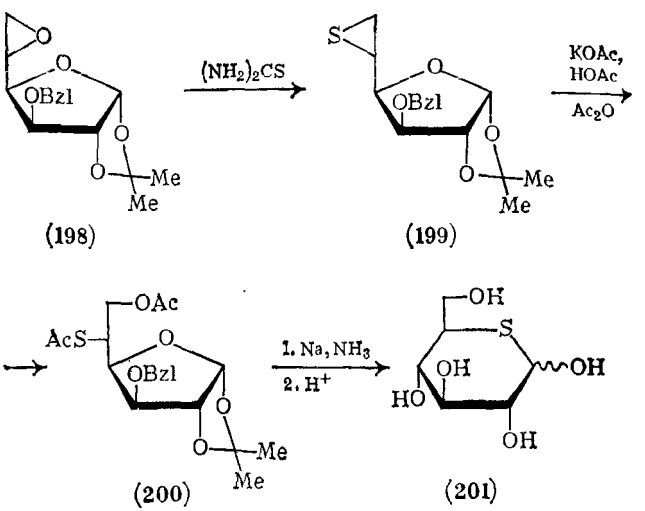


Эпоксисахара реагируют с тиоцианатами и тиомочевиной неожиданным образом, давая соответствующий эписульфид с обращенной конфигурацией (схема 50). Так, 5,6-ангидро-3-*O*-бензил-1,2-*O*-изопропилиден-β-*L*-идофураноза (**198**) при реакции с тиомочевиной образует 5,6-эписульфид (**199**), имеющий *глюко*-конфигурацию. Последующее нуклеофильное раскрытие эписульфидного цикла ацетатом калия в уксусном ангидриде приводит к ацетилированному 5-тиопроизводному (**200**) и затем к тио-*D*-глюкопиранозе (**201**) [163] (схема 51). Поскольку для осуществления реакции, приведенной на схеме (50), необходимо свободное вращение вокруг С—С-связи, она не имеет места в случае эпоксидов, конденсированных с другими циклами. Однако 2,3-эписульфиды, соответствующие эпоксидам (**38**) и (**39**), могут быть получены непрямым способом путем обработки соответствующего эпоксида тиоцианатом калия с последующим мезилированием и обработкой продукта реакции основанием.

Высокая способность атомов серы к соучастию приводит к различным перегруппировкам, которые нашли применение в синтезе. Например, сольволиз диэтилацеталя 5-*O*-тозил-*D*-ксилозы (**202**) приводит к этил-5-*S*-этил-1,5-дитио-*L*-арабинофуранозиду (**203**) путем «S»-соучастия в замещении сульфонилоксигруппы (схема 52). Значительно более глубокие перегруппировки происходят при этантиолизе 3-*O*-бензоил-1,2 : 5,6-ди-*O*-изопропилиден-α-*D*-глюкофуранозида, в результате которого с выходом 40 % был выделен этил-4-*O*-бензоил-2,3,6-три-*S*-этил-1,2,3,6-тетратио-α-*D* - маннопиранозид (**206**). *S*-Этильные группы первоначально образующегося

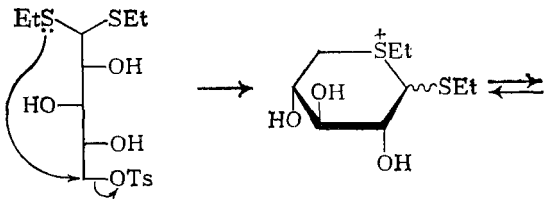


(50)

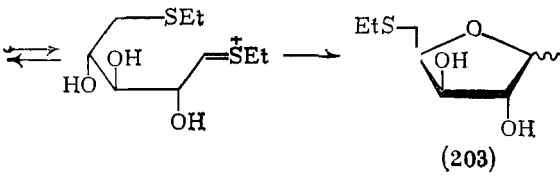


(51)

дитиоацеталя (204) претерпевают 1→2-миграцию через 2,3-оксониевый ион (205). Происходит передача *S*-этильной группы по цепочке 1→2→3→6 через 2,3-, 3,4- и 4,6-оксониевые ионы, и в конечном счете образуется тиопиранозид (206) [164] (схема 53). Известно много сходных перегруппировок.

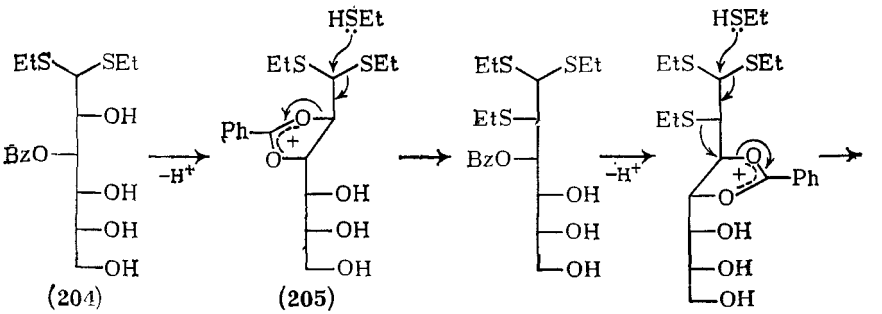


(202)



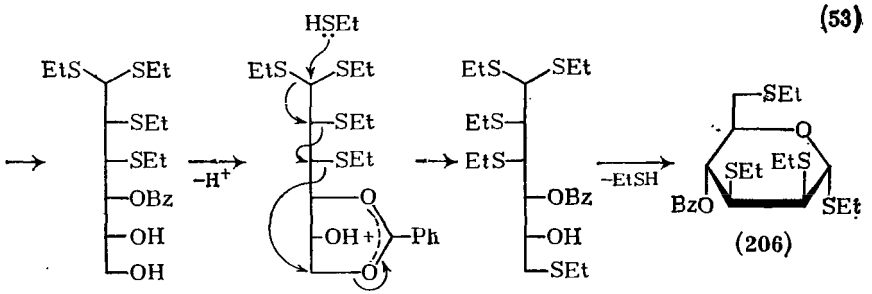
(203)

(52)



(204) (205)

(53)

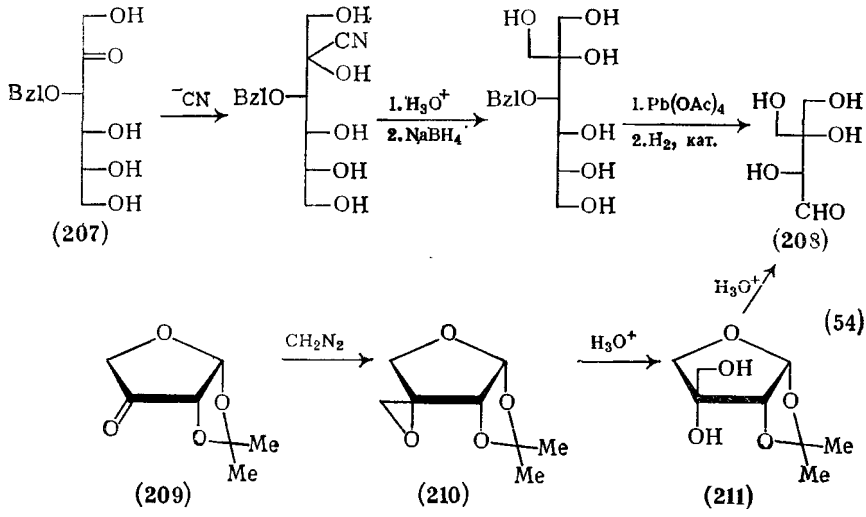


(206)

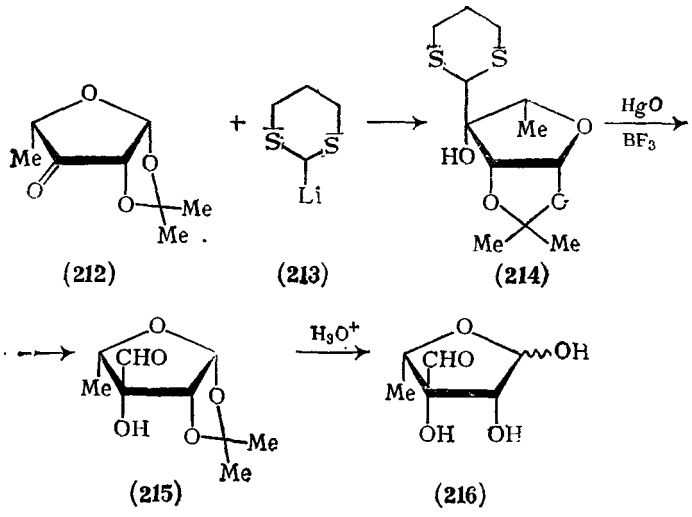
26.1.9.5. Разветвленные сахара

Этот класс соединений уникален, поскольку среди его представителей нет сахаров с линейным углеродным скелетом [165]. Разветвленные сахара входят в состав антибиотиков и содержатся в некоторых растениях. Например, в состав антибиотика стрептомицина входит стрептоза (**216**); 3-*C*-гидроксиметил-*D*-*глицеро*-тетроза [166] (апиоза) (**208**) обнаружена в виде гликозида в петрушке, а 2-*C*-гидроксиметил-*D*-рибоза (гамамелоза) в виде диэфира с галловой кислотой — в коре лещины виргинской.

Введение боковой цепи в альдозу осуществляют через соответствующее кетопроизводное, используя различные «углеродные» нуклеофилы, например реактив Гриньяра, цианид-ион, диазометан, нитрометан, реактив Виттига и др. Так, апиозу (208) получают (схема 54) из 3-*О*-бензил-*D*-фруктозы (207) реакцией с цианидом и гидролизом образующегося циангидрина до кислоты. Последнюю превращают в лактон, который восстанавливают боргидридом натрия; после расщепления в полученном соединении 4,5- и 5,6-связей тетраацетатом свинца получают *О*-бензилапиозу, из которой бензильную группу удаляют каталитическим гидрированием. В отличие от этого способа реакция кетотетрозы (209) с диазометаном протекает стереоспецифично и нуклеофильная атака из *экзо*-положения приводит к спироэпоксиду (210), гидролиз которого дает апиозу [166].

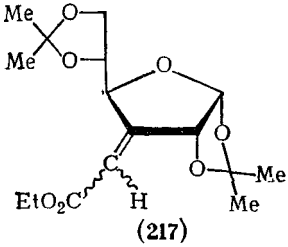


Важное значение стерического фактора при введении несущих функциональные группы боковых цепей привело к разработке метода, в котором используются 2-литий-1,3-дитианы, например (213) [167]. Большие размеры молекул этих реагентов обычно гарантируют высокую степень избирательности, а дитиановый цикл может быть десульфурирован с образованием алкильной цепи или расщеплен до содержащей кето- или альдегидогруппу боковой цепи. Таким путем, например, осуществлен синтез стрептозы (216) из 3-кетопроизводного (212), когда дитиан вводится в *экзо*-положение к конденсированной бициклической системе (схема 55). Карбоксальдегидную боковую цепь стрептозы вводили также реакцией соединения (212) с винилмагнийбромидом и последующим озонолизом.

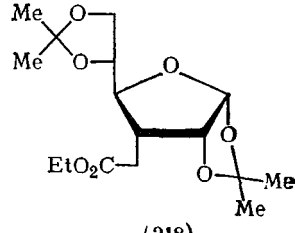


(55)

Вышеуказанными способами можно получать разветвленные сахара с третичными гидроксильными группами в точках ветвления. Однако представители этого класса соединений, у которых отсутствует такая гидроксигруппа, синтезируют путем раскрытия эпоксидных циклов «углеродными» нуклеофилами или с помощью реакции Виттига. Например, реакция метил-2,3-ангидро-4,6-*O*-бензилиден-α-*D*-маннопиранозида (38) с реактивом Гриньяра, 2-литий-1,3-дитианами и др., приводит к разветвленным производным (40; X = боковая цепь). Напротив, обработка реактивом Виттига [например, $(MeO)_2P(O)CHCO_2Et$] кетопроизводного, например 3-улозы (43), приводит к разветвленному аналогу (217), который стереоспецифически гидрируется, присоединяя атом водорода с менее пространственно затрудненного фронта молекулы, и превращается в *алло*-изомер (218), который может быть подвергнут дальнейшей модификации.



(217)



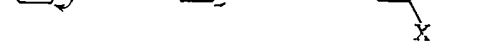
(218)

26.1.9.6. Непредельные производные сахаров [168]

Производные сахаров, содержащие C=C-связь, являются широко распространенными промежуточными соединениями, хотя многие из них стали доступны сравнительно недавно. Классические

пиранен-1-озы, например (185), имеющие тривиальное название «гликали», легко могут быть получены из соответствующего гликозилбромида, например (101), восстановлением цинком в уксусной кислоте. Родственный 2-ацетоксигликаль получается при последовательной обработке гликозилбромида иодид-ионом и триэтиламином или прямым способом с помощью 1,5-диазабицикло[5.4.0]ундецена-5 (ДБУ) [169].

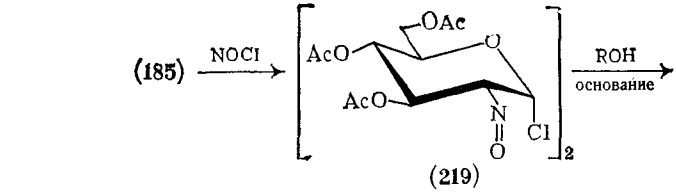
Реакции присоединения по двойной связи гликалей нашли широкое применение [168]. На направление присоединения ионных реагентов влияет мезомерное взаимодействие кислородного атома цикла с двойной связью, так что атом С-2 является наиболее нуклеофильным атомом, присоединяющим входящую электрофильную частицу (схема 56). Такое присоединение должно приводить к четырем возможным диастереомерам, однако на практике наблюдается заметная стереоспецифичность, которая зависит от применяемых реагентов. Так, при иод(метоксил)ировании три-*О*-ацетилглюкаля (185) образуются два 1,2-*транс*-2-иодгликозида с *манно*- и *глюко*-конфигурацией в отношении 2:1. *транс*-Конфигурация этих продуктов является результатом образования 1,2-иодониевого иона, который затем атакуется с тыла и с фронта. В отличие от иодирования при бромировании образуются α-*D*-*глюко*- (1,2-*цис*)- и α-*D*-*манно*-изомеры (1,2-*транс*) в отношении 2:1. *глюко*-Изомер в этом случае образуется из 1,2-бромониевого иона в форме β-аномера, который, являясь невыгодным вследствие аномерного эффекта, превращается в условиях реакции в α-аномер.



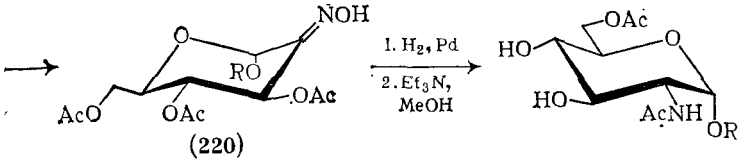
(56)

Присоединение псевдогалогена нитрозилхлорида NOCl к гликалям имеет большое значение, так как на этом основан высокоселективный синтез сложных α-гликозидов [170]. Например, реакция глюкаля (185) с этим реагентом приводит к 3,4,6-три-*О*-ацетил-2-дезокси-2-нитрозо-α-*D*-глюкопиранозилхлориду в виде димера (219). Последний при обработке спиртами или фенолами стереоспецифически превращается в соответствующий α-гликозид (220), причем во время реакции нитрозогруппа таутомеризуется в оксимную группу. Эта последовательность реакций завершается либо дезоксиминированием и восстановлением полученного кетона борогидридом, либо восстановлением самого оксима, что приводит к 2-амино-2-дезоксигликозиду (схема 57).

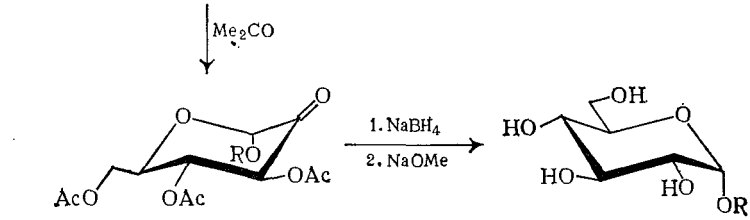
Присоединение воды, спиртов, фенолов и других реагентов к гликалям в присутствии кислотных катализаторов приводит к 2-дезоксисахарам. В отсутствие кислотных катализаторов происходит перегруппировка молекулы. Так, аллильная перегруппировка триацетилглюкаля (185) в кипящей воде приводит к 4,6-ди-*О*-ацетил-2,3-ди-дезокси-*D*-*эритро*-гексен-2-улозе (221).



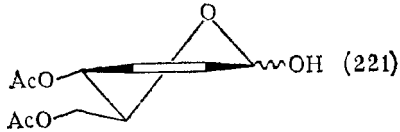
(219)



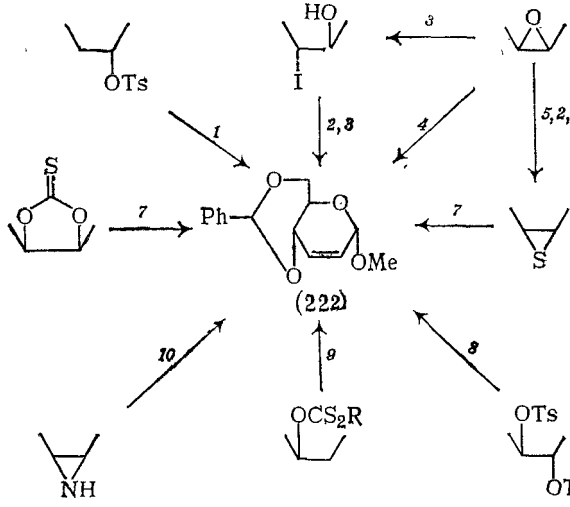
(220)



(57)



(221)



(58)

(222)

1–основание; *2*–MsCl, C_5H_5N; *3*–NaI; *4*–$KOCS_2Et$; *5*–KSCN; *6*–NaOMe; *7*–$(EtO)_3P$; *8*–NaI, *Zn*, ДМФ; *9*–нагревание; *10*–HNO_2

Способы введения двойной связи в другие положения пираноз или фураноз приведены на примере синтеза метил-4,6-*О*-бензилиден-2,3-дидезокси-α-*D*-*эритро*-гексен-2-озида (222) (схема 58). Одним из наиболее широко применяемых способов введения двойной связи в молекулу углеводов является метод Типсона — Коэна [171], в котором α,β-дитозилат нагревают с цинковой пылью и иодидом натрия в диметилформамиде.

ЛИТЕРАТУРА

1. *K. Freudenberg*, 'Emil Fischer and his contribution to carbohydrate chemistry', Adv. Carbohydrate Chem., 1966, **21**, 1
2. *J. M. Bijvoet, A. F. Peerdeman, and A. J. van Bommel*, Nature, 1951, **168**, 271.
3. *W. N. Haworth*, 'Constitution of the Sugars', Arnold, London, 1929.
4. *T. Purdie and J. C. Irvine*, J. Chem. Soc., 1903, 1021.
5. *E. L. Hirst*, J. Chem. Soc., 1926 350.
6. *W. N. Haworth and E Hirst*, J. Chem. Soc., 1926, 1858; 1927, 1237, 2436.
7. *H. S. Isbell and C. S. Hudson*, J. Res. Nat. Bur. Stand., 1932, **8**, 327, 615; 1933, **10**, 337.
8. *J. W. Green*, Adv. Carbohydrate Chem., 1948, **3**, 176.
9. *H. S. Isbell and H L Frush*, J. Res. Nat. Bur Stand., 1943, **31**, 33.
10. *E. L. Jackson*, Org. Reactions, 1944, **2**, 341; *J. M. Bobbitt*, Adv. Carbohydrate Chem., 1956, **11**, 1.
11. *H. Herrissey, P. Fleury, and M. Jolly*, J. Pharm. Chim., 1934, **20**, 149.
12. *L. Hough, T. J. Taylor, G H. S. Thomas, and B. M. Woods*, J. Chem. Soc., 1958, 1212.
13. *L. D. Hall*, Adv. Carbohydrate Chem., 1964, **19**, 51; 1974, **29**, 11
14. *N. K. Kochetkov and O S. Chizhov*, Adv. Carbohydrate Chem., 1966, **21**, 39.
15. *G. A. Jeffrey and R. D. Rosenstein*, Adv. Carbohydrate Chem., 1964, **19**, 7; ibid., 1970, **25**, 53; 1974, **30**, 445; 1975, **31**, 347; 1976, **32**, 353; 1976, **33**, 387; 1977, 34, 345.
16. *T. E. Acree, R. S. Shallenberger, C. Y. Lee, and J. W. Einset*, Carbohydrate Res., 1969, **10**, 355; *A S. Hill and R. S. Shallenberger*, ibid., 1969, **11**, 541.
17. *R. E. Reeves*, Adv. Carbohydrate Chem., 1951, **6**, 107.
18. *N. S. Bhacca, D. Horton, and H. Paulsen*, J. Org. Chem., 1968, **33**, 2484.
19. *B. Coxon*, Carbohydrate Res., 1966, **1**, 357.
20. *J. T. Edward*, Chem. and Ind. (London), 1955, 1102.
21. *R. U. Lemieux*, in 'Molecular Rearrangements Part II', ed. P. De Mayo, Interscience, New York, 1963, p. 735.
22. *P. L. Durette and D. Horton*, Adv. Carbohydrate Chem., 1971, **26**, 49.
23. *R. U. Lemieux and A. R. Morgan*, Canad. J. Chem., 1965, **43**, 2205.
24. *S. J. Angyal*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1969, **8**, 157.
25. *L. Hough and A C. Richardson*, 'The Carbohydrates', ed. W. Pigman and D. Horton, Academic, New York, 1972, vol. 1A, chapter 3.
26. *H. G. Fletcher, H. W. Diehl, and C S. Hudson*, J. Amer. Chem. Soc., 1950, **72**, 4546.
27. *D. L. MacDonald and H. O. L. Fischer*, J. Amer. Chem. Soc., 1952, **74**, 2087; Biochem. Biophys. Acta, 1953, **12**, 203.
28. *L. Hough and T. J. Taylor*, J. Chem. Soc., 1956, 970; *A. Farrington and L. Hough*, Carbohydrate Res., 1971, **16**, 59.
29. *E. Dimant and M. Banay*, J. Org. Chem., 1960, **25**, 475.
30. *J. C. P. Schwarz and M McDougall*, J. Chem. Soc., 1956, 3065.
31. *C. S. Hudson*, Adv. Carbohydrate Chem., 1945, **1**, 1.
32. *H. S. Isbell*, J. Res. Nat. Bur. Stand., 1952, **48**, 163; *W. Militzer*, Arch. Biochem., 1949, **21**, 143.
33. *M. Hanack*, 'Conformation Theory' Academic, New York, 1965, p. 344.

34. *J. F. Stoddart*, 'Stereochemistry of Carbohydrates', Wiley-Interscience, New York, 1971, p. 93 [*Дж. Стоддард.* Стереохимия углеводов. — Пер. с англ. М., М.: Мир, 1975].
35. *M. L. Wolfrom and A. Thompson*, Methods Carbohydrate Chem., 1963, **2**, 65 [см.: Методы химии углеводов. — Пер. с англ. (сокращ.). М.: Мир, 1967].
36. *R. Kuhn and H. Grassner*, Annalen, 1958, **612**, 55; *R. Kuhn and P. Klesse*, Chem Ber., 1958, **91**, 1989.
37. *J. C. Sowden*, Adv. Carbohydrate Chem., 1951, **6**, 291.
38. *J. M. Webber*, Adv. Carbohydrate Chem., 1962, **17**, 20.
39. *D. Horton, J. B. Hughes, and J. K. Thomson*, J. Org. Chem., 1968, **33**, 728 и более ранние работы.
40. *N. K. Kochetkov and B A. Dmitriev*, Tetrahedron, 1965, **21**, 803.
41. *Yu. A. Zhdanov, Yu. E. Alexeev, and V. G. Alexeeva*, Adv. Carbohydrate Chem., 1972, **27**, 227.
42. *F. W. Parrish and D. H. Ball*, Adv. Carbohydrate Chem., 1968, **23**, 233; 1969, **24**, 139.
43. *A. C. Richardson*, Carbohydrate Res., 1969, **10**, 395.
44. *D. H. Buss, L D. Hall, and L. Hough*, J. Chem. Soc., 1965, 1616.
45. *M. Nakajima, H. Shibata, K. Kitahara, S. Takahashi, and A. Hasegawa*, Tetrahedron Letters, 1968, 2271.
46. *A. C. Richardson and E. Tarelli*, J. C. S. Perkin I, 1972, 949.
47. *R. Ahluwahlia, S. J. Angyal, and M. H. Randall*, Carbohydrate Res., 1967, **4**, 478.
48. *C. L. Stevens, R. P. Glinski, K. G. Taylor, P. Blumbergs, and F. Sirokman*, J. Amer. Chem. Soc., 1966, 88, 2073; *S. Hanessian*, Chem. Comm., 1966, 796.
49. *M. Miljkovic, M. Gligorijevic, and D. Glesin*, J. Org. Chem., 1974, **39**, 3223.
50. *F. H. Newth*, Quart. Rev., 1959, **13**, 30; *N. R Williams*, Adv. Carbohydrate Chem., 1970, **25**, 109.
51. *R. F. Butterworth and S. Hanessian*, Synthesis, 1971, **49**, 2755.
52. *D. C. Baker, D. Horton and C G. Tindall, Jr*. Carbohydrate Res., 1972, **24**, 192.
53. *K. N. Slessor and A. S. Tracey*, Canad. J. Chem., 1970, **48**, 2900; *R. U. Lemieux and R. V. Stick*, Austral. J. Chem., 1975, **28**, 1799.
54. *R. U. Lemieux, T. L. Nagabhushan, and K. James*, Canad. J. Chem., 1973, **51**, 1; *R. U. Lemieux, T. L. Nagabhushan, K. J. Clemetson, and L. C. N. Tucker*, ibid., 1973, **51**, 53.
56. *H. Paulsen and C. P. Herold*, Chem. Ber., 1970, **103**, 2450.
57. *L. Hough and A. C. Richardson*, in 'Rodd's Chemistry of Carbon Compounds', Elsevier, Amsterdam, 1967, vol. 1F, chapter 22.
58. *P. D. Bragg and L. Hough*, J. Chem. Soc., 1957, 4347.
59. *M. L Wolfrom and J. N. Schumacher*, J. Amer. Chem. Soc., 1955, **77**, 3318.
60. *P. Deslongchamps and C. Moreau*, Canad. J. Chem., 1971, **49**, 2465.
61. *R. S. Teague*, Adv. Carbohydrate Chem., 1954, **9**, 185.
62. *B. Capon and B. C. Ghosh*, Chem. Comm., 1965, 586.
63. *K. Heyns and H. Paulsen*, Adv. Carbohydrate Chem., 1962, **17**, 169.
64. *C. L. Mehltretter*, Adv Carbohydrate Chem., 1953, 8, 231.
65. *S. Bayne and J. A. Fewster*, Adv. Carbohydrate Chem., 1956, **11**, 43.
66. *K. E. Pfitzner and J. G. Moffatt*, J. Amer. Chem. Soc., 1965, **87**, 5661, 5670.
67. *O. Theander*, Adv. Carbohydrate Chem., 1962, **17**, 264.
68. *J. D. Albright and L. Goldman*, J. Amer. Chem. Soc., 1967. **89**, 2416.
69. *K. Onodera, S. Hirano, and N. Kashimura*, Carbohydrate Res., 1968, **6**, 276.
70. *J. R. Parikh and W. von E Doering*, J. Amer Chem. Soc., 1967, **89**, 5505.
71. *P. J. Beynon, P. M. Collins, and W. G. Overend*, Proc. Chem. Soc., 1964, **342**.
72. *R. E. Arrick, D. C. Baker, and D. Horton*, Carbohydrate Res., 1973, **26**, 441.
73. *V. M. Parikh and J. K. N. Jones*, Canad. J. Chem., 1965, **43**, 3452.
74. *B. R. Baker and D. H. Buss*, J Org Chem., 1965, **30**, 2304, 2308.
75. *D. Horton, J. S. Jewell, E. K. Just, and J. D Wander*, Carbohydrate Res., 1971, **18**, 49.
76. *S. J. Angyal and K. James*, Chem. Comm., 1970, 320.
77. *S. J. Angyal and K. James*, Austral. J. Chem., 1970, **23**, 1209.

78. *R. D. Guthrie*, Adv. Carbohydrate Chem., 1961, **16**, 105.
79. *W. E. Harvey, J. J. Michalski, and A. R Todd*, J. Chem. Soc., 1951, 2271.
80. *M. Cantley, L. Hough, and A. O. Pittet*, J. Chem. Soc., 1963, 2527.
81. *J. E. Hodge*, Adv. Carbohydrate Chem., 1955, **10**, 169.
82. *N. Prentice, L. S. Cuendet, and F. Smith*, J. Amer. Chem. Soc., 1956, **78**, 4439.
83. *J. C. Sowden*, Adv. Carbohydrate Chem., 1957, **12**, 35; *J. D. Grum*, ibid., 1958, **13**, 169.
84. *J. C. Sowden and D. R Strobach*, J. Amer. Chem. Soc., 1960, **82**, 3707.
85. *E. F. L. J. Anet*, Adv. Carbohydrate Chem., 1964, **19**, 181.
86. *Z. Dische*, Methods Carbohydrate Chem., 1962, **1**, 477 [см.: Методы химии углеводов. — Пер. с англ. (сокращ.). М.: Мир, 1975].
87. *W. G. Overend*, in 'The Carbohydrates', ed. W. Pigman and D. Horton, Academic, New York, 1972, vol 1A, chapter 9.
88. *C. T. Bishop and F. P. Cooper*, Canad. J. Chem., 1962, **40**, 224; 1963, **41**, 2743.
89. *B. Capon, G. W. Loveday, and W. G. Overend*, Chem. and Ind. (London), 1962, 1537; *B. Capon*, Chem. Rev., 1969, **69**, 407.
90. *G. Wagner and P. Nahn*, Die Pharmazie, 1966, **21**, 205, 261.
91. *F. Micheel and A. Klemer*, Adv. Carbohydrate Chem,. 1961, **16**, 85.
92. *B. Capon*, Chem. Rev., 1969, **69**, 462.
93. *H. S. Isbell and H. L. Frush*, J. Res. Nat. Bur. Stand., 1949, **43**, 161.
94. *N. K. Kochetkov and A. F. Bochkov*, Recent Develop. Chem. Natural Carbon Compounds. 1971, **4**, 75.
95. *R. U. Lemieux and A. R. Morgan*, Canad. J. Chem., 1965, **43**, 2199.
96. *K. Igarashi, J. Irisawa, and T. Homma*, Carbohydrate Res., 1975, **39**, 213, 341.
97. *R. U. Lemieux, K. B Hendricks, R V. Stick, and K. James*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 4057.
98. *R. U. Lemieux and H. Driguez*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 4063, 4069; *R. U. Lemieux, D. R. Bundle, and D. A. Baker*, ibid., 1975, **97**, 4076.
99. *J. Conchie, G. A. Levvy, and C. A. Marsh*, Adv. Carbohydrate Chem., 1957, **12**, 157.
100. *D. H. Leaback and P. G. Walker*, Biochem. J., 1961, **78**, 151.
101. *D. Robinson, J. N. Smith, and R. T. Williams*, Biochem. J., 1952, **50**, 221.
102. *J. N. BeMiller*, Adv Carbohydrate Chem., 1967, 22, 25.
103. *C. E. Ballou*, Adv Carbohydrate Chem., 1954, 9, 59.
104. *R. Kuhn, I. Low, and H. Trischmann*, Chem. Ber., 1957, **90**, 203.
105. *J. S. Brimacombe, B D. Jones, M Stacey, and J. J. Willard*, Carbohydrate Res., 1966, **2**, 167; Methods Carbohydrate Chem., 1972, **6**, 376.
106. *J. O. Deferrari, E. G. Gros, and I. M. E. Thiel*, Methods Carbohydrate Chem., 1972, **6**, 365.
107. *J. M. Sugihara*, Adv. Carbohydrate Chem., 1953, **8**, 1.
108. *C. M. McCloskey*, Adv Carbohydrate Chem., 1957, **12**, 137.
109. *R. Gigg and C. D. Warren*, J. Chem Soc., 1965, 2205.
110. *F. Franke and R. D. Gurhrie*, Austral. J. Chem., 1977, **30**, 639.
111. *C. B. Reese, R. Saffhill, and J. E. Sulston*, Tetrahedron, 1970, **26**, 1023.
112. *S. Soltzberg*, Adv. Carbohydrate Chem., 1970, **25**, 229.
113. *L. F. Wiggins*, Adv. Carbohydrate Chem., 1950, **5**, 191.
114. *M. Cerny and J. Stanek*, Fortschr. Chem. Forsch., 1970, **14**, 526.
115. *S. J. Angyal and K. Dawes*, Austral. J. Chem, 1968, **21**, 2747.
116. *C. Bullock, L. Hough, and A. C. Richardson*, Chem. Comm., 1971, 1276; *J. S. Brimacombe, J. Minshall, and L. C. N. Tucker*, J. C S. Perkin I, 1973, 2691.
117. *S. Peat*, Adv. Carbohydrate Chem., 1946, **2**, 37.
118. *G. Birch, C. K Lee*, and *A. C. Richardson*, Carbohydrate Res., 1971, **19**, 119.
119. *N. R. Williams*, Adv. Carbohydrate Chem., 1970, **25**, 109.
120. *G. Charalambous and E. Percival*, J. Chem. Soc , 1954, 2443.
121. *J. G Buchanan and R. Fletcher*, J. Chem. Soc., 1965, 6316.
122. *M. Horner. L. Hough and A. C. Richardson*, J. Chem. Soc. (C), 1971, 99.
123. *A. H. Haines*, Adv. Carbohydrate Chem., 1976, 33, 11
124. *K. Capek, J. Capkova-Steffkova, and J. Jary*, Coll. Czech. Chem. Comm., 1966, **31**, 1854.

125. *J. M. Williams and A. C. Richardson*, Tetrahedron, 1967, **23**, 1369, 1641.
126. *R. S. Tipson*, Adv. Carbohydrate Chem., 1953, **8**, 107.
127. *S. E. Creasey and R. D. Guthrie*, J. C. S. Perkin I, 1974, 1373.
128. *L. D. Hall and D. C. Miller*, Carbohydrate Res., 1975, **40**, C1.
129. *S. Zen, S. Tashima, and S. Koto*, Bull. Chem. Soc. Japan, 1968, **41**, 3025; *A. D. Barford, A. B. Foster, and J. H. Westwood*, Carbohydrate Res., 1970, **13**, 189.
130. *H. C. Jarrell, R. G. S. Ritchie, W. A. Szarek, and J. K. N. Jones*, Canad. J. Chem., 1973, **51**, 1767.
131. *A. N. de Belder*, Adv. Carbohydrate Chem., 1965, **20**, 219; *A. B. Foster*, Ann. Rev. Biochem., 1961, **30**, 45.
132. *M. E. Evans and F. W. Parrish*, Carbohydrate Res., 1973, **28**, 359.
133. *P. J. Garegg and C. G. Swahn*, Acta Chem. Scand., 1972, **26**, 3895; *N. Baggett, J. M. Duxbury, A. B. Foster, and J. M. Webber*, Carbohydrate Res., 1965, **1**, 22.
134. *M. E. Evans, F. W. Parrish, and L. Long*, Carbohydrate Res., 1967, **3**, 453.
135. *F. H. Bissett, M. E. Evans, and F. W. Parrish*, Carbohydrate Res., 1967, **5**, 184.
136. *R. Khan*, Carbohydrate Res., 1974, **32**, 375; 1975, **43**, 247.
137. *S. A. Barker and E. J. Bourne*, Adv. Carbohydrate Chem., 1952, **7**, 137; *J. A. Mills*, ibid., 1955, **10**, 1; *R. J. Ferrier and W. G. Overend*, Quart. Rev., 1959, **13**, 265.
138. *J. S. Brimacombe, A. B. Foster, and M. Stacey*, Chem. and Ind. (London), 1958, 1228.
139. *T. H. Fife*, Accounts Current Res., 1972, **5**, 264.
140. 'The Amino Sugars', ed. R. W. Jeanloz and E. E. Balazs, Academic, New York, 1969, vol. 1A.
141. *S. Umezawa*, in 'Internat. Rev. Sci., Org. Chem. Ser. 2', Butterworths, London, 1976, vol. 7, chapter 5.
142. *A. C. Richardson*, in 'Internat. Rev. Sci., Org. Chem. Ser. 1', Butterworths, London, 1973, vol. 7, chapter 4.
143. *H. Paulsen and D. Stoye*, Chem. Ber., 1969, **102**, 3833.
144. *T. Suami and T. Shoji*, Bull. Soc. Chem. Japan, 1970, **43**, 2948.
145. *Y. Ali and A. C. Richardson*, J. Chem. Soc. (C), 1968, 1764; *W. Meyer zu Reckendorf*, Chem. Ber., 1964, **97**, 1275.
146. *F. W. Lichtenthaler*, Fortschr. Chem. Forsch., 1970, **14**, 556.
147. *H. H. Baer*, Adv. Carbohydrate Chem., 1969, **24**, 67.
148. *T. Sakakibara and R. Sudoh*, J. C. S. Chem. Comm., 1974, **69**.
149. *L. Goodman*, Adv. Carbohydrate Chem., 1967, **22**, 109.
150. *R. W. Jeanloz*, J. Amer. Chem. Soc., 1957, **79**, 2591.
151. *Y. Ali, A. C. Richardson, C. F. Gibbs, and L. Hough*, Carbohydrate Res., 1968, **7**, 255.
152. *J. S. Brimacombe and J. G. H. Bryan*, Carbohydrate Res., 1968, **6**, 423.
153. *J. E. G. Barnett*, Adv. Carbohydrate Chem., 1967, **22**, 177; *S. Hanessian*, Adv. Chem. Ser., 1968, **74**, 159; *W. A. Szarek*, Adv. Cardohydrate Chem. 1973, **28**, 225.
154. *A. B. Foster and J. H. Westwood*, Pure Appl. Chem., 1973, **35**, 147.
155. *R. G. Edwards, L. Hough, A. C. Richardson, and E. Tarelli*, Carbohydrate Res., 1974, **35**, 111; *R. S. Bhatt, L. Hough, and A. C. Richardson*, ibid., 1976, **49**, 103.
156. *L. Hough and S. Phadnis*, Nature, 1976, **263**, 800.
157. *S. Hanessian*, Adv. Carbohydrate Chem., 1966, **21**, 143.
158. *B. T. Lawton, W. A. Szarek, and J. K. N. Jones*, Carbohydrate Res., 1970, **14**, 255; 1970, **15**, 397.
159. *H. Arita, K. Fukukawa, and Y. Matsushima*, Bull. Chem. Soc. Japan, 1972, **45**, 3611.
160. *D. Horton and D. H. Hutson*, Adv. Carbohydrate Chem., 1963, **18**, 115.
161. *H. Paulsen and K. Todt*, Adv. Carbohydrate Chem., 1968, **23**, 115.
162. *J. C. P. Schwarz and K. C. Yule*, Proc. Chem. Soc., 1961, 417; *T. J. Adley and*

L. N. Owen, J. Chem Soc. (C), 1966, 1287; *D. L. Ingles and R. L Whistler*, J. Org Chem., 1962, 27, 3896.
163. *R. L. Whistler and W. C. Lake*, Methods Carbohydrate Chem., 1972, **6**, 286.
164. *G. S. Bethell and R. J Ferrier*, J. C. S. Perkin I, 1972, 2873; 1973, 1400.
165. *F. Shafizadeh*, Adv. Carbohydrate Chem., 1956, **11**, 263.
166. *R. R. Watson and N. S. Orenstein*, Adv. Carbohydrate Chem., 1975, **31**, 135; *H. Paulsen*, Stärke, 1973, **12**, 389.
167. *A. M. Sepulchre, A. Gateau-Olesker, G. Lukacs, G. Vass, and S. D. Gero*, Tetrahedron Letters, 1972 3945; *H. Paulsen, V. Sinnwell, and P. Stadler*, Chem. Ber., 1972, **105**, 1978.
168. *R. J. Ferrier*, Adv. Carbohydrate Chem., 1965, **20**, 67; 1969, **24**, 199; in 'Internat. Rev. Sci., Org. Chem. Ser. 2', Butterworths, London, 1976, vol. 7, chapter 2; *B. Fraser-Reid*, Accounts Chem. Res., 1975, **8**, 192.
169. *R. J. Ferrier and G. H. Sankey*, J. Chem. Soc. (C), 1966, 2339; *N. A. Hughes*, Carbohydrate Res., 1972, **25**, 242; *D. R. Rao and L. M. Lerner*, ibid., 1972, **22**, 345.
170. *R. U. Lemieux, T. L. Nagabhushan, and I. K. O'Neill*. Canad J. Chem., 1968, 46, 413.
171. *R. S. Tipson and A. Cohen*, Carbohydrate Res., 1965, **1**, 338; *S. Umezawa, Y. Okazaki, and T. Tsuchiya*, Bull. Chem. Soc. Japan, 1972, **45**, 3619.

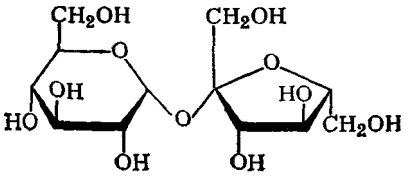
26.2. ОЛИГОСАХАРИДЫ

*Л. ХАФ, А. РИЧАРДСОН (Queen Elizabeth College, **University of** London)*

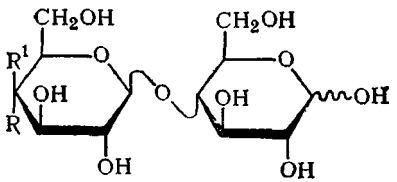
26.2.1. ВВЕДЕНИЕ

При присоединении одного моносахарида к другому посредством гликозидной связи с формальным отщеплением 1 моль воды образуется соединение, называемое дисахаридом. Присоединение следующих молекул моносахарида дает три-, тетра-, пентасахариды и высшие сахариды вплоть до высокомолекулярных соединений — полисахаридов. Хотя не существует строгого определения олигосахаридов, обычно считают, что к ним относятся соединения, содержащие менее семи или восьми углеводных остатков. Наиболее известными и легкодоступными представителями олигосахаридов являются дисахариды. Среди них наибольшее распространение имеет сахароза (α-*D*-глюкопиранозил-β-*D*-фруктофуранозид) (1) — невосстанавливающий дисахарид, встречающийся во всех растениях [1]. Дисахарид лактоза (4-*O*-β-*D*-галактопиранозил-*D*-глюкоза) (3) входит в состав молока млекопитающих [2]. Кроме них единственным природным олигосахаридом, доступным в больших количествах, является трегалоза (α-*D*-глюкопиранозил-α-*D*-глюкопиранозид) (4) — невосстанавливающий дисахарид, содержащийся в значительном количестве в сухих дрожжах [3]. У насекомых трегалоза выполняет функцию резервного сахара, из которого при необходимости регенерируется глюкоза. Раффиноза (5), единственный легкодоступный природный трисахарид, содержится вместе с сахарозой в сахарной свекле. Некоторые олигосахариды довольно легко можно получать частичным гидролизом полисаха-

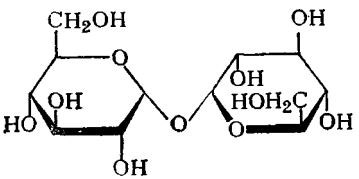
ридов; например, из крахмала образуется мальтоза (6), а из целлюлозы — целлобиоза (2).



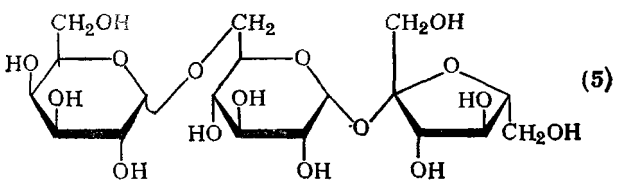
(1)



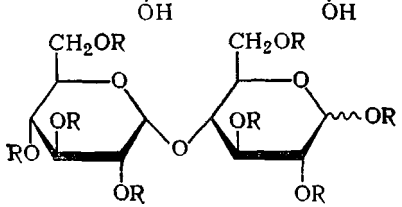
(2) R= OH, R^1= H
(3) R=H, R^1= OH



(4)



(5)



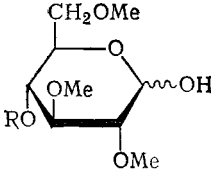
(6) R= H
(7) R= Me

26.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ ОЛИГОСАХАРИДОВ [4]

При изучении структуры олигосахаридов сначала идентифицируют входящие в их состав моносахариды, которые образуются при мягком кислотном или ферментативном гидролизе. С помощью ферментативного гидролиза часто можно получить дополнительную информацию относительно конфигурации (α- или β-) гликозидной связи. Выделяющиеся сахара могут быть идентифицированы методами хроматографии; особенно ценные данные могут быть получены при применении метода ГЖХ [5]. Так, при метанолизе олигосахаридов получают по четыре возможных гликозида каждой обычной альдозы: два пиранозида и два фуранозида. Их переводят в триметилсилильные эфиры и далее разделяют методом ГЖХ. Если вместо метанола для проведения гидролиза использовать хиральный спирт, например (—)-бутанол-2, то можно различить *D*- и *L*-энантиомеры альдоз [6].

Концевое восстанавливающее звено в восстанавливающих олигосахаридах может быть определено путем восстановления до альдита или окисления до альдоновой кислоты с последующим кислотным гидролизом и идентификацией модифицированной альдозы. Лактоза при окислении бромной водой превращается в лактон, содержащий карбоксигруппу, гидролиз которого приводит к *D*-галактозе и *D*-глюконовой кислоте. Следовательно, на восстанавливающем конце этого олигосахарида находится *D*-глюкоза.

Основной проблемой при определении строения олигосахаридов является установление размеров цикла моносахаридных звеньев и места присоединения их друг к другу. Оригинальный метод, разработанный Хеуорсом и включающий метилирование олигосахарида и последующий гидролиз, в последние годы значительно усовершенствован [7] и теперь может быть осуществлен на минимальном количестве исследуемого материала. Свободные гидроксильные группы в олигосахариде метилируют диметилсульфатом в присутствии гидроксида натрия или лучше метилиодидом в присутствии метилсульфинил-катиона (метод Хакомори), а затем проводят кислотный гидролиз или метанолиз и идентификацию полученных производных моносахаридов [7]. В условиях этого метода мальтоза (6) превращается в 2,3,4,6-тетра-*O*-метил-*D*-глюкозу (8) и 2,3,6-три-*O*-метил-*D*-глюкозу (9), из чего следует, что невосстанавливающее звено имеет пиранозную форму и связано с 4- или 5-ОН восстанавливающего моносахаридного остатка. Для уточнения места присоединения мальтозу окисляют до альдоновой кислоты, затем метилируют и после гидролиза идентифицируют образующиеся продукты. В случае мальтозы при этом образуются 2,3,4,6-тетра-*O*-метил-*D*-глюкоза (8) и 2,3,5,6-тетра-*O*-метил-*D*-глюконовая кислота, из чего следует, что в образовании гликозидной связи участвует 4-гидроксигруппа. Положение связи, однако, более легко можно определить таким современным методом, как масс-спектрометрия, используя микрограммовые количества олигосахарида [8, 9].



(8) R=Me
(9) R=H

Для определения конфигурации гликозидной связи между остатками моносахаридов использовали в основном ферментативный гидролиз. Например, сахарозу идентифицировали как α-*D*-глюкопиранозид, так как она гидролизуется мальтазой — ферментом, гидролизующим исключительно α-глюкопиранозиды. Этот дисахарид гидролизуется также ферментом, специфичным по отношению к β-*D*-фруктофуранозидам, поэтому ему была приписана

структура α-глюкозил-β-фруктофуранозида. Ферменты все еще широко используются для структурного анализа высших олигосахаридов; однако для низших олигосахаридов обычно используют методы спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C [9, 10]. Например, в спектре ПМР сахарозы в слабом поле имеется дублет ($J_{1,2}$ 3,5 Гц) в области $\delta \approx 5{,}5$, тогда как в случае олигосахарида с β-связью, например целлобиозы, этот дублет находится в более сильном поле и имеет бóльшую константу спин-спинового взаимодействия ($J_{1,2}$ 8,0 Гц). В случае раффинозы (**5**) в спектре ПМР имеются два сигнала аномерных протонов в виде дублетов с константой спин-спинового взаимодействия ~3—4 Гц; это указывает на то, что оба гликозидных остатка соединены α-гликозидными связями.

26.2.3. СИНТЕЗ ОЛИГОСАХАРИДОВ

В принципе существуют два подхода к синтезу олигосахаридов: превращение одного олигосахарида в другой без создания новых гликозидных связей и построение олигосахарида из более простых звеньев с построением гликозидных связей.

26.2.3.1. Взаимопревращения олигосахаридов

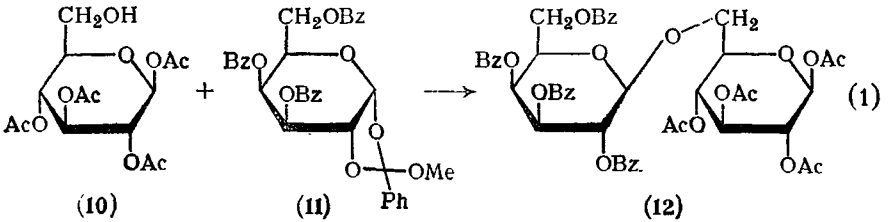
Этот метод имеет ограниченное применение из-за малой доступности олигосахаридов, за исключением сахарозы, лактозы, целлобиозы, трегалозы, раффинозы и мальтозы [(**1**)—(**6**)]. Легкодоступные восстанавливающие дисахариды могут быть модифицированы путем удлинения (см. разд. 26.1.4.2) или укорочения (см. разд. 26.1.4.1) их углеродной цепи. Химический синтез сахарозы (см. разд. 26.2.3.2) и, в меньшей степени, трегалозы связан со значительными трудностями, поэтому для получения их аналогов обычно используют эти дисахариды, выделенные из природных источников. Так, α-*D*-галактопиранозил-β-*D*-фруктофуранозид получают из сахарозы (**1**) последовательным введением трех тритильных групп, ацетилированием, детритилированием в условиях, вызывающих миграцию 4-*O*-ацетильной группы к атому С-6, повторным тритилированием оставшихся двух свободных первичных гидроксильных групп и мезилированием 4-гидроксигруппы. Замещение мезилоксигруппы бензоат-анионом приводит к 4-*O*-бензоату, из которого после удаления защитных групп получают не имеющее сладкого вкуса вещество — «галакто»-сахарозу [12].

Симметричность строения трегалозы (**4**) в значительной мере способствует ее превращению в симметричные аналоги, а ее химические превращения сходны с превращениями метил-α-*D*-глюкопиранозида. Синтезированы «алло»-, «галакто»- и «альтро»-трегалозы, а также их многочисленные производные [13]. Несимметричные аналоги трегалозы получают частичными химическими превращениями производных этого олигосахарида. Реакции трегалозы, имеющие первый порядок по каждому моносахаридному

остатку, можно рассматривать как последовательные реакции, в которых вероятность того, что в реакцию вступит второй углеводный остаток, составляет лишь половину вероятности для первого остатка. Следовательно, выход несимметричных продуктов реакции в любом случае не превышает 50 %. Так, гидролиз тетрабензоата 4,6 : 4′,6′-ди-*О*-бензилидентрегалозы приводит с выходом 43 % к монобензилиденовому производному [14], из которого был получен ряд несимметричных производных трегалозы.

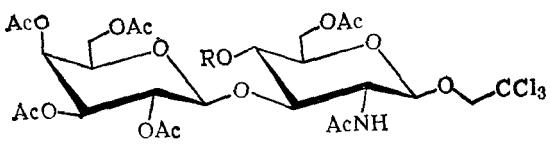
26.2.3.2. Синтез олигосахаридов с построением новой гликозидной связи

Методы синтеза сложных гликозидов (см. разд. 26.1.8.1) применимы и для синтеза олигосахаридов. Однако для синтеза восстанавливающих дисахаридов необходимо, чтобы моносахарид, который станет восстанавливающим звеном конечного продукта, был защищен так, чтобы гидроксильная группа, по которой будет создаваться гликозидная связь, оставалась свободной. Затем этот защищенный моносахарид вводят в реакцию с соответствующим гликозилгалогенидом или родственным соединением. Одним из наиболее эффективных и общих методов синтеза 1,2-*транс*-гликозидов (см. разд. 26.1.8.1) является ортоэфирный метод. Так, реакция 1,2,3,4-тетра-*О*-ацетил-β-*D*-глюкопиранозы (**10**) с 1,2-ортобензоатом (**11**) приводит к сложному эфиру дисахарида (**12**) с выходом 93 % (схема 1).



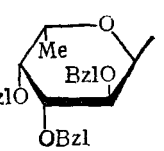
Для синтеза 1,2-*цис*-гликозидов (см. разд. 26.1.8.1) должны использоваться несоучаствующие *О*-защитные группы и 1,2-*транс*-гликозилгалогениды в качестве гликозилирующих агентов. Например, гликозилированием производного дисахарида (**13**) 2,3,4-три-*О*-бензил-6-дезокси-α-*L*-галактопиранозилбромидом в присутствии тетра-*N*-этиламмонийбромида (для превращения α-бромида в его β-аномер) и этилдиизопропиламина (затрудненное основание) в смеси дихлорметана и диметилформамида получен трисахарид (**14**) [15]. Синтез 1,2-*цис*-олигосахаридов, содержащих остатки 2-амино-2-дезоксигексоз, имеет важное значение для полного синтеза аминогликозидных антибиотиков и подобных соединений; этот синтез осуществляют с использованием несоучаствующей азидной группы при С-2, которую на последней стадии синтеза превращают

в аминогруппу [16]. Альтернативный способ получения подобных гликозидов описан в разд. 26.1.9.6.



(13) R= H

(14) R=



ЛИТЕРАТУРА

1. *R. Khan*, Adv. Carbohydrate Chem., 1976, **33**, 236.
2. *J. R. Clamp, L. Hough, J. L. Hickson, and R. L. Whistler*, Adv. Carbohydrate Chem., 1961, **16**, 159.
3. *G. G. Birch*, Adv. Carbohydrate Chem., 1963, **18**, 201.
4. *J. Stanek, M. Cerny, and J. Pacak.* 'The Oligosaccharides', Academic, New York, 1965.
5. *G. G. S. Dutton*, Adv. Carbohydrate Chem., 1973, **28**, 11; 1974, **30**, 9.
6. *J. P. Kamerling, G. J. Gerwig, and J. F. G. Vliegenthart*, неопубликованные данные.
7. *S.-I. Hakomori*, J. Biochem. (Japan), 1964, **55**, 205.
8. *J. Lonngren and S. Svensson*, Adv. Carbohydrate Chem., 1974, **29**, 41.
9. *N. K. Kochetkov and O. S. Chizhov*, Adv. Carbohydrate Chem., 1966, **21**, 39.
10. *L. D. Hall*, Adv. Carbohydrate Chem., 1964, **19**, 51; 1974, **29**, 11.
11. *A. S. Perlin*, in 'Internat. Rev. Sci., Org. Chem. Ser. 2', Butterworths, London, 1976, vol. 7, chapter 1.
12. *P. H. Fairclough, L. Hough, and A. C. Richardson*, Carbohydrate Res., 1975, **40**, 285.
13. *A. F. Hadfield, L. Hough, and A. C. Richardson*, Carbohydrate Res., 1978, **63**, 51 и более ранние публикации.
14. *A. C. Richardson and E. Tarelli*, J. Chem. Soc. (C), 1971, 3733.
15. *J. M. Sugihara*, Adv Carbohydrate Chem., 1953, **8**, 1.
16. *H. Paulsen and W. Stenzel*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1975, **14**, 558.

26.3. ПОЛИСАХАРИДЫ

ДЖ. Ф. КЕННЕДИ (University of Birmingham),
К. А. УАЙТ (Lea Castle Hospital, Kidderminster)

26.3.1. НАХОЖДЕНИЕ В ПРИРОДЕ, НОМЕНКЛАТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ

Полисахариды представляют собой высокомолекулярные соединения, образующиеся в результате реакций конденсации, при которых обычные нейтральные моносахариды (или такие моносахариды, как 2-амино-2-дезоксигексозы или соответствующие гексуроновые кислоты) соединяются путем образования гликозидных связей между гидроксильной группой у С-1 одного моносахаридного звена и свободной гидроксильной группой другого звена с отщеплением воды. Связи между остатками моносахаридов имеют ту же природу, что и в олигосахаридах, и эти два типа соединений отличаются друг от друга лишь молекулярной массой.

Четкую границу между олигосахаридами и полисахаридами провести трудно; обычно к полисахаридам относят вещества, содержащие более десяти моносахаридных звеньев. Соединения, молекулы которых состоят из 5—15 моносахаридных звеньев, редко встречаются в природе. Обычно в состав полисахаридов входит 80—100 моносахаридных звеньев; известно лишь несколько полисахаридов, содержащих 25—75 моносахаридных остатков. Известны также некоторые полисахариды, в состав которых входит более ста моносахаридных остатков; например, нативная целлюлоза содержит в среднем 3000 таких остатков. Полисахариды существуют в виде смесей полимергомологов, а не в виде набора дискретных макромолекул с одной и той же молекулярной массой.

Полисахариды входят в состав почти всех живых организмов и являются одним из наиболее крупных классов природных соединений. Они играют роль источников энергии или структурных элементов в живых организмах. В качестве примера структурной роли полисахаридов можно привести целлюлозу (полимер *D*-глюкозы), являющуюся самым распространенным органическим веществом в природе и опорным материалом у растений, а также хитин (полимер 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы) — основной компонент наружного скелета членистоногих. В качестве одного из основных источников энергии для живых организмов отдельные полисахариды участвуют в главном направлении энергообмена в большинстве клеток. Крахмалы и гликогены (полимеры *D*-глюкозы) являются аккумуляторами энергии в растениях и животных, соответственно. Полисахариды выполняют и более специфические функции; например, они ответственны за групповую специфичность пневмококков. Другие природные макромолекулы, состоящие не только из углеводных остатков и содержащие в своем составе блоки из моносахаридных звеньев, необходимы для нормального развития и функционирования тканей животных. Групповые вещества крови, например, относятся к гликопротеинам, у которых расположение моносахаридных остатков в углеводных субъединицах ответственно за способность всей молекулы определять групповую принадлежность крови.

Тривиальные названия полисахаридов обычно отражают источник их нахождения в природе; так, целлюлоза является основным компонентом клеточной стенки (*cell* — клетка) у растений, а дерматан (обычно в сульфированной форме) впервые обнаружен в дермальном слое кожи. Тривиальные названия могут отражать некоторые свойства выделенного полимера; например, английское название *starch* (крахмал) происходит от слова *stercan* (придавать жесткость). Для природных полисахаридов одного и того же типа обычно указывают их происхождение. Так, например, крахмалы из различных растительных источников можно легко различить химическими методами, поэтому в их названиях указывают источник выделения (например, маисовый крахмал). Такие традиционные названия, как целлюлоза, гликоген и амилоза,

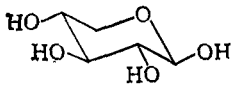
сохранились до сих пор. Однако по мере накопления знаний о строении полисахаридов их номенклатура и классификация должны отражать их структуру; это следует учитывать при построении названий вновь открываемых полисахаридов. Полисахариды называют также гликанами (от слова гликоза); более узкие названия образуют, используя название исходного моносахарида с заменой суффикса «оза» суффиксом «ан»; например, «маннан» — полимер, построенный из остатков маннозы. Если необходимо, в названия включают обозначения *D*- или *L*-конфигурации, например, *D*-глюкан (из *D*-глюкозы). Полисахариды, при гидролизе которых выделяются моносахариды только одного типа, называют гомогликанами, нескольких типов — гетерогликанами.

В настоящее время не доказано существование полисахаридов, состоящих более чем из шести типов моносахаридных звеньев. В большинстве случаев компонентами полисахаридов являются пентозы, гексозы и их производные, например гексуроновые кислоты, 6-дезоксигексозы, 2-амино-2-дезоксигексозы (гексозамины) и метилированные сахара. Моносахариды, наиболее часто входящие в состав полисахаридов, приведены на с. 210 (для каждого соединения показан только один аномер).

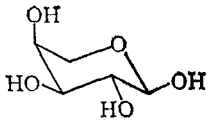
Взаимопревращение пар моносахаридов, например *D*-глюкозы и *D*-маннозы, которые являются эпимерами по С-2, может быть осуществлено с помощью ферментов. Выделены ферменты, способные эпимеризовать моносахариды по С-2, С-4 и С-5. Пентозы *D*-ксилоза и *D*-арабиноза могут быть получены соответственно из *D*-глюкозы и *D*-галактозы окислением до соответствующих уроновых кислот и последующим декарбоксилированием; эти же реакции осуществляются в природных объектах.

При образовании дисахарида конденсацией двух идентичных моносахаридов могут возникнуть 11 различных изомеров, если принимать во внимание только пиранозные формы, тогда как при образовании трисахарида число возможных изомеров достигает 176 [1]. Такое число изомеров объясняется возможностью образования гликозидных связей с участием различных гидроксигрупп. Для восьми из одиннадцати упомянутых выше дисахаридов в образовании гликозидной связи участвуют гидроксигруппа при С-1 одной молекулы моносахарида в α- или β-конфигурации и гидроксигруппы при С-2, С-3, С-4 или С-6 второй молекулы моносахарида [α-(1→2)-, β-(1→3)-связи и т. д.]. Три других изомера возникают путем образования гликозидной связи с участием гидроксигрупп при С-1 обеих молекул моносахаридов в α- или β-конфигурации. В природных полисахаридах реализуется лишь относительно небольшое число возможных структур, и они являются гораздо менее сложными вследствие специфичности участвующих в их биосинтезе ферментов (о механизме действия ферментов см. сс. [2]).

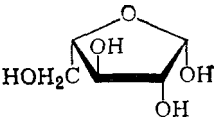
Наиболее простой разновидностью гомополисахаридов являются линейные полимеры, которые содержат гликозидные связи



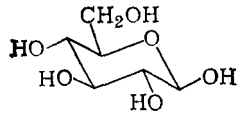
D-ксилопираноза



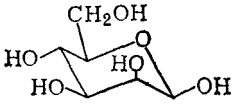
L-арабинопираноза



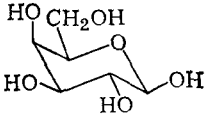
L-арабинофураноза



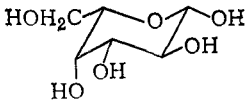
D-глюкопираноза



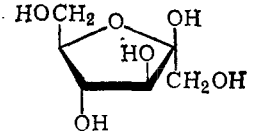
D-маннопираноза



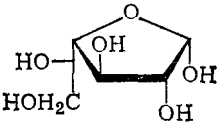
D-галактопираноза



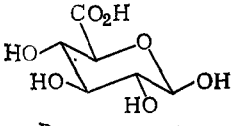
L-галактопираноза



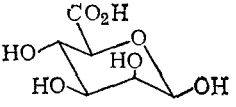
D-фруктофураноза



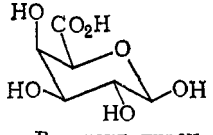
D-галактофураноза



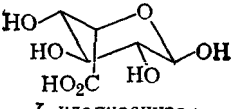
D-глюкопиран-уроновая кислота



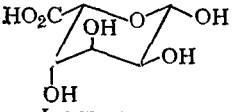
D-маннопиран-уроновая кислота



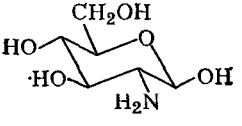
D-галактопиран-уроновая кислота



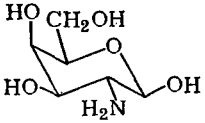
L-идопирануроновая кислота



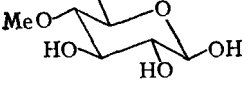
L-гулопиран-уроновая кислота



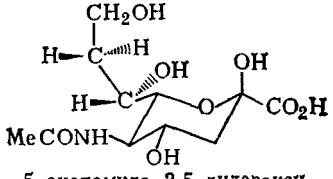
2-амино-2-дезокси-*D*-глюкопираноза (*D*-глюкозамин)



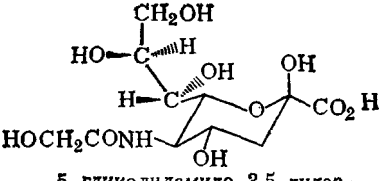
2-амино-2-дезокси-*D*-галактопираноза (*D*-галактозамин)



4-О-метил-*D*-глюкопирануроновая кислота



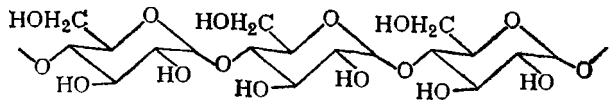
5-ацетамидо-3,5-дидезокси-*D*-глицеро-*D*-галакто-2-нонулозоновая кислота



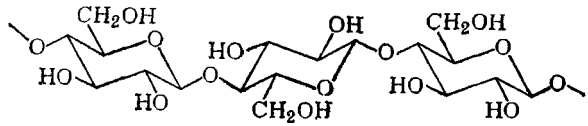
5-гликолиламидо-3,5-дидезокси-*D*-глицеро-*D*-галакто-2-нонулозоновая кислота

только одного типа; например амилоза (1) и целлюлоза (2) состоят исключительно из остатков *D*-глюкозы, соединенных α-(1→→4)- и β-(1→4)-связями, соответственно. Эти два полисахарида заметно различаются по свойствам, что объясняется, по-видимому, различной конфигурацией гликозидных связей. Целлюлоза совсем нерастворима в воде, молекулы ее имеют нитевидную конформацию.

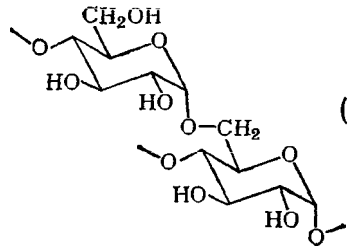
Амилоза растворима; вследствие более гибкой формы молекул ее цепи могут принимать выгодные конформации, и в присутствии комплексообразователей, например иода, она может существовать в виде спирали с шестью остатками *D*-глюкозы в каждом витке.



(1)



(2)



(3)

Ситуация усложняется в случае разветвленных полисахаридов, у которых одно из элементарных звеньев участвует в образовании трех глнкозидных связей (точка ветвления) (3). С увеличением степени разветвленности возрастает сложность строения молекулы полисахарида (рис. 26.3.1). Ни в одном известном случае не было обнаружено трехмерной каркасной структуры.

Если в гомогликане имеется более одного типа гликозидных связей, они имеют тенденцию располагаться в определенной, повторяющейся последовательности. Например, в точках ветвления разветвленных гомогликанов часто встречается один и тот же тип гликозидной связи.

Более сложное строение имеют полисахариды, состоящие из остатков двух и более моносахаридов (гетерогликаны), однако

и они обычно построены по определенному плану. Гликаны, состоящие из моносахаридных остатков двух типов, можно разделить на две группы: в одной группе моносахариды обоих типов расположены в одной и той же линейной цепи, а в другой — моносахаридные остатки одного типа составляют основную цепь, остатки другого типа находятся в боковых цепях. Некоторые гетерогликаны имеют структуру, в которой моносахаридные остатки второго типа присоединены к основной цепи как «подвески» с помощью идентичных гликозидных связей (см. рис. 26.3.1*в*). Если же присутствует более двух типов моносахаридных остатков, то обычно

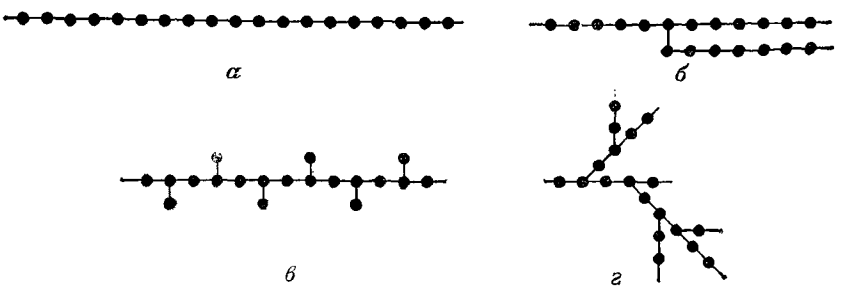


Рис. 26.3.1. Возможное расположение моносахаридных остатков в молекуле полисахарида:
а — линейная молекула; *б*—*д* — разветвленные молекулы

осуществляется структура *г* (см. рис. 26.3.1): в главной цепи находятся в основном гексозы и гексуроновые кислоты, а в ответвлениях — преимущественно пентозы.

Названия гетерогликанов также составляют из названий входящих в них моносахаридов. В качестве корня используют названия моносахарида, доминирующего в основной части линейной цепи или образующего основную цепь разветвленного гликана, в качестве префикса (префиксов) — название моносахарида (моносахаридов), присоединенных к этой основной цепи. Например, разветвленную структуру, в которой к основной цепи, состоящей из остатков *D*-маннозы, присоединены остатки *D*-галактозы, правильнее назвать *D*-галакто-*D*-маннаном, чем *D*-манно-*D*-галактаном. В названиях более сложных полисахаридов с менее определенным расположением звеньев префиксы часто располагают в алфавитном порядке, но, чтобы избежать сверхсложных и громоздких названий, в название часто включают префиксы, относящиеся только к одному или двум наиболее важным моносахаридам. Альтернативно названия сложных полисахаридов производят от названий источников, из которых они выделены.

Недавно обнаружено, что строение многих сложных полисахаридов имеет много общего и различается лишь в деталях. Это удалось установить благодаря разработке методов структурного анализа гетерополисахаридов, а также ферментативных методов

Таблица 26.3.1 Наиболее распространенные гомополисахариды

Полисахариды и типы связей (тип цепи)	Источник выделения	Общепринятое название
L-Арабинаны; α-1,3-, α-1,5- (разветвленные)	Пектиновые вещества растений	—
D-Галактаны		
β-1,3-, α-1,4- (линейные)	Красные морские водоросли	Каррагинан
β-1,3-, β-1,6- (разветвленные)	Легкие быка	—
β-1,4- (линейные)	Пектиновые вещества растений	—
β-1,5- (линейные)	Пенициллиновая плесень	Галактокаролоза
D-Галактуронаны; α-1,4- (линейные)	Пектиновые вещества растений	Пектовая кислота
D-Глюканы		
β-1,2-	Агробактерии	—
α-1,3-, α-1,4-	*Aspergillus niger*, исландский мох	Нигеран, изолихенан
β-1,3-	Бурые морские водоросли, растения, водоросли, грибы, дрожжи	Ламинаран, каллоза
β-1,3-, β-1,4-	Исландский мох, зерна хлебных злаков	Лихенан
α-1,4-	Крахмалы растений	Амилоза
α-1,4-, α-1,6- (линейные)	Грибы	Пуллулан
α-1,4-, α-1,6- (разветвленные)	Крахмалы растений, животные, микроорганизмы	Гликоген, амилопектин
β-1,4- (линейные)	Клеточные стенки растений	Целлюлоза
α-1,6-, α-1,3- (разветвленные)	Бактерии	Декстран
β-1,6- (линейные)	Лишайники	Пустулан
D-Глюканы, 2-амино-2-дезокси; β-1,4- (линейные)	Панцири крабов и омаров, грибы	Хитин
D-Ксиланы		
β-1,3- (линейные)	Зеленые морские водоросли	Родименан
β-1,3-, β-1,4- (линейные)	Красные морские водоросли	—
β-1,4- (линейные)	Клеточные стенки растений	—
D-Фруктаны		
β-1,2- (линейные)	Одуванчики, георгины, земляные груши	Инулин
β-2,6- (линейные)	Травы	Леваны
β-2,6-, β-2,1- (разветвленные)	Растения, бактерии	»
L-Фуканы; α-1,2-, α-1,4- (разветвленные)	Бурые морские водоросли	Фукоидан

Таблица 26.3.2. Некоторые гетерополисахариды

Моносахаридный состав (тип цепи)	Источник выделения	Общепринятое название
L-Арабиноза, *D*-галактоза (разветвленный)	Хвойные деревья	—
L-Арабиноза, *D*-ксилоза (разветвленный)	Клеточные стенки растений	—
D- и *L*-Галактоза (линейный)	Красные морские водоросли	Агароза, порфиран
(разветвленный)	Брюхоногие моллюски	—
D-Галактоза, 2-амино-2-дезокси-*D*-глюкоза (линейный)	Роговая оболочка глаза	Кератансульфат
D-Галактоза, *D*-манноза (разветвленный)	Семена бобовых, грибы	—
2-Амино-2-дезокси-*D*-галактоза, *D*-глюкуроновая кислота (линейный)	Роговая оболочка глаза, хрящ	Хондроитин, хондроитинсульфаты
2-Амино-2-дезокси-*D*-галактоза, *L*-идуроновая кислота (линейный)	Кожа	Дерматансульфат
D-Глюкоза, *D*-манноза (линейный)	Хвойные деревья, семена, луковицы	—
2-Амино-2-дезокси-*D*-глюкоза, *D*-глюкуроновая кислота (линейный)	Ткани животных	Гиалуроновая кислота
D-Гулуроновая кислота, *D*-ксилоза (разветвленный)	Клеточные стенки растений	—
D-Гулуроновая кислота, *D*-маннуроновая кислота (линейный)	Бактерии, бурые морские водоросли	Альгиновая кислота

исследования. Так, например, семейство ксиланов включает не только ксиланы в прямом смысле этого слова, но и арабиноксиланы и глюкуроноксиланы. Названия многих природных полисахаридов, а также их состав и источники выделения приведены в табл. 26.3.1 и 26.3.2.

Прежде полагали, что многие биополимеры, например из эритроцитов крови человека или слизистых выделений, являются белками, а обнаруживаемые вместе с ними углеводы являются примесью. Однако в 1865 г. при элементном анализе очищенного муцина [3] было установлено, что содержание в нем углерода и азота значительно меньше, чем должно быть в случае белка. При кислотном гидролизе муцина был выделен продукт, который оказался глюкозой. Постепенно стало ясно, что существует ряд природных макромолекул (гликопротеинов), в которых углеводы составляют часть общей структуры. Трудность отделения углеводных молекул от белка без их разрушения (за исключением гликозаминогликанов) и тот факт, что гетерополисахариды, присутствующие в одном образце гликопротеина, часто неидентичны, но

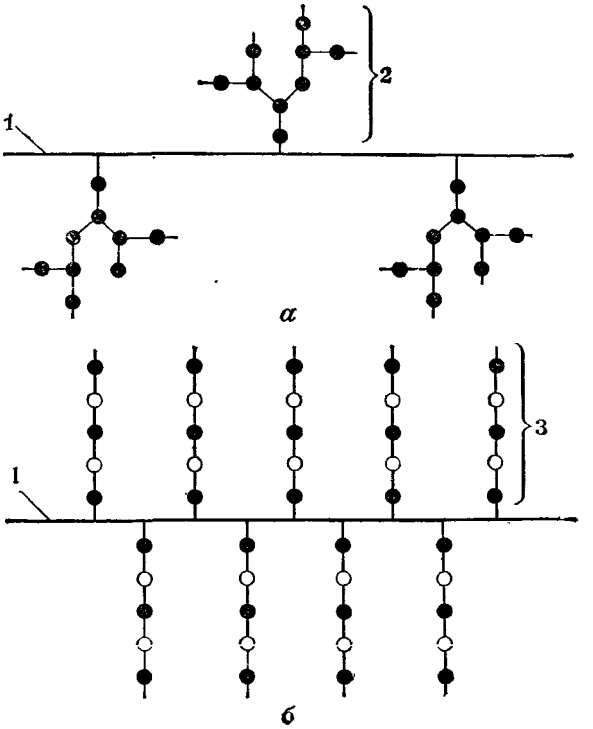


Рис. 26.3.2. Схематическое изображение строения гликопротеинов (*а*) и протеогликанов (*б*):

1—пептидная цепь; *2*—разветвленная гетерополисахаридная цепь, состоящая из остатков гексоз и 2-амино-2-дезоксигексоз; *3*—линейная регулярная полисахаридная цепь, содержащая чередующиеся остатки гексуроновых кислот (или гексоз) и 2-амино-2-дезоксигексоз

их состав отличается минимально, сильно замедлили успехи в установлении строения гликопротеинов, однако в этом направлении проделана огромная работа [4—6]. В связи с усовершенствованием методов установления состава и структуры гликопротеинов может оказаться, что в гораздо большем числе биополимеров, которые считали белками, будут обнаружены углеводы.

Термин «гликопротеин» часто используют для обозначения любого соединения, содержащего углеводную и белковую части, в том числе для гликопротеинов, протеогликанов и углевод-белковых комплексов. Гликопротеины содержат белковую цепь, состоящую из 300 и более остатков природных *L*-α-аминокислот. С основной белковой цепью ковалентно связаны боковые углеводные цепи, являющиеся остатками гетероолигосахаридов. Они обычно разветвлены (см. рис. 26.3.2) и могут содержать нейтральные моносахариды (*D*-глюкозу, *D*-галактозу, *D*-маннозу, *L*-фукозу), основные (2-амино-2-дезокси-*D*-глюкозу, 2-амино-2-дезокси-*D*-галактозу) и кислые (5-амино-3,5-дидезокси-*D-глицеро-D-галакто-*

2-нонулозоновую кислоту). Основные углеводы могут быть *N*-ацетилированы, а кислотные — *N*-гликозилированы и иногда *O*-ацетилированы, что делает олигосахарид слабокислым.

Протеогликаны также содержат основную белковую цепь, но углеводные остатки в них присутствуют в виде линейных цепей, содержащих регулярно повторяющиеся моносахариды (см. рис. 26.3.2), в том числе кислые (*D*-глюкуроновую и *L*-идуроновую кислоты) и основные моносахариды (2-амино-2-дезокси-*D*-галактозу и 2-амино-2-дезокси-*D*-глюкозу). Остатки основных моносахаридов могут быть *N*-ацетилированы и иногда *N*-сульфированы, остатки кислых моносахаридов часто *O*-сульфированы. Это приводит к тому, что полисахаридные цепи становятся сильнокислыми; ранее их называли «кислыми мукополисахаридами». Систематическое название таких полисахаридных цепей — гликозаминогликаны.

Гликопротеины отличаются от протеогликанов, как видно уже из их названий, числом углеводных звеньев на единицу длины (или молекулярной массы) основной белковой цепи; в гликопротеинах преобладает белок, а в протеогликанах — углеводы. Термин «углевод-белковый комплекс» применяется для молекул, которые содержат белок и углеводы, связанные нековалентными (обычно ионными) связями. О номенклатуре гликозаминогликанов и гликопротеинов см. [7].

26.3.2. МЕТОДЫ УСТАНОВЛЕНИЯ СТРОЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ

Первой проблемой при установлении строения полисахаридов, как и при анализе других макромолекулярных соединений, является выделение исследуемого вещества в чистом виде. Понятие чистоты в данном случае не очень четкое из-за наличия микрогетерогенности (минорные изменения внутри одних и тех же частиц вещества). Описаны методы отделения веществ углеводной природы от различных примесей, в том числе от неорганических солей и низкомолекулярных соединений, а также от высокомолекулярных веществ, например белков и лигнинов, однако следует иметь в виду, что каждый полисахарид ведет себя по-своему.

В тех случаях, когда это возможно, первая стадия включает солюбилизацию в водном или апротонном растворителе, например в этиленгликоле или диметилсульфоксиде; эту операцию необходимо проводить с осторожностью, чтобы быть уверенным, что в условиях данного метода и при применении выбранного растворителя макромолекулы не модифицируются и не разрушаются. Поэтому на данной стадии нельзя применять кислоты, основания или ферменты. Низкомолекулярные примеси легко удаляются диализом (разделение по размеру молекул), ионообменной хроматографией (разделение по заряду молекул) или гель-фильтрацией (разделение по размеру молекул) (см. разд. 26.3.2.6). Последние два метода широко применяются также для отделения макромолекулярных примесей. Макромолекулы выделяют из раствора

осаждением растворителями (этанол или ацетон) или в виде комплексов (например, с ионами металлов), а в случае кислых полисахаридов — в виде четвертичных аммониевых солей.

Очистку выделенного вещества следует проводить до тех пор, пока его состав не станет постоянным. В прошлом постоянство состава полисахаридов определяли с помощью физических и химических методов, таких, как определение функциональных групп, оптического вращения и углеводного состава (после кислотного гидролиза). Позднее для определения степени чистоты исследуемого образца стали применять также ультрацентрифугирование, хроматографическое разделение. Лучше всего определять гомогенность полисахарида двумя и более методами.

Когда чистый образец полисахарида получен, первой стадией установления его строения является качественное и количественное определение моносахаридного состава. Для этого проводят кислотный гидролиз полисахарида и анализируют гидролизат хроматографическими методами [8], которые могут быть полностью автоматизированными [9—12]. Гидролиз следует проводить в таких условиях, чтобы при полном его осуществлении моносахаридные звенья разрушались незначительно или не разрушались вовсе. Поскольку различные типы связей разрушаются при гидролизе с разной скоростью и устойчивость моносахаридных остатков в условиях проведения гидролиза различна, для гидролиза каждого полисахарида должны быть подобраны оптимальные условия. Полисахариды, содержащие остатки фураноз или сиаловых кислот, а также 2-дезоксигексоз и 2-дезоксипентоз, гидролизуются легче, чем полисахариды, в состав которых входят гексуроновые кислоты или 2-амино-2-дезоксигексозы; полисахариды, состоящие из гексоз, гидролизуются с промежуточной скоростью. Для гидролиза содержащих гексозы полисахаридов их нагревают в 1 *М* растворе серной кислоты при 100 °С в течение 4 ч; полисахариды, содержащие остатки пентоз, гидролизуют при 70 °С 0,25 *М* раствором серной кислоты. При полном гидролизе степень деградации углеводных остатков зависит от условий его проведения; например, в случае гликозаминогликанов для высвобождения всех 2-амино-2-дезоксигексозных остатков необходимо нагревание в 4 *М* растворе хлороводородной кислоты при 100 °С в течение 9 ч [13], но в этих условиях большая часть остатков гексуроновых кислот распадается. Частичный гидролиз (в более мягких условиях) приводит к небольшому числу олигосахаридов, которые могут быть использованы для структурного анализа, однако при интерпретации результатов следует учитывать, что отщепившиеся моносахариды в некоторых случаях могут рекомбинировать с образованием олигосахаридов, в которых моносахаридные звенья связаны не так, как в исходном полисахариде (процесс реверсии). Некоторые группировки (ацетильная, карбоксильная, карбонильная, алкоксигруппы) при гидролизе элиминируются и для их определения необходимы специальные методы [14].

Ни один из существующих методов не позволяет полностью установить строение полисахаридов, т. е. моносахаридный состав, типы связей между моносахаридными звеньями и последовательность, в которой они соединены. Такую информацию можно получить только при последовательном применении ряда различных методов.

26.3.2.1. Метилирование

После установления моносахаридного состава необходимо определить последовательность моносахаридных звеньев и характер связи между ними. Если все свободные гидроксигруппы полисахарида защитить группировками, устойчивыми к кислотному гидролизу, то при гидролизе гидроксигруппы возникают в тех положениях, по которым в полисахариде осуществлялась связь между моносахаридными остатками. Хеуорс [15] первоначально разработал метод метилирования свободных гидроксигрупп полисахарида диметилсульфатом в водном растворе гидроксида натрия. Позднее этот метод был модифицирован [16] с целью увеличения степени метилирования, поскольку необходимо, чтобы прореагировали все гидроксильные группы. Для этого использовали метилиодид в присутствии оксида серебра в органическом растворителе, но так как полисахариды не растворяются в органических растворителях, этот метод обычно используют уже после того, как будет проведено частичное метилирование по Хеуорсу. Лучшие результаты дает метилирование по Хакомори [17, 18], при котором применяют диметилсульфинил-анион в диметилсульфоксиде с последующей обработкой метилиодидом. Недавно разработан метод [19], заключающийся в растворении полисахарида в диметилсульфоксиде или диметилформамиде и обработке метилиодидом и оксидом бария. Полисахариды, содержащие остатки гексуроновых кислот, метилируются с трудом; сначала получают таллиевые соли этих гексуроновых кислот, а затем обрабатывают их метилиодидом в присутствии гидроксида таллия [20]. Условия реакции необходимо тщательно контролировать, чтобы избежать распада и деметилирования полисахарида. Для метилирования этого класса полисахаридов был использован метод Хакомори, что позволило достичь полного метилирования гидрокси- и карбоксигрупп в одну стадию [21].

Полностью метилированный полисахарид гидролизуют до метилированных моносахаридов в присутствии серной и трифторуксусной кислот. Реакционную смесь фракционируют с помощью распределительной хроматографии на целлюлозе или силикагеле [22], адсорбционной хроматографии или, лучше, газожидкостной хроматографии в виде летучих производных, например полностью метилированных метилгликозидов [23], частично метилированных ацетатов альдитов [24] или частично метилированных триметилсилильных эфиров [25]. Для дальнейшей идентификации этих

летучих производных используют хромато-масс-спектрометрию [26, 27] (см. разд. 26.3.2.8). Соответствующие данные для известных стандартных частично метилированных соединений приведены в обзоре [28].

Полный гидролиз метилированных полисахаридов, содержащих остатки гексуроновых кислот, идет с трудом; однако это затруднение можно обойти с помощью восстановления таких кислот до спиртов борогидридом натрия.

Использование метода метилирования не может дать информации о последовательности моносахаридных звеньев, однако с помощью этого метода можно идентифицировать моносахариды, входящие в состав полисахарида, и установить типы связей между ними.

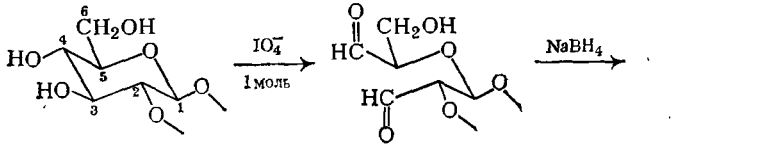
26.3.2.2. Частичный гидролиз

Частичный гидролиз полисахаридов позволяет выделить фрагменты с промежуточной молекулярной массой и разделить их с помощью таких хроматографических методов, как гель-фильтрация, ионообменная или распределительная хроматография. Строение этих более простых олигосахаридов установить легче, чем строение исходного полисахарида. Если все гликозидные связи в полисахариде гидролизуются с одной и той же скоростью (как, например, в линейных гомополисахаридах), то, например, в случае амилозы продукт частичного гидролиза будет состоять из глюкозы и ряда олигосахаридов — мальтозы, мальтотриозы и мальтотетраозы. В гетерополисахаридах присутствуют гликозидные связи разных типов, и скорости гидролиза их различны. Фуранозиды обычно гидролизуются быстрее пиранозидов в 10—1000 раз, что приводит, например, к удалению остатков арабинофуранозы, связанных с остатками ксилопиранозы в арабиноксиланах. Условия гидролиза влияют также на специфичность расщепления полисахарида. (1→6)-Связи более устойчивы к действию минеральных кислот, чем (1→4)-связи, однако если гидролиз проводился в уксусном ангидриде, содержащем около 5 % серной кислоты, менее устойчивы (1→6)-связи. Параллельное использование этих двух методов гидролиза, приводящих к образованию фрагментов разного состава, позволит лучше воспроизвести строение полисахарида. Концентрация углеводов в реакционной смеси должна быть ниже 0,5 % для предотвращения катализируемой кислотами полимеризации фрагментов (кислотной реверсии) [29]. Некоторые гликозидные связи в полисахаридах могут быть избирательно расщеплены в контролируемых условиях ферментами с образованием олигосахаридов (см. разд. 26.3.2.11).

26.3.2.3. Периодатное окисление

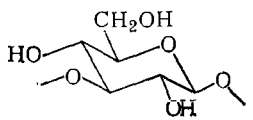
Окисление моносахаридов с расщеплением гликольных группировок широко используется в аналитических целях. Тетраацетат свинца [30] редко применяется в химии полисахаридов из-за

отсутствия подходящих растворителей, в которых должны растворяться углеводы и не должен разлагаться реагент; однако в присутствии пиридина тетраацетат свинца способен окислять диаксиальные диольные группировки, которые трудно расщепить метаиодной кислотой. Более широко применяется метаиодная кислота [31] и ее соли; окисление проводят в водном растворе при pH 3—5 для предотвращения кислотного гидролиза и неспецифического окисления, которое возможно при более высоких значениях pH.



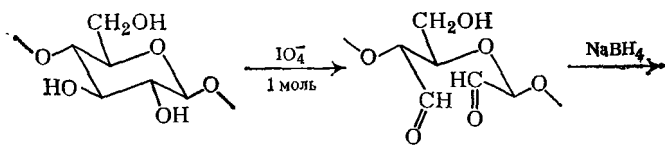
глицерин *D*-глицериновый альдегид

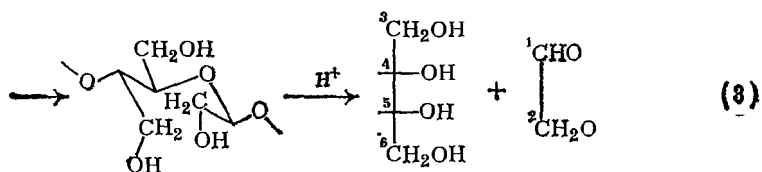
(1)



Реакция не идет

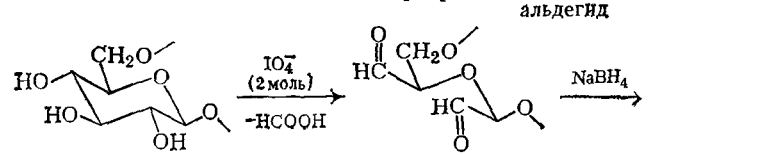
(2)

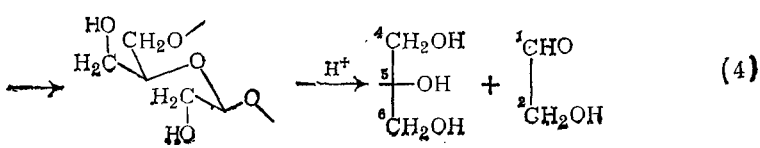




D-эритрит гликолевый альдегид

(3)





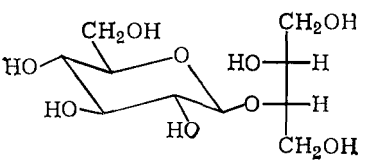
(4)

Эти реагенты расщепляют вицинальные диольные группировки, причем на одну диольную группу расходуется 1 моль метапериодата (схемы 1, 3, 4). Состав продуктов реакции зависит от типа связей между моносахаридными звеньями. Окисление первичной гидроксигруппы, смежной со вторичной, как в случае фуранозного цикла, приводит к высвобождению формальдегида, тогда как в случае вицинальных триольных групп (см. схему 4) образуется муравьиная кислота. По окончании реакции определяют количества израсходованного окислителя и выделившейся муравьиной кислоты и, реже, формальдегида. Этот метод позволяет различать 1,3- (схема 2) и 1,6-связанные моносахаридные звенья (схема 4) и определять общее количество 1,2- и 1,4-связанных звеньев (схемы 1, 3). [В схемах (1)—(4) номера атомов углерода продуктов реакций соответствуют номерам атомов углерода исходных соединений.]

Образующиеся при окислении диальдегиды неустойчивы в водной среде и до проведения гидролиза желательно их восстановить (обычно с помощью борогидрида натрия) в спирты. Определение строения продуктов гидролиза окисленного полисахарида позволяет различить остатки, связанные 1,2- или 1,4-связями, и установить, являются ли устойчивые к действию периодата остатки 1,3-связанными моносахаридными звеньями или 1,2,4-связанными углеводными остатками, находящимися в точках ветвления. Продукты гидролиза — глицерин, гликолевый альдегид, глицериновый альдегид, тетриты (например, эритрит) и свободные моносахариды (возникающие из устойчивых к действию метапериодата остатков) обычно определяют методом ГЖХ в виде триметилсилильных эфиров. Периодатное окисление не позволяет полностью установить последовательность расположения моносахаридных звеньев в полисахариде; полученные с его помощью данные интерпретируются с учетом информации, даваемой другими методами.

26.3.2.4. Расщепление по Смиту

Ценной модификацией описанного выше метода расщепления полисахаридов является расщепление по Смиту [32], заключающееся в окислении полисахарида, восстановлении образовавшегося полиальдегида борогидридом и частичном гидролизе полиола разбавленной минеральной кислотой при комнатной температуре. Частичный гидролиз полиола дает набор гликозидов олигосахаридов, характеризующих исходный полисахарид. Образование гликозидов объясняется относительной устойчивостью гликозидной



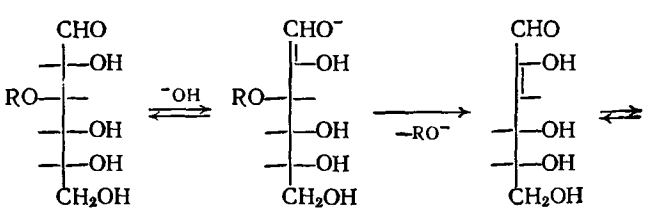
(4)

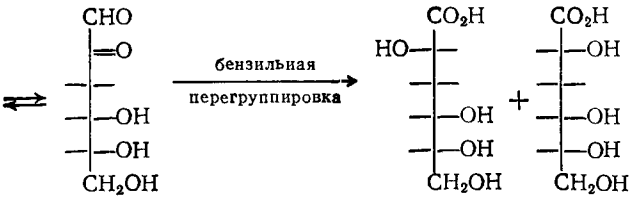
связи к периодатному окислению. Например, при распаде по Смиту из глюкана, содержащего чередующиеся 1,3- и 1,4-связи, должен образовываться 3-*О*-глюкозилэритрит (4).

26.3.2.5. Действие щелочей

Этот метод [33] анализа полисахаридов дает немного дополнительной информации об их общем строении, однако поскольку при выделении чистых образцов полисахаридов часто добавляют щелочь, необходимо знать происходящие при этом реакции. Самым распространенным типом таких реакций является гидролиз сложноэфирных группировок, используемых для защиты гидроксильных или карбоксильных групп в моносахаридных остатках. Наиболее полную информацию дает постепенное расщепление моносахаридных звеньев, начиная с восстанавливающего конца полисахарида, так называемый *пилинг* (англ. *peeling*, слущивание). При анализе разветвленных структур он часто дает больше информации, чем гидролиз ферментами (которые расщепляют молекулу с невосстанавливающего конца), поскольку восстанавливающий конец у молекулы лишь один. При деградации 1,3- и 1,4-связанных моносахаридных звеньев образуются соответствующие сахариновые кислоты (схемы 5, 6), строение которых позволяет определить положение существовавшей связи. (1→4)-Связанные полисахариды разрушаются не полностью из-за конкурирующей реакции, которая приводит к полисахаридам, устойчивым к действию щелочи (схема 7). Кроме того, скорость расщепления (1→3)-связей может в десять раз превышать скорость расщепления (1→4)-связей. Вследствие этого как только расщепится (1→4)-связь, немедленно распадается, если оно связано (1→3)-связью, следующее звено, что затрудняет определение последовательности этих связей.

В точках ветвления распад происходит в направлении только одного ответвления. В полисахаридах, у которых в точках ветвления находятся 1,3,4-связанные остатки моносахаридов, происходит расщепление вдоль (1→3)-связанной цепи, тогда как (1→4)-связанная цепь становится устойчивой к действию щелочи. В полисахаридах, содержащих (1→4)-связи и 1,4,6-связанные боковые цепи, расщепление остановится после первого разветвления, поскольку восстанавливающие концы обеих цепей превратятся в устойчивые к действию щелочи остатки метасахариновых кислот.

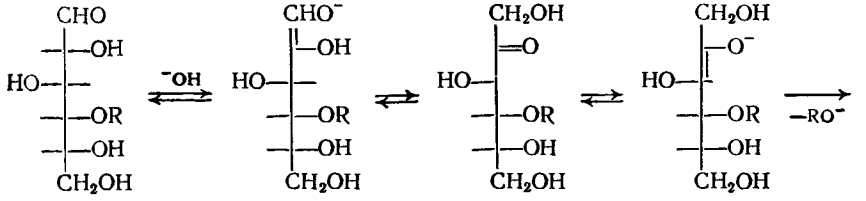




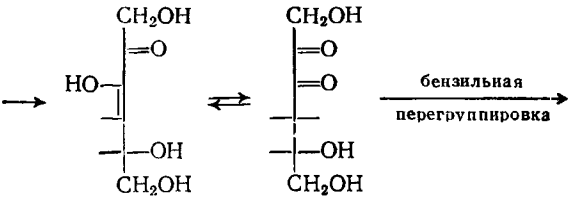
(5)

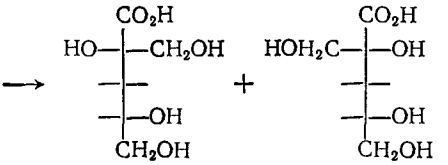
3-дезокси-*D-арабино-* и *-D-рибо-*гексоновые (метасахариновые) кислоты

R — остаток полисахарида; RO^- — остаток цепи, готовый к дальнейшему распаду



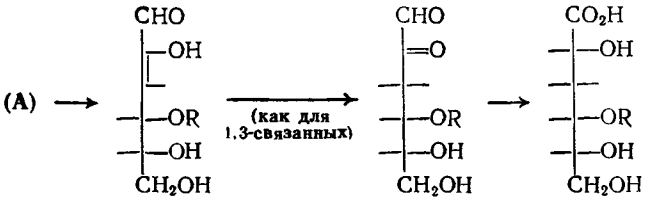
(A)





(6)

3-дезокси-2-*C*-(гидроксиметил)-*D-трео-* и *-D-эритро-*пентоновые (изосахариновые) кислоты



(7)

26.3.2.6. Хроматографические методы

Для разделения полисахаридов может быть использована бумажная [34] и тонкослойная [35] хроматография, однако основными методами являются колоночные гель-фильтрация [36] и

ионообменная [37, 38] хроматография. Гель-фильтрация, для которой используют сшитые декстраны или полиакриламидные гели, основана на разделении углеводов по размеру их молекул; ее применяют для предварительного разделения полисахаридов до начала определения их строения. Ионообменную хроматографию применяют для разделения углеводов с ионизируемыми группами. Однако в боратном буфере можно разделить и нейтральные сахара; в этих условиях они превращаются в боратные комплексы [39], которые затем фракционируют на ионообменной смоле в боратной форме. Эти виды колоночной хроматографии часто используют совместно для определения степени чистоты и микрогетерогенности углеводсодержащего образца.

Преимуществом колоночной хроматографии является возможность количественного фракционирования больших количеств веществ без превращения их в какие-либо производные. Однако хорошее разделение часто возможно лишь при малых скоростях элюирования, поэтому были разработаны новые виды колоночной хроматографии. Методы аффинной и адсорбционной хроматографии основаны на избирательной адсорбции молекул на нерастворимом адсорбенте, который содержит группы (молекулы), специфически взаимодействующие с молекулами подлежащих очистке соединений, например ингибиторы (для очистки ферментов) или антитела (для очистки антигенов); в настоящее время эти методы нашли широкое применение и для разделения углеводов. Невзаимодействующие с адсорбентом примеси удаляются, а связанный с адсорбентом сахар затем десорбируют способом, не приводящим к его разрушению. Десорбцию можно осуществить, изменяя pH, ионную силу среды или применяя соответствующий ингибитор взаимодействия, удерживающего вещество на адсорбенте. Для разделения ряда полисахаридов были использованы иммобилизованные формы (см. разд. 26.3.7.6) конканавалина А [40], являющегося фитогемагглютинином (лектином), который специфически взаимодействует с разветвленными полисахаридами определенного строения; в настоящее время применяют и другие иммобилизованные фитогемагглютинины. Колоночная хроматография на носителях, покрытых полиароматическими соединениями [41], также находит применение для разделения полисахаридов. Благодаря достижениям в производстве носителей для жидкостной хроматографии под высоким давлением можно осуществить хроматографическое разделение быстро и избирательно; описаны методы фракционирования небольших олигосахаридов, продолжающегося менее 1 ч [42].

Газожидкостная хроматография находит лишь ограниченное применение при установлении строения полисахаридов из-за необходимости использования летучих и устойчивых в условиях разделения соединений. Этот метод применяют для анализа моносахаридного состава гидролизатов и, что более важно, для анализа частично метилированных сахаров при установлении строения

полисахаридов методом метилирования (см. разд. 26.3.2.1). Дисахариды можно превратить в производные, достаточно летучие для исследования методом ГЖХ. Такой анализ производится значительно быстрее, чем с помощью колоночной хроматографии, однако при этом разделяются и изомеры моносахаридов, вследствие чего число пиков на хроматограмме превышает число анализируемых моносахаридов. Необходимость использования для анализа летучих соединений привела к разработке методов получения ряда производных сахаров, отвечающих этим требованиям; обычно углеводы превращают в метиловые эфиры [23], ацетаты альдитов [24] или триметилсилильные эфиры [25]. Существуют методы разделения на основе и других летучих производных, например изопропилиденовых [43]. Чаще всего используют триметилсилильные эфиры, так как они образуются за несколько минут при комнатной температуре. Этот метод был применен также для получения производных кислых [44—46] и основных моносахаридов [47]. К достижениям последних лет, увеличившим значение газожидкостной хроматографии для структурного анализа полисахаридов, относится применение специфических детекторов и прямое подключение газожидкостных хроматографов к счетчикам радиоактивности (газожидкостная радиохроматография) и масс-спектрометрам (см. разд. 26.3.2.7).

26.3.2.7. Масс-спектрометрия

Метод масс-спектрометрии играет большую роль в определении строения полисахаридов. Его используют не только для идентификации производных, полученных при анализе методом метилирования (см. разд. 26.3.2.1), но и для анализа олигосахаридов непосредственно после перевода их в одно из вышеупомянутых летучих производных [23—25, 44—47] (см. разд. 26.3.2.6). Этим методом может быть определена молекулярная масса небольших олигосахаридов, а также последовательность моносахаридных остатков и положение гликозидных связей, хотя для этого обычно необходимы сведения о природе входящих в состав олигосахарида углеводов [48, 49]. Прямая масс-спектрометрическая идентификация олигосахаридов, содержащих более четырех моносахаридных остатков, затруднена, однако была изучена фрагментация полностью ацетилированных гликозидов пентасахаридов [50], а сравнительно недавно описан метод определения *D*-фруктозных звеньев в полностью метилированных олигосахаридах, который дает информацию о соотношении пиранозных и фуранозных форм и положении гликозидных связей [51].

Методы, основанные на химической ионизации [52], а не на электронном ударе, более чувствительны, чем традиционные методы анализа [53, 54]; их применяли для анализа олигопептидов — низкомолекулярных фрагментов, образующихся при гидро-

лизе гликопротеинов. При этом была определена не только аминокислотная последовательность, но и идентифицированы связи углевод — пептид [55].

26.3.2.8. Спектроскопия ЯМР

Метод, позволяющий получить информацию о конфигурации гликозидных связей в полисахаридах при условии, что известен их моносахаридный состав и положения моносахаридных звеньев, создан на основе спектроскопии ЯМР. Гидроксигруппы углеводных остатков превращают (преимущественно) в *О*-метильные или *О*-триметилсилильные для исключения из спектров сигналов гидроксигрупп. Сигналы протонов при аномерных атомах углерода находятся в более низком поле, чем сигналы остальных протонов, причем химические сдвиги сигналов экваториальных протонов выше, чем для аксиальных. Полный структурный анализ полисахаридов осуществлен на основании данных спектров ЯМР ^{1}H метилированных моносахаридов и спектров ЯМР ^{1}H простых полисахаридов, таких как гликогены [56]. Методы спектроскопии ЯМР ^{13}C, ^{19}F и ^{31}P также могут быть использованы при определении места присоединения одного моносахарида к другому, причем в двух последних методах используются такие производные полисахаридов, как [^{19}F]-трифторацетаты.

26.3.2.9. Электрофорез

Электрофорез не заменяет хроматографию, но дает очень ценную дополнительную информацию, так как разделение при электрофорезе основано на других свойствах молекул (заряд, размер, форма). Высоковольтный электрофорез на бумаге применен для разделения не только моно-, но и олигосахаридов. Этот метод может быть использован не только для производных углеводов, содержащих заряженную группу (как, например, гексуроновые кислоты, аминомоносахариды, сульфаты и фосфаты моносахаридов), но и для нейтральных соединений, способных образовывать заряженные комплексы с такими электролитами, как борат, арсенит или молибдат натрия. Относительные подвижности углеводов зависят от природы комплексообразователя [57]. Правильный выбор электролита часто позволяет идентифицировать углевод. Разделение кислых полисахаридов [58] проводят с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге, нейтральные полисахариды предварительно превращают в боратные производные [59].

Использование в качестве носителей ацетата целлюлозы и полиакриламидных гелей — более чистых и однородных хроматографических материалов, минимально адсорбирующих исследуемое вещество, привело к уменьшению размывания зон и возможности более быстрого разделения микроколичеств веществ. Описаны методики разделения кислых полисахаридов на ацетате целлюлозы

[60] и в полиакриламидном геле [61], причем последний метод может быть, по-видимому, использован для определения молекулярной массы.

26.3.2.10. Иммунохимические методы

Установлено, что полисахариды являются детерминантами, определяющими иммунологическую специфичность многих видов микроорганизмов. Специфическое взаимодействие зависит от ассоциации реакционноспособных групп полисахаридного антигена и белкового антитела, и потому метод, основанный на этом типе взаимодействий, обычно специфичен к строению полисахарида. Если получить антисыворотку, специфичную к полисахаридам известного строения, ее можно использовать для установления степени структурного сходства неизвестных полисахаридов и полисахаридов, к которым специфична данная антисыворотка. Таким путем была обнаружена гетерогенность галактана из легких быка. Преципитат, образуемый с антисывороткой, специфичной к *Pneumococcus* типа XIV, содержал *D*-галактозу и *D*-глюкуроновую кислоту в количествах, отличных от исходного препарата [62].

26.3.2.11. Действие ферментов

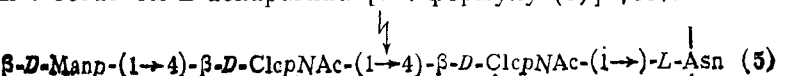
Ферментативный гидролиз является методом, альтернативным контролируемому гидролизу полисахаридов. Ценную информацию дает не только анализ образующихся при гидролизе фрагментов (поскольку фермент действует специфично по отношению к типу моносахаридного звена и типу связи), но и устойчивость полисахарида к действию конкретного фермента или образование частично гидролизованных структур. Ферменты, гидролизующие полисахариды, для удобства разделены на две группы — эндо- и экзогидролазы. Эндогидролазы специфичны к типу связей и типу моносахаридных звеньев и вызывают статистическую фрагментацию гомополисахаридов с образованием набора гомологичных олигосахаридов. Примером ферментов этого типа служит α-амилаза, при действии которой на амилозу образуется набор различных олигосахаридов. Экзогидролазы специфичны к строению моносахаридных звеньев и конфигурации гликозидной связи, но не специфичны к строению звеньев, присоединенных по С-1 гликозидной связью. Они расщепляют полисахариды путем ступенчатого удаления остатков с невосстанавливающего конца молекулы полисахарида, в отличие от щелочного гидролиза (см. разд. 26.3.2.5). Примером экзогидролазы является β-амилаза, последовательно отщепляющая от амилозы мальтозные звенья; если реакция доходит до конца, мальтоза образуется почти с количественным выходом.

Впервые ферментативный анализ был применен для определения длины цепи и степени разветвленности высокоразветвленных

полисахаридов — гликогена и амилопектина. Для проведения такого анализа традиционным путем необходимо химическими методами установить природу невосстанавливающего концевого остатка. Применение ферментов позволяет исследовать меньшие количества вещества и увеличить скорость анализа [63, 64]. Метод Ли и Вилана [63] основан на использовании двух ферментов. Один из них (пуллуланаза) избирательно гидролизует α-(1→6)-связи в точках ветвления, что приводит к образованию линейных цепей из α-(1→4)-связанных остатков *D*-глюкозы. Эти цепи расщепляются вторым ферментом (β-амилазой) с образованием мальтозы и *D*-глюкозы, возникающей при расщеплении цепей с нечетным числом остатков этого моносахарида. Количество *D*-глюкозы в гидролизате является мерой длины цепи, так как одна молекула глюкозы образуется из одной цепи с нечетным числом остатков этого сахара, и если допустить, что в полисахариде число цепей с четным и нечетным числом моносахаридных звеньев одинаково, то одна молекула *D*-глюкозы образуется из двух углеводных цепей.

Позднее некоторые экзогликозидазы были получены в достаточно чистом виде, что позволило разработать на их основе метод определения моносахаридной последовательности в полисахаридах. Такие ферменты должны избирательно отщеплять моносахаридные звенья, связанные определенным типом связей, с невосстанавливающего конца полисахарида. Например, β-галактозидаза отщепляет от полисахарида остатки *D*-галактозы, присоединенные β-гликозидной связью. Основные ферменты, гидролизующие полисахариды, приведены в табл. 26.3.3; источники их выделения и методы очистки описаны в обзоре [65]. Возможно последовательное или совместное применение ферментов, как в случае гидролиза кератансульфата β-*D*-галактозидазой, β-*D*-2-ацетамидо-2-дезоксиглюкозидазой и сульфатазой [66]; этим методом показано, что на невосстанавливающем конце молекулы кератансульфата содержится некоторое число несульфатированных остатков *D*-галактозы и 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы. Метод последовательного ферментативного гидролиза хорошо разработан [67], в частности для анализа углеводных фрагментов макромолекул.

Выделен ряд эндогликозидаз (гликопептидаз), применение которых несомненно должно представить большую ценность для анализа углеводных остатков гликопротеинов. Эти ферменты расщепляют гликозидиую связь, смежную с остатком аминокислоты. Примером такого типа ферментов служит 4-*L*-аспартил-β-*D*-глюкозамин—амидогидролаза, которая расщепляет связь между остатками 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы в гликопротеине, у которого остаток *D*-маннозы связан через остаток ди-*N*-ацетилхитобиозы с остатком *L*-аспарагина [см. формулу (5)] [68].



(5)

Таблица 26.3.3 Ферменты, которые могут быть использованы для анализа полисахаридов

Тривиальное название	Систематическое название	Шифр [65a]
α-Амилаза	1,4-α-*D*-Глюкан—глюканогидролаза	3.2.1.1
β-Амилаза	1,4-β-*D*-Глюкан—мальтогидролаза	3.2.1.2
Арабиназа	—	—
α-*L*-Арабинофуранозидаза	α-*L*-Арабинофуранозид—арабинофураногидролаза	3.2.1.55
Арилсульфатаза	Арилсульфат—сульфогидролаза	3.1.6.1
L-Аскорбат-2-сульфат—сульфатаза	—	—
Аспартилглюкозаминидаза	1-*L*-β-Аспартамидо-2-ацетамидо-1,2-дидезокси-β-*D*-глюкоза—2-амидогидролаза	3.5.1.26
2-Ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозо-6-сульфат—сульфатаза	—	—
α-*N*-Ацетилгалактозаминидаза	2-Ацетамидо-2-дезокси-α-*D*-галактозид—ацетамидодезоксигалактогидролаза	3.2.1.49
β-*N*-Ацетилгалактозаминиидаза	2-Ацетамидо-2-дезокси-β-*D*-галактозид—ацетамидодезоксигалактогидролаза	3.5.1.53
2-Ацетамидо-2-дезокси-*D*-галактозо-4-сульфат—сульфатаза	—	—
β-*N*-Ацетилгексозаминидаза	2-Ацетамидо-2-дезокси-β-гексозид—ацетамидодезоксигексогидролаза	3.2.1.52
α-*N*-Ацетилглюкозаминидаза	2-Ацетамидо-2-дезокси-α-*D*-глюкозид—ацетамидодезоксиглюкогидролаза	3.2.1.50
β-*N*-Ацетилглюкозаминидаза	2-Ацетамидо-2-дезокси-β-*D*-глюкозид—ацетамидодезоксиглюкогидролаза	3.2.1.30
α,β-*N*-Ацетилглюкозаминидаза	—	—
N-Ацетилмурамоил-*L*-аланин—амидаза	Мукопептид—амидогидролаза	3.5.1.28
Бактериальная протеиназа	—	—
α-Галактозидаза	α-*D*-Галактозид—галактогидролаза	3.2.1.22
β-Галактозидаза	β-*D*-Галактозид—галактогидролаза	3.2.1.23
β-*D*-Галактозидазы (гликосфинголипид-специфичные)	—	—
β-*D*-Галактозил-*D*-глюкозилцерамидаза	—	—
Галактозилцерамидаза	*D*-Галактозил-*N*-ацилсфингозин—галактогидролаза	3.2.1.46
β-*D*-Галактосфингозидаза	—	—
Гепаринсульфатаза	—	—

Продолжение

Тривиальное название	Систематическое название	Шифр [65a]
Гиалуроноглюкозаминидаза	Гиалуронат—4-гликаногидролаза	3.2.1.35
Гидролазы гликопептидных связей	—	—
Гликаназа	—	—
Гликолипидсульфат—сульфатаза	—	—
Гликопептидазы	—	—
β-*D*-2-Глициламидо-2-дезоксиглюкозидаза	—	—
D-Глюканазы смешанные	—	—
Глюкоамилаза см. Экзо-1,4-α-глюкозидаза		
α-Глюкозидаза	α-*D*-Глюкозид—глюкогидролаза	3.2.1.20
β-Глюкозидаза	β-*D*-Глюкозид—глюкогидролаза	3.2.1.21
β-*D*-Глюкозилцереброзидаза	—	—
β-Глюкуронидаза	β-*D*-Глюкуронид—глюкуроногидролаза	3.2.1.31
Декстраназа	1,6-α-*D*-Глюкан—6-глюканогидролаза	3.2.1.11
L-Идуронидаза	Мукополисахарид—α-*L*-идуроногидролаза	3.2.1.76
L-Идуронат-2-сульфат—сульфатаза	—	—
Изоамилаза	Гликоген—6-глюканогидролаза	3.2.1.68
Изомальтаза см. α-Глюкозидаза		
Изомеразы углеводов	—	—
Кератансульфат—гидролаза	—	—
Ксиланазы (смешанные)	—	—
β-Ксилозидаза см. Экзо-1,4-β-ксилозидаза		
Ксилозоизомераза	*D*-Ксилоза—кетол-изомераза	5.3.1.5
Лактозосульфат—сульфатаза	—	—
Ламинариназа см. Эндо-1,3(4)-β-глюканаза		
Лизоцим	Мукопептид—*N*-ацетилмурамоилгидролаза	3.2.1.17
Лихеназа	1,3-1,4-β-*D*-Глюкан—4-глюканогидролаза	3.2.1.73
Мальтаза см. α-Глюкозидаза		
D-Маннаназы (смешанные)	—	—
α-Маннозидаза	α-*D*-Маннозид—манногидролаза	3.2.1.24
β-Маннозидаза	β-*D*-Маннозид — манногидролаза	3.2.1.25
Нейраминидаза	Ацилнейраминил—гидролаза	3.2.1.18
Оксидазы углеводов	—	—
Олиго-1,8-глюкозидаза	Декстрин—6-α-глюканогидролаза	3.2.1.10

Продолжение

Тривиальное название	Систематическое название	Шифр [65a]
Пектат-гидролазы	—	—
Пектат-лиаза	Поли(1,4-α-*D* галактуронид)-лиаза	4.2.2.2
Пектин-лиаза	Поли(метоксигалактуронид)-лиаза	4.2.2.10
Пектинэстераза	Пектин—пектилгидролаза	3.1.1.11
Полигалактуроназа	Поли(1,4-α-*D*-галактуронид)—гликаногидролаза	3.2.1.15
Полисахарид—**деацетилаза**	—	—
Пуллуланаза	Пуллулан—6-глюканогидролаза	3.2.1.41
Сахарозо-α-**глюкогидролаза**	Сахароза—α-глюкогидролаза	3.2.1.48
Сульфамидаза	—	—
Тиогликозидаза	Тиогликозид—гликогидралаза	3.2.3.1
Трансферазы **углеводов**	—	—
α,α-Трегалаза	α,α-Трегалоза—глюкогидролаза	3.2.1.28
β-*D*-Фосфогалактозидаза	—	—
β-*D*-Фосфоглюкозидаза	—	—
β-Фруктофуранозидаза	β-*D*-Фруктофуранозид—фруктогидролаза	3.2.1.26
α-1,2-*L*-Фукозидаза	—	—
α-*D*-Фукозидаза	α-*D*-Фукозид—фукогидролаза	3.2.1.38 [a]
Хитиназа	Поли[1,4-β-(2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозид)]—гликаногидролаза	3.2.1.14
Хитозаназа	—	—
Хондроитинсульфат—лиаза**АВС**	Хондроитин—АВС-лиаза	4.2.2.4
Хондроитинсульфат—лиаза АС	Хондроитин—АС-лиаза	4.2.2.5
Хондроитин-4-сульфат—лиаза	—	—
Хондро-4-сульфатаза	$\Delta^{4,5}$-β-*D*-Глюкуронозил-(1,4)-2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-галактозо-4-сульфат—4-сульфогидролаза	3.1.6.9
Хондро-6-сульфатаза	$\Delta^{4,5}$-β-*D*-Глюкуронозил-(1,4)-2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-галактозо-6-сульфат—6-сульфогидролаза	3.6.1.10
Целлюлаза	1,4-(1,3:1,4)-β-*D*-Глюкан—4-глюканогидролаза	3.2.1.4
Цереброзидсульфатаза	Цереброзид-3-сульфат—сульфогидролаза	3.1.6.8
Экзо-β-*D*-2-ацетамидо-2-дезоксиглюкозидаза	—	—
Экзо-β-*D*-2-ацетамидо-2-дезоксигексозидаза	—	—
Экзо-β-*D*-2-ацетамидо-2-дезоксигликаназа	—	—
Экзо-β-*D*-ацетамидодезоксиглюканаза	—	—
Экзо-β-*D*-галактаназа	—	—
Экзо-*D*-глюканаза	—	—

Продолжение

Тривиальное название	Систематическое название	Шифр [65а]
Экзо-1,3-β-глюкозидаза	1,3-β-*D*-Глюкан—глюкогидролаза	3.2.1.58
Экзо-1,4-α-глюкозидаза	1,4-α-*D*-Глюкан—глюкогидролаза	3.2.1.3
Экзо-1,4-β-глюкозидаза	1,4-β-*D*-Глюкан—глюкогидролаза	3.2.1.74
Экзо-1-6-α-глюкозидаза	1,6-α-*D*-Глюкан—глюкогидролаза	3.2.1.70
Экзо-1,4-β-ксилозидаза	1,4-β-*D*-Ксилан—ксилогидролаза	3.2.1.37
Экзополигалактуроназа	Поли(1,4-α-*D*-галактуронид)—галактуроногидролаза	3.2.1.67
Экзополи-α-галактуронозидаза	Поли(1,4-α-*D*-галактозидуронат)—дигалактуроногидролаза	3.2.1.82
Эндо-β-*D*-2-ацетамидо-2-дезоксиглюканаза	см. Хитиназа	
Эндогалактаназа	—	—
Эндо-β-*D*-галактаназа	—	—
Эндо-1,3-β-глюканаза	1,3-β-*D*-Глюкан—глюканогидролаза	3.2.1.39
Эндо-1,6-β-глюканаза	1,6-β-*D*-Глюкан—глюканогидролаза	3.2.1.75
Эндо-1,3(4)-β-глюканаза	1,3-(1,3:1,4)-β-*D*-Глюкан—3(4)-глюканогидролаза	3.2.1.6

[а] Изъято из классификации.—*Прим. перев.*

Гидролиз гликозидных связей ферментами включает расщепление связи гликозил—кислород, однако ряд ферментов, известных под названием элиминазы, или лиазы (обычно бактериального происхождения), действуют иначе и расщепляют связи кислород—агликон (рис. 26.3.3) в кислых полисахаридах (например, в пектинах) с образованием остатков ненасыщенных гексуроновых кислот.

Результаты ферментативного анализа следует интерпретировать с осторожностью. При действии экзогликозидаз можно определить, от какой боковой цепи (цепей) был удален терминальный

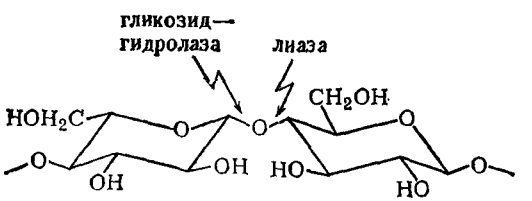


Рис. 26.3.3. Направление действия гликозидаз и лиаз

остаток (остатки); в этом отличие этого метода от щелочного распада полисахаридов (см. разд. 26.3.2.5). Микрогетерогенность цепей в одной и той же молекуле также затрудняет интерпретацию результатов. Важно, чтобы применяемый фермент был высокоочищенным, поскольку примеси других гликозидаз также могут приводить к неопределенности и некорректным допущениям. Так, например, ранее полагали, что все остатки *D*-маннозы в гликопротеинах соединены α-связями, и только применение α-*D*-маннозидазы, полностью очищенной от β-*D*-маннозидазы, показало ошибочность этого мнения.

26.3.2.12. Определение размера и формы молекул

Полное описание полисахарида включает установление размера и формы его молекул. Эти характеристики могут быть определены в ходе установления строения полисахарида некоторыми из описанных выше методов, например, гель-фильтрацией (см. разд. 26.3.2.1), определение невосстанавливающих концевых остатков методом метилирования (см. разд. 26.2.3.5) или периодатного окисления (см. разд. 26.3.2.3); однако существуют и специальные методы.

Применение электронной микроскопии в этой области ограничено из-за малого размера молекул, с которыми приходится иметь дело. Сами по себе эти молекулы слишком малы, чтобы рассеивать электроны, однако при использовании техники теней, отбрасываемых нанесенным на них металлом, можно получить изображение одной молекулы, как в случае *O*-(гидроксиэтил)целлюлозы [69]; обычно этот метод дает информацию только об агрегатах молекул и конформации [70].

Для исследования полисахаридов используют также рентгеноструктурный анализ [71, 71a]; удовлетворительные рентгенограммы были получены для волокнообразующих полисахаридов. Обычно такие соединения имеют линейные молекулы, однако присоединение боковых цепей, состоящих из одного моносахаридного остатка (если только они не расположены слишком часто), не мешает образованию кристаллов и, следовательно, применению этого метода. Высокоразветвленные полисахариды имеют кристаллическую структуру только в случае, если боковые цепи расположены упорядоченно, но в большинстве случаев эти соединения кристалличны лишь отчасти, что приводит к нарушению кристаллической решетки, появлению больших аморфных областей и затрудняет интерпретацию рентгенограмм. С помощью этого метода показано, например, как расположены повторяющиеся дисахаридные звенья в цепях гликозаминогликанов [72, 73].

Для определения молекулярной массы используют коллигативные (т. е. зависящие от концентрации) свойства растворов полисахаридов. При молекулярной массе менее 20 000 может быть применен метод, основанный на измерении разницы давления паров

или температур кипения чистого растворителя и раствора, однако эти различия невелики и область применения метода ограничена чувствительностью приборов. При молекулярной массе более 20 000 единственным успешно применяемым методом является осмометрия. Верхний предел молекулярных масс, определяемых этим методом, составляет $5 \cdot 10^5$, так как при более высоких молекулярных массах абсолютные значения осмотического давления невысоки. Нижний предел зависит от проницаемости мембраны. Были успешно использованы методы парофазной осмометрии [74] и динамической осмометрии [75].

Измерение рассеяния света разбавленными водными растворами полисахаридов также используют для определения их молекулярной массы. Через растворы полисахаридов пропускают монохроматический (поляризованный или неполяризованный) свет и измеряют интенсивность рассеянного света как функцию угла рассеяния. На основании полученных данных можно определить форму молекул и их молекулярную массу [76].

Молекулярную массу и форму молекул полисахаридов можно также определить с помощью метода ультрацентрифугирования. По скорости седиментации при ультрацентрифугировании рассчитывают значение молекулярной массы; сравнивая поведение исследуемого образца и молекулярной модели, можно оценить форму молекулы. Этот метод применен [77] при изучении гиалуроновой кислоты. Ультрацентрифугирование не используют как способ очистки, но обычно применяют в качестве теста на гомогенность очищенного образца.

26.3.3. ПОЛИСАХАРИДЫ РАСТЕНИЙ И ВОДОРОСЛЕЙ

26.3.3.1. Крахмал

Основным резервным полисахаридом растений является крахмал. Он служит основным источником углеводов в пищевом рационе человека и, следовательно, имеет большое экономическое значение; его получают в промышленном масштабе. Крахмал обнаружен в некоторых простейших, бактериях и водорослях, но до сих пор основным его источником являются семена, плоды, листья и луковицы растений, где содержание крахмала составляет от нескольких процентов до $>75\,\%$ (зерна хлебных злаков). Крахмал имеет зернистую структуру, причем форма зерен (гранул) зависит от источника выделения. Гранулы крахмала можно выделить из растительной ткани без их разрушения, так как они нерастворимы в холодной воде, в которой растворяются многие примеси. Такие гранулы обратимо набухают в холодной воде, что используется при промышленной экстракции крахмала [78]. При повышении температуры этот процесс становится необратимым, и в конце концов гранулы разрушаются с образованием крахмального клейстера. Не все гранулы крахмала в образце разрушаются при одной и той

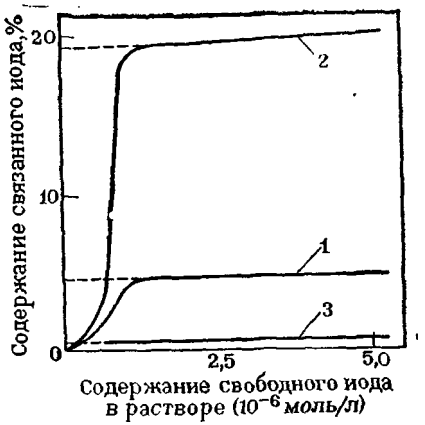


Рис. 26.3.4. Поглощение иода крахмалом (*1*), амилозой (*2*) и амилопектином (*3*)

же температуре, однако каждый индивидуальный крахмал имеет характерный интервал температуры гелеобразования.

Крахмал может быть разделен на два компонента (явление, впервые открытое в начале 1940 годов, хотя гетерогенность крахмала отмечалась и раньше). Эти два компонента — амилоза и амилопектин — в крахмалах из разных источников содержатся в разных количествах; содержание амилозы в кукурузе восковой спелости составляет $<2\,\%$, а в кукурузном крахмале — $\sim 80\,\%$, однако обычно содержание амилозы в крахмалах равно 15—35 %. Считают, что соотношение амилозы и амилопектина зависит от соотношения двух синтетаз, одна из которых ответственна за биосинтез амилозы, а другая — за биосинтез амилопектина [79]. Определение этого соотношения для данного образца крахмала основано на его способности связывать иод. Как видно из рис. 26.3.4, амилоза связывает иод с образованием окрашенного в синий цвет комплекса; количество связываемого иода частично зависит от экспериментальных условий (в данном случае содержание связанного иода составляет $\sim 20\,\%$). Амилопектин связывает небольшое количество иода, образуя комплекс красного цвета; крахмал, как смесь этих форм, обладает промежуточной способностью связывать иод. Экстраполированием линейной части кривой связывания к нулевой концентрации свободного иода можно определить максимальную способность крахмала связывать иод. Содержание амилозы рассчитывают по отношению количества иода, связываемого крахмалом, к максимальному количеству иода, связываемого амилозой. Для этого определения традиционно используют потенциометрическое титрование [80], однако утверждают, что спектрофотометрическое определение при двух длинах волн дает более точные результаты [81].

Фракционирование крахмала [82] на компоненты обычно осуществляют прибавлением к водной суспензии зерен крахмала полярного органического растворителя; при этом амилоза образует нерастворимый комплекс. Амилоза затем может быть очищена повторным осаждением. Для первого осаждения используют тимол, для последующей очистки — бутанол [83]. Фракцию амилопектина извлекают из надосадочной жидкости, которая остается после удаления комплексного соединения амилозы. Для предотвращения деградации этих фракций их очистку необходимо проводить в отсутствие кислорода; для более полного диспергирования часто

необходима предварительная обработка гранул диметилсульфоксидом.

Амилоза и амилопектин являются α-*D*-(1→4)-связанными глюканами [см., например, (1)], однако в амилопектине, имеющем разветвленное строение, в точках ветвления (3) имеются дополнительно α-*D*-(1→6)-связи. Это было известно уже много лет назад из результатов анализа методом метилирования и гидролиза. При кислотном гидролизе кукурузного и рисового крахмала, выделенных из зерен в стадии восковой спелости, обнаружено, что в их состав входит заметное количество *D*-глюкозо-6-фосфата [84]. Последующий анализ показал, что в амилопектине в среднем один из шести остатков *D*-глюкозы фосфорилирован. При метилировании амилозы и последующем гидролизе в качестве основного продукта образуется 2,3,6-три-*O*-метил-*D*-глюкоза и менее 0,4 % 2,3,4,6-тетра-*O*-метил-*D*-глюкозы, происходящей из невосстанавливающего концевого остатка, т. е. молекула амилозы линейна и ее единичная цепь состоит из 200—350 остатков *D*-глюкозы. Определенная осмотическим методом молекулярная масса соответствует такой длине цепи [85]. Однако анализ неразветвленной структуры достаточно сложен из-за небольшого числа концевых остатков по сравнению с общим числом остатков, образующих цепь, а также из-за деградации: разрушение одной связи может вдвое уменьшить длину цепи. Физические методы определения длины цепи, при условии использования независимых методов для определения гомогенности препарата, дают большие значения длины молекул амилозы, чем значения, полученные химическими методами. Анализ методом светорассеяния и ультрацентрифугирования показывает, что длина цепи молекулы амилозы часто достигает 6000 моносахаридных звеньев. Обработка амилозы β-амилазой показала, что молекула линейна; единственным продуктом расщепления была мальтоза. Изучение действия пуллуланазы и других амилолитических ферментов на различные амилозы показало, что их молекулы содержат некоторое количество разветвлений, присоединенных к основной цепи α-(1→6)-связями [63, 64]. Гидродинамическое поведение фракций амилозы также свидетельствует о том, что амилоза в некоторой степени является разветвленной.

Многие свойства амилозы могут быть объяснены способностью ее молекулы принимать в растворе различные конформации. В нейтральных водных растворах нормальной для амилозы конформацией является статистический клубок. Если в растворе присутствуют комплексообразователи, амилоза принимает конформацию спирали, каждый виток которой содержит около шести остатков *D*-глюкозы (спираль 6_1). В этой конформации амилоза образует окрашенный в синий цвет комплекс с иодом, а также комплексы с жирами и полярными органическими растворителями, причем комплексообразователь располагается в центре спирали. Вследствие конформационных переходов молекул амилозы в растворе могут возникать различные ретроградированные формы. Ретрогра-

дацией амилозы называется ее самоосаждение из раствора вследствие ассоциации молекул (явление, редко наблюдаемое у амилопектина). Методом рентгенографии ретроградированных амилоз показано, что размер молекул и тип кристаллической модификации амилозы, а также концентрация, температура и pH раствора влияют на образование таких нерастворимых ассоциатов, причем для них наблюдаются рентгеновские спектры различных типов. Амилоза А характерна для крахмала из хлебных злаков; она образуется также ретроградацией амилозы при температуре выше 50 °С; амилоза В характерна для крахмалов из клубней и образуется ретроградацией амилозы при комнатной температуре. Ясной картины конформаций, существующих для этих модификаций, в настоящее время нет, однако полагают, что амилоза В может представлять собой двойную спираль.

Третьей кристаллической модификацией амилозы, о которой имеется больше сведений, является так называемая V-форма. Она образуется в результате ретроградации в присутствии комплексообразователей. Рентгенограммы этой формы указывают на то, что она является гибкой спиралью, в каждом витке которой содержится шесть или семь остатков *D*-глюкозы в зависимости от размера молекулы комплексообразователя. Форма В может образовываться из V-формы путем растяжения спирали и разрыва одних и образования других водородных связей [86]. Рентгеновские спектры V-формы амилозы сравнивали с рентгеновскими спектрами ряда циклических олигосахаридов, полученных при действии на крахмал амилазы из *Bacillus macerans*. Эти циклические олигосахариды (циклоамилозы, декстрины Шардингера) [87] состоят из α-(1→4)-связанных остатков *D*-глюкозы и имеют вид замкнутой петли, причем рентгенограмма циклогексамилозы сходна с рентгенограммой V-формы; считают, что она соответствует одному витку V-спирали.

Амилопектин при анализе методом метилирования в качестве основного продукта образует 2,3,6-три-*O*-метил-*D*-глюкозу и около 4 % 2,3,4,6-тетра-*O*-метил-*D*-глюкозы; это означает, что длина его цепи меньше, чем в амилозе. Выделение помимо этих продуктов 2,3-ди-*O*-метил-*D*-глюкозы указывает на наличие 1,4,6-связанных моносахаридных остатков в точках ветвления. Длину цепи такой единицы определяют по количеству муравьиной кислоты, выделяющейся при периодатном окислении терминальных моносахаридных остатков на невосстанавливающем конце цепей; более точно эту величину определяют ферментативным расщеплением (см. разд. 26.3.2.11) [63, 64]. Средняя длина цепи обычно составляет 17—26 моносахаридных остатков. Цепи в разветвленной молекуле амилопектина могут быть расположены по-разному. На рис. 26.3.5 показано три возможных способа их расположения: (а) слоистая структура, предложенная Хеуорсом [88]; (б) структура в виде «елочки», предложенная Штаудингером и Хуземан [89]; (в) «ветвистая» структура, предложенная Мейером и Бернфельдом [90].

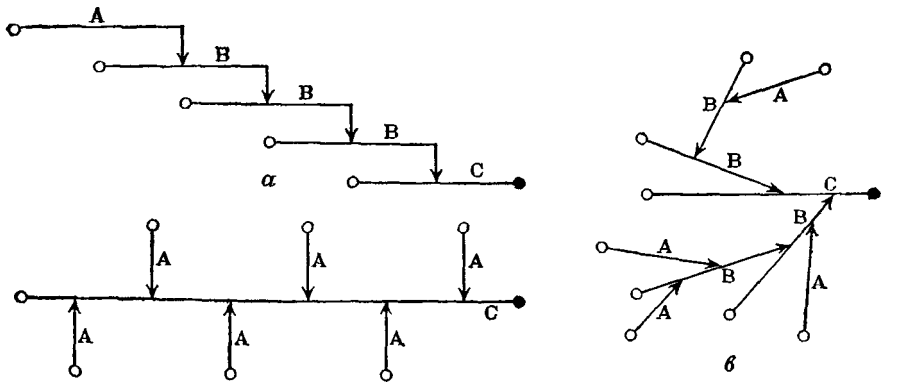


Рис 26.3.5. Схематическое изображение предполагаемого расположения цепей, содержащих около 20 (1 → 4)-связанных остатков α-*D*-глюкозы:

а — слоистая структура; *б* — структура в виде «елочки»; *в* — ветвистая структура; светлым кружком изображено невосстанавливающее концевое звено, темным — восстанавливающее концевое звено, стрелкой — α-(1 → 6)-связи

В этих структурах имеются цепи трех типов: А — боковые цепи, присоединенные к остову молекулы только восстанавливающими концами; В — цепи, к которым присоединены цепи А, и С — цепи со свободными восстанавлнвающими концами (в молекуле может быть только одна цепь С). Результаты анализа [91], основанного на расщеплении амилопектина с помощью β-амилазы и фермента, отщепляющего боковые цепн от точек ветвления, свидетельствуют о высокоразветвленной структуре, однако результаты обработки изоамилазой, фосфорилазой и β-амилазой указывают на то, что цепи А и В не образуют регулярно разветвленной структуры (см. рис. 26.3.5) [92].

Молекулы амилопектина слишком велики, и точное определение их молекулярной массы затруднено. Однако по результатам светорассеяния они состоят прнмерно из 10^6 остатков *D*-глюкозы, что делает амилопектнн одной из самых больших природных молекул [93].

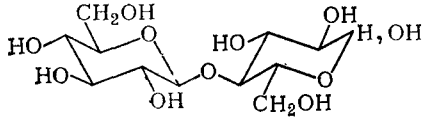
Неспособность амилопектнна связывать нод в большом количестве (его комплекс с иодом имеет характерную красную окраску) обусловливается наличием в его молекуле большого числа точек ветвления, что делает невозможным осуществленне какой-либо спиральной конформацни.

26.3.3.2. Целлюлоза

Целлюлоза является наиболее распространенным органическим природным соединением. Она является главным компонентом клеточной стенки высших растений и ее основным структурным элементом. В почти чистом виде она встречается в волокнах семян

хлопчатника (98 %); несколько меньше ее содержание в волокнах льна (80 %), джута (60—70 %) и в древесине (40—50 %). Этот полисахарид обнаружен также в некоторых водорослях; продуцируется он и некоторыми бактериями. Выделение целлюлозы из большинства источников затруднено из-за ее нерастворимости в большинстве растворителей и осуществляется путем отделения от нее в растворимой форме примесей — гемицеллюлозы (см. разд. 26.3.3.6) и лигнина. Обычные методы выделения целлюлозы основаны на суспендировании сырья в щелочном растворе для удаления нецеллюлозных полисахаридов. Однако примеси моносахаридов удаляются с трудом, и это приводит к появлению сообщений о присутствии в целлюлозе следовых количеств моносахаридов, отличных от глюкозы.

Первичная структура целлюлозы установлена в 1930-х годах. При анализе этого полисахарида методом метилирования образуется более 90 % 2,3,6-три-*O*-метил-*D*-глюкозы; следовательно, молекулы целлюлозы в основном линейны. Поскольку при частичном гидролизе целлюлозы образуется целлобиоза (**6**), этот полисахарид содержит β-(1→4)-связи. β-Конфигурация внутримолекулярных гликозидных связей подтверждена ферментативным анализом. Определение длины цепи по содержанию концевых групп в случае в основном линейных молекул неточно и дает очень низкие значения (~200 моносахаридных звеньев) из-за деструкции в ходе анализа. Длина молекулы целлюлозы, определенная физическими методами, составляет до 10 000 остатков *D*-глюкозы. Изучение кинетики гидролиза целлюлозы показало, что свыше 99 % связей в ее молекулах имеет один и тот же характер (β-1,4-связи) [94]. Существование в молекулах целлюлозы связей другого типа не доказано.



(6)

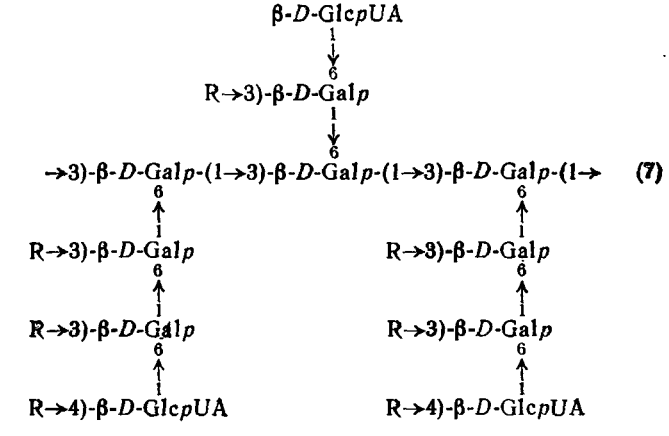
Характерные свойства целлюлозы обусловлены тенденцией ее индивидуальных цепей образовывать микрофибриллы за счет меж- и внутримолекулярных водородных связей, что приводит к высокоупорядоченной структуре. Аналогичным образом микрофибриллы образуют волокно; ось волокна расположена под углом к осям микрофибрилл, а индивидуальные молекулы лежат параллельно оси микрофибриллы. Такое регулярное расположение молекул достаточно для получения рентгенограмм, из которых видно, что структуры целлюлозы из любого природного источника в основном аналогичны [95], однако отличаются от структуры целлюлозы, регенерированной из ее производных или выделенной из раствора. Тип кристаллической структуры, характерной для природной цел-

люлозы, называют целлюлозой I, а для регенерированной целлюлозы — целлюлозой II. С помощью рентгеноскопии можно обнаружить еще четыре структурные модификации целлюлозы [96]. Рентгенограммы целлюлоз III_I и IV_I аналогичны рентгенограммам целлюлозы I, а целлюлоз III_{II} и IV_{II} — рентгенограммам целлюлозы II. Конформации молекул этих полимеров в растительной клетке различны, однако структурные модификации семейства целлюлозы I(I, III_I и IV_I) имеют «изогнутую» конформацию, а II(II, III_{II} и IV_{II})— «изогнуто-скрученную» [97]. Первоначально предлагали структуры, основанные на «прямых» конформациях цепи [98], в которой все остатки глюкозы лежат в одной плоскости. «Изогнутая» конформация более выгодна, так как исключает затруднения, связанные с перекрыванием ван-дер-ваальсовых радиусов атомов О-2 и С-6 и отталкиванием между атомами водорода при С-1 и С-4, и сохраняет внутримолекулярные водородные связи, что согласуется с данными ИК-спектроскопии в поляризованном свете [99]. Целлюлоза II, как оказалось, термодинамически более устойчива, чем целлюлоза [100].

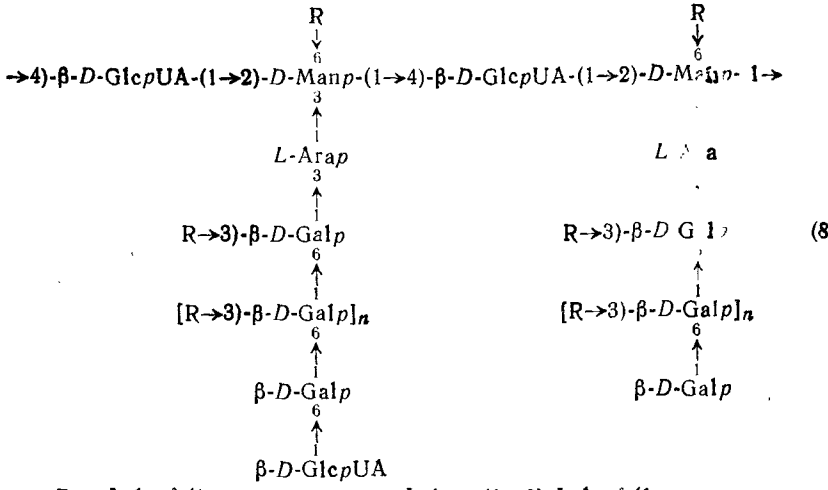
26.3.3.3. Камеди

Растительные камеди являются в основном высокоразветвленными полисахаридами, содержащими остатки гексуроновых кислот в солевой форме и ряд остатков нейтральных моносахаридов, которые часто этерифицированы. Камеди могут образовываться самопроизвольно или при повреждении коры или плодов, выделяются в виде вязких жидкостей, которые застывают в виде стеклообразной массы и защищают места повреждения от микроорганизмов. Многие камеди находят промышленное применение в качестве загустителей или стабилизаторов эмульсий. Для определения строения камедей используют разницу в скоростях гидролиза различных гликозидных связей, получая путем избирательного распада олигосахариды, структура которых может быть установлена более легко и точно. Наиболее часто проводят аутогидролиз (нагревание кислой камеди в водном растворе), мягкий гидролиз 0,01 *М* кислотой для отщепления *L*-арабинофуранозных звеньев, гидролиз 0,1—0,5 *М* кислотой или продолжительный аутогидролиз для разрушения более лабильных связей между остатками гексопираноз и жесткий кислотный гидролиз 0,5 *М* серной кислотой для отщепления всех моносахаридных остатков за исключением гексуроновых кислот, что приводит к выделению кислых олигосахаридов, в частности дисахаридов, содержащих один остаток гексуроновой кислоты. Распространению камедей в природе и их экстракции посвящены обзоры [101—103]; во многих случаях приведено строение индивидуальных представителей этого класса соединений. В некоторых случаях, как оказалось, строение камедей близко к строению других менее сложных растительных полисахаридов [102].

Гуммиарабик, камедь из различных видов *Acacia*, является, по-видимому, наиболее известным примером растительной камеди и типичным представителем ряда камедей, содержащих внутренние цепи из остатков β-(1→3)-связанной *D*-галактозы. К этим цепям присоединены цепи, в состав которых входят остатки *L*-арабинофуранозы, *L*-рамнопиранозы и *D*-глюкопирануроновой кислоты. Аутогидролиз арабиковой кислоты (кислой формы гуммиарабика) приводит к *L*-арабинозе, *L*-рамнозе и дисахариду *D*-галакто-*L*-арабинозе; следовательно, эти остатки присоединены к основным цепям. В общем виде строение этого полисахарида изображено формулой (7), в которую не включены уникальные моно- и дисахаридные звенья, присоединенные к внешней цепи. Ряд других камедей из *Acacia*, как было показано, имеет один и тот же *D*-галактановый кор, но различные степень разветвленности [104], природу и способ присоединения периферических остатков *L*-арабинозы и *L*-рамнозы. Некоторые камеди, например камедь из *A. karroo* [105], также содержат остатки α-*D*-глюкопирануроновой кислоты, присоединенные (1→4)-связями к остаткам *D*-галактозы. Камеди из растений семейства *Acacia* подгруппы Juli florae содержат большее число кислотных групп и метоксигрупп и имеют более высокую молекулярную массу, но содержат меньше остатков *L*-рамнозы и *L*-арабинозы [106].

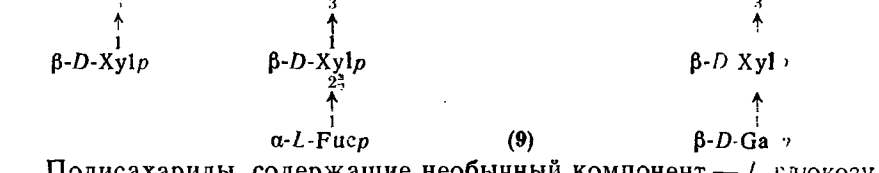


Камедь из *Anogeissus latifolia* имеет внутренние цепи, состоящие из чередующихся остатков *D*-глюкуроновой кислоты и *D*-маннозы с высоким содержанием концевых остатков *L*-арабинофуранозы. Небольшое количество *L*-арабинопиранозных звеньев присутствует в более кислотоустойчивой части полисахарида. В формуле (8) показаны основные структурные особенности этой камеди.



(8)

Трагакантовая камедь содержит внутренние цепи, состоящие из 4-*O*-замещенных остатков α-*D*-галактуроновой кислоты и является примером камеди, родственной по строению пектовым кислотам (см. разд. 26.3.3.5). Камеди из растений родов *Sterculia* и *Khaya* имеют внутреннюю цепь из остатков галактуроновой кислоты, но с включением в нее различного числа остатков 2-*O*-замещенной *L*-рамнозы и ряда других моносахаридов (в том числе *D*-глюкуроновой кислоты) в качестве невосстанавливающих концевых остатков. Трагакантовая камедь лишь частично растворима в воде, однако ее основной компонент, трагакантовая кислота, был выделен. Установлено, что трагакантовая кислота (**9**) состоит из остатков *D*-галактуроновой кислоты, *D*-ксилозы, *L*-фукозы и *D*-галактозы и содержит небольшие количества *D*-глюкуроновой кислоты, *L*-рамнозы и *L*-арабинозы. В качестве минорного компонента в этой камеди обнаружен высокоразветвленный *L*-арабино-*D*-галактан [107].



(9)

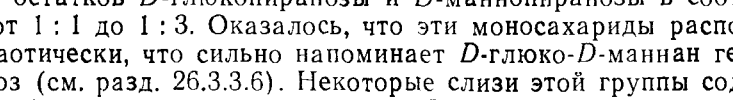
Полисахариды, содержащие необычный компонент — *L*-глюкозу, обнаружены в камеди мескитового дерева (см. также разд. 23.3.3.7).

26.3.3.4. Слизи

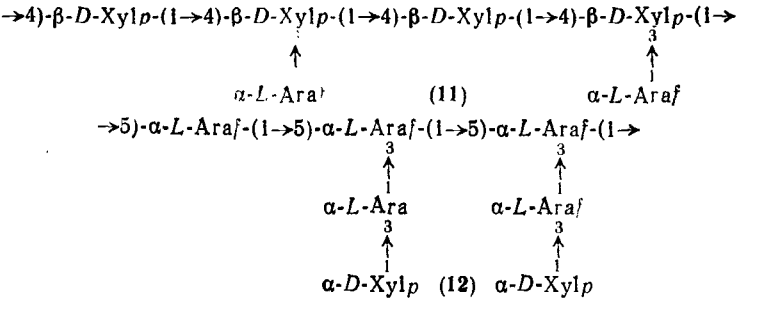
Слизи выделяют из коры, семян, корней и листьев растений. В их состав входят кислые и нейтральные полисахариды. В семе-

нах они, по-видимому, играют роль резервуаров для удерживания воды, чтобы защитить семена от обезвоживания.

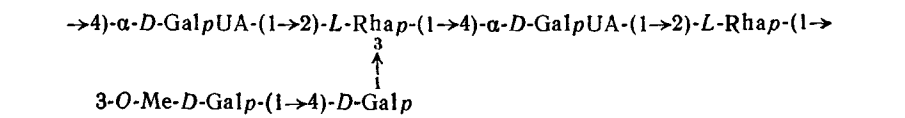
Слизи семян бобовых растений являются *D*-галакто-*D*-маннанами; в семенах других растений обнаружены *L*-арабино-*D*-ксиланы и *D*-ксило-*L*-арабинаны, а также кислые полисахариды. В зависимости от источника выделения соотношение моносахаридов в этих полисахаридах различно, однако их молекулы построены по одному плану; они содержат цепи (**10**), состоящие из β-(1→4)-связанных остатков маннозы, к которым (1→6)-связями присоединены через разные интервалы боковые цепи, состоящие из одного остатка α-*D*-галактозы. Например, у гуарана остаток *D*-галактозы присоединен к каждому второму остатку маннозы [108], а у маннанов из плодов фителéфаса [109] содержание галактозы очень малó. Слизи из семян и луковиц ряда растений, например семян ириса и луковиц лилии, представляют собой в основном линейные *D*-глюко-*D*-маннаны, цепи которых состоят из связанных (1→4)-связями остатков *D*-глюкопиранозы и *D*-маннопиранозы в соотношении от 1 : 1 до 1 : 3. Оказалось, что эти моносахариды расположены хаотически, что сильно напоминает *D*-глюко-*D*-маннан гемицеллюлоз (см. разд. 26.3.3.6). Некоторые слизи этой группы содержат в небольшом количестве остатки *D*-галактопиранозы в виде состоящих из одного моносахаридного остатка боковых цепей.



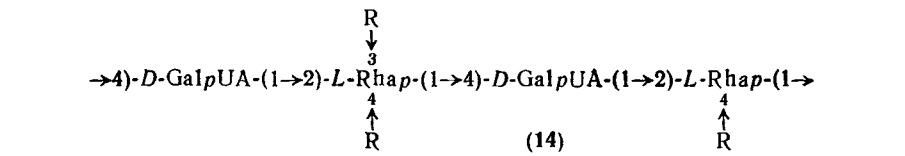
Другая группа нейтральных слизей (ассоциированных с кислыми полисахаридами) выделена из хлебных злаков и состоит из высокоразветвленных *L*-арабино-*D*-ксиланов. Эти слизи (**11**) построены из β-(1→4)-связанных остатков *D*-ксилозы, к которым через нерегулярные промежутки присоединены α-(1→3)-связью остатки α-*L*-арабинофуранозы. Слизь из семян кресс-салата содержит нейтральный полисахарид (**12**), цепи которого построены из α-(1→5)-связанных остатков *L*-арабинофуранозы; к этим цепям присоединены остатки *L*-арабинозы и *D*-ксилозы.



Кислые слизи охарактеризованы хуже; тем не менее показано, что они содержат цепи из чередующихся остатков *D*-галактуроновой кислоты и *L*-рамнозы, к которым присоединены боковые цепи, состоящие из остатков 3-*O*-метил-*D*-галактозы, *D*-галактозы, *L*-рамнозы и *D*-ксилозы, а также 4-*O*-метил-*D*-глюкуроновой кислоты. Слизи из вяза ржавого (**13**) [110] и семян кресс-салата (**14**) [111] являются типичными представителями этого класса соединений.



(13)



(14)

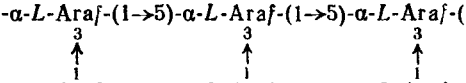
R = *L*-Rha*p*-(1→, *D*-Gal*p*-(1→ 4-*O*-Me-*D*-Glc*p*UA-(1→4)-*D*-Gal*p*-(1→, *D*-Xyl*p*-(1→4)-*D*-Gal*p*-(1→

26.3.3.5. Пектиновые вещества

Пектиновые вещества (пектины) обнаружены в первичных клеточных стенках и межклеточных слоях наземных растений. Их содержание достигает 15 % в яблоках и 30 % в кожуре плодов цитрусовых; в тканях деревьев содержание пектинов невелико. Полисахариды, в состав которых часть *D*-галактуроновой кислоты входит в виде ее метилового эфира, называют пектиновыми кислотами, а полисахариды, у которых остатки *D*-галактуроновой кислоты не этерифицированы, — пектовыми кислотами. Пектиновые кислоты очень легко экстрагируются водой и способны образовывать гели; эта способность используется для приготовления желе из фруктовых соков. В отличие от них пектовые кислоты часто существуют в виде кальциевых солей входящих в их состав гексуроновых кислот, менее растворимы и для их экстракции требуется применение бис[ди(карбоксиметил)амино]этана (H_4-ЭДТА, этилендиаминтетрауксусной кислоты) или гексаметафосфата натрия. К пектиновым веществам относятся гомополисахариды — *D*-галактаны, *L*-арабинаны и *D*-галактуронаны, однако самыми распространенными пектиновыми веществами являются гетерополисахариды, содержащие как кислые, так и нейтральные сахара.

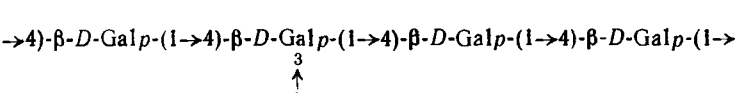
Изучение строения гомополисахаридных пектинов позволило установить основные структурные особенности более сложных пектинов. Повышенная чувствительность пектинов к кислотному и щелочному гидролизу может означать, что эти гомополисахариды получаются при деградации более сложных природных полисахари-

дов. *D*-Галактаны, цепи которых состоят из β-(1→4)-связанных остатков *D*-галактозы, выделены из семян белого люпина [112], а также древесины красной ели. Более сложный кислый *D*-галактан с такими же основными структурными особенностями выделен из ели европейской [113]. Высокоразветвленные *L*-арабинофурананы (**15**), не содержащие остатков других моносахаридов, выделены из семян горчицы [114], а *D*-галактуронан — из головок подсолнечника [115], хотя кислые гомополисахариды такого типа встречаются редко; *D*-галактуроновая кислота чаще входит в состав гетерополисахаридных пектинов. *D*-Галактуронан имеет линейные цепи, состоящие из α-(1→4)-связанных остатков *D*-галактуроновой кислоты.



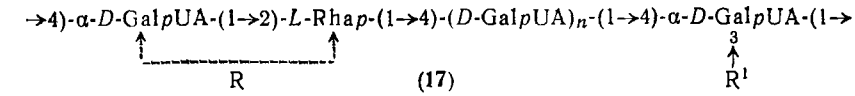
(15)

Пектин (**16**) из соевых бобов является характерным примером *L*-арабино-*D*-галактанов, единственной известной группы нейтральных гетерополисахаридных пектинов, содержащих цепи, составленные из β-(1→4)-связанных остатков *D*-галактозы, к которым (1→3)-связями присоединено различное число остатков *L*-арабинозы.



(16)

Пектовые и пектиновые кислоты обычно содержат различные количества нейтральных моносахаридов (обычно 10—25 %), причем в основную цепь могут входить только остатки *L*-рамнозы; остатки других моносахаридов присоединены в виде боковых цепей (**17**). На примере пектовых кислот, выделенных из соевых бобов, впервые было показано, что боковыми цепями являются остатки *D*-ксилозы [116], как и в трагакантовой кислоте.



(17)

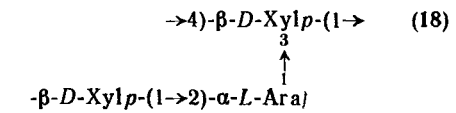
$R = (D\text{-Gal}p)_n\text{-}(1\rightarrow$, $(L\text{-Ara}f)_n\text{-}(1\rightarrow$; $R^1 = \beta\text{-}D\text{-Xyl}p\text{-}(1\rightarrow$,
α-*L*-Fuc*p*-(1→2)-*D*-Xyl*p*-(1→, β-*D*-Gal*p*-(1→2)-*D*-Xyl*p*-(1→

26.3.3.6. Гемицеллюлозы

Гемицеллюлозы обнаружены вместе с целлюлозой в клеточных стенках растений; первоначально полагали, что они являются предшественниками целлюлозы. В настоящее время показано, что они не участвуют в биосинтезе целлюлозы, а представляют отличную

от нее, отдельную группу полисахаридов; их взаимоотношениям в развивающихся растительных клетках посвящен обзор [117]. Обычно гемицеллюлозами называют полисахариды клеточной стенки наземных растений (кроме целлюлозы и пектинов) и классифицируют по типу входящих в их состав моносахаридных звеньев. Молекулы большинства гемицеллюлоз относительно небольшие и содержат 50—200 моносахаридных остатков; молекулы гемицеллюлозы из твердой древесины имеют больший размер (150—200 звеньев). Некоторые из этих соединений имеют кристаллическую структуру; было найдено, что основная цепь молекул *D*-ксиланов [118] состоит из остатков *D*-ксилозы, повернутых относительно друг друга на 120°.

Среди гемицеллюлоз наиболее распространены *D*-ксиланы, находящиеся во всех частях наземных растений в количестве 7—30 %. Основная цепь такого ксилана обычно имеет линейное строение и состоит из β-(1→4)-связанных остатков *D*-ксилозы. Гомогликаны не имеют широкого распространения. Типичным представителем гомогликанов является *D*-ксилан из травы альфа, состоящий из β-(1→4)-связанных остатков *D*-ксилозы; поскольку при анализе этих цепей методом метилирования было выделено небольшое количество 2,3,4-три-*O*-метил-*D*-ксилозы, в них содержится единственная точка ветвления при С-3 остатка *D*-ксилозы. Самой распространенной гемицеллюлозой мягких сортов древесины является (*O*-ацетил-*L*-арабино)-(4-*O*-метил-*D*-глюкуроно)-*D*-ксилан, а наиболее распространенной боковой цепью — α-(1→2)- или, реже, α-(1→3)-связанный остаток 4-*O*-метил-*D*-глюкуроновой кислоты; однолетние растения содержат остатки неметилированных моносахаридов. Число содержащих *D*-глюкуроновую кислоту боковых цепей в ксиланах из разных растений неодинаково; так, *D*-ксиланы из твердых сортов древесины содержат в среднем один остаток этой кислоты на 10 остатков *D*-ксилозы. Другой обычной для ксиланов боковой цепью является α-(1→3)-связанная *L*-арабиноза, однако такие остатки не всегда являются терминальными невосстанавливающими звеньями. Так, например, в ксилане (18) из шелухи ячменя содержатся нетерминальные остатки *L*-арабинозы [119].

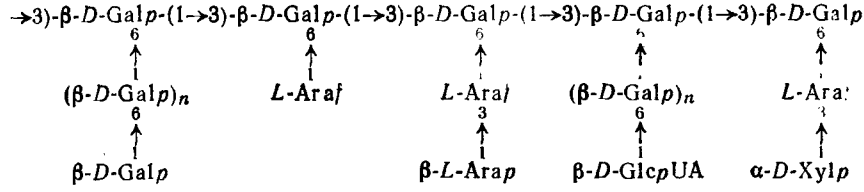


(18)

D-Маннаны, состоящие не менее чем на 95 % из остатков маннозы, содержатся в плодах фителéфаса, зеленых бобах кофе и ряде других растительных источников и имеют общую углеводную структуру [120], построенную из линейных цепей β-(1→4)-связанных остатков *D*-маннозы; длина таких цепей зависит от источника выделения. *D*-Глюко-*D*-маннаны были выделены из твердых сортов древесины; соотношение *D*-глюкозы и *D*-маннозы в этих соединениях составляет 1 : 2. При частичном кислотном гидролизе этих

глюкоманнанов образовывались дисахариды, содержащие *D*-глюкозу и *D*-маннозу, а также целлобиоза, маннобиоза и маннотриоза. Это свидетельствует о статистическом распределении β-(1→4)-связанных остатков *D*-глюкозы и *D*-маннозы в линейных цепях. Аналогичные соединения были выделены из семян некоторых ирисов и орхидей и луковиц лилий, причем соотношение *D*-глюкозы и *D*-маннозы у них колебалось от 1 : 1 до 1 : 4. *D*-Галакто-*D*-глюко-*D*-маннаны содержатся наряду с *D*-глюко-*D*-маннанами в древесине хвойных пород. Их анализ показал наличие одинаковой с *D*-глюко-*D*-маннанами основной цепи; в качестве боковых цепей они содержат единичные α-(1→6)-связанные остатки *D*-галактозы. Показано также, что на невосстанавливающих концах цепей находятся остатки *D*-глюкозы и *D*-маннозы. Наличие боковых цепей придает этим соединениям бóльшую растворимость по сравнению с *D*-глюко-*D*-маннанами, так как мешает образованию сильных межмолекулярных водородных связей (как и в случае других гемицеллюлоз, боковые цепи которых состоят из остатков 4-*O*-метил-*D*-глюкуроновой кислоты, *L*-арабинозы и *O*-ацетилированных моносахаридов).

Другой группой гемицеллюлоз являются водорастворимые *L*-арабино-*D*-галактаны. Они представляют собой высокоразветвленные молекулы с цепями, состоящими из β-(1→3)-связанных остатков *D*-галактозы, к которым присоединены боковые цепи из остатков *L*-арабинофуранозы и *L*-арабинопиранозы, а также *D*-галактозы и *D*-глюкуроновой кислоты. Типичным представителем подобных соединений является *L*-арабино-*D*-галактан (**19**) из сосны приморской.



(19)

26.3.3.7. Другие полисахариды растений

Лихенан, выделенный из исландского мха, является *D*-глюканом; его линейные цепи содержат остатки *D*-глюкозы, связанные статистически распределенными β-(1→4)- или β-(1→3)-связями, причем первый тип связи преобладает (около 70 %). Исландский мох содержит также полисахарид, являющийся аналогом лихенана, так называемый изолихенан. Он состоит из α-(1→4)- и α-(1→3)-связанных остатков D-глюкозы с преобладанием последнего типа связи. Кроме того, цепи изолихенана короче (40—45 моносахаридных звеньев), чем у лихенана (60—360 звеньев). Эти полисахариды важны для понимания механизма действия гликаназ [121].

Из растений выделен ряд гликанов. Нигеран является α-*D*-глюканом с приблизительно равным числом чередующихся α-(1→3)- и α-(1→4)-связей. К β-*D*-глюканам, найденным в растениях, относится пустулан, содержащий β-(1→6)-связи. Обычно в растениях имеются также фруктаны, функционирующие в качестве резервных углеводов сами по себе или вместе с крахмалом. Они состоят из остатков β-*D*-фруктофуранозы, присоединенных друг к другу (2→1)-связями в инулинах и (2→6)-связями в леванах. Фруктаны обычно содержат на невосстанавливающем конце остатки *D*-глюкозы и имеют относительно низкую молекулярную массу (~8000). Леваны из трав состоят в основном из линейных цепей, содержащих 20—30 моносахаридных звеньев.

В ряде растений, включая тамаринд и настурцию, обнаружена группа водорастворимых полисахаридов, названных амилоидами из-за способности давать цветную реакцию с иодом. Они состоят из β-(1→4)-связанных остатков *D*-глюкозы, к которым присоединены α-(1→6)-связями боковые цепи из остатков *D*-ксилозы и 2-*O*-β-*D*-галакто-α-*D*-ксилозы [122].

Среди продуктов гидролиза листьев джута и растений рода *Grindelia* обнаружен необычный моносахарид — *L*-глюкоза.

26.3.3.8. Полисахариды водорослей

К водорослям относятся как микроскопические одноклеточные организмы, так и морские водоросли, тело которых может достигать более 45 м в длину. Из водорослей выделено большое число полисахаридов, однако их строение все еще до конца не определено; этим соединениям посвящены обзоры [103, 124].

Основные резервные полисахариды водорослей включают крахмалоподобные полисахариды и ламинаран. Зеленые, красные и сине-зеленые морские водоросли, а также пресноводные водоросли содержат полисахариды типа крахмала, также состоящие из амилозы и амилопектина. Отсутствие амилозы в некоторых экстрактах может объясняться ее деструкцией при выделении в кислотных или щелочных растворах. В отличие от крахмалов растений крахмалы водорослей дают менее вязкие растворы и обладают более низкой способностью связывать иод, что указывает на меньший размер их молекул. Наличие молекул меньшего размера продемонстрировано также с помощью рентгеноструктурного анализа, который показал, что гранулы этих крахмалов имеют более простую организацию, но все еще обладают характеристиками растительных крахмалов. Крахмалы водорослей более чувствительны к действию амилолитических ферментов. Средняя длина их цепи составляет 10—19 структурных единиц; в их молекулах обнаружено небольшое число α-(1→3)-связей [125].

Ламинаран является водорастворимым β-*D*-глюканом и служит основным резервным полисахаридом ряда бурых водорослей, в

частности морской капусты (*Laminaria*). Его молекулы построены из остатков *D*-глюкозы, присоединенных друг к другу β-(1→3)- и β-(1→6)-связями и образующих цепи, в которых имеется несколько точек ветвления с β-(1→6)-связями. Концевыми звеньями являются восстанавливающая *D*-глюкоза или невосстанавливающий *D*-маннит. Соотношение этих так называемых G- и M-цепей может быть различным, но в большинстве образцов они имеются в приблизительно равных количествах. Средняя длина неразветвленных цепей составляет 7—11 остатков; общее число моносахаридных звеньев для растворимых форм ламинарана около 30, следовательно, такая молекула содержит 2—3 точки ветвления. Молекула нерастворимой формы ламинарана состоит из 16—24 моносахаридных звеньев при средней длине цепи 15—19 звеньев, т. е. в основном она имеет линейное строение. В *D*-глюканах, выделенных из водорослей семейств Chrysophycaae и Bacillariophycaae, не обнаружены цепи, оканчивающиеся остатком *D*-маннита; в остальном эти соединения сходны с ламинараном.

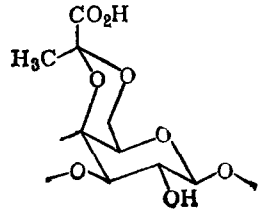
Бурые, красные и зеленые водоросли содержат и структурные полисахариды. К ним относится целлюлоза, в основном сходная с целлюлозой наземных растений, которая составляет около 10 % сухой массы водорослей. С ней очень тесно ассоциированы различные гемицеллюлозы и сходные соединения, включая *D*-маннаны, *D*-ксиланы и полисахарид типа лихенана (см. разд. 26.3.3.7), состоящий из линейных цепочек β-(1→4)- и β-(1→3)-связанных остатков *D*-глюкозы с относительно меньшим, чем в растительном лихенане, числом β-(1→3)-связей. *D*-Маннаны, выделенные из красных морских водорослей, как и *D*-маннаны из плодов фителéфаса, состоят в основном из линейных цепей, построенных примерно из 16 остатков *D*-маннозы, связанных β-(1→4)-связями. Найденные в морских водорослях *D*-ксиланы отличаются от *D*-ксиланов из наземных растений; являясь в основном истинными *D*-ксиланами, они могут содержать, как в случае красной морской водоросли *Rhodymenia palmata*, цепи, построенные из β-(1→3)- и β-(1→4)-связанных моносахаридных остатков с нерегулярным распределением этих типов связей [126], а в случае *D*-ксилана из зеленой морской водоросли *Caulerpa filiformis* цепи состоят только из β-(1→3)-связанных остатков *D*-ксилозы [127].

Альгиновые кислоты являются компонентами бурых водорослей и имеют промышленное значение. Эти полисахариды предотвращают обезвоживание морских водорослей при попадании их на открытый воздух, например при отливе. В промышленности альгиновые кислоты используют в качестве загустителя и стабилизатора эмульсий. Показано, что молекулы этих соединений легко образуют волокна, которые по данным рентгеноструктурного анализа в основном линейны. Вначале полагали, что альгиновые кислоты являются *D*-маннуронанами с β-(1→4)-связями между моносахаридными звеньями, однако в их составе обнаружены остатки *D*-маннуроновой и *L*-гулуроновой кислот. При частичном гидро-

лизе из этих соединений образовывались продукты, состоящие из остатков либо одной, либо другой кислоты, и ряд олигосахаридов, содержащих остатки обеих кислот. Предполагают, что в альгиновых кислотах имеются кристаллические области из остатков β-*D*-маннуроновой и α-*L*-гулоновой кислот и аморфные участки, построенные из (1→4)-связанных остатков обеих кислот [128].

Из водорослей выделены также сульфатированные полисахариды, к которым относятся каррагинан и агар. Каррагинан может быть разделен на ряд полисахаридов, соотношение между которыми колеблется в зависимости от вида водоросли, времени года и окружающих условий. Они построены из сульфатированных остатков *D*-галактозы с чередованием β-(1→3)- и α-(1→4)-связей, причем степень сульфатирования и положение сульфатных групп варьируют. Например, ж-каррагинан — это нерастворимый галактан, содержащий чередующиеся остатки 3-*O*-замещенного β-*D*-галактозо-4-сульфата и 4-*O*-замещенной 3,6-ангидро-α-*D*-галактопиранозы и небольшое число (1→4)-связанных остатков *D*-галактозо-6-сульфата [129], тогда как μ-каррагинан растворим и содержит только α-(1→3)-связанные остатки *D*-галактозо-4-сульфата и β-(1→4)-связанные остатки *D*-галактозо-6-сульфата. ι-Каррагинан включает повторяющуюся структуру из α-(1→3)-связанных остатков *D*-галактозо-4-сульфата и β-(1→4)-связанных остатков 3,6-ангидро-*D*-галактозо-2-сульфата, причем приблизительно один из десяти таких остатков замещен β-(1→4)-связанным остатком *D*-галактозо-2,6-дисульфата [130]. ξ-Каррагинан является полимером *D*-галактозо-2-сульфата с β-(1→4)- и α-(1→3)-связями [131]. λ- и χ-Каррагинаны имеют сходное строение; каждый из них состоит из α-(1→3)-связанных остатков *D*-галактозо-2-сульфата, β-(1→4)-связанных остатков *D*-галактозо-2,6-дисульфата и 3,6-ангидрогалактозо-2-сульфата, причем в χ-каррагинане содержание 3,6-ангидро-*D*-галактозы выше, чем в λ-каррагинане.

В составе агара, по-видимому, содержатся структуры трех типов с чередующимися α-(1→3)- и β-(1→4)-связями: нейтральная агароза, состоящая из β-(1→3)-связанных остатков *D*-галактозы и α-(1→4)-связанных остатков 3,6-ангидро-*L*-галактозы; «пируватированная» агароза, в которой остатки *D*-галактозы замещены пировиноградной кислотой с образованием ацетальной группировки (20), и сульфатированный галактан, который может содержать (и не содержать) несколько остатков 3,6-ангидро-*L*-галактозы или пируватзамещенной *D*-галактозы.



(20)

В водорослях обнаружен также ряд слизей, обладающих сходными свойствами, строение которых до сих пор не установлено. Они часто содержат *L*-рамнозу, *D*-ксилозу, *D*-глюкуроновую кислоту, *D*- и *L*-галактозу и *D*-маннозу. Типичными их представителями являются: полисахарид из пресноводных красных водорослей [133], который может содержать повторяющуюся последовательность из остатков *D*-галактозы и *D*-глюкуроновой кислоты, вышеуказанные нейтральные сахара и остатки метилированных *L*-рамнозы и *D*-галактозы, а также полисахарид из бурых морских водорослей [134], на невосстанавливающих концах цепей которого находятся остатки *L*-фукозы, *D*-ксилозы и *D*-галактозы, а в разветвлениях содержатся остатки *D*-маннозы и *D*-галактозы.

26.3.4. ПОЛИСАХАРИДЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

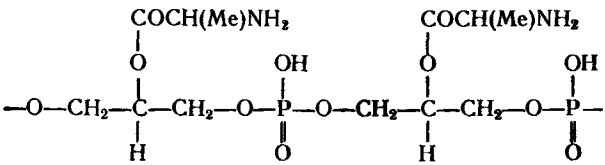
Из микроорганизмов выделено большое число полисахаридов и макромолекул, содержащих углеводные цепи, таких как гликопептиды, гликопротеины и гликолипиды [135]. Многие из этих соединений продуцируются только микроорганизмами и не обнаружены ни в растениях, ни в животных. Вещества полисахаридной природы могут быть интегральными составляющими клеточной стенки микроорганизмов, капсулы микроорганизмов или вырабатываться в культуральной жидкости.

26.3.4.1. Тейхоевые кислоты

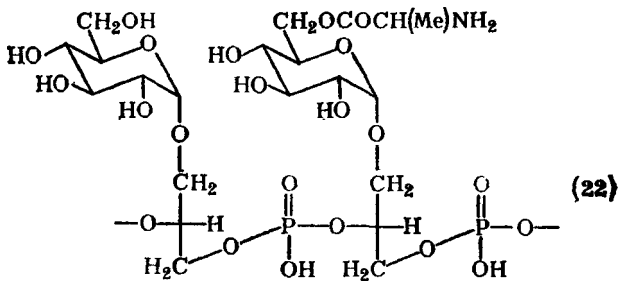
Эти необычные полимеры, содержащие остатки фосфорной кислоты, составляют до 50 % сухой массы клеточных стенок некоторых грамположительных бактерий. Они являются также мембранными и внутриклеточными компонентами бактерий. Тейхоевые кислоты прочно закреплены в клеточной стенке, и для их экстракции необходим такой реагент, как трихлоруксусная кислота. Их распространению, строению и свойствам посвящен обзор [136]. Известны тейхоевые кислоты двух типов, один из которых содержит цепи из остатков *D*-глицерина, связанных фосфодиэфирными связями; второй тип вместо *D*-глицерина содержит *D*-рибит. Рибиттейхоевые кислоты содержат углеводные остатки, присоединенные гликозидной связью; в глицеринтейхоевых кислотах углеводные остатки имеются лишь в некоторых случаях.

Простейшими тейхоевыми кислотами являются глицеринтейхоевые кислоты, например тейхоевые кислоты (**21**) из мембран *Lactobacillus casei*, у которых к основной глицерофосфатной цепи присоединены остатки *D*-аланина. Мембранные тейхоевые кислоты из *Lactobacillus arabinosus* содержат остатки *D*-глюкопиранозы, присоединенные примерно к двум из восемнадцати остатков глицерофосфата (по С-2 остатка глицерина). Бóльшая часть остальных остатков глицерина ацилирована остатками *D*-аланина [137]. Тейхоевая кислота (**22**) из клеточной стенки *Bacillus stearother-*

mophilus содержит цепь из приблизительно 18 глицерофосфатных звеньев, связанных между собой по атомам С-2 и С-3 остатков глицерина. Примерно к четырнадцати остаткам глицерина присоединены гликозидными связями остатки α-*D*-глюкопиранозы, причем половина моносахаридных звеньев этерифицирована по С-6 *D*-аланином [138].

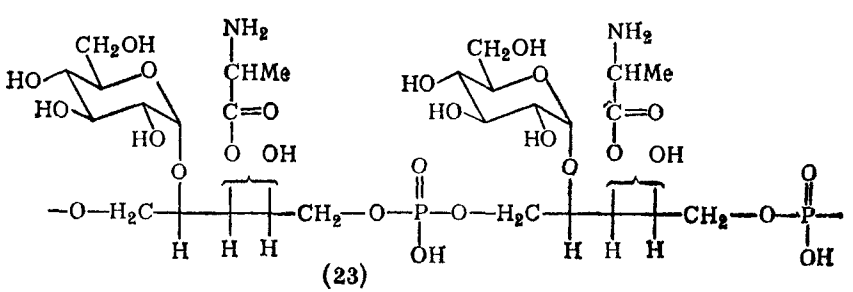


(21)



(22)

Рибиттейхоевые кислоты обнаружены только в составе клеточных стенок. В этих соединениях к остаткам рибита, связанным (1→5)-фосфодиэфирными связями, по С-4 (или по С-4 и С-3) присоединены гликозидными связями остатки моносахарида, а по С-2 или С-3 — остатки *D*-аланина [139]. Примерами этой группы соединений являются тейхоевые кислоты из клеточной стенки *Bacillus subtilis* (23) [140] и *Staphilococcus aureus* [141]; в последнем случае углеводным компонентом является 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкоза.

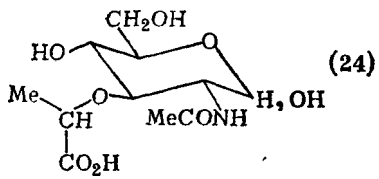


(23)

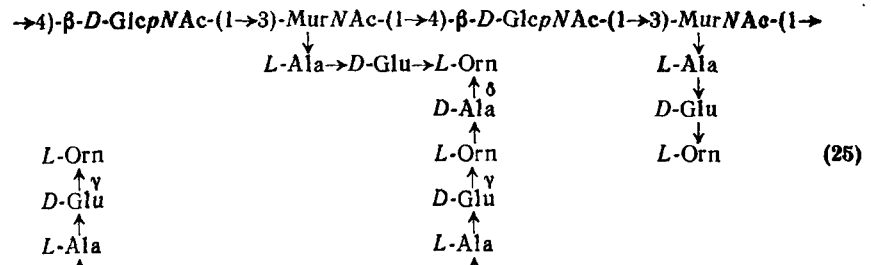
26.3.4.2. Пептидогликаны клеточной стенки (муреины)

Эти высокоразветвленные сложные макромолекулы, содержащиеся в клеточных стенках бактерий, состоят из полисахаридных цепей (построенных из остатков амнносахаров), сшитых пептид-

ными мостиками. Характерной особенностью этого уникального типа полимеров является наличие в их составе аминомоносахаридов — 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы и мурамовой кислоты [2-ацетамидо-2-дезокси-3-*O*-(2-карбоксиэтил)-*D*-глюкозы] (24), а также аминокислот — *D*- и *L*-аланина, *D*-глутаминовой кислоты, *L*-лизина и других (в зависимости от бактерии), причем вышеупомянутые моносахариды образуют линейные цепи с чередующимися звеньями. Типичным примером служит фрагмент пептидогликана (25) из *Spirohaeta stenostrepta* [142, 143]. С помощью гидролиза показано, что в клеточной стенке тейхоевые кислоты могут быть ковалентно связаны фосфодиэфирной связью с остатком мурамовой кислоты муреинов [144].



(24)



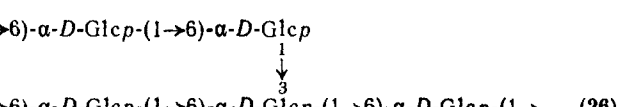
(25)

26.3.4.3. Капсулярные и внеклеточные полисахариды

Бактерии продуцируют ряд полисахаридов, сходных по свойствам с полисахаридами растений (см. разд. 26.3.3), — целлюлозы, леваны и альгиновые кислоты. Строение растительных и бактериальных полисахаридов этого типа различается незначительно. Например, бактериальные леваны имеют очень большую молекулярную массу (порядка 10^6); это разветвленные соединения, боковые цепи которых содержат около десяти β-(2→6)-связанных остатков *D*-фруктофуранозы, присоединенных к основной цепи β-(2→1)-связями. Полисахариды типа альгиновых кислот продуцируются такими бактериями, как *Azotobacter vinelandii* [145], которые вырабатывают частично ацетилированный полисахарид, состоящий в основном из остатков *D*-маннуроновой кислоты и небольшого количества *D*-гулуроиовой кислоты.

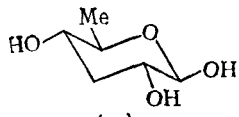
Более важное значение имеют декстраны, которые используют в качестве заменителей плазмы крови и, в модифицированной

форме, как молекулярные сита (см. разд. 26.3.7.5). Основным типом связи между остатками *D*-глюкопиранозы в этих соединениях является α-(1→6); число боковых цепей, связанных с точками ветвления α-(1→3)- и α-(1→4)-связями, зависит от источника выделения. Так, декстран из *Leuconostoc mesenteroides* [147, 148] и *Betacoccus arabinosaceous* [149] имеет в основном линейное строение с (1→3)-связанными боковыми цепями, состоящими из остатков моно- и дисахаридов, тогда как декстран из *Betacoccus arabinosaceous* представляет собой высокоразветвленную структуру (26), отдельные цепи которой состоят из 6 или 7 моносахаридных звеньев.

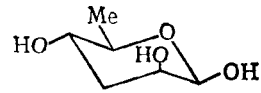


(26)

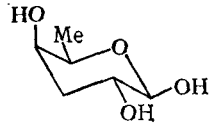
Многие грамотрицательные бактерии продуцируют полисахариды, ответственные за специфические иммунологические реакции. Некоторые из них обусловлены структурными особенностями полисахаридов капсулы. Антигенная специфичность полисахаридов обычно определяется природой невосстанавливающих концевых групп и набором антисывороток, применяемых для анализа таких полисахаридов. С помощью серологических реакций можно установить структурное сходство бактериальных полисахаридов. Кислые полисахариды из *Klebsiella aerogenes* и из *Enterobacter* 349 вступают в перекрестную реакцию (на ~50 %) с гетерологичными антителами (т. е. антителами из антисыворотки, специфичной к противоположному полисахариду). Показано, что оба эти полисахарида содержат остатки 1,3-связанной *D*-галактозы и 1,3- и 1,4-связанной *D*-маннозы. При этом в состав полисахарида из *Klebsiella aerogenes* входит *D*-маннуроновая кислота, образующая с остатками *D*-маннозы повторяющиеся дисахаридные звенья, тогда как полисахарид из *Enterobacter* содержит повторяющиеся дисахаридные звенья из *D*-маннозы, присоединенной к *D*-галактуроновой или *D*-глюкуроновой кислоте. В полисахаридах из грамотрицательных бактерий обнаружены и менее распространенные моносахариды: 3,6-дидезоксиальдогексозы — 3,6-дидезокси-*D*-*рибо*-гексоза (паратоза) (27), 3,6-дидезокси-*D*-*арабино*-гексоза (тивелоза) (28), 3,6-дидезокси-*D*-*ксило*-гексоза (абеквоза) (29), 3,6-дидезокси-*L*-*ксило*-гексоза (кометоза) (30), а также ряд альдогептоз — *L*-глицеро-*D*-манно-гептоза (31), *D*-*глицеро*-*D*-*галакто*-гептоза (32). Уникальным гомополисахаридом, найденным в грамотрицательных бактериях, является полимер 5-ацетамидо-3,5-дидезокси-*D*-*глицеро*-*D*-*галакто*-2-нонулозоновой кислоты (коломиновая кислота) (33) [150], содержащий (2→8)-связи и, в некоторых образцах, внутримолекулярные (1→9)-сложноэфирные связи между смежными остатками.



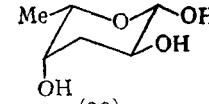
(27)



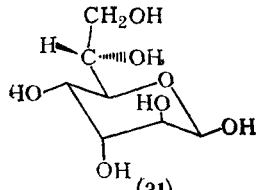
(28)



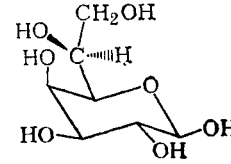
(29)



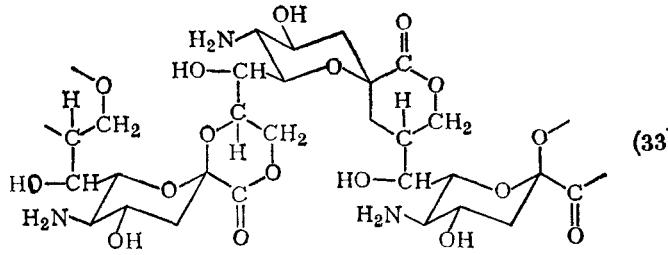
(30)



(31)



(32)



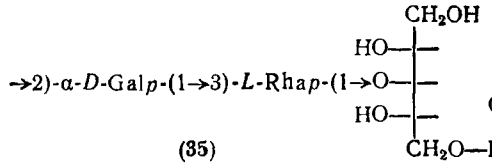
(33)

Грамположительные бактерии продуцируют группоспецифические полисахариды, имеющие сложное строение и часто содержащие остатки аминомоносахаридов наряду с нейтральными и кислыми моносахаридами. Структура ряда таких полисахаридов была определена; установлено, что в эту группу входят полисахариды различных типов [103, 151, 152, 152а]. Так, полисахариды пневмококков типа II, представляющие собой 1,6-связанный *D*-глюкан, к которому (1→4)-связями присоединены цепи, составленные из 1,3-связанных остатков *L*-рамнозы, а также остатки *D*-глюкозы и *D*-глюкуроновой кислоты; полисахариды типа III состоят из чередующихся остатков 1,3-связанной *D*-глюкуроновой кислоты и остатков 1,4-связанной *D*-глюкозы; полисахариды типа VIII содержат остатки *D*-глюкуроновой кислоты, *D*-глюкозы и *D*-галактозы в мольном отношении 1 : 2 : 1, наиболее вероятная повторяющаяся последовательность звеньев показана в формуле (34). Существует также ряд полисахаридов, имеющих структурное сходство с тейхоевыми кислотами; типичными примерами таких

соединений являются полисахариды пневмококков типа VI (35) и X_A (36), причем последний необычен тем, что содержит остатки *D*-галактозы как в пиранозной, так и в фуранозной формах.

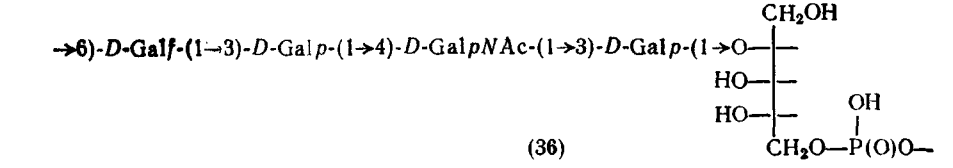
→4)-β-*D*-Glc*p*UA-(1→4)-β-*D*-Glc*p*-(1→4)-α-*D*-Glc*p*-(1→4)-*D*-Gal*p*-(1→

(34)



→2)-α-*D*-Gal*p*-(1→3)-*L*-Rha*p*-(1→O

(35)



→6)-*D*-Gal*f*-(1→3)-*D*-Gal*p*-(1→4)-*D*-Gal*p*N Ac-(1→3)-*D*-Gal*p*-(1→O

(36)

26.3.4.4. Полисахариды грибов

Полисахариды, продуцируемые грибами, составляют предмет ряда обзоров [103, 153, 154]. Из этих соединений особый интерес представляют: α-*D*-глюканы, например соединения, выделенные из клеточных стенок *Polyporus tumulosus*, которые содержат только 1,3-связанные звенья; β-глюканы, например пахиман из *Porin cocos*, также состоящий из 1,3-связанных моносахаридных остатков, и лютеоза — полимер с 1,6-связанными звеньями из *Penicillium luteum*, а также ряд резервных полисахаридов типа ламинарана, линейных или разветвленных, содержащих 1,3-, 1,4- и 1,6-связанные звенья. Другим основным типом полисахаридов грибов являются *D*-маннаны, типичными представителями которых служат *D*-маннан (37) с 1,6-связанными звеньями из *Saccharomyces rouxii* и *D*-маннан с 1,2-связями из *Saccharomyces cerevisiae*, который содержит фосфорилированные боковые цепи [155]. *D*-Галактан из *Penicillium charlesii* (галактокаролоза) является низкомолекулярным полисахаридом, состоящим из неразветвленных цепей, которые содержат около десяти β-(1→5)-связанных остатков *D*-галактофуранозы.

α-*D*-Man*p*-(1→3)-α-*D*-Man*p*-(1→2)-α-*D*-Man*p*-(1→2)-α-*D*-Man*p*-(1→

O

α-*D*-Man*p*-(1→3)-α-*D*-Man*p*→OP(O) (OH)

(37)

Выделен и охарактеризован ряд гетерополисахаридов, включая *D*-галакто-*D*-маннан из *Cladosporium herbarum* [156], который содержит остатки *D*-галактозы как в пиранозной, так и в фуранозной форме, и *D*-ксило-*D*-маннан из *Cryptococcus leuerentii* [157].

26.3.5. ЗООПОЛИСАХАРИДЫ

26.3.5.1. Гликоген

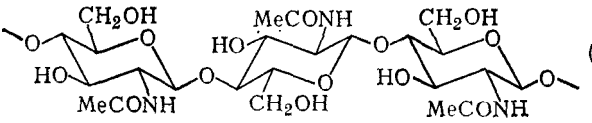
Основным резервным полисахаридом животных организмов является гликоген. Он обнаружен в большинстве животных тканей; наиболее удобными источниками для его экстракции обычно служат печень или мышечная ткань. Печень человека содержит до 10 % гликогена (от сухой массы). В отличие от крахмала выделение и очистка гликогена — непростая задача. По классическому методу ткань нагревали в сильнощелочном растворе при 100 °С в течение 3 ч для ее растворения и затем осаждали гликоген этанолом. После обнаружения факта щелочного распада (см. разд. 26.3.2.5) была разработана другая методика. При экстракции холодным разбавленным раствором трихлоруксусной кислоты был выделен продукт, молекулярная масса которого была в 10 с лишним раз больше, чем у продукта, полученного традиционным методом [158]. В настоящее время разработаны методы, позволяющие еще надежнее исключить распад в процессе выделения [159]; с их помощью можно определить действительную молекулярную массу выделенного полисахарида. Было найдено, например, что молекулярная масса гликогена из печени при общем нарушении процесса отложения в ней гликогена меньше нормальной.

Классическими методами анализа, например метилированием, показано, что гликоген состоит из α-(1→4)-связанных остатков *D*-глюкозы, и имеет α-(1,4,6)-связанные точки ветвления. Применение амилолитических ферментов для определения тонкой структуры гликогена показало, что он имеет «ветвистое» строение (см. рис. 26.3.5, *в*), причем каждая цепь состоит из 12 остатков *D*-глюкозы. Столь малая длина цепей в соединении, имеющем молекулярную массу порядка 10^7—10^8, свидетельствует о высокоразветвленной структуре, вследствие чего молекула гликогена поглощает иод в еще меньшем количестве, чем молекула амилопектина. Области густого ветвления, устойчивые к действию α-амилазы, распределены по молекуле статистически [160]. С доступностью паракристаллического гликогена стало возможным применение физических методов для более детального изучения его строения [161]. Нахождению в природе, выделению, строению и ферментативному расщеплению гликогена посвящены обзоры [162—164].

26.3.5.2. Хитин

Наиболее распространенным полисахаридом, содержащим остатки аминомоносахаридов, является хитин — структурный полисахарид панцирей ракообразных (*Crustacea*). Он имеется также в грибах и некоторых зеленых водорослях. Его строение было установлено путем выделения и анализа олигосахаридов, образующихся в результате частичного гидролиза этого полисахарида. Показано, что хитин является гомополимером 2-ацетамидо-2-де-

зокси-*D*-глюкозы, в котором моносахаридные звенья соединены друг с другом β-(1→4)-связями и образуют линейные цепи (38). Этот полисахарид можно рассматривать как аналог целлюлозы, у которого гидроксильные группы при С-2 заменены на ацетамидогруппы.



(38)

Хитин в природных источниках редко находится в индивидуальном состоянии; обычно в панцирях крабов и омаров он связан с белком, в виде комплекса или ковалентными связями [165]. Это свойство может быть объяснено недавно открытым фактом, что в большинстве хитинов не все аминогруппы *N*-ацетилированы, поэтому они могут выступать в качестве основных групп и образовывать комплексные соединения с другими молекулами, имеющими соответствующим образом расположенные ионные группы. Хитин не растворяется в воде и многих органических растворителях. Это затрудняет установление его строения и проявляется, например, в виде низкой реакционной способности при метилировании. Большинство образцов хитина в результате обработки минеральной кислотой при выделении частично *N*-дезацетилированы и имеют более низкую молекулярную массу, чем нативный хитин. Рентгеноструктурный анализ кристаллического хитина показал, что элементарное звено его макромолекулы состоит из двух цепей в изогнутой конформации с меж- и внутримолекулярными водородными связями, подобно целлюлозе (см. разд. 26.3.3.2).

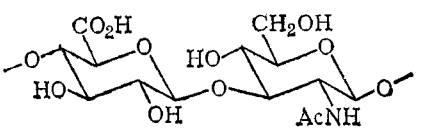
26.3.5.3. Гликозаминогликаны

Соединения этой группы, за исключением кератансульфата, построены из чередующихся остатков гексуроновых кислот и 2-амино-2-дезоксигексоз, причем последние *N*-ацетилированы, часто *O*-сульфированы, а иногда *N*-сульфированы. Исторически сложилось так, что подобные соединения имеют ряд названий, включая мукополисахариды [166] и кислые мукополисахариды. Эти названия появились до того, как стало известно, что такие полисахариды ковалентно присоединены к белку. В настоящее время углеводную часть этих соединений называют гликозаминогликанами, а полисахарид, связанный с белком, — протеогликаном [7].

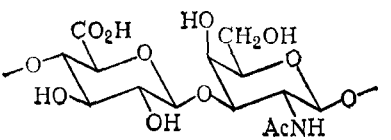
Протеогликаны являются одним из главных компонентов соединительной и других тканей. Показано, что ряд заболеваний, включающих изменение костной ткани скелета, связан с протеогликанами. Гиалуроновая кислота, образующая высоковязкие растворы, является смазкой и амортизатором в суставах конечностей. Благодаря большому размеру молекул и наличию в них заряда протеогликаны могут функционировать в качестве полупроницаемой

мембраны для удаления чужеродных веществ из организма. Единственным в своем роде среди гликозаминогликанов является гепарин, обладающий антикоагулянтным действием. Ряд хорошо изученных заболеваний (гипергликозаминогликанурия, мукополисахаридозы) связан с повышенной экскрецией различных гликозаминогликанов, присоединенных к пептидам. Во многих недавних работах была применена микротехника для демонстрации нарушений функционирования гликозаминогликана при различных состояниях тканей [131, 167] и для контроля коррекции этих нарушений во время лечения [168—170]; в настоящее время исследования направлены на распознавание таких заболеваний на основании определения химического строения гликозаминогликанов [171] и проведения скрининг-тестов [60, 172, 173]. Роли протеогликанов и гликозаминогликанов в здоровом и больном организме посвящен ряд обзоров [7,174—177].

Для гликозаминогликанов характерно наличие определенных повторяющихся дисахаридных звеньев [5]. Простейшим по строению представителем гликозаминогликанов является гиалуроновая кислота; ее повторяющееся звено (**39**) состоит из остатков *D*-глюкуроновой кислоты и 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы, связанных β-(1→3)-связью, т. е. остаток уроновой кислоты, имеющий β-конфигурацию, связан по С-1 гликозидной связью с С-3 остатка 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы. Между остатками 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы и *D*-глюкуроновой кислоты осуществляется β-(1→4)-связь. Хондроитин также является природным несульфатированным гликозаминогликаном и изомерен гиалуроновой кислоте. Его повторяющееся звено (**40**) состоит из остатка *D*-глюкуроновой кислоты, присоединенного посредством β-(1→3)-связи к остатку 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-галактозы, который в свою очередь присоединен посредством β-(1→4)-связи к следующему остатку *D*-глюкуроновой кислоты. Единственное различие между гиалуроновой кислотой и хондроитином заключается в ориентации одной гидроксильной группы в каждом втором моносахаридном остатке полисахаридной цепи.



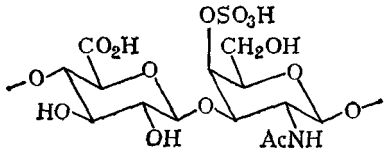
(39)



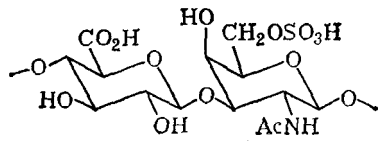
(40)

Хондроитин-4- и хондроитин-6-сульфаты являются *O*-сульфированными производными хондроитина с сульфатными группами в положениях 4 или 6 остатков 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-галактозы; повторяющимися звеньями являются дисахариды (**41**) и (**42**), соответственно. Известны хондроитинсульфаты, содержащие более одной сульфатной группы в повторяющемся дисахаридном звене. Так называемый хондроитинсульфат D, выделенный из хрящевой

ткани акулы, фактически является единственным «сверхсульфатированным» хондроитин-6-сульфатом.

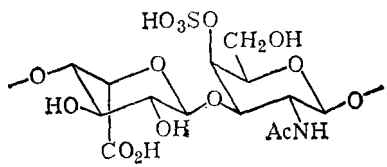


(41)



(42)

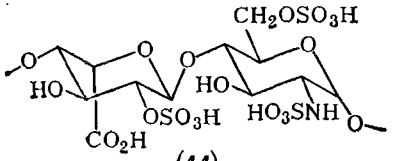
Дерматансульфат представляет собой изомер хондроитин-4-сульфата, в который вместо остатков *D*-глюкуроновой кислоты входят остатки *L*-идуроновой кислоты, однако абсолютная конфигурация связей остается той же самой. Повторяющееся звено (43) этого полисахарида отличается от повторяющегося звена хондроитин-4-сульфата только конфигурацией карбоксигруппы при С-5 в каждом втором моносахаридном звене. Однако в этом соединении один или два остатка *L*-идуроновой кислоты заменены остатками *D*-глюкуроновой кислоты [178], а повторяющееся дисахаридное звено может содержать две сульфатные группы или не содержать такие группы [179]. Несульфатированная форма дерматансульфата (изомер хондроитина и гиалуроновой кислоты) и дерматан-6-сульфат (изомер хондроитин-6-сульфата) в природе не обнаружены, но это не исключает возможности их существования. Дерматан может быть получен химическим десульфированием дерматансульфата.



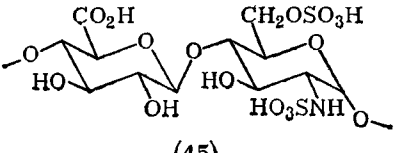
(43)

Повторяющееся звено гепарина несмотря на многочисленные попытки удалось определить лишь в конце 1960-х годов, когда было наконец доказано положение сульфатных групп. В настоящее время известно, что в молекуле гепарина имеются два повторяющихся дисахаридных звена (44) и (45). Первое содержит *O*-сульфированную в положение 2 *L*-идуроновую кислоту и 2-дезокси-2-сульфамидо-*D*-глюкозо-6-сульфат, а второе — *D*-глюкуроновую кислоту и 2-дезокси-2-сульфамидо-*D*-глюкозо-6-сульфат. Моносахаридные звенья гепарина аналогичны звеньям гиалуроновой кислоты и дерматансульфата, однако они имеют α-конфигурацию. Повторяющееся дисахаридное звено в гепарине содержит 2—3 сульфогруппы. Гепарансульфат не является (как можно подумать, судя по названию) продуктом *O*-сульфирования гепарина. Основная его углеводная цепь сходна с гепарином, однако содержит меньшее число *O*-сульфированных остатков и может содержать

N-ацетилированные звенья. Результаты ферментативного гидролиза этого полисахарида [180] и его расщепления действием азотистой кислоты [181] свидетельствуют о наличии в его молекуле повторяющихся моносахаридных блоков.

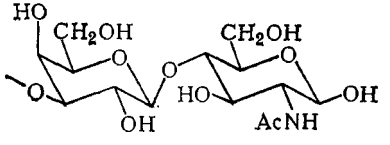


(44)



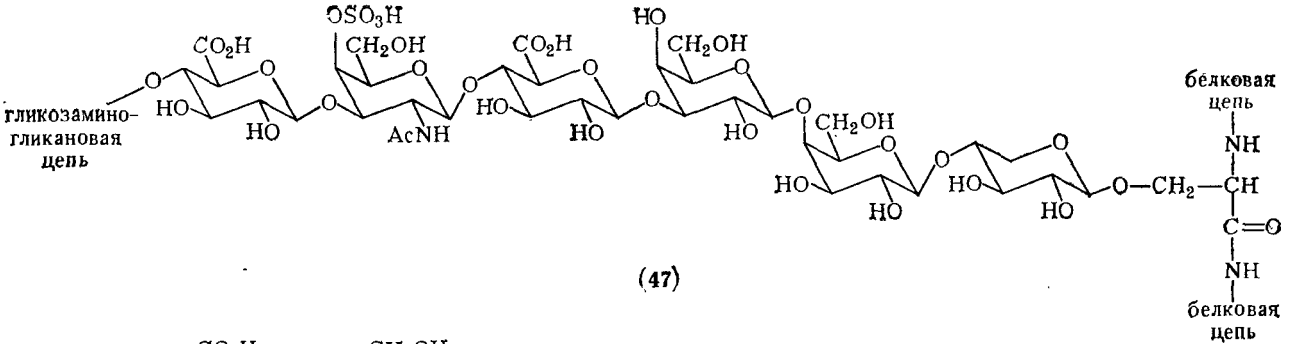
(45)

Кератансульфат в отличие от других гликозаминогликанов не содержит остатков гексуроновых кислот. Его молекула состоит из повторяющихся дисахаридных звеньев (**46**), в которые входит остаток *D*-галактозы и 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозо-6-сульфата, однако в отличие от гликозаминоглюкуронанов в них остаток *D*-галактозы связан β-(1→4)-связью с остатком 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозо-6-сульфата, который соединен β-(1→3)-связью со следующим остатком *D*-галактозы. Известны кератансульфаты, содержащие другие нейтральные сахара, например *D*-маннозу, *L*-фукозу и сиаловую кислоту [182], более чем одну сульфатную группу на дисахаридное повторяющееся звено и дополнительную сульфатную группу при С-6 нейтральных полисахаридных звеньев [183]. Иногда остатки нейтральных моносахаридов могут быть несульфатированными [184]. Хотя приведенные здесь структуры гликозаминогликанов в основном состоят из повторяющихся олигосахаридных звеньев, нужно иметь в виду, что иногда их цепи имеют нерегулярное строение; такие отклонения наиболее ярко выражены в структурах гепарина, гепарансульфата и кератансульфата [7].

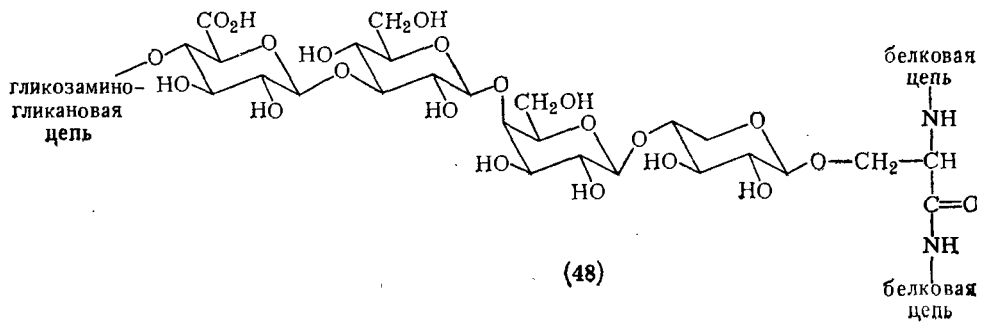


(46)

В протеогликанах гликозаминогликаны связаны с белком посредством гликопептидной связи, в которую в большинстве случаев вовлечены моносахаридные остатки, отличные от входящих в основную полисахаридную цепь. Эти связывающие моносахариды соединены друг с другом гликозидными связями, причем их терминальная восстанавливающая группа связана с боковой цепью остатка аминокислоты [185]. Одной из первых была изучена область связывания хондроитин-4-сульфата в протеогликане, ей была приписана структура (**47**). Гликопептидная связь осуществляется между восстанавливающей группой остатка *D*-ксилозы и боковой цепью остатка *L*-серина; из трех моносахаридных звеньев области связывания одним является остаток *D*-глюк-

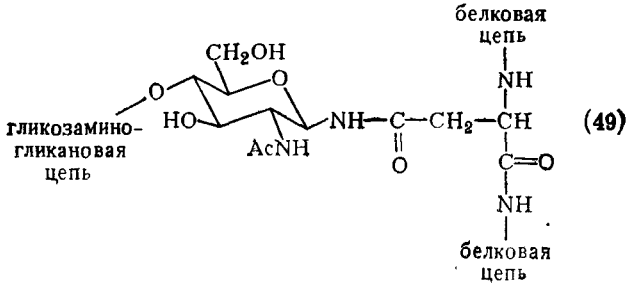

гликозамино-
гликановая
цепь
OSO_3H
CO_2H
CH_2OH
AcNH
HO
белковая
цепь
NH
CH
C=O
CH_2
O
белковая
цепь

(47)


гликозамино-
гликановая
цепь
CO_2H
CH_2OH
HO
O
белковая
цепь
NH
CH
C=O
CH_2
белковая
цепь

(48)

уроновой кислоты, а два других — это остатки *D*-галактозы. Связь хондроитин-6-сульфата и дерматансульфата с белком осуществляется одинаково: к остатку одной и той же аминокислоты присоединены одинаковые тетрасахаридные звенья (48). Не ясно, существует ли гепарин в виде протеогликана, но все образцы этого полисахарида содержат аминокислоты и область связывания также имеет структуру (48).



(49)

В кератансульфате (49) из роговицы, как и во многих гликопротеинах, остаток 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы связан с остатком *L*-аспарагина. В отличие от этого в кератансульфате из костей скелета остаток 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы связан с остатком *L*-серина или *L*-треонина, причем может также осуществляться и другой тип связи. Гликопептидные связи хондроитина и гиалуроновой кислоты полностью не описаны. Полагают, что у хондроитина она осуществляется так же, как для хондроитин-4- и -6-сульфатов, тогда как у гиалуроновой кислоты в ее образовании, возможно, участвуют остатки нейтральных моносахаридов.

Гетерогенность гликозаминогликановых цепей одного и того же протеогликана может быть объяснена особенностями метаболических процессов в ходе образования этих соединений [177], однако зависимость структуры протеогликанов от источника выделения (нормального или патологического, как, например, в случае гипергликозаминогликанурии) изучена мало. Строение белкового фрагмента протеогликанов исследовано не до конца, не определены аминокислотные последовательности.

26.3.6. ГЛИКОПРОТЕИНЫ

Белки представляют собой линейные молекулы, существующие в форме тяжей, которые могут быть изогнуты, скручены или сложены, однако ни разу не было обнаружено разветвленной структуры.

Долгое время считали, что любой углевод, найденный в белке, является примесью, и многие белки тщательно очищали, чтобы удалить все следы углеводов. Во второй половине прошлого века углеводы были обнаружены в слюне; благодаря усовершенствованию техники анализа в последние годы было установлено, что мно-

гие белки содержат углеводы и фактически являются гликопротеинами. Углеводы в гликопротеинах существуют в виде соединенных гликозидными связями углеводных звеньев, размер которых колеблется от моно- и дисахаридных до полисахаридных и которые могут быть присоединены в различные положения белковой цепи. В природе не найдены блоксополимеры с чередованием пептидных и олигосахаридных последовательностей.

По-видимому, в природе существует гораздо большее число белков, ковалентно связанных с углеводами, чем «чистых» белков. Гликопротеины широко распространены в тканях высших животных, растениях и микроорганизмах и выполняют различные функции. Так, структурными гликопротеинами являются коллаген, гликопротеины клеточной стенки бактерий, экстензин из клеточной стенки растений; резервную функцию выполняют казеин, овальбумин, гликопротеины эндосперма, аллергены цветочной пыльцы; ферментами являются рибонуклеаза В свиньи, дезоксирибонуклеаза свиньи, α-амилаза свиньи, ацетилхолинэстераза, фицин, бромелаин, такаамилаза (α-амилаза грибов), дрожжевая инвертаза (β-*D*-фруктофуранозидаза); транспортную функцию выполняют церулоплазмин, гаптоглобулин, трансферрин; гормонами служат тироглобулин, хорионический гонадотропный гормон (хорионический гонадотропин) человека, фолликулостимулирующий гормон, эритропоэтин; защитную функцию выполняют фибриноген, интерферон, иммуноглобулины, муцины; в плазме и других жидкостях организма содержатся α-, β- и γ-гликопротеины; рицин, фитотоксины грибов являются токсинами. Неизвестна функция групповых веществ крови и авидина (яичного белка). Гликопротеинам посвящены обзоры [4, 6, 186, 187]. Гликопротеины из разных источников различаются содержанием углеводов (табл. 26.3.4), а также размером и формой углеводных цепей. Роль углеводных остатков в гликопротеинах ясна не до конца. Как будет показано далее, терминальные углеводные звенья таких гликопротеинов, как групповые вещества крови, ответственны за их специфичность;

Таблица 26.3.4. Содержание углеводов в некоторых гликопротеинах

Содержание углеводов, %	Гликопротеины
80—90	Групповые вещества крови
60	Муцин подчелюстной железы собаки
~ 50	Агглютинин из картофеля. муцин подчелюстной железы овцы
~ 40	Кислый α_1-гликопротеин, экстензин
~ 20—30	Глюкозооксидаза, пероксидаза хреиа, фолликулостимулирующий гормон человека, лютеинизирующий гормон человека, фетуин, овомукоид, хорионический гонадотропный гормон человека
⩽ 10	Иммуноглобулин М человека (IgM), тироглобулин, α_2-макроглобулин быка, агглютинин из бобов сои, рибонуклеаза В, овальбумин, бромелаин, иммуноглобулин G человека

отщепление нейраминидазой остатков сиаловых кислот от гликопротеинов, обладающих антифризными свойствами, приводит к потере этих свойств. Существует ряд загадок, одна из которых связана с ферментной активностью рибонуклеаз А и В. Рибонуклеаза В, которая является гликопротеином, имеет такую же активность, как и рибонуклеаза А, которая не содержит углеводов; следовательно, наличие углеводов не влияет на активность этих ферментов. Для объяснения роли углеводов выдвинут ряд гипотез: от утверждения, что они служат для осуществления межклеточных взаимодействий и регулирования транспорта белков из одной области клетки в другую, до предположения, что углеводы придают белкам устойчивость к расщеплению ферментами и в то же время дают им возможность быть узнанными определенными рецепторными сайтами.

Поскольку многие гликопротеины содержат лишь небольшое количество углеводов, для их анализа могут быть использованы протеолитические ферменты (например, проназы); при обработке этими ферментами образуются гликопептиды с небольшим числом аминокислотных остатков, к которым присоединены интактные углеводные звенья. Такие гликопептиды анализируют [188] классическими методами периодатного окисления [189] и метилирования, а также последовательным ферментативным гидролизом (см. разд. 26.3.2.11) для идентификации моносахаридных звеньев, в результате которого получают единственный аминокислотный остаток, связанный с моносахаридным звеном. Установлено, что осуществляются только два типа такой связи: *О*-гликозидная связь с серином, треонином, гидроксипролином и гидроксилизином, и *N*-гликозидная связь с аспарагином. Показано, что в образовании таких связей могут участвовать только пять моносахаридов: *L*-арабиноза, *D*-ксилоза, *D*-галактоза, 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкоза и 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-галактоза.

26.3.6.1. Гликопротеины, обладающие гормональной активностью

Эта группа гликопротеинов включает фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон, хорионический и менопаузальный гонадотропины человека, гонадотропин сыворотки жеребых кобыл и тироидстимулирующий гормон. Первичная структура углеводных фрагментов этих гликопротеинов еще не определена из-за сложности отделения достаточного количества чистого гормона от очень похожих (по химическим и физическим свойствам) гормонов и других макромолекул, включая гликопротеины, присутствующие в окружающей среде. Методам исследования гормонов посвящен обзор [190]. Очистка отдельного гормона включает ряд стадий, причем успех этой операции зависит от специфических свойств молекулы гормона: наличия кислотных или основных групп в некоторых аминокислотных остатках и кислотных групп 5-ацет-

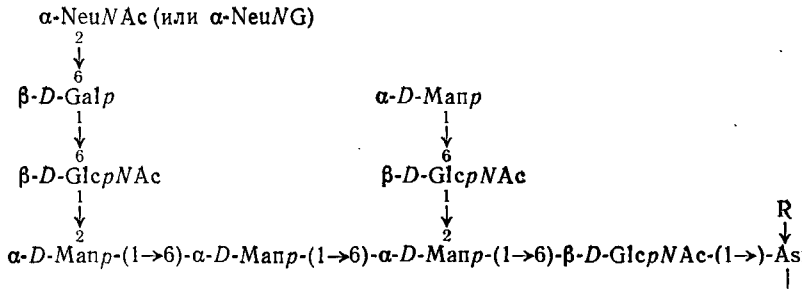
амидо-3,5-дидезокси-*D-глицеро-D-галакто*-нонулозоновой кислоты. Во время очистки необходимо контролировать активность препарата, поскольку частичная деградация молекулы может привести к полной потере биологической активности; очистку следует проводить в условиях, не слишком отличающихся от физиологических. Так, для очистки фолликулостимулирующего гормона человека используют хроматографическое разделение [191—193] на фосфате кальция, ионообменных смолах и молекулярных ситах, в результате чего получают очищенный в 5000 раз гормон [191]. Перспективным является применение для разделения методов иммуноадсорбции, поскольку теоретически очистка может быть проведена в одну стадию [194] (если предварительно гормон был очищен настолько хорошо, что это дало возможность получить специфичные к нему антитела).

С помощью иммунологических реакций гормональных гликопротеинов показано значительное сходство этих соединений. Например, антисыворотка к фолликулостимулирующему гормону перекрестно реагирует с лютеинизирующим гормоном, хорионическим гонадотропином человека и тиреостимулирующим гормоном, что указывает на наличие в молекулах этих гормонов ряда общих антигенных групп наряду с их специфическими антигенными детерминантами. Показано, что такие гормоны состоят из субъединиц [195, 196], которые могут высвобождаться при действии трипсина, растворов пропионовой кислоты (1 *М*), мочевины (8 *М*) или додецилсульфата натрия. Хотя таким образом были испытаны не все гликопротеины человека, однако в настоящее время полагают, что β-субъединицы ответственны за специфичность гормона, тогда как α-субъединицы являются взаимозаменяемыми. Такой вывод согласуется со сходством аминокислотных последовательностей в α-субъединицах и уникальным характером β-субъединиц. При совместной инкубации α- и β-субъединиц в физиологических условиях возможна их рекомбинация, причем конечная биологическая активность выше суммарной активности отдельных субъединиц. Найдено также, что субъединицы гормонов из разных источников взаимозаменяемы. Более важен, однако, тот факт, что путем комбинации субъединиц из различных гликопротеиновых гормонов могут быть получены гибридные молекулы [196, 197], причем тип гормональной активности гибридного гликопротеина определяется первоначальной активностью β-субъединицы.

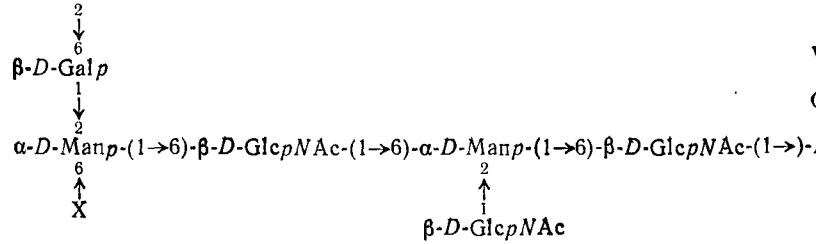
Достигнут некоторый успех в установлении строения этой группы гликопротеинов [175]. Попытка определения моносахаридной последовательности интактного фолликулостимулирующего гормона человека путем обработки гликозидгидролазами оказалась безуспешной из-за ингибирования высвобождения углеводных остатков смежными частями молекулы; однако было установлено, что на невосстанавливающем конце находятся остатки 5-ацетамидо-3,5-дидезокси-*D-глицеро-D-галакто*-нонулозоновой (сиаловой) кислоты, а рядом с ними — остатки галактозы [198]. Идентифика-

дия продуктов метилирования и последующего гидролиза методом ГЖХ и масс-спектрометрии показала, что на невосстанавливающих концах цепей находятся и остатки *L*-фукозы; остатки *D*-галактозы являются 1,2-связанными; остатки *D*-маннозы могут находиться на невосстанавливающих концах, могут быть 1,6-связанными звеньями или 1,3,4-связанными точками ветвления; обнаружены также 1,6-связанные остатки 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы; все сахара находятся в пиранозной форме [199].

Применение гликозидгидролаз и химических методов для анализа хорионического гонадотропина человека оказалось более успешным, были определены типы связей [200] и порядок расположения углеводных остатков [201, 202] в интактной молекуле этого соединения. Изучение строения чистой α-субъединицы [203] показало наличие двух гликопептидов (**50**) и (**51**).



(**50**) R = ←Val—Thr—Ser—Glu(Gln)—Ser—Thr—Cys—Cys—Val—Ala—Lys— (все кислоты *L*-ряда); G — гликолоил



(**51**)

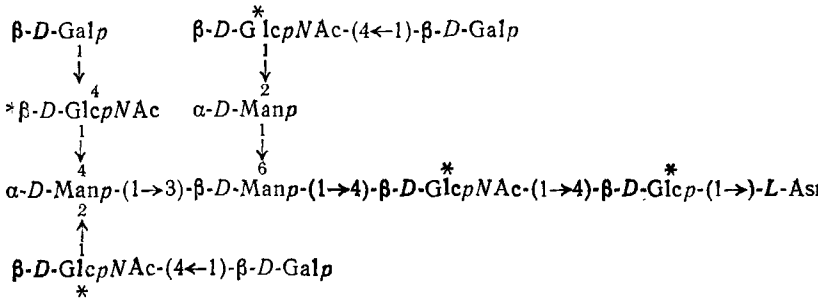
R = ←His—Thr—Ala—Cys—His—Cys—Ser—Thr—Cys—Tyr—Tyr—His—Lys—Ser—OH (все кислоты *L*-ряда); X — неизвестный заместитель

26.3.6.2. Гликопротеины сыворотки и плазмы крови

Было найдено, что многие белки, содержащиеся в плазме и сыворотке крови, являются гликопротеинами; только сывороточный альбумин и преальбумин не содержат углеводов. Строению и функциям многих из этих соединений посвящен обзор [204];

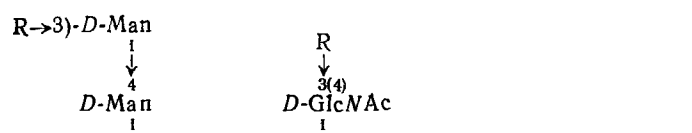
рассмотрена также роль углеводов в регулировании продолжительности жизни гликопротеинов плазмы в сыворотке [205]. Представителями этой группы гликопротеинов являются α_1-кислый гликопротеин (орозомукоид), трансферрин и фетуин.

α_1-Кислый гликопротеин является сывороточным гликопротеином и имеет наивысшее для этого ряда содержание углеводов (около 40 %). Установлению его строения посвящено большое число работ, так как при некоторых заболеваниях изменяется содержание этого соединения в сыворотке. В углеводную часть этого гликопротеина входят: 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкоза (12,2—15,3 %), *D*-манноза (4,7—6,5 %), *D*-галактоза (6,5—12,2 %), *L*-фукоза (0,7—1,5 %) и 5-ацетамидо-3,5-дидезокси-*D-глицеро-D-галакто*-нонулозоновая кислота (10,8—14,7 %), причем остатки *L*-фукозы и 5-ацетамидо-3,5-дидезокси-*D-глицеро-D-галакто*-нонулозоновой кислоты находятся на невосстанавливающих концах цепей и связаны преимущественно с остатками *D*-галактозы. Для десиалированного гликопротеина было предложено несколько возможных структур, аналогичных структуре (**52**); полагали, что он содержит кор *D*-Glc*N*Ac—*D*-Man—*D*-Glc*N*Ac—Asn [206], однако это было опровергнуто с помощью метилирования и расщепления гликозидгидролазой.



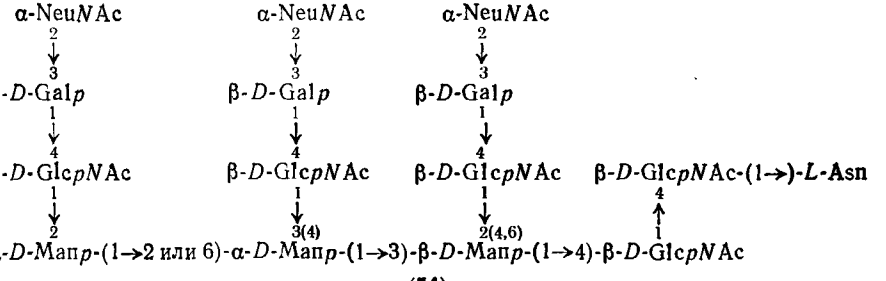
(**52**) *β-*D*-Gal*p*-(1→4)-β-*D*-Glc*p*NAc-(1→3)

Трансферрин — гликопротеин, который образует комплексы с железом и служит для перевода железа, содержащегося в тканях (особенно в печени) в резервной форме, в его метаболически активную форму в гемоглобине. Методами периодатного окисления, метилирования и расщепления гликоздазой [207] установлено, что олигосахаридные цепи трансферрина имеют структуру (**53**).



(**53**) R = Neu*N*Ac-(2→6)-*D*-Gal-[1→3(4)]-*D*-Glc*N*Ac-(1→

Фетуин является основным гликопротеином сыворотки плода коровы (постепенно он замещается нормальными гликопротеинами). По многим свойствам фетуин сходен с α_1-кислым гликопротеином, и, как было показано, его олигосахаридная цепь (54) в области кора аналогична олигосахаридной цепи α_1-кислого гликопротеина [208]. Однако в молекуле фетуина обнаружены олигосахариды (55), присоединенные гликозидной связью к остатку серина или треонина, причем некоторые из них не содержали (2→6)-связанных остатков 5-ацетамидо-3,5-дидезокси-*D-глицеро*-*D-галакто*-нонулозоновой кислоты [209], т. е. в этом гликопротеине имеются олигосахаридные цепи и другого типа.



(54)

α-NeuNAc-(2→3)-β-*D*-Gal*p*-(1→3)-α-*D*-Gal*p*NAc-(1→)-*L*-Ser(*L*-Thr)

(55)

26.3.6.3. Иммуноглобулины

Иммуноглобулинами называют группу сывороточных гликопротеинов, выполняющих функцию антител и продуцируемых в ответ на стимулирующее действие антигенов. В настоящее время известно пять классов иммуноглобулинов: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Основу структуры всех изученных иммуноглобулинов (в мономерной форме) составляют четыре полипептидные цепи, связанные дисульфидными мостиками. Обнаружены полипептидные цепи двух типов, так называемые легкие и тяжелые, причем каждый мономер содержит по две цепи каждого типа (рис. 26.3.6). Существуют два типа легких цепей — каппа ($\varkappa$) и лямбда (λ), общие для всех классов иммуноглобулинов, причем индивидуальные иммуноглобулины в мономерном виде содержат в качестве легких цепей либо две $\varkappa$-, либо две λ-цепи. Тяжелые цепи специфичны для иммуноглобулинов и определяют их класс. Каждый класс иммуноглобулинов содержит характерное для него количество углеводов, которое может колебаться от 22 моносахаридных остатков в IgG до 82 остатков в мономерном IgM. Из полимерных форм иммуноглобулинов описаны димерный IgA и пентамерный IgM. Макромолекулярный IgM, как полагают, содержит пять мономерных единиц, соединенных в виде кольца, из которого радиально выступают пять «клешней».

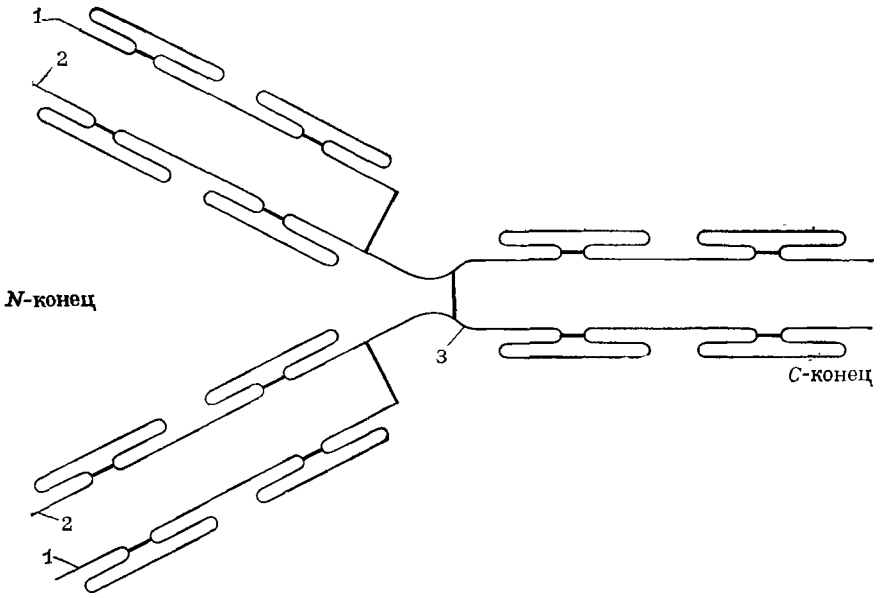
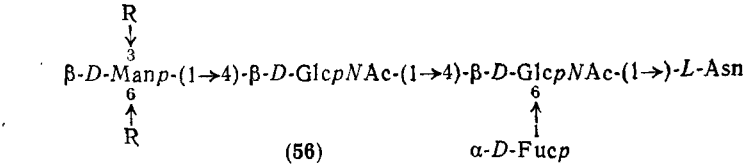


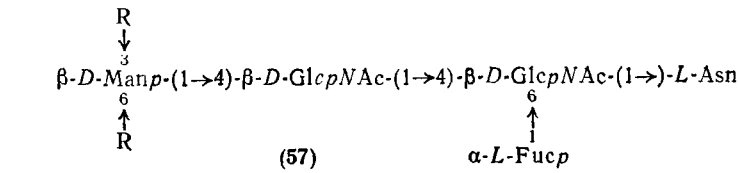
Рис. 26.3.6. Схематическое изображение молекулы иммуноглобулина:
1 — «легкие» цепи; *2* — «тяжелые» цепи; *3* — «шарнирный» участок

Первые работы по исследованию олигосахаридной части иммуноглобулинов выполнены Портером [210], а также Смитом с сотр. [211]. Показано, что нормальный IgG состоит из трех гликопептидов, содержащих два типа олигосахаридных звеньев [211]. При периодатном окислении этого иммуноглобулина разрушались не все остатки 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы и *D*-маннозы; с помощью мягкого кислотного гидролиза показано, что остатки *L*-фукозы и сиаловой кислоты находятся на невосстанавливающих концах молекулы и связаны с *D*-галактозой; остатки *D*-маннозы замещены при С-3 или находятся в точках ветвления, а некоторые остатки 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы (окисляемые периодатом) связаны по С-6 или являются терминальными. Эти результаты вместе с данными, полученными при расщеплении IgG гликозидгидролазой, позволили приписать одному из гликопептидов IgG человека структуру (56) [212]. Сходное строение имеют иммуноглобулины E [213] и A [214] человека, которые содержат разные количества невосстанавливающих концевых остатков сиаловых кислот и *D*-галактозы, что указывает на различные стадии завершенности биосинтеза внешних цепей или микрогетерогенность. В состав IgG быка [215] входит гликопептид (57), идентичный IgG человека, но не содержащий остатки сиаловой кислоты.



(56)

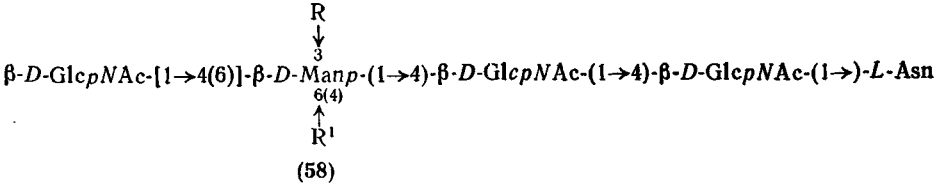
R = α-Neu*N*Ac-(2→6)-β-*D*-Gal*p*-(1→4)-β-*D*-Glc*pN*Ac-(1→2)-α-*D*-Man*p*-(1→



(57)

R = β-*D*-Gal*p*-(1→4)-β-*D*-Glc*pN*Ac-(1→2)-α-*D*-Man*p*-(1→

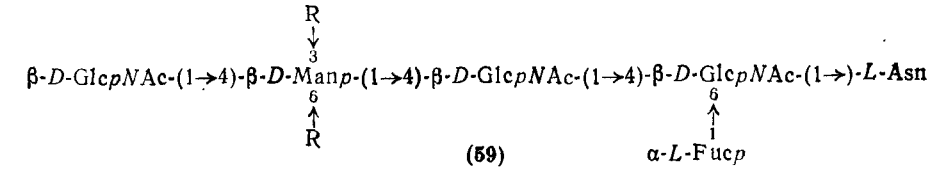
Иное строение имеет гликопептидный фрагмент иммуноглобулина А человека, миеломный гликопептид IIA (58), в котором отсутствует фукоза и имеется дополнительный остаток 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы, присоединенный к находящемуся в точке ветвления остатку *D*-маннозы [214]. Гликопептид B-3 из миеломного IgG человека отличается также строением кора (59). В гликопептиде C-1 с высоким содержанием *D*-маннозы из иммуноглобулина Е человека [216] область кора (60) сильно отличается по структуре от других гликопротеинов и состоит из чередующихся остатков *D*-маннозы и 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы, один из которых связан необычной для этих соединений α-связью. Такие изменения в строении кора следует отличать от микрогетерогенности, возникающей вследствие незавершенности внешних цепей, поскольку они могут отражать генетические различия (например, при миеломе).



(58)

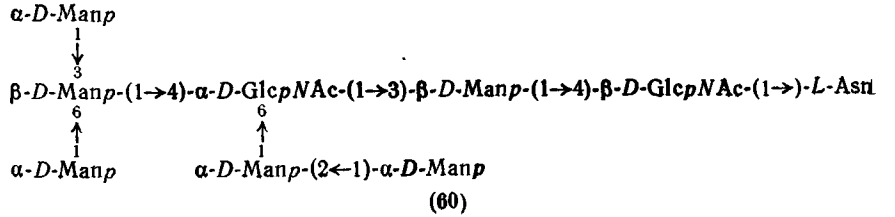
R = α-Neu*N*Ac-(2→6)-β-*D*-Glc*p*-(1→4)-β-*D*-Glc*pN*Ac-(1→2)-α-*D*-Man*p*-(1→

R¹ = α-Neu*N*Ac-(2→6)-β-*D*-Gal*p*-(1→4)-β-*D*-Glc*pN*Ac-(1→2)-α-*D*-Man*p*-(1→



(59)

R = α-Neu*N*Ac-(2→6)-β-*D*-Gal*p*-(1→4)-β-*D*-Glc*pN*Ac-(1→2)-α-*D*-Man*p*-(1→

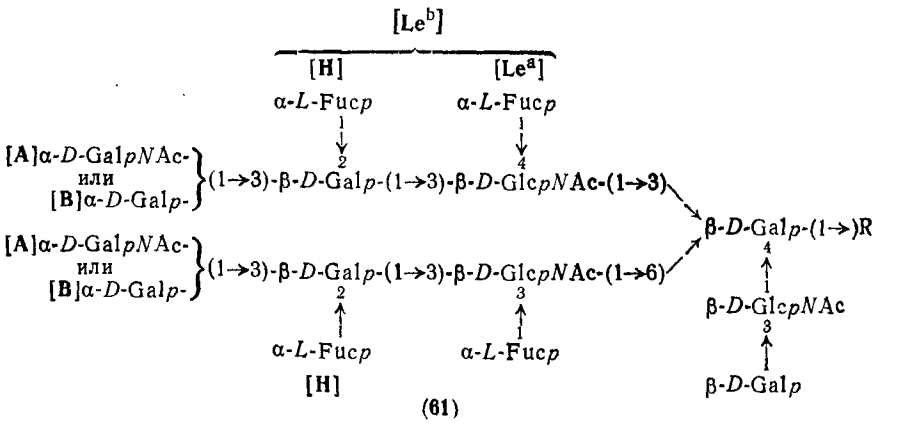


(60)

26.3.6.4. Групповые вещества крови

Под этим названием известны гликопротеины сходного строения, которые находятся на поверхности эритроцитов и определяют групповую принадлежность крови. Значение олигосахаридных остатков этих гликопротеинов для проявления группоспецифичности показано с помощью ферментативного удаления терминальных остатков α-связанной 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-галактозы из эритроцитов группы А или α-связанной *D*-галактозы из эритроцитов группы В, в результате которого в обоих случаях образовывались эритроциты группы О [6]. Подтверждением этих результатов явилось обнаружение в крови специфических ферментов (гликозилтрансфераз). В крови группы А имеется фермент, осуществляющий перенос на олигосахаридный кор остатка 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-галактозы; кровь типа В содержит фермент, катализирующий присоединение к тому же кору остатка *D*-галактозы; в крови группы О такие ферменты отсутствуют.

Структура углеводных цепей групповых веществ крови изучалась иммунологическими методами для определения изменения серологической активности при кислотном гидролизе или обработке специфическими ферментами. Были определены терминальные углеводные остатки, ответственные за иммунологическую специфичность. С помощью щелочной деградации показано, что оли-



(61)

R = →3)-β-*D*-GlcpNAc-(1→3)-β-*D*-Galp-(1→3)-β-*D*-GalpNAc-(1→)-*L*-Ser(*L*-Thr)

госахаридные цепи присоединены к молекуле белка гликозидными связями по остаткам серина или треонина [217, 218]. Связи строения групповых веществ крови с их иммунологическими свойствами посвящены обзоры [219, 220]. Остатки, ответственные за группоспецифичность A, B, H(O), Le^a и Le^b, показаны в обобщенной структуре (61).

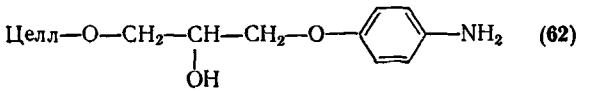
26.3.7. ПРОИЗВОДНЫЕ ПОЛИСАХАРИДОВ

Некоторые производные полисахаридов находят применение в промышленности; так, например, ксантогенат целлюлозы применяется для производства искусственного шелка, а нитрат целлюлозы — для производства взрывчатых веществ. В связи с появлением водонерастворимых реагентов для приготовления иммуноадсорбентов и перевода ферментов и антител в нерастворимое состояние был синтезирован ряд новых модифицированных полисахаридов. Сведения о таких производных включены во многие обзоры, посвященные полисахаридам, например целлюлозе [222, 223], крахмалу [224, 225] и другим [226]; см. также [65, 227]. Чтобы облегчить поиск ссылок на методы их получения, эти производные классифицированы ниже по типу содержащихся в их молекулах заместителей, а не по природе исходного полисахарида.

26.3.7.1. Простые эфиры

Методы получения метилированных полисахаридов [15—19] и их применение для анализа описаны выше (см. разд. 26.3.2.1). Частично метилированные производные сшитых декстранов (например, сефадекса) используют в качестве носителей для гельфильтрации и ионообменной хроматографии в неводных растворах. Карбоксиалкильные производные полисахаридов получают реакцией их простых алкиловых эфиров с монохлоруксусной кислотой [228]. Эти производные (например, карбоксиметилцеллюлозу) применяют в качестве ионообменных материалов; введение таких групп используют как способ активации гидроксильных групп полисахаридов для облегчения реакций, например, с тионилхлоридом (синтез реакционноспособных хлорангидридов) или этилхлорформиатом (при которой в конечном счете образуется оксид [230]); продукты этих реакций применяются для иммобилизации биологических макромолекул. Получены алкиламинопроизводные и алкиламиноалкиловые простые эфиры полисахаридов; их применяют в качестве ионообменных смол (например, диметиламиноэтилсефадекс) и носителей для электрофореза и иммуноэлектрофореза (гели диэтиламиноэтилагарозы). Обработка полисахаридов, содержащих третичные аминогруппы, эпихлоргидрином [231] приводит к продукту, имеющему боковые цепи с реакционноспособной эпоксигруппой и используемому для получения сшитых полисахаридов или нерастворимых биологически активных макро-

молекул. Для иммобилизации ферментов используют содержащие остаток ароматического амина простые эфиры целлюлозы, например соединение (62).



(62)

26.3.7.2. Сложные эфиры

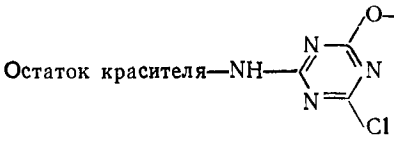
Сложные эфиры крахмала применяют в пищевой промышленности [224, 225]. Для получения сложных эфиров полисахаридов, применяемых в качестве носителей для хроматографического разделения, используют ангидриды и хлорангидриды алифатических и ароматических карбоновых кислот [234—236]. Обработкой некоторых полисахаридов тетраполифосфорной кислотой [237] получают соответствующие фосфаты. Фосфоэфирные группировки можно использовать для сшивки полисахаридов; так, крахмалы с фосфатными сшивками используют в пищевой промышленности. Получены сульфаты [238] многих полисахаридов; некоторые из них, подобно гепарину, обладают антикоагулянтным и противовоспалительным действием (см. разд. 26.3.5.3). Получение эфиров сульфокислот, в частности эфиров *n*-толуолсульфокислоты, и их производных используют для защиты гидроксигрупп; гликозидные связи таких эфиров обладают повышенной устойчивостью к действию кислот.

Карбонаты полисахаридов получают действием на них этилхлорформиата [239]. В тщательно подобранных условиях образуются циклические карбонаты [240], применяемые для иммобилизации ферментов [241—243].

26.3.7.3. Производные красителей

Ряд окрашенных производных полисахаридов образуется в результате нанесения нерастворимого красителя на полисахаридные волокна или путем образования водородных связей между углеводными остатками и молекулами красителя, однако наиболее важны производные, в которых молекула красителя ковалентно связана с молекулой полисахарида. Диазиновые и триазиновые красители, содержащие, например, остаток 2,4,6-трихлортриазина, реагируют с полисахаридами [244, 245] с образованием продукта (63). Многие полисахариды, окрашенные монохлортриазиновым красителем (цибакрон голубой), используют в качестве субстратов для определения ряда гликаназ [246, 247]; количество низкомолекулярного вещества, отщепляемого ферментом, определялось спектрофотометрически. Окрашивание полисахаридов применяют для идентификации при хроматографическом и электрофоретическом разделении, однако из-за присутствия красителя характери-

стики полисахарида в процессе исследования изменяются.



(63)

26.3.7.4. Сшитые полисахариды

Сшитые полисахариды широко применяются в промышленности. Наибольший интерес представляют сшитые целлюлозы, крахмалы, декстраны (сефадекс) и агарозы (сефароза), используемые как хроматографические носители; наиболее распространенными сшивающими агентами являются эпихлоргидрин и формальдегид. Сшивкой разных полисахаридов получают водонерастворимые субстраты для очистки и определения ферментов. Так, обработкой гликозаминогликанов циклическими имидокарбонатными производными агарозы [248] получен субстрат для определения гликозаминогликаназ.

26.3.7.5. Нерастворимые в воде производные

Нерастворимые в воде ферменты получают путем их присоединения к нерастворимым полисахаридным носителям [65, 227, 249]. Применение нерастворимых ферментов упрощает проведение ферментативных реакций, так как такие ферменты могут быть легко удалены из реакционной смеси фильтрацией или центрифугированием, тогда как удаление растворенных ферментов — очень трудоемкая процедура.

Антитела, иммобилизованные на полисахаридных носителях, используют для очистки антигенов обычно с помощью колоночной хроматографии (иммуноадсорбция), при которой раствор неочищенного антигена пропускают через носитель с закрепленными на нем антителами. Специфический антиген адсорбируется антителами, тогда как примеси вымываются из колонки. Далее антиген может быть десорбирован в чистом виде [250]. Опубликован очень подробный обзор [227] с описанием подобных нерастворимых продуктов и способов их применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *I. Danishefsky, R. L. Whistler, and F. A. Bettelheim*, in 'Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry', ed. W. Pigman and D. Horton, Academic Press, New York, 2nd edn., 1970, vol. IIA, chap. 35.
2. *W. Z. Hassid*, in 'Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry', ed. W. Pigman and D. Horton, Academic Press, New York, 2nd edn., 1970, vol. IIA, chap. 34.
3. *E. Eichwald*, Ann. Chem. Pharm., 1865, **134**, 177.
4. 'Glycoproteins', ed. A. Gottschalk, Elsevier, Amsterdam, 2nd edn., 1972.
5. *J. S. Brimacombe and J. Webber*, 'Mucopolysaccharides', Elsevier, Amsterdam, 1964.

6. *N. Sharon*, 'Complex Carbohydrates, Their Chemistry and Biochemistry', Addison-Wesley, Massachusetts, 1975.
7. *J. F. Kennedy*, in 'Proteoglycans — Biological and Chemical Aspects in Human Life', Elsevier, Amsterdam, 1978.
8. *O. Samuelson and L. Thede*, J. Chromatog., 1967, **30**, 556.
9. *J. F. Kennedy*, Biochem. Soc. Trans., 1974, **2**, 54.
10. *J. F. Kennedy and J. E. Fox*, Carbohydrate Res., 1977, **54**, 13.
11. *J. F. Kennedy*, in 'Methods in Carbohydrate Chemistry', ed. R. L. Whistler, Academic Press, New York, vol. VIII.
12. См. сс. 11.
13. *S. A. Barker, J. F. Kennedy, and P. J. Somers*, Carbohydrate Res., 1968, **8**, 482.
14. *D. Aminoff, W. W. Binkley, R. Schaffer, and R. W. Mowry*, in 'The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry', ed. W. Pigman and D. Horton, Academic Press, New York, 2nd edn., 1970, vol. IIB, chap. 45.
15. *W. N. Haworth*, J. Chem. Soc., 1915, **107**, 8.
16. *T. Purdie and J. C. Irvie*, J. Chem. Soc., 1903, **83**, 1021.
17. *S.-I. Hakomori*, J. Biochem. (Japan), 1964, **55**, 205.
18. *D. M. W. Anderson, G. M. Cree, J. J. Marshall, and S. Rahman*, Carbohydrate Res., 1966, **2**, 63.
19. *K. Wallenfels, G. Bechtler, R. Kuhn, H. Trischmann, and H. Egge*, Angew. Chem. Internat Edn, 1963, **2**.
20. *C. M. Fear and R. C. Menzies*, J. Chem. Soc., 1926, 937.
21. *B. Lindberg and J. Lönngren*, in 'Methods in Carbohydrate Chemistry', ed. R. L. Whistler and J. N. BeMiller, Academic Press, New York, 1976, vol. VII, p. 142.
22. *W. W. Binkley*, Adv. Carbohydrate Chem., 1955, **10**, 55.
23. *C. T. Bishop*, Adv. Carbohydrate Chem., 1964, **19**, 95.
24. *H. Björndal, B. Lindberg, and S. Svensson*, Carbohydrate Res., 1967, **5**, 433.
25. *C. C. Sweeley, W. W. Wells, and R. Bently*, in 'Methods in Enzymology', ed. E. F. Neufeld and V. Ginsburg, Academic Press, New York, 1966, vol. 8, p. 95.
26. *N. K. Kochetkov and O. S. Chizhov*, Adv. Carbohydrate Chem., 1966, **21**, 39.
27. *J. Lönngren and S. Svensson*, Adv. Carbohydrate Chem. Biochem., 1974, **29**, 41.
28. *H. Björndal, C. G. Hellerqvist, B. Lindberg, and S. Svensson*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1970, **9**, 610.
29. *A. Thompson, M. L. Wolfrom, and E. J. Quinn*, J. Amer. Chem. Soc., 1953, **75**, 3003.
30. *A. S. Perlin*, Adv. Carbohydrate Chem., 1959, **14**, 9.
31. *J. M. Bobbitt*, Adv. Carbohydrate Chem., 1956, **11**, 1.
32. *J. K. Hamilton, G. W. Huffman, and F. Smith*, J. Amer. Chem. Soc., 1959, **81**, 2176.
33. *R. L. Whistler, and J. N. BeMiller*, Adv. Carbohydrate Chem., 1958, **13**, 289.
34. *T. Yamada, M. Hisamatsu and M. Taki*, J. Chromatog., 1975, **103**, 390.
35. *C. E. Weill and P. Hanke*, Analyt. Chem., 1962, **34**, 1736.
36. *M. John, G. Trénel and H. Dellweg*, J. Chromatog., 1969, **42**, 476.
37. *S. A. Barker, B. W. Hatt, J. F. Kennedy, and P. J. Somers*, Carbohydrate Res., 1968, **9**, 327.
38. *K. Mopper and E. T. Degens*, Analyt. Biochem., 1972, **45**, 147.
39. *S. A. Barker, E. J. Bourne, and O. Theander*, J. Chem. Soc., 1955, 4276.
40. *J. F. Kennedy and A. Rosevear*, J. C. S. Perkin I, 1973, 2041.
41. *J. F. Kennedy, S. A. Barker, and C. A. White*, Carbohydrate Res., 1974, **38**, 13.
42. *F. M. Rabel, A. G. Caputo, and E. T. Butts*, J. Chromatog., 1976, **126**, 731.
43. *H. W. Kircher*, in 'Methods in Carbohydrate Chemistry', ed. R. L. Whistler and M. L. Wolfrom, Academic Press, New York, 1962, vol. 1, p. 13.
44. *J. F. Kennedy, S. M. Robertson, and M. Stacey*, Carbohydrate Res., 1976, **49**, 243.

45. *J. F. Kennedy, S. M. Robertson, and M. Stacey*, Carbohydrate Res., 1977, **57**, 205.
46. *J. F. Kennedy and S. M. Robertson*, неопубликованные данные.
47. *M. B. Perry*, Canad. J. Biochem., 1964, **42**, 451.
48. *N. K. Kochetkov and O. S. Chizhov*, Adv. Carbohydrate Chem., 1966, **21**, 39.
49. *O. S. Chizhov, N. V. Molodtsov, and N. K. Kochetkov*, Carbohydrate Res., 1967, **4**, 273.
50. *G. S. Johnson, W. S. Ruliffson, and R. G. Cooks*, Chem. Comm., 1970, 587.
51. *J. Moor and E. S. Waight*, Biomed. Mass. Spectrometry, 1975, **2**, 36.
52. *M. S. B. Munson and F. H. Field*, J. Amer. Chem. Soc., 1966, **88**, 2621.
53. *W. R. Gray and U. E. Del Valle*, Biochemistry, 1970, **9**, 2134.
54. *W. R. Gray, L. H. Wojcik, and J. H. Futrell*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1970, **41**, 1111.
55. *V. N. Reinhold, J. Biller, and K. Biemann*, 18th Ann. Conf. Mass Spectrometry and Allied Topics, 1970, **18**, 1379.
56. *T. Terui, T. Yadomae, H. Yamada, O. Hayashi, and T. Miyazaki*, Chem. and Pharm. Bull. (Japan), 1974, **22**, 2476.
57. *B. Lindberg and B Swan*, Acta Chem. Scand., 1960, **14**, 1043.
58. *S. Gardell, A. H. Gordon, and S. Aqvist*, Acta Chem. Scand., 1950, **4**, 907.
59. *D. H. Northcote*, in 'Methods in Carbohydrate Chemistry', ed. R. L. Whistler, Academic Press, New York, 1965, vol. V, p. 49.
60. *P. W. Lewis, D. N. Raine, and J. F. Kennedy*, Ann. Clin. Biochem., 1974, **11**, 67.
61. *M. B. Mathews*, in 'Methods in Carbohydrate Chemistry', ed. R. L. Whistler and J. N. BeMiller, Academic Press, New York, 1976, vol. VII, p. 116.
62. *M. Heidelberger, Z. Dische, W. B. Neely, and M. L. Wolfrom*, J. Amer. Chem. Soc., 1955, **77**, 3511.
63. *E. Y. C. Lee and W. J. Whelan*, Arch. Biochem. Biophys., 1966, **116**, 162.
64. *W. Banks and C. T. Greenwood*, Carbohydrate Res., 1968, **6**, 177.
65. *J. F. Kennedy*, in 'Carbohydrate Chemistry — Specialist Periodical Reports' ed. J. S. Brimacombe, The Chemical Society, London, 1971—77, vols. 4—9, part II.
65a. Enzyme Nomenclature: Recommendation (1972) of the Internation Union of Pure and Appllied Chemistry and the Internation Union of Biochemistry; Supplement 1. Correction and Addition (1975). Biochim. Biophys. Acta, 1976, **429**, 1 [Номенклатура ферментов. Рекомендации (1972 г.) Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов, а также по единицам ферментов и символам кинетики ферментативных реакций (с дополнениями по 1975 г.). Пер. с англ./Под ред. А. Е. Брауштейна. М., 1979].
66. *M. Nishida-Fukuda and F. Egami*, Biochem. J., 1970, **119**, 39.
67. *Y. T. Li and S.-C. Li*, in 'Methods Carbohydrate Chemistry', ed. R. L. Whistler and J. N. BeMiller, Academic Press, New York, 1976, vol. VII, p. 221.
68. *A. L. Tarentino, T. H. Plummer, jun., and F. Maley*, J. Biol. Chem., 1974, **249**, 818.
69. *N. Gellerstedt*, Arkiv Kemi, 1963, **20**, 147.
70. *F. A. Bettelheim and D. E. Philpott*, Biochim. Biophys. Acta, 1959, **34**, 124.
71. *R. H. Marchessault and A. Sarko*, Adv. Carbohydrate Chem., 1967, **22**, 421.
71a. *R. H. Marchessault and P. R. Sundararajan*, Adv. Carbohydrate Chem. Biochem., 1976, **33**, 387.
72. *F. A. Bettelheim*, Biochim. Biophys. Acta, 1964, **83**, 350.
73. *J. M. Guss, D. W. L. Hukins, P. J. C. Smith, W. T. Winter, S. Arnott, R. Moorhouse, and D. A. Rees*, J. Mol. Biol., 1975, **95**, 359.
74. *D. E. Burge*, J. Phys. Chem., 1963, **67**, 2590.
75. *I. C. McNeill*, Polymer, 1963, **4**, 247.
76. *F. A. Bettelheim, Y. Hashimoto, and W. Pigman*, Biochim. Biophys. Acta, 1962, **63**, 235.
77. *T. C. Laurent, M. Ryan, and A. Pietruszkiewicz*, Biochim. Biophys. Acta, 1960, **42**, 476.
78. *G. K. Adkins and C. T. Greenwood*, Stärke, 1966, **18**, 213.

79. *S. Schiefer, E. Y. C Lee, and W. J. Whelan*, F. E. B. S. Letters, 1973, **30**, 129.
80. *F. L. Bates, D. French, and R. E. Rundle*, J. Amer. Chem. Soc., 1943, **65**, 142.
81. *M. Sanyal, V. S. Rao, and K. B. De*, Z. analyt. Chem., 1974, **271**, 208.
82. *T. J. Schoch*, Adv. Carbohydrate Chem., 1945, **1**, 247.
83. *C. T. Greenwood and J. Thomson*, J. Chem. Soc., 1962, 222.
84. *S. Tabata, K. Nagata, and S. Hizukuri*, Stärke, 1975, **27**, 333.
85. *K. H. Mayer, M. Wertheim, and P. Bernfeld*, Helv. Chim. Acta, 1940, **23**, 865; 1941, **24**, 378.
86. *J. J. Cael, J. L. Koenig, and J. Blackwell*, Carbohydrate Res., 1973, 29, 123; Biopolymers, 1975, **14**, 1885.
87. *D. French*. Adv. Carbohydrate Res., 1957, **12**, 189.
88. *W. N. Haworth, E. L. Hirst, and F. A. Isherwood*, J. Chem. Soc., 1937, 577.
89. *H. Staudinger and E. Husemann*, Annalen, 1937, **527**, 195.
90. *K. H Meyer and P. Bernfeld*, Helv. Chim. Acta, 1940, **23**, 875.
91. *S. Peat, W. J. Whelan, and G. J. Thomas*, J. Chem. Soc., 1952, **4546**.
92. *Z. Gunja-Smith, J. J. Marshall, C. Mercier, E. E. Smith, and W. J. Whelan*, F. E. B. S. Letters, 1970, **12**, 101.
93. *R. Geddes, C. T. Greenwood, and S. MacKenzie*, Carbohydrate Res., 1965, **1**, 71.
94. *K. Freudenberg and G. Blomqvist*, Berzelius, 1935, **68**, 2070.
95. *R. H. Marchessault and A. Sarko*, Adv. Carbohydrate Chem., 1967, **22**, 421.
96. *J. Hayashi, A. Sueoka, J. Ookita, and S. Watanabe*, J. Chem. Soc. Japan, 1973, 146.
97. *J. Hayashi, A. Sueoka, and S. Watanabe*, J. Chem. Soc. Japan, 1973, 153.
98. *K. H. Meyer and L. Misch*, Helv. Chim. Acta, 1937, **20**, 232.
99. *C. Y. Liang and R. H. Marchessault*, J. Polymer Sci., 1959, **37**, 385.
100. *I. Y. Levdik, N. M. Birbrover, N. A. Dobrynin, T. V. Mlechko, and V. N. Nikitin*, Cellulose Chem. Technol., 1974, **8**, 141.
101. *F. Smith and R. Montgomery*, 'The Chemistry of Plant Gums and Mucilages', Reinhold, New York, 1959.
102. *G. O. Aspinall*, Adv. Carbohydrate Chem., 1969, **24**, 333.
103. *R. J. Sturgeon*, in 'Carbohydrate Chemistry — Specialist Periodical Reports', ed. J. S. Brimacombe, The Chemical Society, London, 1972—77, vols. 5—9, part II.
104. *D. M. W. Anderson, E. L. Hirst, and J. F. Stoddart*, J. Chem. Soc. (C), 1967, 1476; *J. F. Stoddart and J K. N. Jones*, Carbohydrate Res., 1968, **8**, 29.
105. *A. J. Charlson, J. R. Nunn, and A. M. Stephen*, J. Chem. Soc., 1955, 1428.
106. *D. M. W. Anderson and M. C. L. Gill*, Phytochemistry, 1975, **14**, 739.
107. *G. O. Aspinall and J Baillie*, J. Chem. Soc., 1963, 1714.
108. *Z. F. Ahmed and R. L. Whistler*, J. Amer. Chem. Soc., 1950, **72**, 2524.
109. *G. O. Aspinall, R. B. Rashbrook, and G. Kessler*, J. Chem. Soc. 1958, 215.
110. *R. J. Beveridge, J. K. N. Jones, R. W. Lowe, and W. A. Szarek*, J. Polymer Sci., Part C, Polymer Symposia, 1971, **23**, 461.
111. *J. M. Tyler*, J. Chem. Soc., 1965, 5300.
112. *E. L. Hirst, J. K. N. Jones, and W. O. Walder*, J. Chem. Soc., 1947, 1225.
113. *H. O. Bouveng and H. Meier*, Acta Chem. Scand., 1959, **13**, 1884.
114. *D. A. Rees and N. G. Richardson*, Biochemistry, 1966, **5**, 3099.
115. *V. Zitko and C. T. Bishop*, Canad. J. Chem., 1966, **44**, 1275.
116. *G. O. Aspinall, K. Hunt, and I. M. Morrison*, J. Chem. Soc. (C), 1967, 1080.
117. *P. Albersheim*, Sci. Amer., 1975, **232(4)**, 80.
118. *R. H. Marchessault and C. Y. Liang*, J. Polymer Sci., 1959, **37**, 385.
119. *G. O. Aspinall and K M. Ross*, J Chem. Soc., 1963, 1681.
120. *H. Pringsheim and A Genin*, Z physiol. Chem., 1964, **140**, 229.
121. *A. S. Perlin*, in 'Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials', ed. E. T. Reese, Macmillan, New York, 1963, p. 185
122. *J. E. Courtois and P le Dizet*, Compt. rend. (D), 1973, **277**. 1957.
123. *H. Saha and K. N Choudhury*, J. Chem. Soc, 1922, **121**, 1044.
124. *E. Percival and R. H. McDowell*, 'Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides', Academic Press, New York, 1967.

125. *S. Peat, J. R. Turvey, and J. M. Evans*, J. Chem. Soc., 1959, **3223**, 3341.
126. *H. Björndal, K.-E. Eriksson, P. J. Garegg, B. Lindberg, and B. Swan*, Acta Chem. Scand., 1965, **19**, 2309.
127. *I. M. Mackie and E. Percival*, J. Chem. Soc., 1959, 1151.
128. *A. Haug, B. Larsen, and O. Smidsrød*, Carbohydrate Res., 1974, **32**, 217.
129. *A. Penman and D. A. Rees*, J. C. S. Perkin I, 1973, 2191.
130. *N. S. Anderson, T. C. S. Dolan, and D. A. Rees*, J. C. S. Perkin I, 1973, 2173.
131. *A. Penman and D. A. Rees*, J. C. S. Perkin I, 1973, 2188.
132. *M. Duckworth and W. Yaphe*, Carbohydrate Res., 1971, **16**, 189.
133. *J. R. Turvey and L. M. Griffiths*, Phytochemistry 1973, **12**, 2901.
134. *A. F. Pavlenko, A. V. Kurika, V. A. Khomenko, and Yu. S. Ovodov*, Khim. prirod. Soedinenii, 1974, 172 [*А. Ф. Павленко, А. В. Курика, В. А. Хоменко, Ю. С. Оводов* — Хим. природ. соединений, 1974, с. 179].
135. *L. Glaser*, Ann. Rev. Biochem., 1973, **42**, 91.
136. *K. W. Knox and A. J. Wicken*, Bacteriol. Rev., 1973, **37**, 215.
137. *P. Critchey, A. R. Archibald, and J. Baddiley*, Biochem. J., 1962, **85**, 420.
138. *A. J. Wicken*, Biochem. J., 1966, **99**, 108.
139. *J. Baddiley*, Fed. Proc., 1962, **21**, 1084.
140. *J. J. Armstrong, J. Baddiley, and J. G. Buchanan*, Biochem. J., 1961, **80**, 254.
141. *A. R. Sanderson, J. L. Strominger, and S. G. Nathenson*, J. Biol. Chem., 1962, **237**, 3603.
142. *K. H. Schleifer and R. Joseph*, F. E. B. S. Letters, 1973, **36**, 83.
143. *K. H. Schleifer and O. Kandler*, Bacteriol. Rev., 1972, **36**, 407.
144. *P. A. J. Gorin and J. F. T. Spencer*, Canad. J. Chem., 1966, **44**, 993.
145. *A. R. Archibald, J. Baddiley, and J. E. Heckels*, Nature New Biol., 1973, **241**, 29.
146. *R. L. Sidebotham*, Adv. Carbohydrate Chem. Biochem., 1974, **30**, 371.
147. *B. Lindberg and S. Svensson*, Acta Chem. Scand., 1968, **22**, 1907.
148. *E. J. Bourne, R. L. Sidebotham, and H. Weigel*, Carbohydrate Res., 1974, **34**, 279.
149. *S. A. Barker, E. J. Bourne, G. T. Bruce, W. B. Neely, and M. Stacey*, J. Chem. Soc., 1954, 2395.
150. *G. T. Barry and W. F. Goebel*, Nature, 1957, **179**, 206.
151. *M. Stacey and S. A. Barker*, 'Polysaccharides of Microorganisms', Oxford University Press, 1960.
152. *M. J. How, J. S. Brimacombe, and M. Stacey*, Adv. Carbohydrate Chem., 1964, **19**, 303.
152a. *O. Larm and B. Lindberg*, Adv. Carbohydrate Chem. Biochem., 1976, **33**, 295.
153. *R. J. Sturgeon*, in 'Plant Carbohydrate Biochemistry', ed. J. B. Pridham, Phytochemical Society Symposium, Academic Press, New York, 1974, no. **10**, p. 219.
154. *C. E. Ballou*, Adv. Enzymol., 1974, **40**, 239.
155. *L. Rosenfeld and C. E. Ballou*, J. Biol. Chem., 1974, **249**, 2319.
156. *T. Miyazaki and Y. Naoi*, Chem. and Pharm. Bull. (Japan), 1974, **22**, 1360.
157. *J. S. Schutzbach, M. K. Raizada, and H. Ankel*, J. Biol. Chem., 1974, **249**, 2953.
158. *M. R. Stetten, H. M. Katzen, and D. Stetten*, J. Biol. Chem., 1956, **222**, 587.
159. *R. D. Edstrom*, Arch. Biochem Biophys., 1970, **137**, 293.
160. *G. L. Brammer, M. A. Rougvie, and D. French*, Carbohydrate Res., 1972, **24**, 343.
161. *H. De Wulf and H. G. Hers*, in 'Biosynthesis of the Glycosidic Linkage', ed. R. Piras and H. G. Pontis, Academic Press, New York, 1972, p. 399.
162. *C. T. Greenwood*, in 'The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry', ed. W. Pigman and D. Horton, Academic Press, New York, 2nd edn., 1970, vol. IIB, chap. 38.
163. *R. D. Marshall*, in 'Carbohydrate Chemistry — Specialist Periodical Reports', ed. J. S. Brimacombe, The Chemical Society, London, 1975—76, vols. 7 and 8, part II.
164. *B. J. Catley*, in 'Carbohydrate Chemistry — Specialist Periodical Reports', ed. J. S. Brimacombe, The Chemical Society, London, 1977, vol. 9, part II.

165. *K. M. Rudall*, Adv. Insect Physiol., 1963, **1**, 257.
166. *K. Meyer*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1938, 6, 91.
167. *S. A. Barker, J. F. Kennedy, and C. N. D. Cruickshank*, Carbohydrate Res., 1969, **10**, 65.
168. *S. A. Barker and J. F. Kennedy*, Life Sci., 1969, 8, part II, 989.
169. *E. J. Moynahan and J. F. Kennedy*, Proc. Roy. Soc. Med., 1966, **59**, 1125.
170. *E. J. Moynahan and J. F. Kennedy*, 'XIII Congressus Internationalis Dermatologiae — München, 1967', Springer-Verlag, Berlin, 1968, p. 1543.
171. *J. F. Kennedy, C. H. Sinette, and J. B. Familusi*, Clin. Chim. Acta, 1970, **29**, 37.
172. *P. W. Lewis, J. F. Kennedy, and D. N. Raine*, Biochem. Soc. Trans., 1973, **1**, 844.
173. *C. A. White, J. F. Kennedy, and D. N. Raine*, неопубликованные данные.
174. *J. F. Kennedy*, Biochem Soc. Trans., 1973, **1**, 807.
175. *J. F. Kennedy*, 'The Meldola Medal Lecture', Chem. Soc. Rev., 1973, **2**, 355.
176. *J. F. Kennedy and M. Stacey*, Egypt. J. Chem. Spec. Spec. Issue 'Tourky', 1973, 223.
177. *J. F. Kennedy*, Adv. Clin. Chem., 1976, **18**, 1.
178. *L.-A. Fransson and L. Rodén*, J. Biol. Chem., 1967, **242**, 4161, 4170.
179. *K. Murata, T. Harada, T. Fujiwara, and T. Furuhashi*, Biochim. Biophys. Acta, 1971, **230**, 583.
180. *A. Linker and P. Hovingh*, Biochim. Biophys. Acta, 1968, **165**, 89.
181. *J. A. Cifonelli*, Carbohydrate Res., 1968, 8, 233.
182. *N. Toda and N. Seno*, Biochim. Biophys. Acta, 1970, **208**, 227.
183. *V. P. Bhavanandan and K. Meyer*, J. Biol. Chem., 1968, **243**, 1052.
184. *S. Hirano and K. Meyer*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1971, **44**, 1371.
185. *U. Lindahl and L. Rodén*, in 'Glycoproteins', ed. A. Gottschalk, Elsevier, Amsterdam, 2nd edn., 1972, p. 491.
186. *R. D. Marshall and A. Neuberger*, Adv. Carbohydrate Chem. Biochem., 1970, **25**, 407.
187. *R. Kornfeld and S. Kornfeld*, Ann. Rev. Biochem., 1976, **45**, 217.
188. *J. F. Kennedy*, in 'Structure-Activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones', ed. M. Margoulies and F. C. Greenwood, International Congress Series 241, Exerpta Medica, Amsterdam, 1972, part 2, p. 360.
189. *J. F. Kennedy and W R. Butt*, Biochem. J., 1969, **115**, 225.
190. 'Methods in Enzymology, Hormone Action', ed. B. W. O'Malley and J. G. Hardman, Academic Press, New York, 1975, vols. 36 and 37.
191. *W. R. Butt, S. S. Lynch, and J. F. Kennedy*, in 'Structure-Activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones', ed. M. Margoulies and F. C. Greenwood, International Congress Series 241, Exerpta Medica, Amsterdam 1972, part 2, p. 355.
192. *A. S. Hartree*, Biochem. J., 1966, **100**, 754.
193. *S. A. Barker, C. J. Gray, J. F. Kennedy, and W. R. Butt*, J. Endocrinol., 1969, **45**, 275.
194. *D. Gospodarowicz*, J. Biol. Chem., 1972, **247**, 6491.
195. *W. R. Butt and J. F. Kennedy*, in 'Structure-Activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones', ed. M. Margoulies and F. C. Greenwood, International Congress Series 241, Exerpta Medica, Amsterdam, 1971, part 1, p. 115.
196. *J. F. Kennedy*, Endocrinol. Experimentalis, 1973, 7, 5.
197. *L. E. Reichert, M. A. Rasco, D. N. Ward, G. D. Niswender, and A. R. Midgley*, J. Biol. Chem., 1969, **244**, 5110.
198. *M. F. Chaplin, L. J. Gray, and J. F. Kennedy*, in 'Gonadotrophins and Ovarian Development', ed. W. R. Butt, A. C. Cooke, and M. Ryle, Livingstone, Edinburgh, 1970, p. 77.
199. *J. F. Kennedy and M. F. Chaplin*, Biochem. J., 1972, **130**, 417.
200. *J. F. Kennedy, M. F. Chaplin, and M. Stacey*, Carbohydrate Res., 1974, **36**, 369.
201. *O. P. Bahl*, J. Biol. Chem., 1969, **244**, 575.

202. *O. P. Bahl*, in 'Structure-Activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones', ed. M. Margoulies and F. C. Greenwood, International Congress Series 241, Exerpta Medica, Amsterdam, 1971, part 1, p. 99.
203. *J. F. Kennedy and M. F Chaplin*, Biochem. J., 1976, **155**, 303.
204. *H. G. Schwick*, Naturwiss, 1974, **61**, 484.
205. *G. Ashwell and A. G Morell*, Adv. Enzymol., 1974, **41**, 99.
206. *P. V. Wagh, I. Bornstein, and R. I. Winzler*, J. Biol. Chem., 1969, **244**, 658.
207. *G. A. Jamieson, M. Jett, and S. L. DeBernardo*, J. Biol. Chem., 1971, **246**, 3686.
208. *R. G. Spiro*, Adv. Protein Chem., 1973, **27**, 349.
209. *R. G. Spiro and V. D. Bhoyroo*, J. Biol. Chem., 1974, **249**, 5704.
210. *R. R. Porter*, Biochem. J., 1959, **73**, 119.
211. *J. W. Rosevear and E. L. Smith*, J. Biol. Chem., 1961, **236**, 425.
212. *R. Kornfeld, J. Keller, J. Baenziger, and S. Kornfeld*, J. Biol. Chem., 1971, **246**, 3259.
213. *J. Baenziger, S. Kornfeld, and S. Kochwa*, J. Biol. Chem., 1974, **249**, 1897.
214. *J. Baenziger and S. Kornfeld*, J. Biol. Chem., 1974, **249**, 7260.
215. *T. Tai, S. Ito, K. Yamashita, T. Muramatsu, and A. Kobata*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1975, **65**, 968.
216. *J. Baenziger, S. Kornfeld, and S. Kochwa*, J. Biol. Chem., 1974, **249**, 1889.
217. *B. Anderson, N. Seno, P. Sampson, J. G. Riley, P. Hoffman, and K. Meyer*, J. Biol. Chem., 1964, **239**, PC2716.
218. *B. Anderson, P. Hoffman, and K. Meyer*, J. Biol. Chem., 1965, **240**, 156.
219. *V. Ginsburg*, Adv. Enzymol., 1972, **36**, 131.
220. *S.-I. Hakomori and A. Kobata*, in 'The Antigens', ed. M. Sela, Academic Press, New York and London, 1974, vol. 2, p. 80.
221. *T. Feizi, E. A. Kabat, G. Vicari, B. Anderson, and W. L. Marsh*, J. Immunol., 1971, **106**, 1578.
222. 'Cellulose', in 'Methods in Carbohydrate Chemistry', ed. R. L. Whistler, Academic Press, New York, 1963, vol. III.
223. 'Cellulose and Cellulose Derivatives', 'High Polymers', ed. N. M. Bikales and L. Segal, Wiley-Interscience, New York, 2nd edn., 1971, vol. 5, parts IV and V.
224. *J. A. Radley*, 'Starch and its Derivatives', Chapman and Hall, London, 4th edn., 1968.
225. 'Starch, Chemistry and Technology', ed. R. L. Whistler and E. F. Paschall, Academic Press, New York, 1965, vol. I, and 1967, vol. II.
226. 'General Polysaccharides', in 'Methods in Carbohydrate Chemistry', ed. R. L. Whistler, Academic Press, New York, 1965, vol. V.
227. *J. F. Kennedy*, Adv. Carbohydrate Chem. Biochem., 1974, **29**, 305.
228. *H. Vink*, Makromol. Chem., 1969, **122**, 271.
229. *C. Arsenis and D. B. McCormick*, J. Biol. Chem., 1964, **239**, 3093.
230. *M. A. Mitz and L. J. Summaria*, Nature, 1961, **189**, 576.
231. *D. M. Soignet, R. J. Berni, and R. R. Benerito*, Textile Res. J., 1966, **36**, 978.
232. *J. Porath and N. Fornstedt*, J. Chromatog., 1970, **51**, 479.
233. *S. A. Barker, P. J. Somers, and R. Epton*, Carbohydrate Res., 1968, **8**, 491.
234. *K. Graves*, Tappi, 1972, **55**, 263.
235. *J. W. Sedat, R. B. Kelly, and R. L. Sinsheimer*, J. Mol. Biol., 1967, **26**, 537.
236. *I. Gillam, S. Millward, D. Blew, M. von Tigerstrom, E. Wimmer, and G. M. Tener*, Biochemistry, 1967, **6**, 3043.
237. *G. A. Towle and R. L. Whistler*, Methods Carbohydrate Chem., 1972, **6**, 408.
238. *R. L. Whistler and W. W Spencer*, Analyt. Chim. Acta, 1971, **55**, 448.
239. *W. M. Doane, B. S. Shasha, E. I. Stout, C. R. Russell, and C. E. Rist*, Carbohydrate Res., 1967, **4**, 445.
240. *S. A. Barker, H. Cho Tun, S. H. Doss, C. J. Gray, and J. F. Kennedy*, Carbohydrate Res., 1971, **17**, 471.
241. *J. F. Kennedy, S. A. Barker, and A. Rosevear*, J C. S. Perkin I, 1973, 2293.
242. *J. F. Kennedy and A. Rosevear*, J. C. S. Perkin I, 1974, 757.
243. *J. F. Kennedy and A. Zamir*, Carbohydrate Res., 1973, **29**, 497.
244. *H. N. Fernley*, Biochem. J., 1963, **87**, 90.
245. *R. H. Hackman and M. Goldberg*, Analyt. Biochem., 1964, **8**, 397.

246. *J. F. Kennedy*, Stärke, 1976, **28**, 196.
247. *J. F. Kennedy*, Stärke, 1977, **29**, 114.
248. *P.-H. Iverius*, J. Biol. Chem., 1972, **247**, 2607.
249. *O. R. Zaborsky*, 'Immobilised Enzymes', C. R. C. Press, Cleveland, 1973.
250. *J. F. Kennedy, P. A. Keep, and D. Catty*, Biochem. Soc. Trans., 1976, **4**, 135.

26.4. КОНФОРМАЦИИ ПОЛИСАХАРИДОВ

Д. А. РИС (Unilever Research, Bedford)

26.4.1. ВВЕДЕНИЕ

Методы и теоретические положения органической химии наиболее эффективно применимы для изучения равновесия, реакционной способности и биологических функций молекул, находящихся в высокосольватированном состоянии. В этой главе рассмотрены конформационные свойства полисахаридов (в основном в растворах) и кратко описаны некоторые достижения в области определения конформации полисахаридов методом рентгеноструктурного анализа.

В современных обзорах, посвященных более детальному описанию конформации полисахаридов, приведены расчеты стереохимии полисахаридных цепей в зависимости от типа имеющихся в них химических связей [1], описаны методы предсказания параметров неупорядоченных форм молекул полисахаридов в растворах [2], рассмотрены вторичные и третичные структуры полисахаридов в растворах и гелях [3]. В более ранних обзорных работах рассмотрены основные принципы образования конформаций полисахаридов [4]; формам молекул полисахаридов посвящен обзор [5].

26.4.2. РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛИСАХАРИДОВ

Многие полисахариды, в том числе крахмал и целлюлоза, существуют в природе в кристаллическом и полукристаллическом состояниях, и, следовательно, направление реакций замещения и модификации этих соединений определяется формой их молекул и способом укладки углеводных цепей.

Конформации полисахаридов в твердом состоянии долгое время не удавалось определить из-за несовершенства существовавших методов рентгеноструктурного анализа. В настоящее время эта проблема решена [6]. Установлено, что в природной целлюлозе (целлюлоза I) все углеводные цепи расположены параллельно, а не антипараллельно (т. е. в каждом кристаллите все невосстанавливающие концы находятся с одной стороны, а все восстанавливающие — с другой [7]), тогда как в регенерированной или мерсеризованной целлюлозе (целлюлоза II), в которую природная целлюлоза часто превращается в результате промышленной

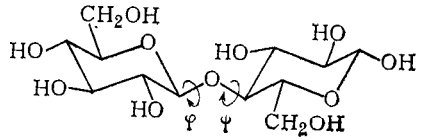
обработки, цепи антипараллельны [8]. Аналогично с помощью рентгенографии в настоящее время показано, что молекулы так называемой V-формы амилозы имеют конформацию левой полой спирали (которую принимает амилозный компонент крахмала при образовании известного соединения включения с иодом или трииодидом, окрашенного в интенсивный иссиня-черный цвет; это явление используется в объемном анализе и для окраски гистологических препаратов) [9]. Крахмал зерен хлебных злаков и корневищ овощей имеет, как показано [10], конформацию двойной спирали (что предполагали, но не могли доказать в течение ряда лет [11]).

Важную группу полисахаридов составляют гликозаминогликаны, к которым относятся гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты и кератансульфат. Было показано, что в ориентированных пленках молекулы этих соединений в зависимости от типа присутствующих катионов могут принимать целый ряд взаимопревращаемых конформаций [12]. Эти конформации представляют собой группу левых спиралей, упакованных антипараллельно и отличающихся в основном степенью растянутости. Наиболее сжатой является одна из конформаций гиалуроновой кислоты, в которой одна молекула закручена вокруг другой с образованием двойной спирали [13]; во всех остальных случаях молекулы упакованы «бок о бок». В некоторых случаях удалось детально выяснить строение молекул, что для волокнистых веществ, в отличие от кристаллических, очень трудно сделать; удалось даже выявить положение молекул воды и геометрию участков молекул, координированных вокруг катионов [14]. Важными вехами на пути понимания конформационных принципов строения полисахаридных цепей стали: *а*) первый пример установления с помощью рентгеноструктурного анализа упорядоченной конформации разветвленного полисахарида (внеклеточного полисахарида *E. coli*); это позволило предположить, что наличие ветвлений играет важную роль при ориентации боковых цепей антипараллельно основной цепи и стабилизации таким образом конформации молекул полисахарида посредством нековалентных взаимодействий [15]; *б*) первое изучение этим же методом структуры кристаллического гликопротеина, которое показало упорядоченность конформации его углеводной части [16]. Ко времени опубликования работы [16] определение строения (F_c-фрагмента иммуноглобулина G) не было доведено до конца, однако уже можно было сделать ряд важных выводов, которые будут рассмотрены ниже.

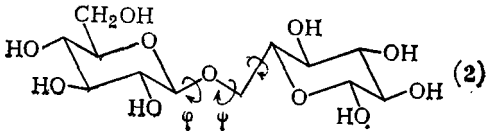
26.4.3. КОНФОРМАЦИИ ПОЛИСАХАРИДОВ В РАСТВОРЕ

Конформации индивидуальных моносахаридных циклов в углеводных цепях обычно могут быть предсказаны на основании ранее сформулированных правил и подтверждены с помощью экспериментальных данных для соответствующих низкомолеку-

лярных моделей. Исключение составляют некоторые углеводные цепи в неупорядоченном состоянии (когда может оказаться необходимым принять в расчет относительно меньшую часть высокоэнергетических конформаций углеводных циклов, которые должны существовать в состоянии равновесия [2]) или в упорядоченном состоянии, но в том относительно редком случае, когда один из углеводных остатков конформационно нестабилен (например, остаток *L*-идуроновой кислоты в некоторых гликозаминогликанах, который существует в альтернативных конформациях $^4C_1$, $^1C_4$ и *твист*-конформации [17]). Для более простых и более общих случаев конформационный анализ значительно упрощается, если считать, что полисахаридная цепь состоит из ряда жестких элементов, соединенных ограниченным числом связей, которые допускают свободное вращение вокруг них; если гликозидная связь образована с участием вторичной гидроксигруппы, имеются две такие связи (1), а с участием первичной — три (2).



(1)



(2)

Конечно, несложно анализировать альтернативные заторможенные конформационные состояния, образующиеся путем вращения вокруг таких связей [(1) и (2)], и с учетом нековалентных взаимодействий располагать их согласно энергетической выгодности. К сожалению, такой подход дает лишь картину общей конформации, из которой нельзя заключить, упорядочена полимерная цепь или нет; это объясняется тем (как показано с помощью физических и математических моделей), что определяемые таким образом общая форма и размеры молекулы зависят даже от незначительной корректировки в пределах каждого энергетического минимума. Для полной интерпретации неупорядоченных конформаций необходимо рассчитать, какие конформации будут принимать отдельные участки молекулы при данной температуре. Возможности выполнения этой задачи и существующие для этого методы обсуждаются в работах [2, 4, 5].

Основной целью теоретического предсказания или экспериментального определения является установление того, в какой конформации находится отдельная углеводная цепь — в упорядоченной или неупорядоченной. В упорядоченном состоянии углы вращения вокруг связей [(1) или (2)] имеют фиксированные значе-

ния, которые, по-видимому, идентичны для всех пар ковалентно связанных углеводных остатков вдоль цепей, тогда как в неупорядоченном состоянии происходит непрерывное вращение и колебание вокруг этих связей, и представляется невероятным, чтобы между любой парой углеводных остатков в любом случае наблюдались эквивалентные стереохимические отношения. Как объясняется более детально в работе [4], существование упорядоченного состояния требует кооперативных взаимодействий внутри полисахаридных цепей или между цепями; это означает, что минимизация энергии взаимодействия между одной парой углеводных остатков одновременно способствует такой минимизации для соседней пары, и так по всей молекуле. Кроме того, неупорядоченное состояние выгодно с точки зрения конформационной энтропии; это следует из вероятности того, что в результате теплового движения цепь будет принимать со временем все возможные конформационные состояния и что конформационная гибкость углеводной цепи выше в неупорядоченном состоянии. Для предсказания того, в какой форме находится цепь (упорядоченной или неупорядоченной), необходимо вычислить свободные энергии, соответствующие обоим этим состояниям. В настоящее время такой расчет не может быть осуществлен и, следовательно, ответ на этот вопрос должен быть найден экспериментальным путем. Однако предсказательные методы полезны для указания возможных свойств отдельно упорядоченного и неупорядоченного состояния молекул.

26.4.3.1. Упорядоченные состояния

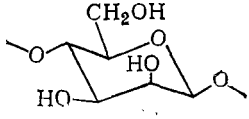
Изучение пространственных моделей и построение математических моделей позволяют предположить существование таких свойств упорядоченных конформаций углеводных цепей, по которым они отличаются от конформаций других важных биополимеров — белков и нуклеиновых кислот. Во-первых, углеводные цепи значительно жестче и, следовательно, число форм, которые может принимать полисахаридная цепь, более ограничено из-за пространственных запретов. Расчет по методу твердых сфер для цепей, в которых последовательно соединенные остатки разделены двумя связями, показывает, что обычно реализуется лишь 5 % возможных конформаций цепи [18]. Во-вторых, изменение последовательности углеводных остатков в полисахаридной цепи может приводить к гораздо более начительному изменению стереохимии молекулы, чем изменени порядка расположения аминокислотных или нуклеотидных остатков, поскольку в случае полипептидов или полинуклеотидов происходит перестройка лишь боковых цепей при сохранении структуры основной цепи, тогда как в полисахаридах изменение конфигурации или положения гликозидной связи ведет к существенным изменениям именно в основной цепи. В-третьих, углеводные цепи часто имеют разветвленную структуру с различным типом связей в точках ветвления, и взаимодействие

между такими цепями открывает новые возможности для изменения конформации, которых нет в линейных биополимерах.

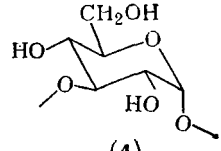
Из рассмотрения характерных особенностей углеводсодержащих полимеров следует, что между их первичной структурой и третичной структурой может существовать более явная и четкая корреляция, чем в других биополимерах. Могут быть сформулированы следующие правила.

1) Гомопериодичные последовательности, такие, как полисахаридные цепи из 1,4-связанных остатков β-*D*-маннопиранозы (3) или из 1,3-связанных остатков α-*D*-глюкопиранозы (4), в которых диэдральный угол между агликоном и гликозидной связью близок к 180°, существуют, вероятно, только в упорядоченных конформациях, вытянутых или имеющих вид ленты.

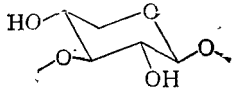
2) Гомопериодичные последовательности, подобные поли-1,3-β-*D*-ксилопиранозе (5) или поли-1,4-α-*D*-глюкопиранозе (6), для которых этот угол близок к 0°, по-видимому, принимают только конформацию полой спирали. В то время как гомопериодичные последовательности первого типа, вероятно, образуют плотные волокнистые агрегаты, цепи второго типа обычно образуют комплексы включения или двойные и тройные спирали.



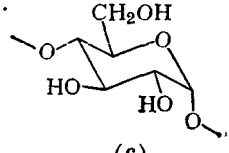
(3)



(4)



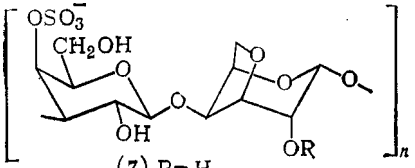
(5)



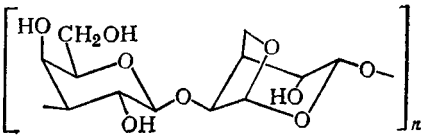
(6)

3) Гетероперіодичные последовательности образуют подобным же образом спиральные или лентообразные конформации, однако предсказать их вид только на основании расчетов труднее. Ценную информацию в этом случае дает построение моделей. Стерические ограничения внутри таких цепей позволяют проводить аналогии между родственными ковалентными последовательностями. Например, молекулы довольно большой группы полисахаридов с чередующимися последовательностями углеводных звеньев [κ-каррагинан (7), ι-каррагинан (7а), агароза (8), гиалуронат (9), хондроитин-4-сульфат (10), хондроитин-6-сульфат (10а), дерматансульфат (10б), кератансульфат (11)] существуют в виде растянутых полых спиралей; некоторые из этих спиралей состоят

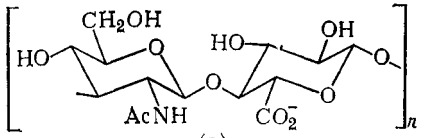
из двух тяжей [1, 10, 13].



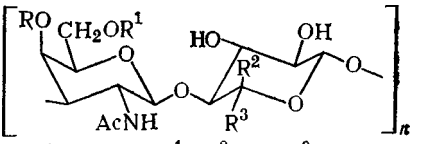
(7) R = H
(7а) R = SO_3^-



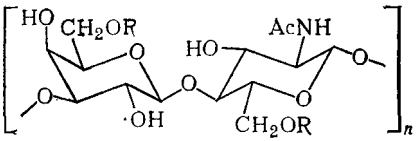
(8)



(9)



(10) R = SO_3^-, R^1 = R^2 = H, R^3 = CO_2^-
(10а) R^1 = SO_3^-, R^2 R^2 = H, R^3 = CO_2^-
(10б) R = SO_3^-, R^1 = R^3 = H, R^2 = CO_2^-



(11) R = H, SO_3^-

4) Если в периодичную последовательность вклиниваются «чужие» остатки, данный вид конформации прерывается. По-видимому, таким образом в биологических системах осуществляется терминирование ассоциации полисахаридных цепей, которая зависит от переплетения регулярных участков цепи, приводящего к образованию сетчатых структур или гелей. Некоторые типы конформационного упорядочения, которые, как было показано, ответственны за образование сетчатых структур, приведены на рис. 26.4.1.

5) Многие углеводные цепи можно классифицировать как апериодичные, поскольку они не имеют регулярной структуры (состоят из углеводных остатков разных типов, гликозидные связи в них осуществляются по различным положениям и часто имеют разную конфигурацию даже на коротких участках молекулы). Такие цепи, в которых отсутствует периодичность в ковалентной последовательности, не могут принимать периодичных упорядоченных конформаций, например, не могут образовывать спирали или ленты (см. пункт 1). Такие структуры часто бывают разветвленными. Показано [18], что наличие боковой цепи может сильно повысить жесткость полисахаридной цепи и наложить дополнительные ограничения на возможные конформации вокруг точки ветвления, особенно когда боковая цепь присоединена по вторичной гидроксигруппе углеводного цикла, смежной с гидроксигруппой, участвующей в образовании основной цепи. В некоторых случаях ветвление может создавать возможность для складывания цепи таким образом, что боковая цепь располагается по одной

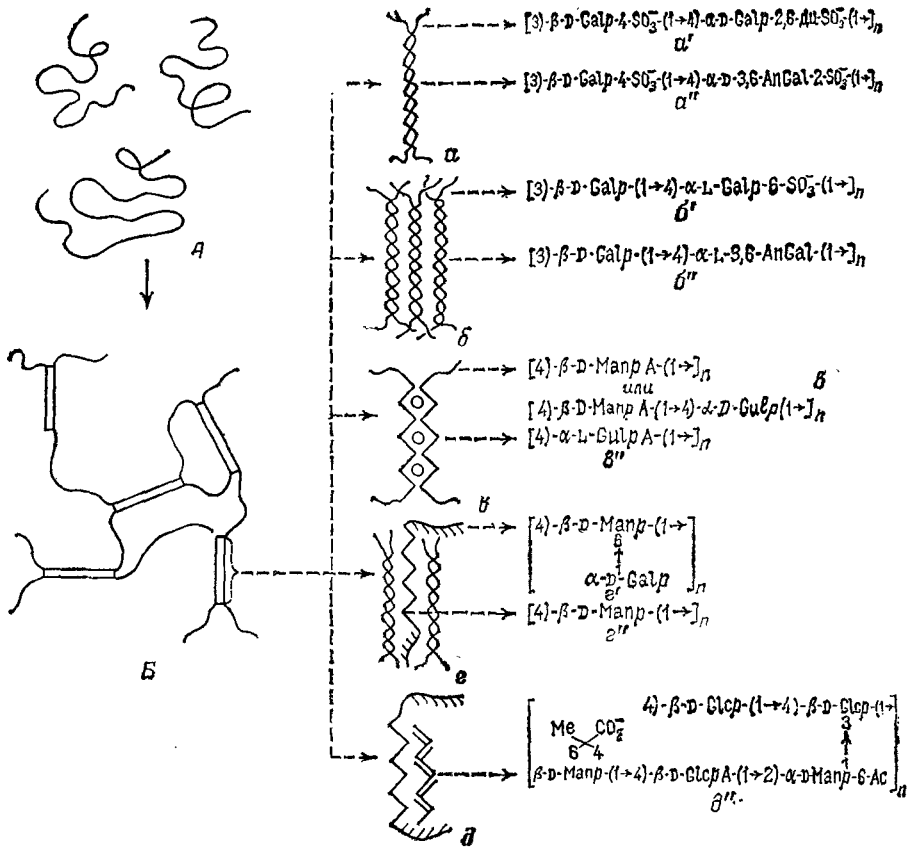


Рис. 26 4.1. Образование сетчатой структуры (Б) из молекул полисахарида в конформации статистического клубка (А); конформации упорядоченных участков (*а*—*д*) и углеводные последовательности упорядоченных (*а'*—*д'*) и неупорядоченных (*а''*—*г''*) участков некоторых полисахаридов:

а — двойная спираль ι-каррагинана; *б* — пучок двойных спиралей агарозы; *в* — «яичная упаковка» альгината (кружками обозначены ионы Ca^{2+}); *г* — кооперативный ассоциат агарозы (двойные спирали) и галактоманнана («ленты»); *д* — ассоциат ксантана («стержни») и галактоманнана («ленты»). Прямоугольниками в структуре Б обозначены упорядоченные участки

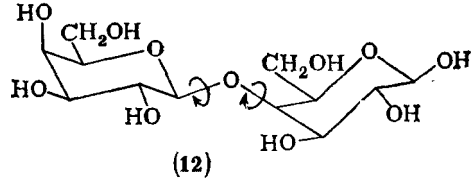
линии (соосно) с основной, причем за счет благоприятных нековалентных взаимодействий достигается взаимная стабилизация этих цепей. Наиболее известным примером стабилизации такого типа служит внеклеточный полисахарид из *E. coli* [15]. Еще одним примером полисахарида, у которого упорядоченное состояние существует и в растворе, является внеклеточный полисахарид из фитопатогенной бактерии рода *Xanthomonas* [19]. Наконец, полученные данные о конформации компонентов крахмала в твердом состоянии [10] могут, по-видимому, служить подтверждением [11] соосного расположения в амилопектине и гликогене α-1,4-связан-

ных основной и боковой (присоединенной к основной цепи α-1,6-связями) цепей с образованием двойной спирали.

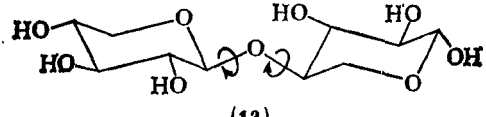
Углеводные цепи апериодичного разветвленного типа являются широко распространенными компонентами гликопротеинов и ряда гликолипидов. Из приведенных выше правил следует, что любые упорядоченные конформации, очевидно, должны быть скорее компактными и глобулярными, чем вытянутыми и периодичными. Это дает возможность объяснить связь между структурой и функцией полисахаридных цепей (например, на поверхности клеток в процессе клеточного узнавания и взаимодействий типа гормон — рецептор). Определение структуры первого кристаллического гликопротеина и в самом деле указывает на возможное соосное расположение и стабилизацию конформаций углеводных и пептидных цепей.

26.4.3.2. Неупорядоченные состояния

Неупорядоченное состояние (форма статистического клубка) существует из-за того, что в полимере имеется большое число связей, вокруг которых возможно вращение с относительно малым изменением энергии; это приводит к тому, что цепь принимает множество альтернативных форм. В состоянии статистического клубка конформация цепи непрерывно флуктуирует между различными возможными состояниями. Чем больше внутренних степеней свободы, тем больше должно быть число возможных переходных форм от одной конформации к другой, и, следовательно, тем труднее молекуле преодолеть тепловое движение, чтобы принять форму, соответствующую минимуму потенциальной энергии. Поэтому неупорядоченному состоянию благоприятствует соединение углеводных остатков посредством трех валентных связей [ср. (1) и (2)]. Для соединения углеводных остатков посредством двух связей расчет путем построения модельных структур показывает, что гибкость цепи ограничивается при увеличении размера смежных с этими связями экваториальных групп, а также при увеличении числа аксиальных гликозидных связей. В соединении (12) такие связи менее гибки, чем связи в соединении (1), которые в свою очередь менее гибки, чем в (13). Как уже отмечалось, наличие



(12)



(13)

разветвлений в цепи вносит дополнительные ограничения, в особенности когда боковые цепи присоединены по вторичным гидроксильным группам в положениях, смежных с гидроксигруппой, участвующей в образовании основной цепи.

Для характеристики неупорядоченного состояния лучше использовать средние общие размеры молекулы, а не средние локальные конформации, потому что такие свойства, как объемная вязкость и способность связывать воду определяются общим объемом раствора, охватываемым подвижной цепью. Математически можно показать, что проблема вычисления средних общих размеров сводится к проблеме определения средней ориентации одного углеводного остатка по отношению к следующему за ним остатку и в принципе может быть решена методом построения моделей с помощью ЭВМ [2]. Чтобы рассчитать соответствующие энергии взаимодействий на каждой стадии для их усреднения согласно распределению Больцмана, необходимо рассмотреть все возможные ориентации углеводных остатков относительно друг друга и затем вычислить среднее квадратичное расстояние между концами цепи. Результаты можно сравнить с экспериментальными значениями, в частности полученными методом светорассеяния. Выяснилось, что две основные группы периодичных гомополисахаридов, которые можно распознать по их четко определенным типам конформаций (см. выше), различаются по основным свойствам и в состоянии статистического клубка. Молекулы соединений, имеющих конформацию ленты, как было правильно предсказано [20], охватывают в растворе большее пространство (типичное характеристическое отношение $C_\infty \approx 100$) по сравнению с молекулами в конформации полой спирали ($C_\infty \approx 10$).

Невозможно, конечно, учесть любые изменения степени взаимодействия между цепью и растворителями, например, когда цепь имеет тенденцию выдвигаться в окружающую среду, чтобы стать более сольватированной, или сокращаться для удаления элементов цепи из раствора. Поэтому результаты расчетов соответствуют таким условиям («θ-точка»), при которых полимерная цепь является «невозмущенной» и тенденции выдвигаться или сокращаться строго сбалансированы. Условия в θ-точке обычно не отвечают условиям, наиболее способствующим проявлению биологических функций молекулы или ее свойств, представляющих технологический интерес. Следует отметить также, что математические методы для расчета энергий взаимодействия внутри цепи все еще весьма неточны, и поэтому их можно успешно применять для предсказания лишь общих тенденций. Однако в этом направлении достигнут некоторый успех [21]. Наиболее интересным общим свойством углеводных цепей в неупорядоченном состоянии является способность связывать воду и ионы, а также включать другие полимерные цепи в свой домен или исключать из него [1]. Связывание воды объясняется тем, что движущая сила этого процесса, конформационная энтропия, делает предпочтительной конформацию ста-

тистического клубка, которая легче осуществляется при наличии большого водного домена, увеличивающего возможность флуктуаций формы молекулы. Связывание катионов обычно происходит быстро и путем случайных столкновений без необходимости воспроизведения геометрии молекулы при каждом акте взаимодействия; при этом вокруг цепи молекулы такого полиэлектролита возникает ионная атмосфера, аналогичная газовой атмосфере, окружающей планеты. Катионы удерживаются вследствие требования общей электронейтральности молекулы, но за счет энтропийного фактора они максимально смешаны с растворителем; это увеличивает внутреннее осмотическое давление, в результате чего вода впитывается в домен полимера [1].

В полимерных цепях, находящихся в растянутых неупорядоченных конформациях, должны осуществляться множественные сегмент-сегментные контакты; при этом проявляются некоторые типичные свойства таких взаимодействий. Энтропия смешения растворов двух различных полимеров зависит в первом приближении от числа участвующих в этом процессе молекул и, следовательно, не зависит от молекулярной массы. Энергия же взаимодействия между двумя полимерами в смеси зависит от числа сегмент-сегментных контактов и для данного числа молекул должна расти с увеличением их молекулярной массы. Поэтому значение энтропийного члена возрастает по мере увеличения молекулярной массы и поведение полимеров в смеси определяется энергиями взаимодействия, даже когда сегмент-сегментные контакты непродолжительны и энергии их малы. Если взаимодействия между сходными полимерными сегментами более выгодны, чем между несходными, два водных раствора могут разделиться на четкие фазы, которые ведут себя как две несмешивающиеся жидкости. Такое явление часто называют «несовместимостью полимеров». Если же взаимодействие между несходными сегментами выгоднее, чем между сходными, то возможно, что два полимера образуют одну общую фазу, подобную жидкости или твердому веществу. Такое явление часто называют «комплексной коацервацией». Несовместимость полимеров может оказаться полезной, например, для получения двух несмешивающихся водных фаз при биохимических разделениях, как в хорошо известной методике выделения плазматических мембран, где в качестве одной из фаз используют полисахарид декстран [22]. На основе комплексных коацерватов полисахаридов и белков, имеющих противоположные заряды (в особенности гуммиарабика и желатины) создана современная технология микроинкапсулирования.

26.4.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОРМЫ МОЛЕКУЛ ПОЛИСАХАРИДОВ В РАСТВОРЕ

Первый вопрос, на который следует получить ответ при любой попытке охарактеризовать конформацию полисахарида в растворе, — это упорядочены его молекулы или нет. Необходимую

информацию можно получить с помощью классических методов определения размера, формы и асимметрии полимерных молекул, в том числе методов, основанных на светорассеянии, рассеянии рентгеновских лучей под малым углом, измерения вязкости (для полиэлектролитов в зависимости от ионной силы) [23] и седиментации. Все эти методы обычно применимы к полимерам многих типов; детали их теоретических принципов и экспериментальные методики приведены в работах по изучению растворов полимеров [24, 25]. Однако эти методы обычно дают информацию об усредненных свойствах молекулы полимера как единого целого. Следовательно, если часть молекулы имеет упорядоченное строение, тогда как остальная часть является неупорядоченной, данные этих методов будут свидетельствовать, что в среднем молекула является неупорядоченной. Это неудобно, так как любая специфичность физических или биологических свойств, очевидно, связана с упорядоченным участком и, следовательно, важно обнаружить и охарактеризовать именно его. Еще одним недостатком является необходимость определения упорядоченной конформации как конформации, закрепленной вблизи энергетического минимума кооперативными взаимодействиями. Существование подобных кооперативных взаимодействий можно лишь предположить, их нельзя обнаружить методами, применяемыми для исследования полимеров.

Найдены два других подхода к этой проблеме, полезные, в частности, для доказательства существования кооперативно стабилизированных областей молекулы. Они будут детально обсуждены ниже.

26.4.4.1. Ядерная магнитная релаксация

Важным параметром в методе спектроскопии ЯМР является время спин-спиновой релаксации T_2, измеряемое либо непосредственно как временная константа экспоненциального спада намагничивания в импульсном спектрометре, либо в виде величины $\Delta\nu_{1/2}$ в спектрометре высокого разрешения. Согласно преобразованию Лоренца

$$\Delta\nu_{1/2} = (\pi T_2)^{-1} \tag{1}$$

Время релаксации характеризует скорость дефазирования ядерных спинов, которое замедляется в результате теплового движения. Следовательно, при быстром тепловом движении молекул возникают узкие спектральные линии, тогда как медленное тепловое движение приводит к такому уширению линий, что их невозможно детектировать с помощью соответствующего спектрального дисплея высокого разрешения. Таким образом можно непосредственно отличить конформацию статистического клубка [в котором (по определению) тепловое движение приводит к быстрому взаимопревращению конформаций локальных сегментов молекул в пределах энергетически возможных состояний] от конформаций, в которых локальные сегменты полисахаридной цепи настолько свя-

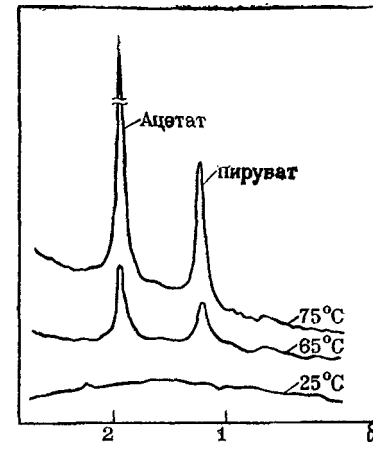


Рис. 26.4.2. Часть спектра ЯМР ^1H высокого разрешения ксантана при различных температурах

заны кооперативными взаимодействиями, что полимер участвует в тепловом движении как единая частица. В результате в спектрах ЯМР ^1H высокого разрешения полисахаридов в неупорядоченном состоянии действительно достигается высокая степень разрешения и среднее значение T_2 составляет ~ 10 мс при комнатной температуре, тогда как в спектрах полисахаридов с кооперативно упорядоченными конформациями сигналы слишком широки для детектирования и T_2 может составлять ~ 100 мкс [26]. Хорошим примером служит переход типа «порядок — беспорядок» у ксантана (внеклеточного полисахарида из бактерии *Xanthomonas campestris*). Его молекула (см. рис. 26.4.1) содержит две *C*-метильные группы, которым соответствуют хорошо разрешенные сигналы (*1*, *2*) в спектре ЯМР ^1H при высоких температурах. Эти сигналы полностью исчезают при охлаждении вследствие перехода полисахаридных цепей в упорядоченное состояние (рис. 26.4.2) [19].

При применении метода ЯМР удобнее пользоваться спектрами высокого разрешения, так как соответствующие приборы обычно более доступны. Следует, однако, отметить два серьезных ограничения этого метода. Во-первых, если разные области одной цепи имеют различные конформации, то должен существовать быстро релаксирующий компонент. Точное интегрирование сигналов спектров можно осуществить путем использования внешних стандартов, форма сигналов которых максимально (насколько это возможно) приводится к форме сигнала измеряемого вещества [27]; однако подобные косвенные доказательства всегда неудовлетворительны. Во-вторых, действительное время релаксации для быстро релаксирующего компонента замерить невозможно, так как ширину ненаблюдаемого сигнала измерить нельзя; следовательно, этот ценный параметр, характеризующий степень жесткости молекулы, в данном случае недоступен. Обе эти проблемы в принципе можно обойти прямыми измерениями времени спада намагничивания, однако это до сих пор трудно осуществить и вследствие усреднения этого параметра по химически неэквивалентным ядрам могут быть получены низкие значения T_2. Следовательно, лучше всего применять указанные выше методы совместно и рассматривать их как дополняющие друг друга.

26.4.4.2. Переходы типа «порядок — беспорядок»

Важной отличительной чертой конформаций, стабилизированных кооперативными взаимодействиями, является то, что переход молекул в неупорядоченное состояние совершается достаточно резко независимо от того, чем он вызван: изменением температуры, состава или ионной силы растворителя или другого фактора. Часто такой переход приближается к случаю «все или ничего», т. е. сильно отличается от постепенного сдвига конформационного равновесия в малых молекулах. Подобные резкие переходы могут быть обнаружены путем измерения любого физического параметра полисахарида, который зависит от общей конформации его молекулы. Характерные сигмоидные кривые иллюстрируют конформационные переходы ксантана, за которым следили по изменениям вязкости, оптического вращения в монохроматическом свете, площади детектируемого сигнала в спектре ЯМР (рис. 26.4.3) или амплитуды кривой кругового дихроизма при соответствующей длине волны, а также другими методами.

В принципе наличие ступенчатого изменения измеряемого параметра при определении любой физической характеристики полимера является четким подтверждением кооперативности взаимодействий, которые стабилизируют по крайней мере одно из равновесных состояний его молекул. Хотя подобное ступенчатое изменение может возникнуть вследствие взаимодействий между полимером и растворителем, между растворителем и сорастворителем или растворителем и сорастворенным веществом, обычно можно (по крайней мере в случае переходов, вызываемых изменением

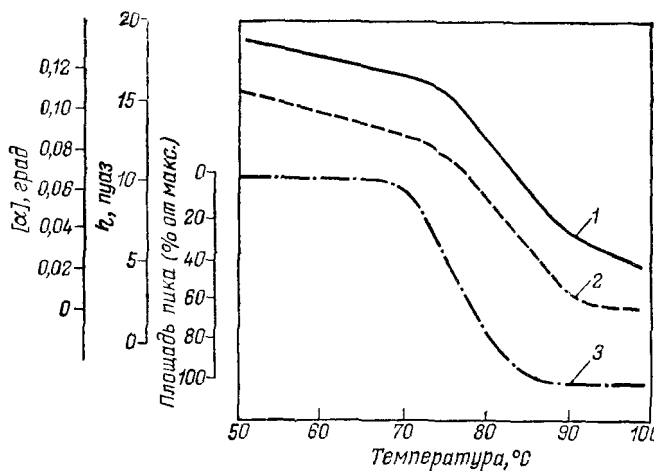


Рис. 26.4.3. Влияние температуры на вязкость (*1*), оптическое вращение (*2*) и интегральную площадь (*3*) сигнала, наблюдаемого в спектре ЯМР высокого разрешения раствора ксантана

температуры) уверенно отнести природу этого явления к возмущению самой молекулы. Когда скачок вызывается изменением состава растворителя, концентрации сорастворителя или pH среды, трудно исключить альтернативные интерпретации ступенчатого изменения физической характеристики полимера. По этой причине, а также вследствие того, что абсолютные термодинамические взаимоотношения определять легче, в качестве независимой переменной, вызывающей изменение конформации, лучше использовать температуру.

Наличие кооперативных взаимодействий можно также определить по изменению свойств ряда гомологичных олигосахаридов с длиной цепи, большей или меньшей критического порога существования упорядоченной конформации, что было продемонстрировано при изучении способности олигогалактуронатов и олигогулуронатов связывать ионы кальция [28]. Для этих олигосахаридов продемонстрирована четкая сигмоидная зависимость увеличения сродства к ионам кальция от длины цепи; выше и ниже соответствующей длины цепи способность к связыванию изменялась постепенно.

26.4.4.3. Описание упорядоченных конформаций в растворе

Если установлено, что молекулы данного полисахарида в растворе имеют частично или полностью упорядоченную конформацию, то следующим шагом является возможно более детальное определение их геометрии. Все имеющиеся в настоящее время подходы к решению этой проблемы основаны на сравнении с базисными конформациями, определенными рентгеноструктурным анализом в твердом состоянии. Сравнение некоторых основных особенностей конформаций молекул может быть сделано на основании анализа стехиометрии при переходе «порядок — беспорядок»; так, можно выяснить, из скольких тяжей составлена упорядоченная конформация молекулы. Так, изучение концентрационной зависимости указанного перехода показало, что ксантан упорядочен внутримолекулярно [19], тогда как ι-каррагинан образует упорядоченный димер [29], что и ожидалось для обоих случаев по аналогии с твердым состоянием. Для полиглюкуроната стехиометрия связывания ионов кальция, как было показано, может соответствовать только двухтяжевой укладке его молекулы [30]. Такая двухтяжевая ассоциация полисахаридных цепей в нескольких независимых областях связывания может приводить к возникновению незавершенной трехмерной сетчатой структуры, т. е. к гелеобразованию; введение в молекулу полисахарида короткоцепных сегментов, имеющих только одну область связывания, может подавить процесс образования сетчатой структуры за счет конкурентного ингибирования ассоциации цепей. Такое явление может быть использовано для получения данных, подтверждающих двухтяжевый характер ассоциата, как это было сделано для ι-каррагинана и полигулуроната [31].

Для получения информации о стереохимических особенностях молекул могут быть также применены хироптические методы. Например, сильное нарушение $\pi \rightarrow \pi^*$-перехода для карбоксилатного хромофора при кооперативном связывании ионов кальция полигулуронатом и полигалактуронатом согласуется с существованием такой области связывания, в которой катион расположен в непосредственной близости от орбиталей, не участвующих в связывании (что действительно можно предположить по аналогии с известными конформациями цепей) [32]. Широкое применение имеет эмпирическое соотношение [33] между значением оптического вращения и значениями основных конформационных переменных полисахаридной цепи, а именно диэдральных углов φ и ψ [см. формулы (1) и (2)]. Величину, известную как «связевое вращение» $[\Lambda]_D$, определяют, вычитая из значения молекулярного вращения углеводного остатка в цепи значение молекулярного вращения соответствующего метилгликозида. Для гликозидной связи, в образовании которой участвуют вторичные гидроксигруппы [как в (1)], ее определяют по уравнению (2).

$$[\Lambda]_D = A—B\,(\sin \Delta\varphi + \sin \Delta\psi) \qquad (2)$$

где A и B — известные постоянные, $\Delta\varphi$ и $\Delta\psi$ — равные соответственно $\varphi - 180°$ и $\psi - 180°$ (φ и ψ — диэдральные углы).

Аналогичное выражение может быть составлено для связи по первичной гидроксигруппе [как, например, в (2)].

Это соотношение было проверено на модельных соединениях и показано, что его можно успешно применить для корреляции конформаций в растворе и(или) геле каррагинана [34], агара [35], некоторых арабиноксиланов [36] и полимера 3-*O*-метил-*D*-глюкозы из *Mycobacterium smegmatum* [37] с учетом конформаций для твердого состояния. К сожалению, этот метод анализа усложняется, если в молекуле имеются хромофоры, поглощающие в доступной УФ-области спектра, которые оптически активны и чувствительны к общей конформации молекулы, так как такие хромофоры могут искажать истинное значение оптического вращения.

26.4.4.4. Описание неупорядоченных конформаций в растворе

Помимо общеупотребительных методов определения общих размеров статистического клубка, которые обычно применяют для исследования растворов полимеров, существуют специальные методы определения локальных конфигураций гликозидных связей углеводных цепей. При растворении полисахарида в диметилсульфоксиде можно наблюдать сдвиг в слабое поле сигналов протонов гидроксильных групп, участвующих в образовании водородных связей между углеводными остатками. Величина такого сдвига определяется прочностью водородной связи [38]. Анализ этих спектров помогает идентифицировать подобные связи [38, 39]. Анализ констант спин-спинового взаимодействия $^{13}C—H$, возможно, также

будет полезен для определения диэдральных углов между связями [40].

Соотношение между значениями оптического вращения и диэдральных углов при гликозидной связи (см. выше) также применимо к флуктуирующим неупорядоченным конформациям, однако в этом случае получаемый результат соответствует взвешенному среднему для всех молекул в состоянии равновесия. Для некоторых типов связей, как, например, в целлобиозе и ее олигомерах, а также в лактозе, полученные данные свидетельствуют о том, что их углеводные остатки в растворе флуктуируют так, что конформации молекул близки к конформациям, существующим в кристалле [33, 41]. Однако для мальтозы, ее олигомеров и полимеров наблюдаемое оптическое вращение можно интерпретировать таким способом лишь при использовании в качестве растворителя диметилсульфоксида, но не воды. На основании этого предположили [33, 41], что в водном растворе каждый отдельный четкий энергетический минимум должен быть до некоторой степени заселен. Позднее это было подтверждено открытием именно такой формы существования молекул в кристаллах гликозида [42]. Другое предсказание — что молекула циклогексаамилозы существует в симметричной конформации с осью симметрии шестого порядка в диметилсульфоксиде или при образовании комплекса с гидрофобными молекулами в водном растворе (но не в свободном виде)— получило некоторое подтверждение при последующем исследовании кристаллических структур [43].

26.4.5. ПРИМЕРЫ УПОРЯДОЧЕННЫХ КОНФОРМАЦИЙ ПОЛИСАХАРИДОВ В РАСТВОРАХ И ГЕЛЯХ

Многие относительно простые периодичные полисахариды, например целлюлоза и крахмал, в упорядоченном состоянии нерастворимы. Это объясняется, во-первых, тем, что принятие упорядоченной конформации обычно облегчает укладку цепей за счет благоприятных нековалентных взаимодействий между ними для минимизации общей потенциальной энергии и, во-вторых, тем, что упорядочение цепей приводит к повышению их жесткости и снижению конформационной энтропии, которая играет важную роль в процессе растворения. Следовательно, агрегация цепей и осаждение являются более выгодными процессами даже в тех случаях, когда взаимодействие типа полимер — полимер лишь незначительно предпочтительнее взаимодействий типа полимер — растворитель и даже когда упаковка молекул не упорядочена. Поэтому в упорядоченном состоянии молекулы полисахарида продолжают существовать в растворе только при наличии благоприятных дополнительных факторов.

1) Полисахаридные полиэлектролиты в упорядоченных конформациях могут быть растворимыми, поскольку наличие заряда в основной цепи, а также тенденция противоионов смешиваться

с растворителем больше благоприятствуют растворению, чем агрегации.

2) Полисахаридные цепи, неудобные для компактной укладки, например в ксантане (пятитяжевая конформация с узловатыми разветвлениями и отчасти полиэлектролитным характером), могут оказаться более стабильными в растворе или в слабоагрегированном состоянии, чем полностью отделенные от раствора.

3) Цепи полисахаридов могут иметь упорядоченную конформацию и, следовательно, находиться в агрегированном состоянии, которое лишь в малой степени кооперативно и потому всегда существует в равновесии с растворимой конформацией статистического клубка.

Дополнительное биологическое «приспособление» для поддержания полисахаридных цепей в упорядоченной конформации имеется в полисахаридах с прерывающейся периодичностью строения (см. разд. 26.4.3.1). В таких структурах блоки периодичных последовательностей, имеющие склонность к конформационному упорядочению, прерываются модифицированными последовательностями, конформационно неупорядоченными и потому растворимыми. Тенденция упорядоченных сегментов уходить из раствора из-за легкости их агрегации или энтропийных факторов противостоит тенденции неупорядоченных сегментов оставаться в контакте с растворителем. Если упорядоченное состояние образовано двумя или более полисахаридными тяжами, то возникает сетчатая структура, в которой также имеются топологические ограничения для агрегации упорядоченных сегментов. Некоторые типы конформационного упорядочения, которые, как было показано, ответственны за образование в этих последовательностях областей связывания, показаны на рис. 26.4.1. Более детальные сведения об упорядоченных конформациях полисахаридов, которые были описаны для растворов и гелей, приведены в обзорах [3, 5].

ЛИТЕРАТУРА

1. *D. A. Rees*, M. T. P. Internat. Rev. Sci., Biochem. Series One, 1975, **5**, 1.
2. *D. A. Brant*, Quart. Rev. Biophys., 1976, **9**, 527.
3. *D. A. Rees and E. J. Welsh*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1977, **16**, 214.
4. *D. A. Rees*, M. T. P. Internat. Rev. Sci., Org. Chem. Series One, 1973, **7**, 251.
5. *D. A. Rees*, 'Polysaccharide Shapes', Chapman and Hall, London, 1977.
6. *S. Arnott*, Trans. Amer. Crystallogr. Assoc., 1973, **9**, 31.
7. *K. H. Gardner and J. Blackwell*, Biopolymers, 1974, **13**, 1975.
8. *F. J. Kolpak and J. Blackwell*, Macromolecules, 1976, **9**, 273.
9. *V. G. Murphy, B. Zaslow, and A. D. French*, Biopolymers, 1975, **14**, 1487.
10. *H.-C. H. Wu and A. Sarko*, Carbohydrate Res., 1978, **61**, 7; ibid., p. 27.
11. *K. Kainuma and D. French*, Biopolymers, 1972, **11**, 2241.
12. *S. Arnott and W. T. Winter*, Fed. Proc., 1977, **36**, 73; *E. D. T. Atkins, D. H. Isaas, J. A. Nieduszynski, C. F. Phelps, and J. K. Sheehan*, Polymer, 1974, **15**, 263.
13. *J. K. Sheehan, K. H. Gardner, and E. D. T. Atkins*, J. Mol. Biol., 1977, **117**, 113.
14. *W. T. Winter, P. J. C. Smith, and S. Arnott*, J. Mol. Biol., 1975, **99**, 219.

15. *R. Moorhouse, W T. Winter, S. Arnott, and M E. Bayer*, J. Mol. Biol., 1977, **109**, 373.
16. *R. Huber, J. Deisenhofer, P M. Colman. M. Matsushima, and W. Palm*, Nature, 1976. **264**, 415.
17. *A. S. Perlin, B. Casu, G. R. Sanderson, and J. Tse*, Carbohydrate Res., 1972, **21**, 123.
18. *D. A. Rees and W. E. Scott*, J. Chem. Soc. (B), 1971, 469.
19. *E. R. Morris, D. A. Rees, G. Young, M. D. Walkinshaw, and A. Darke*, J. Mol. Biol., 1977, **110**, 1.
20. *S. G. Whittington and R. M. Glover*, Macromolecules, 1972, **5**, 55.
21. *E. R. Morris, D. A. Rees, E. J. Welsh, L. G. Dunfield, and S. G. Whittington*, J. C S. Perkin II, 1978, in the press.
22. *D. M. Brunette and J. E. Till*, J. Membrane Biol., 1971, **5**, 215.
23. *O. Smidsrød and A. Haug*, Biopolymers, 1971, **10**, 1227.
24. *C. Tanford*, 'Physical Chemistry of Macromolecules', Wiley, New York, 1961.
25. *H. Morawetz*, 'Macromolecules in Solution', 2nd edn., Wiley, New York, 1975.
26. *S. Ablett, E. R. Morris, D. A. Rees and E. J. Welsh*, неопубликованные данные.
27. *E. G. Finer, R. Henry, R. B. Leslie, and R. N. Robertson*, Biochim. Biophys. Acta, 1975, **380**, 320.
28. *R. Kohn and O. Luknar*, Coll. Czech. Chem. Comm., 1977, **42**, 731 и более ранние публикации.
29. *T. A. Bryce, D. A. Rees, D. S. Reid, and A. H. Clark*, неопубликованные данные.
30. *J. Boyd, E. R. Morris, D. A. Rees, D. Thom, and J. R. Turvey*, неопубликованные данные.
31. *E. R. Morris, D. A. Rees, and G. Young*, неопубликованные данные
32. *G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith, and D. Thom*, F. E. B. S. Letters, 1973, **32**, 195.
33. *D. A. Rees*, J. Chem. Soc. (B), 1970, 877.
34. *D. A. Rees, W. E. Scott, and F. B. Williamson*, Nature, 1970, **227**, 390.
35. *I. C. M. Dea, A. A. McKinnon, and D. A. Rees*, J. Mol. Biol., 1972, **68**, 153.
36. *I. C. M. Dea, D. A. Rees, R. J. Beveridge, and G. N. Richards*, Carbohydrate Res., 1973, **29**, 363
37. *D. A. Rees*, неопубликованные данные.
38. *B. Casu, M. Reggiani, G. G. Gallo, and A. Vigevani*, Tetrahedron, 1966, **22**, 3061.
39. *M. St.-Jacques, P. R. Sundararajan, K. J. Taylor, and R. H. Marchessault*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 4386.
40. *R. U. Lemieux and S. Koto*, Tetrahedron, 1974, **30**, 1933.
41. *D. A. Rees and D. Thom*, J. C. S. Perkin II, 1977, 191.
42. *J. Tanaka, A. Tanaka, T. Ashida, and M. Kakudo*, Acta Cryst., 1976, **32B**, 155.
43. *P. C. Manor and W. Saenger*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 3630.

ЧАСТЬ 27
ОРГАНИЧЕСКИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЫ

П. ХОДЖ (University of Lancaster)

Эта глава посвящена синтетическим органическим полимерам, а также природному каучуку и гуттаперче. Другие важнейшие природные полимеры (нуклеиновые кислоты, белки и полисахариды) рассмотрены в других главах этого тома, а также тома 10 перевода. Во многих работах, посвященных синтетическим высокомолекулярным соединениям, описываются в первую очередь их технические свойства. В данном обзоре этому аспекту уделено сравнительно мало внимания. Высокомолекулярные соединения рассматриваются здесь просто как еще один тип органических соединений; описаны методы их синтеза, химические превращения и применение в органической химии. Два последних вопроса представляют особый интерес и все больше привлекают к себе внимание химиков-органиков.

27.1. СИНТЕЗ ОРГАНИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ

Методы синтеза органических высокомолекулярных соединений описаны в данной главе весьма кратко. Этому вопросу посвящено большое число обзоров и монографий, ссылки на которые приведены в настоящем разделе. Для более подробного знакомства с теоретическими аспектами синтеза полимеров особенно полезны монографии Оудиана [1], а также Дженкинса и Ледвита [2]. Методические аспекты подробно рассмотрены в книгах Брауна с соавт. [3] и Соренсена и Кэмпбела [4]. Много ценных сведений по всем проблемам синтеза макромолекул приведено в книге [5].

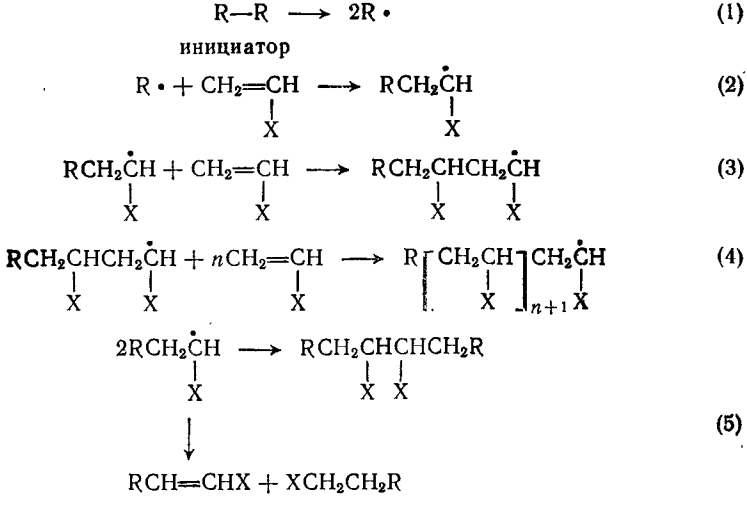
По своему механизму процессы синтеза полимеров могут быть разделены на два основных типа: полимеризация (цепная и ступенчатая) и поликонденсация (иногда также называемая ступенчатой «полимеризацией»). Получаемые этими способами полимеры можно затем модифицировать с помощью различных химических реакций, что позволяет получать материалы с самыми разными свойствами.

27.1.1. ЦЕПНАЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ

При цепной полимеризации (называемой иногда «присоединительной» полимеризацией) происходит соединение ненасыщенных мономеров в макромолекулу *. Инициирование полимеризации осуществляется различными способами (см. ниже).

(1) Радикальная полимеризация [7]

В качестве инициаторов этой реакции используют соединения, генерирующие свободные радикалы. Присоединение свободного радикала к молекуле ненасыщенного мономера дает новый свободный радикал, который в свою очередь присоединяется к следующей молекуле мономера, образуя еще более крупный свободный радикал, и т. д. Обрыв цепи происходит при рекомбинации или диспропорционировании двух радикалов. В процесс цепной радикальной полимеризации входят реакции инициирования (схемы 1, 2), роста цепи (схемы 3, 4) и обрыва цепи (схема 5). Для реакций цепной полимеризации обычно характерны следующие особенности, отличающие их от процессов ступенчатой полимеризации: (а) рост цепи происходит путем быстрого присоединения молекул мономера к небольшому числу активных центров; (б) скорость полимеризации очень быстро достигает максимального значения и затем остается более или менее постоянной до тех пор, пока не будет израсходован весь инициатор; (в) концентрация мономера равномерно уменьшается; (г) даже при низкой степени конверсии мономера в продуктах реакции содержатся полимеры с высокой молекулярной массой.



(1)

(2)

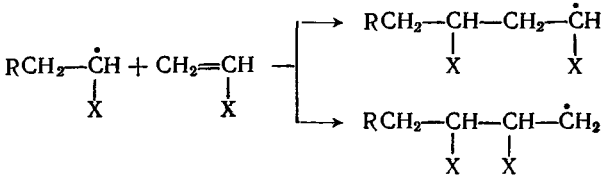
(3)

(4)

(5)

* Если в качестве мономеров используют монозамещенные олефины (стирол, винилхлорид, метилакрилат и другие соединения, содержащие винильную группировку), в этих случаях процесс их полимеризации иногда называют «винильной» полимеризацией [6].

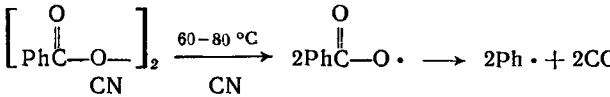
Многие моно- и 1,1-дизамещенные производные этилена, например винилхлорид, винилацетат, стирол, 1,1-дихлорэтилен, бутадиен-1,3, акрилонитрил, акриламид, метилакрилат и метилметакрилат, могут полимеризоваться по радикальному механизму. Заместители стабилизируют радикалы, образующиеся при росте цепи, протекающем согласно уравнению (6). Вследствие этого все или почти все мономерные звенья включаются в растущую цепь указанным в схеме (6) путем, а не по реакции (7). Из-за пространственных препятствий 1,2-ди-, три- и тетразамещенные этилены обычно полимеризуются с трудом или вообще не полимеризуются. Исключением из этого правила являются тетрафторэтилен и некоторые циклические ненасыщенные мономеры.



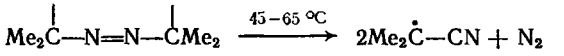
(6)

(7)

Полимеризация виниловых мономеров является, как правило, экзотермическим процессом, вследствие чего полимеризация олефина в блоке используется сравнительно редко, однако ее можно осуществить в растворе, суспензии или эмульсии. В качестве инициаторов наиболее широко применяют бензоилпероксид и азобис(изобутиронитрил) (АЗБН) (схемы 8 и 9). Если полимеризацию проводят в водной эмульсии, то можно использовать растворимые в воде инициаторы, например пероксодисульфат калия, или окислительно-восстановительные системы, например пероксид водорода — ион Fe^{2+}.



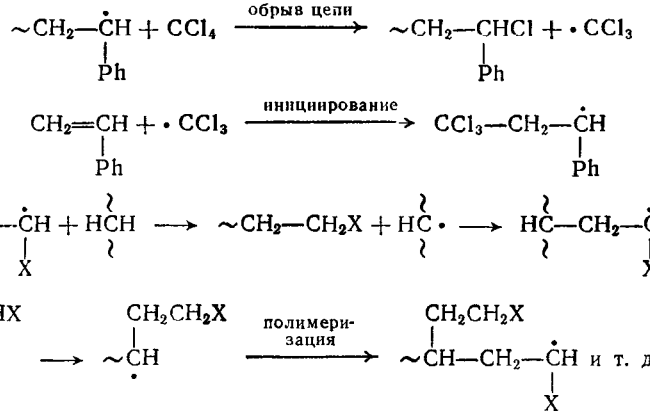
(8)



(9)

Процесс полимеризации, являясь в общем случае экзотермическим, протекает в то же время с значительным уменьшением энтропии. Поэтому изменение изобарно-изотермического потенциала при полимеризации будет иметь отрицательное значение только ниже некоторой определенной температуры, и, следовательно, только ниже этой температуры будет возможна полимеризация. Такая температура называется предельной ($T_п$). Точное значение ее зависит от условий реакции (растворитель, концентрация мономера и т. п.). Знание этой температуры особенно необходимо в случае слабо экзотермических реакций, так как при этом значение $T_п$ может быть ниже 100 °С. Так, при полимеризации α-метилстирола в виде его 0,76 *М* раствора в тетрагидрофуране $T_п$ равна 0 °С, а при полимеризации в блоке мономера она равна 61 °С.

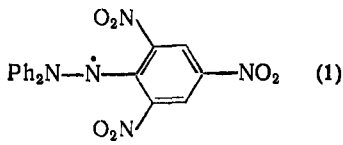
Свободные радикалы — частицы с очень высокой реакционной способностью, и присутствие в реакционной смеси небольших количеств иных веществ кроме инициатора и мономера может резко изменить ход полимеризации. Для получения полимеров с большой молекулярной массой необходимо использовать тщательно очищенные мономеры. Влияние примесей может осуществляться по двум основным направлениям. Примером первого из них служит полимеризация стирола в присутствии небольшого количества тетрахлорида углерода. Полимеризация происходит с такой же скоростью, что и в отсутствие CCl_4, но образующийся полистирол имеет меньшую среднюю молекулярную массу и содержит следы хлора. Это обусловлено явлением «передачи цепи», когда обрыв цепи приводит к образованию радикала, способного инициировать цепную полимеризацию находящегося в системе мономера (схемы 10, 11). Число растущих цепей и, следовательно, скорость полимеризации не изменяются, но число элементарных актов на стадии роста цепи до ее обрыва уменьшается. Особенно важен тот случай, когда сами макромолекулы выступают в роли передатчиков цепи. Это приводит к появлению разветвлений (схема 12), причем образующиеся боковые цепи могут быть очень длинными. В тех случаях, когда растущий радикал атакует свою собственную цепь (схема 13), образуются более короткие боковые цепи. Типичными агентами передачи цепи являются тетрахлорид углерода, толуол и тиолы.



(10) (11) (12) (13)

В том случае, когда добавленное вещество реагирует с растущим радикалом так же, как и в предыдущем случае, но генерируемый новый радикал недостаточно реакционноспособен для того, чтобы инициировать новую цепную реакцию, добавки ингибируют полимеризацию. Если добавка введена в достаточном количестве, то полимеризация может вовсе не идти. Ингибиторы часто добавляют к реакционноспособным мономерам для увеличения срока их хранения. Типичными ингибиторами являются хиноны,

кислород и α,α′-дифенилпикрилгидразил (ДФПГ) (1). Последний ингибитор особенно удобен, так как он окрашен в глубокий фиолетовый цвет, а продукт его рекомбинации с другим радикалом — в желтый цвет или бесцветен.



(1)

Если для полимеризации используют не один мономер («гомополимеризация»), а смесь мономеров («сополимеризация»), то можно получить сополимеры, каждая макромолекула которых содержит мономерные звенья нескольких типов [8]. В простейшем случае сополимеризации с использованием всего двух мономеров (M и M¹) реакция может протекать с промежуточным образованием любого из двух типов растущих радикалов: радикала, оканчивающегося звеном M, или радикала, оканчивающегося звеном M¹. Если каждый из этих радикалов имеет одинаковую реакционную способность по отношению к обоим мономерам, то основными факторами, влияющими на вероятность их взаимодействия с тем или иным мономером, будут относительная концентрация мономеров (которую можно регулировать скоростью подачи каждого из них) и относительная реакционная способность одного мономера по сравнению с другим. При этом образуется сополимер с нерегулярным чередованием звеньев (2). Примером такой сополимеризации является сополимеризация стирола и бутадиена-1,3. Если же растущий радикал, оканчивающийся мономерным звеном одного типа, реагирует только со вторым типом мономера, то образуется сополимер, в цепи которого наблюдается правильное чередование элементарных звеньев обоих типов (альтернирующий сополимер) (3).

ММ¹М¹ММ¹М¹МММ¹МММ¹ (2)

ММ¹ММ¹ММ¹ММ¹ММ¹ (3)

Такого типа сополимер образуется при сополимеризации стильбена и малеинового ангидрида. Тенденция к альтернированию приписана влиянию полярных факторов. По существу, она проявляется в тех случаях, когда один олефин содержит электронодонорные, а второй — электроноакцепторные заместители. Весьма важная особенность сополимеризации состоит в том, что мономеры типа стильбена и малеинового ангидрида с большим трудом вступают в реакции гомополимеризации, но часто легко образуют сополимеры. Приведенные примеры представляют собой два граничных случая. Обычно в макромолекулах сополимеров имеются последовательности элементарных звеньев каждого типа.

(2) Катионная полимеризация [9]

Цепная полимеризация, идущая с участием катионов, как правило, протекает по схеме, аналогичной описанной выше для радикальной полимеризации; однако в этом случае реакционными частицами, обеспечивающими рост цепи, являются карбениевые ионы или иные положительно заряженные частицы. В зависимости от природы «растущего» катиона и его противоиона, от сольватирующей и ионстабилизирующей способности растворителя и температуры реакции в той или иной степени могут участвовать как свободные катионы, так и различные ионные пары.

Для инициирования катионной полимеризации используют различные катализаторы: серную кислоту, трихлорид алюминия, трифторид бора (со следами воды), соли триалкилоксония, а также различные комбинации реагентов, которые, взаимодействуя между собой, дают карбениевые ионы, например ацил- или алкилхлориды в сочетании с кислотами Льюиса.

Полимеризация протекает особенно легко, если мономер реагирует с образованием стабилизированного карбениевого иона. Такими мономерами являются изобутен, простые виниловые эфиры, стирол, α-метилстирол и бутадиен, но не такие вещества, как, например, акриламид. Поскольку реакционная способность мономеров очень различна, катионную сополимеризацию трудно осуществить.

Обрыв цепи при катионной полимеризации обычно осуществляется путем переноса протона к мономеру или рекомбинации карбениевого иона с анионом. Такие соединения, как амины, простые эфиры и сульфиды, которые реагируют с карбениевыми ионами, образуя более устойчивые ионы, ингибируют реакцию. По катионному механизму полимеризуются не только виниловые мономеры; известны и другие примеры (уравнения 14, 15). В реакциях полимеризации, проходящих с разрывом цикла в мономере, движущей силой процесса в значительной мере является напряженность цикла.

$$HCHO \xrightarrow{BF_3} {\sim}OCH_2OCH_2OCH_2OCH_2{\sim} \qquad (14)$$



$$\xrightarrow{HClO_4} {\sim}O(CH_2)_4O(CH_2)_4O(CH_2)_4{\sim} \qquad (15)$$

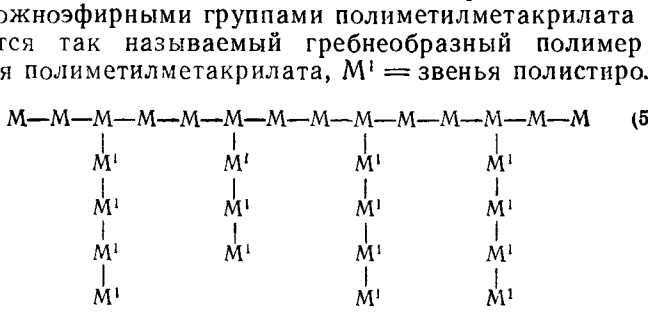
(3) Анионная полимеризация [10]

Анионная полимеризация также протекает по схеме, аналогичной описанной выше для радикальной полимеризации, но в этом случае частицами, осуществляющими перенос цепи, служат анионы. Однако имеется одно очень важное отличие: если мономер и инициатор хорошо очищены, а растворитель инертен, то обычно процесс анионной полимеризации протекает без обрыва цепи. Таким образом, раз начавшись, полимеризация идет до тех пор, пока

не будет израсходован весь мономер. В этом случае реакционная смесь содержит «живой» полимер: если к ней добавить новую порцию мономера, то полимеризация продолжается снова и размер макромолекулы увеличивается. Это можно с успехом использовать для получения блок-сополимеров (4) [11, 12]; при этом полимеризуют сначала один мономер (например, стирол) и в тот момент, когда весь стирол израсходуется, в реакцию с «живым» полимером вводят второй мономер (например, бутадиен-1,3).

$$MMMMMMM^1M^1M^1M^1M^1M^1M^1MM \qquad (4)$$

Анионная полимеризация катализируется сильными основаниями: щелочными металлами, амидом калия или *н*-бутиллитием. Она особенно характерна для мономеров, способных реагировать с образованием стабилизированных анионов, например, для винилхлорида, стирола, бутадиена-1,3, акрилонитрила и метилметакрилата. Когда полимеризация доходит до конца (т. е. до полного исчезновения мономера), к образовавшемуся «живому» полимеру добавляют кислоту или другие электрофилы, способные реагировать с карбанионом, например эпоксиды или алкилгалогениды. Интересной практической модификацией такого способа обрыва цепи является связывание анионных центров «живого» полистирола сложноэфирными группами полиметилметакрилата При этом образуется так называемый гребнеобразный полимер (**5**; M = = звенья полиметилметакрилата, M^1 = звенья полистирола).



(5)

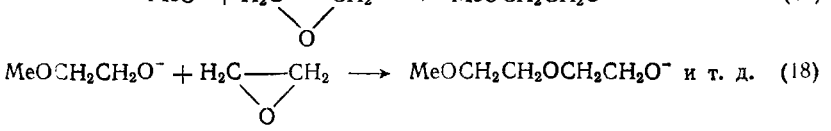
По другому способу сополимеры такого типа получают, используя для инициирования анионной полимеризации стирола металлоорганическое соединение, полученное обработкой сополимера *п*-хлорстирола и стирола металлическим натрием. Получающийся при этом сополимер можно рассматривать также как пример так называемого привитого полимера [12, 13].

Для инициирования полимеризации стирола можно использовать систему нафталин — металлический натрий. При этом образуется анион-радикал стирола (через промежуточное образование анион-радикала нафталина), который затем димеризуется (схема 16), после чего полимеризация идет с обоих концов цепи.



(16)

По анионному механизму полимеризуются не только виниловые мономеры. Например, этиленоксид в присутствии небольшого количества основания превращается в полиэфир с высокой молекулярной массой (схемы 17, 18).



$$MeO^- + H_2C{-}CH_2 \longrightarrow MeOCH_2CH_2O^- \quad (17)$$

$$MeOCH_2CH_2O^- + H_2C{-}CH_2 \longrightarrow MeOCH_2CH_2OCH_2CH_2O^- \text{ и т. д.} \quad (18)$$

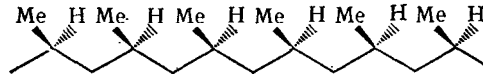
(4) Анионно-координационная полимеризация [14, 15]

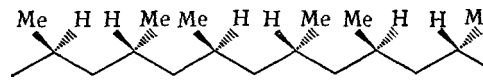
Анионно-координационной полимеризацией называют процесс, происходящий под действием катализаторов Циглера — Натта, которые представляют собой комплексы галогенидов переходных металлов с металлорганическими соединениями. Типичными катализаторами этого типа являются системы тетрахлорид титана — триэтилалюминий и тетрахлорид ванадия — диэтилалюминийхлорид, известны и другие системы. По-видимому, аналогично действуют и другие катализаторы, например дикобальтоктакарбонил и некоторые π-аллилникельгалогениды. Точная природа реакционноспособных промежуточных соединений, образуемых этими системами, продолжает оставаться предметом обсуждения, но полимеризация, по всей вероятности, протекает путем внедрения винильного мономера по связи переходный металл — углерод (схема 19; М — металл). Важнейшими мономерами, вступающими в реакцию координационной полимеризации, являются этилен, пропилен, бутадиен-1,3 и изопрен.

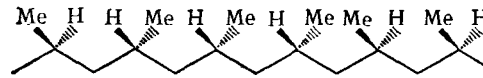
$$MR + CH_2{=}CH_2 \longrightarrow MCH_2CH_2R \longrightarrow M(CH_2CH_2)_nR \quad (19)$$

По сравнению с радикальной цепной полимеризацией координационная полимеризация обладает двумя важными преимуществами. Во-первых, она приводит к сравнительно мало разветвленным макромолекулам. Так, в полиэтилене, полученном при использовании в качестве катализатора системы тетрахлорид титана — триэтилалюминий, одно разветвление приходится более чем на 200 атомов углерода основной цепи, тогда как при радикальной полимеризации этилена под высоким давлением разветвления встречаются через каждые 30—50 атомов углерода основной цепи. Второе преимущество координационной полимеризации в том, что она обеспечивает высокую стереоспецифичность процесса [16]. Например, полимеризация пропилена может приводить к трем стереохимическим ситуациям: в изотактическом полимере (6) все метильные группы находятся по одну сторону плоскости, на которой расположены (или на которую спроектированы) атомы углерода основной цепи, в синдиотактическом полимере (7) они регулярно оказываются то по одну, то по другую сторону от этой плоскости,

а в атактическом полимере (8) метильные группы хаотически распределены по обе стороны плоскости. Подбирая условия реакции, удается получить один из стереоизомерных полипропиленов. С помощью стереоспецифических катализаторов можно контролировать также конфигурацию двойных связей в полимере. Так, при полимеризации изопрена получен полимер, практически идентичный природному каучуку, т. е. *цис*-1,4-полиизопрен.

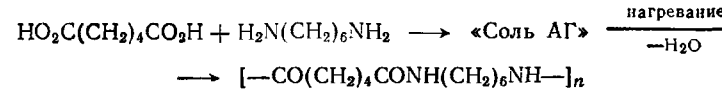

(6)


(7)

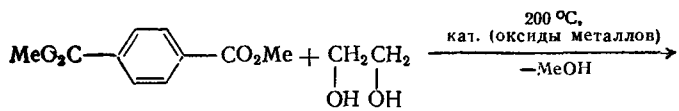

(8)

27.1.2. СТУПЕНЧАТАЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ И ПОЛИКОНДЕНСАЦИЯ [17]

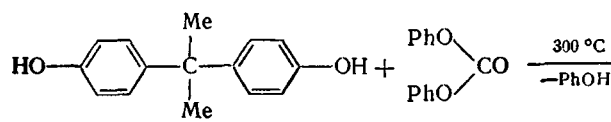
При этих методах синтеза полимеров бифункциональные мономеры реагируют друг с другом часто с образованием сложноэфирных или амидных связей, в результате чего возникают молекулы полимера. Примеры подобных превращений приведены ниже (схемы 20—24). Если образование полимера сопровождается отщеплением воды, метанола или других низкомолекулярных соединений, то такой процесс называют поликонденсацией.

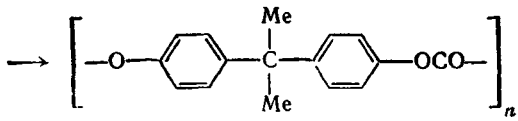


полиамид (найлон-6,6) (20)



полиэфир (21)





(22)

поликарбонат

$$HO—R—OH + OCN—R^1—NCO \longrightarrow [—O—R—OCONH—R^1—NHCO—]_n \quad (23)$$

полиуретан

$$H_2N—R—NH_2 + OCN—R^1—NCO \longrightarrow$$
$$\longrightarrow [—NH—R—NHCONH—R^1—NHCO—]_n \quad (24)$$

поликарбамид

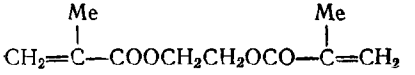
При ступенчатой полимеризации и поликонденсации механизм каждой отдельной стадии обычно такой же, как и в случае низкомолекулярных соединений. Все находящиеся в реакционной смеси молекулы способны реагировать в любой момент времени. Таким образом, первоначально мономеры превращаются в олигомеры, а затем, после того как весь мономер израсходован, олигомеры реагируют друг с другом, образуя полимеры с большей молекулярной массой, и т. д. Для получения полимера с высокой молекулярной массой необходимо, чтобы все элементарные реакции проходили с высокими выходами. Это означает, что все побочные реакции должны быть исключены, мономеры (а при проведении процесса в растворе и растворители) должны быть тщательно очищены. Ступенчатая полимеризация и поликонденсация отличаются от цепной полимеризации несколькими особенностями: (а) рост макромолекулы происходит при взаимодействии любых двух находящихся в системе частиц; (б) скорость полимеризации максимальна в начале процесса и непрерывно убывает в ходе реакции; (в) концентрация мономера быстро уменьшается еще до того, как в системе появится сколько-нибудь заметное количество полимера с высокой молекулярной массой; (г) полимеры с высокой молекулярной массой образуются лишь при очень высокой степени конверсии.

27.1.3. ТРЕХМЕРНЫЕ СШИТЫЕ ПОЛИМЕРЫ

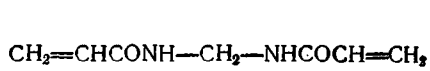
Хотя некоторые специалисты по химии полимеров все твердые или полутвердые полимеры называют смолами, в данной главе целесообразно использовать этот термин лишь применительно к полимерам с трехмерной структурой.

Смолы можно получать непосредственно с помощью процессов полимеризации, аналогичных описанным в предыдущих разделах. По-видимому, наиболее известной смолой является сшитый полистирол. Его получают сополимеризацией стирола с *п*-дивинилбензолом (ДВБ), взятом в небольшом количестве (обычно $< 10\ \%$). Молекулы ДВБ внедряются сразу в две полимерные цепи. Вследствие этого между цепями возникают поперечные сшивки, придающие полимеру трехмерную структуру. При подобной сополимеризации, как и при получении соответствующего линейного полимера, образующийся сополимер до известного момента находится

в растворе, а затем из реакционной смеси начинает выделяться нерастворимый полимер. Этот момент называют точкой гелеобразования (или точкой желатинизации); реакционная смесь в этот момент состоит из нерастворимой фракции полимера (гель) и растворимой фракции (золь). По мере дальнейшего протекания реакции фракция геля возрастает за счет фракции золя. Для многих практических целей пригодны полистирольные смолы, полученные в присутствии 1—2 % ДВБ. Для некоторых областей применения представляют интерес макропористые смолы. Их получают при сополимеризации стирола и ДВБ либо в присутствии вещества, которое затем можно вымыть из образовавшегося сшитого полимера (например, в присутствии линейного полимера), либо в присутствии вещества, которое является хорошим растворителем для мономеров, но в котором почти не набухает образующийся полимер (например, в гептане) [18]. Получаемые таким путем макропористые смолы имеют сравнительно жесткую структуру и крупные поры, сохраняющиеся даже в отсутствие растворителя. Другими бифункциональными соединениями, используемыми в качестве сомономеров для получения поперечных сшивок, являются диэфир (**9**) и диамид (**10**).

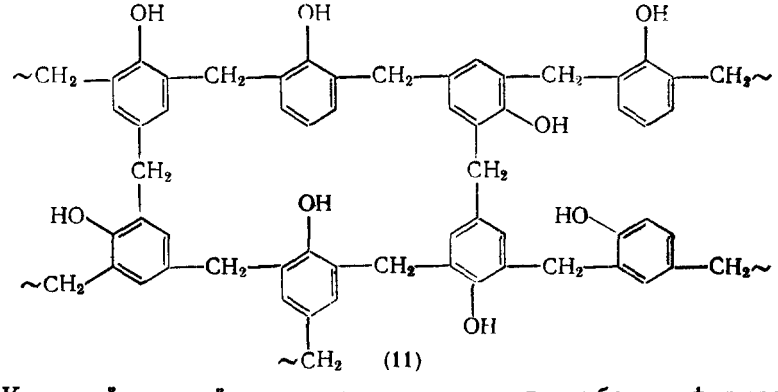


(9)



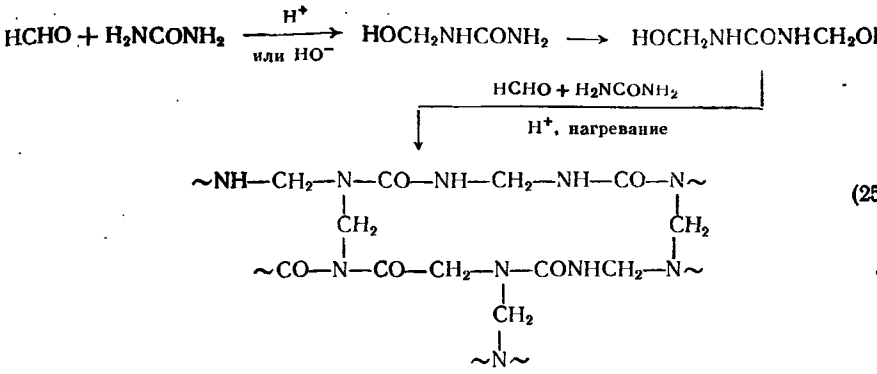
(10)

Одними из первых были изучены фенолоформальдегидные смолы [19]. При нагревании в присутствии основания фенол и формальдегид реагируют с образованием трехмерной структуры типа (**11**). Этот процесс начинается с образования *о*- и *п*-гидроксиметилфенолов, а трехмерная сетка возникает потому, что каждая молекула фенола может реагировать всеми тремя нуклеофильными центрами в ароматическом ядре. Аналогично реагируют и некоторые другие фенолы и альдегиды.



(11)

К другой важной группе смол относятся карбамидоформальдегидные смолы [20] (см. схему 25).

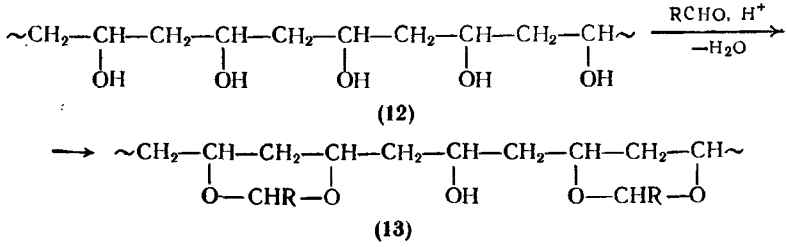


(25)

27.1.4. МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИМЕРОВ

Химическая модификация полимеров позволяет синтезировать многие макромолекулы, трудно доступные иными путями [21, 22]. Следует, однако, помнить, что если реакция модификации не доведена до конца или сопровождается побочными реакциями, то в цепи полимера может оказаться целый набор функциональных групп.

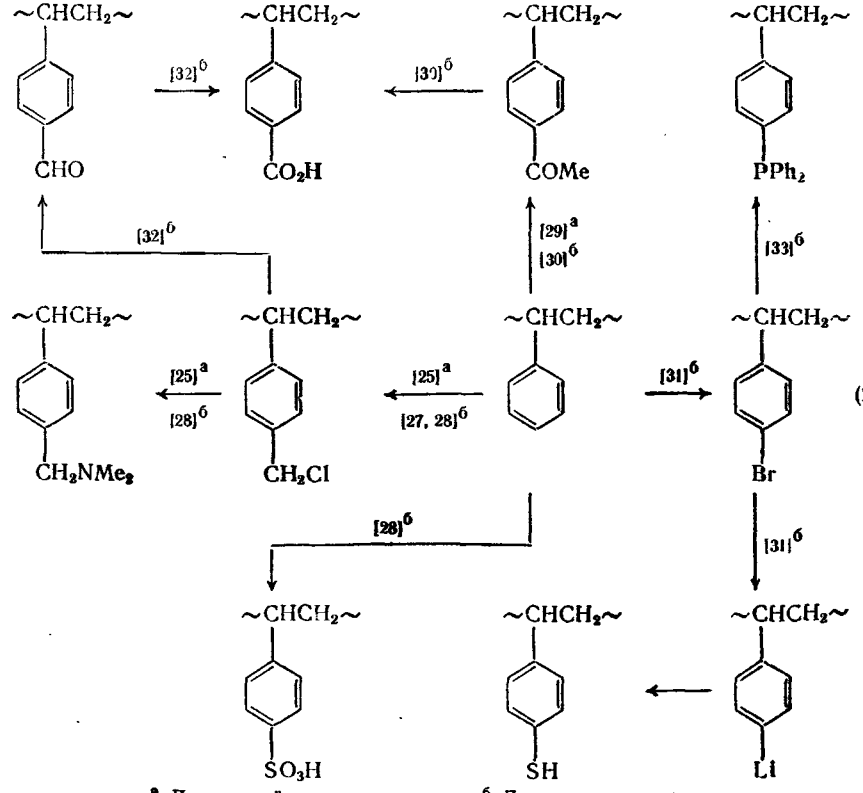
Модификации могут быть подвергнуты как линейные, так и сшитые полимеры (смолы). Важным примером модификации первого рода является гидролиз сложноэфирных групп в поливинилацетате, приводящий к поливиниловому спирту (12) [23]. Поливиниловый спирт можно затем вводить в реакцию с альдегидами, получая поливинилацетали (13) [23]. Для реакций этого типа имеется теоретический верхний предел числа способных к ацеталированию гидроксильных групп (86,5 %); остальные гидроксигруппы оказываются изолированными друг от друга образующимися ацетальными звеньями и не могут реагировать с альдегидами [24]. Примером того, какие трудности могут возникнуть при модификации, является хлорметилирование полистирола [25]. Образующиеся первоначально хлорметильные группы способны реагировать с фенильными группами той же самой или соседней полимерной цепи (образование метиленовых мостиков). Если метиленовыми мостиками сшиваются соседние цепи, то возникает трехмерная структура. Некоторые реакции линейного полистирола представлены на схеме (27).



(26)

В некоторых случаях именно образование сшивок может быть целью модификации. Сшитые полимеры можно получить, обрабатывая хлорметилированный линейный полистирол аммиаком или диаминами [25]. Вулканизация природного каучука с помощью серы — это тоже процесс образования сшивок (см. разд. 27.2). Образования сшивок в линейном полимере, например в полиэтилене, можно добиться и с помощью рентгеновского облучения [26]. Такое облучение вызывает появление некоторого числа радикальных центров в цепи полимера, и рекомбинация радикалов, находящихся в двух соседних цепях, приводит к их сшиванию.

Химическая модификация смол — очень важный процесс, но осуществить его сложнее, чем модификацию линейных полимеров, так как смолы нерастворимы ни в каких растворителях. Поэтому при модификации обычных смол растворитель, в котором проводится реакция, должен вызывать набухание смолы до такой степени, чтобы реагент смог проникнуть в глубину трехмерной сетки. Однако заметное набухание смол, как правило, наблюдается лишь при невысокой степени сшивки (меньше 10 %), да и в этом случае выбор подходящих растворителей ограничен. Для облегчения мо-



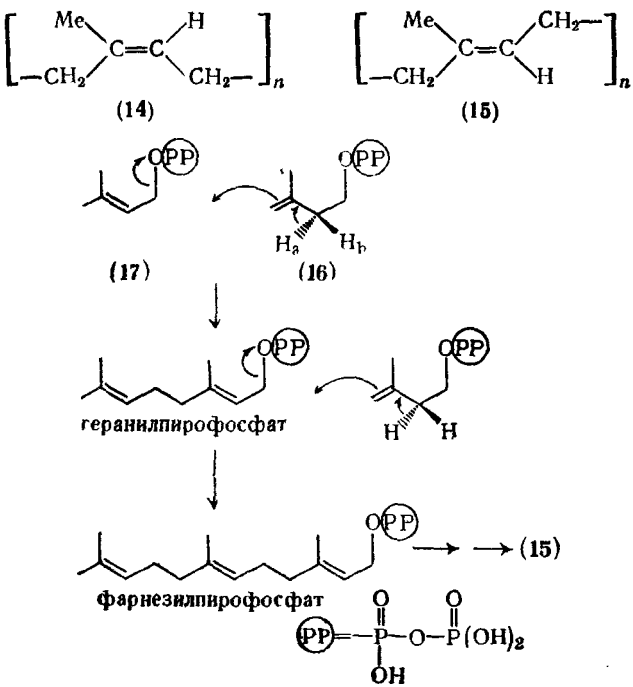
(27)

[а] Для линейного полимера. [б] Для сшитого полимера.

дификации иногда используют крупнопористые смолы, потому что круг реагентов, способных проникать внутрь таких смол, шире. Некоторые важные реакции модификацин сшитых полистиролов представлены на схеме (27).

27.2. БИОСИНТЕЗ КАУЧУКА И ГУТТАПЕРЧИ

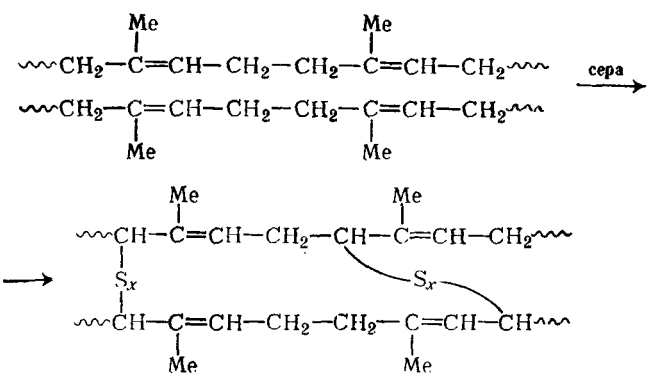
Многие высшие растения, в частности каучуковое дерево (*Hevea brasiliensis*), способны вырабатывать натуральный каучук (**14**). Меньшее число растений, из которых наиболее известным является *Palaquium gutta*, продуцирует гуттаперчу (**15**). Оба эти природных соединения представляют собой линейный полиизопрен, причем каучук содержит исключительно *цис*-двойные связи, а гуттаперча — исключительно *транс*-двойные связи. Биосинтез гуттаперчи, по-видимому, осуществляется из изопентенилпирофосфата (**16**), который образуется из ацетата через мевалонат; механизм образования гуттаперчи в общих чертах тот же, как и при образовании таких терпеноидов, как гераниол, фарнезол и геранилгераниол [34] (см. также разд. 29.2). Изомеризация изопентенилпирофосфата (**16**) дает диметилаллилпирофосфат (**17**), действующий как «инициатор» «цепной реакции» (схема 28), которая продолжается до тех пор, пока не образуется цепь приблизительно из 100 элементарных звеньев. Каким образом происходит обрыв цепи, пока неясно.



(28)

Опыты с введением изотопных меток показывают, что природный каучук образуется путем аналогичного процесса полимеризации, в котором диметилаллилпирофосфат (**17**), по всей вероятности, также участвует в качестве инициатора [34]. Однако в этом случае в условиях ферментативного контроля атом H_b в изопентенилпирофосфате (**16**) отщепляется строго стереоспецифично, что приводит к возникновению *цис*-двойной связи; процесс полимеризации продолжается до тех пор, пока не образуется цепь, содержащая от 500 до 5000 элементарных звеньев [35]. Образование *цис*-двойной связи — явление исключительное в биосинтезе терпенов — не связано с изомеризацией более обычной для них *транс*-двойной связи [35].

При промышленной переработке природного каучука можно существенно улучшить его свойства с помощью вулканизации, в результате которой каучук становится более твердым, более прочным и менее липким. Вулканизация — это образование поперечных связей между цепями при нагревании природного каучука с серой [36]. Реакция затрагивает реакционноспособные аллильные положения в макромолекуле (схема 29; x — небольшое целое число).



(29)

27.3. СВОЙСТВА ПОЛИМЕРОВ

Химические свойства высокомолекулярных соединений сходны со свойствами аналогичных по строению малых молекул. Многочисленные реакции макромолекул описаны в разд. 27.1.4 и 27.4.2, поэтому в данном разделе рассмотрены в основном физические свойства полимеров как в твердом состоянии, так и в растворе [37].

Физические свойства свободных от примесей линейных полимеров с высокой молекулярной массой зависят от температуры. При медленном охлаждении жидкого полимера он становится все более и более вязким и, наконец, вязкоэластичным. При дальнейшем охлаждении он делается жестким и затем затвердевает. Тем-

Таблица 27.1. Температуры стеклования и плавления некоторых полимеров [a] *[37а]*

Полимер	T_c, °C	$T_{пл}$, °C	Полимер	T_c, °C	$T_{пл}$, °C
цис-Полиизопрен	—72	28	Полистирол атактический	100	240
Полиэтиленадипинат	—63	~ 50	Полиметилметакрилат атактический	105	—
Полиметилакрилат	5	—	Полиакриламид	195	—
Полиэтилентерефталат	69	~ 270			

[a] Соответствующие переходы происходят не резко, а в интервале нескольких градусов.

пература, при которой происходит последний переход, называется температурой плавления, $T_{пл}$. Температуры плавления некоторых полимеров приведены в табл. 27.1. Упорядочить макромолекулы не так просто, как малые молекулы, и потому истинные кристаллы полимеров не получены. Некоторые участки полимерного образца могут стать упорядоченными, но остальная часть сохранит аморфную структуру. Упорядоченные участки называют кристаллитами. Степень кристалличности — это та доля образца (обычно выражаемая в единицах массы), которая имеет кристаллическую структуру; она может достигать 90 %. Высокая степень кристалличности чаще встречается у таких макромолекул, которые имеют: (а) повторяющиеся звенья, способные к плотной упаковке (например, в полиэтилене или политетрафторэтилене), (б) стереорегулярную структуру (изотактические полимеры более кристалличны, чем соответствующие атактические полимеры), (в) высокую энергию межмолекулярного взаимодействия (например, из-за наличия водородных связей в полиамидах). При охлаждении ниже $T_{пл}$ происходит следующее важное изменение физического состояния: в аморфном домене твердого полимера «замораживается» вращательное движение вокруг простых связей внутри каждого мономерного звена. Этот переход характеризуется так называемой температурой стеклования, T_c. Как всякая другая температурная характеристика изменения физического состояния полимеров, температура стеклования соответствует некоторому более или менее узкому интервалу температур. Ниже T_c аморфный полимер ведет себя как хрупкое твердое тело, а выше T_c он эластичен. Значения T_c для некоторых типичных полимеров приведены в табл. 27.1.

Трехмерные (сетчатые) полимеры остаются твердыми при всех температурах и не имеют точки плавления. Однако характерная температура стеклования существует и у них. Влияние сшивок сказывается в том, что стеклование начинается при более высоких температурах, чем для соответствующего линейного полимера.

Твердые полимеры подразделяются на две группы: (а) термопластичные полимеры и (б) полимеры с остаточной термической деформацией («термосеты»). К первым относятся твердые тела,

которые обратимо размягчаются при нагревании. Если полимер в значительной мере аморфен, а его T_c выше комнатной температуры, то изготовленный из него материал будет стеклоподобным, т. е. твердым и хрупким; таков, например, полиметилметакрилат. Но если T_c полимера ниже комнатной температуры, то соответствующий материал будет обладать гибкостью и твердостью (например, *цис*-1,4-полиизопрен), а также проявлять вязкоэластические свойства (после снятия кратковременной нагрузки его деформация будет обратимой). Последнее явление соответствует обратимому растяжению полимерных цепей. При длительном деформирующем усилии отдельные сегменты и макромолекулы в целом медленно перемещаются относительно друг друга, что приводит к необратимости процесса. Такую деформацию можно предотвратить, введя между полимерными цепями небольшое число поперечных связей. Классическим примером такого эластомера является вулканизованный природный каучук (см. схему 29). Если полимер в значнтельной степени кристалличен, то он может оказаться пригодным для изготовления волокон. Макромолекулы в волокнах обычно ориентированы параллельно оси волокна (эта ориентация возникает в процессе механического растяжения) и удерживаются вместе благодаря сильным взаимодействиям между цепями макромолекул; таковы, например, полиамиды и полиэфиры. К термосетам относятся полимеры, содержащие линейные или лишь слабо сшитые цепи, при нагревании которых необратимо образуются многочисленные поперечные связи, что приводит к прочным и негибким твердым материалам. Таковы, например, резолы, являющиеся промежуточными продуктами при образовании фенолоформальдегидных смол [19].

Линейные полимеры обычно растворимы в том или ином растворителе, а иногда и в нескольких. В растворе гибкая макромолекула стремится принять форму рыхлого клубка, который постоянно меняет свои очертания вследствие вращения вокруг различных связей. Плотность клубка зависит от степени взаимодействия растворителя с цепью полимера.

Переведя образец полимера в раствор, можно определить много важных количественных характеристик полимера, в частности его молекулярную массу. Способ получения полимеров таков, что не все составляющие образец макромолекулы имеют одинаковую молекулярную массу. Среднечисловая молекулярная масса образца $\bar{M}_n$ есть среднее арифметическое молекулярных масс всех содержащихся в образце макромолекул.

Значение $\bar{M}_n$ можно определить с помощью различных методов; наилучшие результаты дает осмотический метод. Существенно также знать распределение макромолекул образца по молекулярной массе. Одним из методов определения полидисперсности высокомолекулярного вещества является фракционное осаждение с последующим определением молекулярной массы каждой фракции. Менее трудоемким и более современным методом является гель-

хроматография [см. разд. 27.4.1(1)].

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i^t n_i M_i}{\sum_i^t n_i} \qquad \overline{M}_w = \frac{\sum_i^t n_i M_i^2}{\sum_i^t n_i M_i}$$

где n_i — число молекул с молекулярной массой M_i.

Термодинамические методы — отнюдь не единственный путь определения молекулярной массы. Широко используют также методы, основанные на рассеянии света и на измерении вязкости. Первый из них использует тот факт, что направление и интенсивность света, рассеиваемого раствором полимера, есть функция размеров и формы рассеивающих свет частиц. Этот метод позволяет определить среднемассовую молекулярную массу $\overline{M}_w$.

Значение $\overline{M}_w$ всегда больше, чем $\overline{M}_n$; наличие в полимере фракций с различной молекулярной массой может быть охарактеризовано коэффициентом полидисперсности $\overline{M}_w/\overline{M}_n$. Чем уже кривая молекулярно-массового распределения, тем ближе это соотношение к единице. Измерение вязкости растворов полимеров позволяет определить так называемую средневязкостную молекулярную массу $\overline{M}_v$. Значение $\overline{M}_v$ занимает промежуточное положение между $\overline{M}_w$ и $\overline{M}_v$ и зависит от используемого растворителя.

Свойства раствора полимера и особенности строения полимера можно исследовать методами ИК- и УФ-спектроскопии, а также спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C. Эти методы дают ценную информацию о строении и структуре исследуемого образца [38]. Особый интерес представляют спектры ПМР сополимеров, поскольку детальный анализ этих спектров часто дает ценную информацию о последовательности разных мономерных звеньев.

Сетчатые полимеры (смолы), как правило, не растворяются ни в одном из растворителей. Тем не менее они могут взаимодействовать с растворителем и набухать, иногда до объема в десять раз большего, чем исходный. Степень набухания зависит от степени сшивки и от природы используемого растворителя. Чем меньше степень сшивки, тем сильнее набухает образец. Нерастворимость смол во многих случаях является весьма ценным свойством, однако она делает невозможным снятие УФ-спектров и очень затрудняет снятие спектров ЯМР ^1H и ^{13}C. Однако можно исследовать образцы смол с помощью ИК-спектроскопии.

27.4. ПРИМЕНЕНИЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Существуют две области применения синтетических высокомолекулярных соединений в лаборатории химика-органика: хроматография и проведение органических реакций на полимерных носителях. Между этими областями нет резкой границы. Например,

ионообменные смолы могут быть использованы как в хроматографии, так и в качестве катализаторов; некоторые материалы, применяемые в аффинной хроматографии, также представляют собой реагенты, фиксированные на матрице полимера. В обеих областях чаще всего используют смолы, так как они нерастворимы ни в одном растворителе. Иногда применяют и линейные полимеры. Их преимущество в том, что при изучении реакций или процессов с их участием не возникает проблем, связанных с нерастворимостью смол и диффузией реагентов в толщу сшитого полимера. Полимеры необходимого строения и структуры можно получать путем модификации ранее синтезированных полимеров (см. разд. 27.1.4) или методом сополимеризации, как описано выше. Наиболее широко используются синтетические высокомолекулярные соединения на основе сшитых полистирола, полиакрилатов, полиметакрилатов и полиакриламидов. Используют также различные полисахариды (например, агарозу) или продукты их модификации (например, сефадекс), особенно если нужен гидрофильный полимерный материал.

27.4.1. ХРОМАТОГРАФИЯ

При хроматографическом разделении компоненты смеси распределяются между стационарной и подвижной фазами. В данном разделе рассмотрены те виды хроматографии, в которых в качестве стационарной фазы используют синтетические смолы. Обычно разделяемую смесь помещают в верхнюю часть колонки, заполненной стационарной фазой. Подвижную фазу пропускают через колонку сверху вниз, и вместе с ней передвигаются компоненты смеси. Разделение смеси происходит вследствие того, что различные вещества имеют разное сродство к стационарной и к мобильной фазам и, следовательно, перемещаются по колонке с различной скоростью. По существу, различные формы хроматографии отличаются друг от друга лишь по характеру взаимодействия между разделяемыми веществами и стационарной фазой.

(1) Гель-хроматография

Наверное, простейшая по типу хроматография — это хроматография, использующая пористую инертную стационарную фазу. Разделение здесь достигается на основе соответствия размера и формы молекул размеру и форме пор. В методе гельпроникающей хроматографии [39] стационарной фазой обычно служит сшитая полистирольная смола, а подвижной фазой — органический растворитель, который в практических целях пропускают через колонку под высоким давлением. Очень близок к этому методу по технике исполнения метод гель-фильтрации [40], где стационарной фазой является сшитый полиакриламид (или другой гидрофильный материал), а подвижной фазой служит водный раство-

ритель, пропускаемый через колонку при нормальном (или высоком) давлении. Общее название этих методов — «гель-хроматография».

Разделение происходит потому, что стационарная фаза имеет поры разного диаметра. Более мелкие молекулы могут проникать в большее число пор, чем более крупные молекулы, и потому они более длительное время будут находиться в колонке, чем более крупные молекулы, и, следовательно, более крупные молекулы будут вымываться из колонны первыми. Молекулы еще большего размера, которые не могут проникнуть даже в самые крупные поры используемого носителя, сразу проходят через колонку без разделения. Промежуток времени, за который молекула проходит через всю колонну, зависит от размера молекулы и ее массы. Поэтому если прокалибровать колонну по образцам с известной молекулярной массой, то с помощью гель-хроматографии можно определять молекулярную массу.

Наиболее важная область применения гельпроникающей хроматографии — это определение полидисперсности образцов синтетических полимеров. Из полученных данных можно рассчитать среднечисловую ($\bar{M}_n$) и среднемассовую ($\bar{M}_w$) молекулярные массы.

Гель-фильтрацию используют для разделения белков и определения их молекулярной массы.

(2) Ионообменная хроматография

В методе ионообменной хроматографии [41, 42] стационарной фазой служит нерастворимый в воде материал, содержащий ионогенные группы. Ассоциированные с этими группами противоионы могут обмениваться с имеющими аналогичный заряд ионами из окружающей среды. Различные ионы имеют неодинаковое сродство к ионогенным группам, фиксированным на смоле, вследствие чего их можно разделить.

Первоначально в ионообменной хроматографии использовали природные неорганические ионообменники типа цеолитов, но в большинстве случаев их можно заменить синтетическими органическими ионообменными смолами. Эти смолы можно классифицировать по характеру входящих в них ионогенных групп. Сильнокислотные катионообменные смолы содержат группировки, например сульфогруппы, которые ионизуются с образованием анионного центра практически во всем рабочем диапазоне обычных значений pH. Слабокислотные катионообменники содержат группировки, например карбоксигруппу, которые диссоциируют с образованием ионных центров только при pH, бóльших, чем pH 6. Сильноосновные анионообменные смолы содержат катионные центры, например четвертичные аммониевые группы, которые сохраняют свой заряд во всем диапазоне pH. Слабоосновные анионообменники содержат группировки типа *N,N*-диалкилбензиламинной, образующие

Таблица 27.2. Некоторые ионообменные смолы

Ионогенная группировка	Полимерная матрица	Тип смолы	pH ионизации
Сульфогруппа	Сшитый полистирол	Сильнокислотный катионит	0—14
	Фенолоформальдегидная смола	То же	»
Карбоксигруппа	Полиакриловая или полиметакриловая кислота	Слабокислотный катионит	$\geqslant 6$
N,N-диалкилбензиламиногруппа	Сшитый полистирол	Слабоосновный анионит	$\leqslant 8$
Бензилтриметиламмониевая	То же	Сильноосиовный анионит	0—14
N-Метилпиридиниевая	»	То же	»

катионные центры при взаимодействии с кислотами. Наиболее распространенными полимерными носителями являются сшитые полистирол и полиметакриловая кислота. Фенолоформальдегидные смолы также находят применение в ионообменной хроматографии, но они химически менее инертны. Наиболее общие типы ионообменных смол приведены в табл. 27.2. Аналогичные ионообменники можно получать на основе модифицированных природных полисахаридов.

Процесс ионного обмена в основе своей есть процесс диффузионный, и стадией, определяющей его скорость, может быть либо диффузия ионов через жидкую пленку, непосредственно прилегающую к частице смолы, либо диффузия ионов внутри пор частицы. Первый фактор доминирует при работе с разбавленными растворами, второй — при работе с концентрированными растворами или в случае объемистых ионов. Сродство ионов к тому или иному типу смолы зависит от многих факторов, в том числе от валентности и размера иона, от концентрации, температуры и растворителя. В водных растворах низкой концентрации (менее 0,1 экв) сродство к смоле повышается с увеличением валентности иона, а для ионов с одинаковой валентностью — с уменьшением диаметра гидратированного иона. Точный порядок изменения сродства сильно зависит от конкретного вида смолы. Порядки изменения сродства ионов к типичным промышленным ионообменным смолам в нормальных условиях приведены ниже:

Катиониты

сильнокислотные: $Fe^{3+} > Cu^{2+} > Ag^{+} > NH_4^{+} > K^{+} > Na^{+} > H^{+} > Li^{+}$

слабокислотные: $H^{+} \gg Ag^{+} > K^{+} > Na^{+} > Li^{+}$; $H^{+} > Fe^{2+}$

Аниониты

сильноосновные: $NO_3^{-} > NC^{-} > HSO_3^{-} > NO_2^{-} > Cl^{-} > AcO^{-} > HO^{-} > F^{-}$

слабоосновные: $HNO_3 > HCl > HF > HOAc$

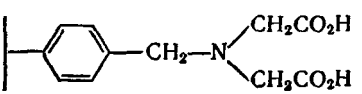
Ионообменную хроматографию широко используют и для разделения неорганических соединений, а в органической химии — для разделения смесей кислот или оснований. Классическим примером является разделение смесей аминокислот, образующихся при гидролизе пептидов и белков [43]. Пептиды, белки и ферменты, содержащие кислотные и (или) основные группировки, также могут быть разделены с помощью ионообменной хроматографии. Интересные возможности открываются при использовании сильноосновных смол в бисульфитной форме [44]. Когда смесь альдегидов и кетонов пропускают через такую смолу, они обратимо связываются со смолой в виде бисульфитных комплексов; это позволяет разделить компоненты смеси.

Ионообменные смолы позволяют производить полную замену одного иона на другой. Например, если раствор натриевой соли карбоновой кислоты пропускать через колонку сильнокислотного катионита, находящегося в форме свободной кислоты (H^+-форма), то все ионы натрия в растворе заменяются на протоны, и из колонки элюируется только карбоновая кислота. Этот способ удобен для выделения некоторых растворимых в воде кислот из растворов их солей; его можно рассматривать как один из примеров использования реагентов на полимерных носителях. Равным образом, если пропустить раствор четвертичной аммониевой соли (например, хлорида) через колонку с сильноосновным анионитом в гидроксидной форме (^-OH-форма), то анионы соли заменятся ионами HO^-. Элюат будет содержать только гидроксид четвертичного аммония; этот способ весьма удобен для получения таких соединений.

Дополнительные сведения о применении ионообменных смол в хроматографии, методики элюирования читатель найдет в соответствующем руководстве [42]. О других аспектах применения ионообменных смол рассказано в разд. 27.4.2 (2).

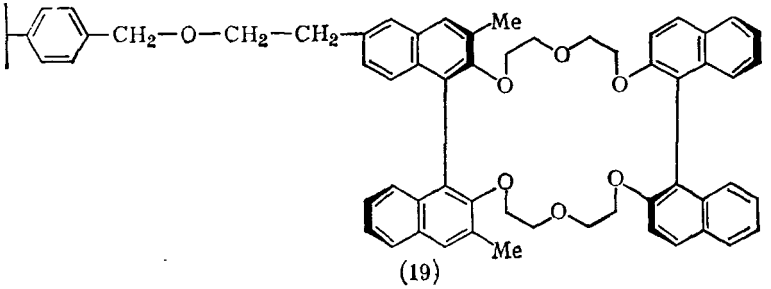
(3) Комплексообразующие смолы

Синтезированы смолы, которые содержат группировки, способные образовывать комплексы с находящимися в растворе веществами [45]. Общим недостатком подобных смол является замедленность процессов обмена на их поверхности. Одним из наиболее изученных представителей комплексообразующих смол является сшитый полистирол (18), содержащий бифункциональные группировки, которые в зависимости от значения pH могут быть электроположительными, электроотрицательными и электронейтральными. Эта смола обладает высоким сродством ко многим двухзарядным катионам, особенно к Cu^{2+} [46].

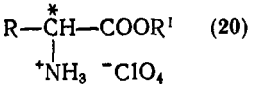


(18)

Группировки, связанные со стационарной фазой, не обязательно должны быть ионогенными. Описан интересный тип неионогенной комплексообразующей смолы [47]. Хиральный краун-эфир был связан с модифицированным сшитым полистиролом, что дало смолу, содержащую комплексообразующий фрагмент (19). Эта смола оказалась эффективной стационарной фазой для разделения оптических изомеров аминокислот или их сложных эфиров в виде перхлоратов (20). В большинстве случаев (*R*)-стереоизомеры удерживались связанным со смолой краун-эфиром (19) прочнее, чем (*S*)-стереоизомеры.



(19)

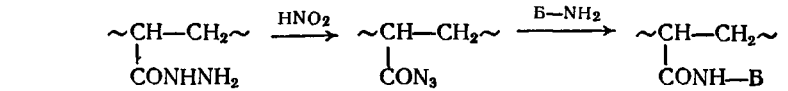


(20) $R^1 = H$ или Me

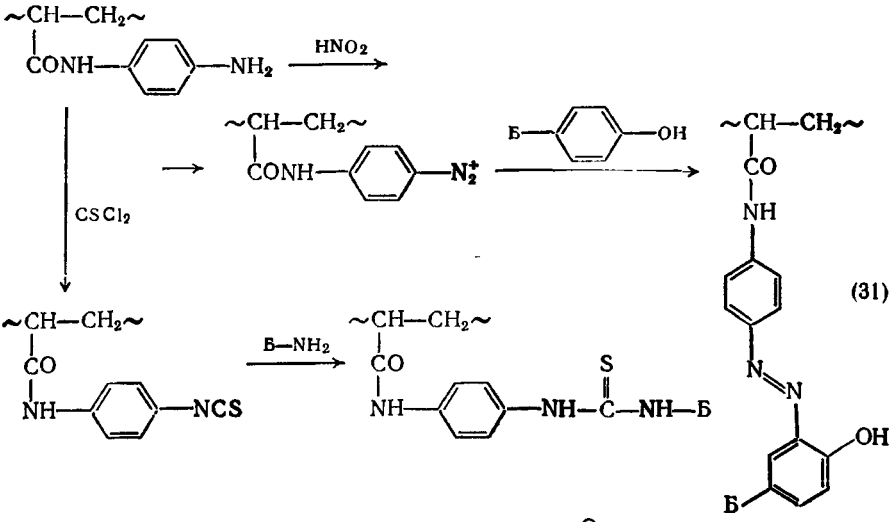
(4) Аффинная хроматография

Хроматографические методы, в которых разделение компонентов смеси основано на различии в размерах, форме или суммарном заряде молекул, часто недостаточно эффективны для разделения смесей белков. В таких случаях может оказаться полезной аффинная хроматография [48]. Успех метода зависит от того, удастся ли найти вещество, которое будет специфически взаимодействовать с подлежащим очистке белком. Для фермента таким веществом может быть конкурентный ингибитор катализируемой этим ферментом реакции, а для участвующего в гормональной регуляции белка-рецептора — соответствующий гормон. Это вещество связывают с подходящим нерастворимым гидрофильным носителем, и полученный материал используют при хроматографии как стационарную фазу. Вещества такого типа часто сами оказываются большими природными макромолекулами, и приемы, используемые для соединения их с носителями, сходны с методами приготовления иммобилизованных ферментов [см. разд. 27.4.2 (5)]. Реакции, с помощью которых белки, содержащие аминогруппы или фенольные группировки, могут быть связаны с носителем на основе сшитого полиакриламида, содержащего некоторое число гидразидных или 4-аминоанилидных остатков (схемы 30, 31; Б — остаток белка). Хорошие результаты получены в тех случаях,

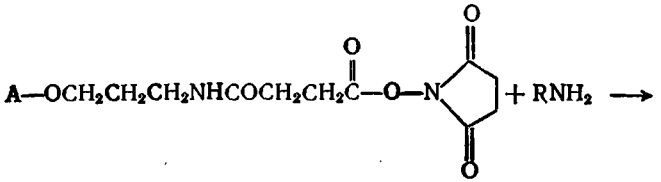
когда вещество, специфически взаимодействующее с белком, прикрепляется к носителю с помощью мостика из небольших молекул («спейсера»); это объясняется, вероятно, уменьшением стерических препятствий между веществом и носителем (см., например, схему 32; А — остаток агарозы).



(30)



(31)





(32)

27.4.2. ОРГАНИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ НА ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЯХ

Реакции на полимерных носителях (РПН) в последние годы стали объектом изучения многих исследовательских групп [49]. Такие реакции обладают рядом привлекательных особенностей, большая часть которых обусловлена тем, что иммобилизованные

реагенты или продукты РПН легко могут быть отделены от остальных компонентов реакционной смеси. Как правило, используемый полимерный носитель представляет собой смолу, и тогда разделение продуктов достигается простым фильтрованием или центрифугированием. Однако иногда применяются и несшитые полимеры, и тогда разделение продуктов осуществляют либо с помощью мембранного фильтра, либо путем добавления растворителя, который осаждает полимер. Столь легкое разделение облегчает выделение нужных продуктов и делает возможной автоматизацию процесса. Если возможна регенерация полимерного реагента по окончании реакции, то становится выгодным получение даже очень сложных реагентов на полимерных носителях. В благоприятных случаях удается проводить реакции и процесс регенерации на колоннах, заполненных реагентом на полимерном носителе, почти так же, как и при использовании ионообменных смол.

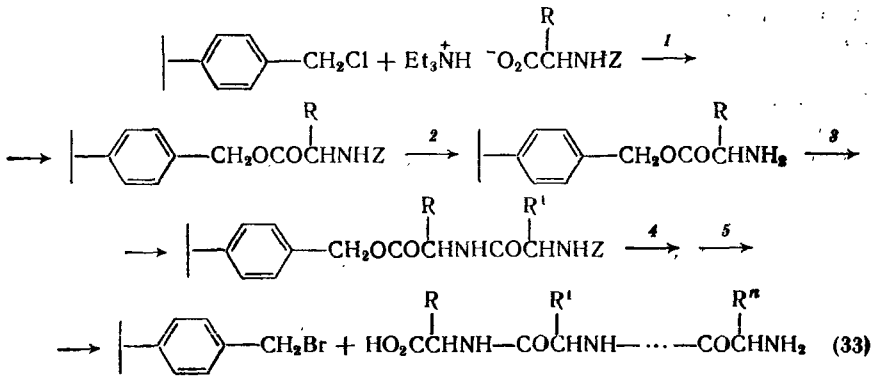
Другая привлекательная особенность РПН состоит в том, что для образования продуктов РПН можно подобрать условия, соответствующие как области высоких концентраций, так и области высокого разбавления [50]. В первом случае используют смолы на основе гибких макромолекул с небольшим числом поперечных сшивок, содержащие реакционные центры в значительной части повторяющихся звеньев. Во втором случае используют смолы с большим числом поперечных связей (например, 20 %) или негибкие макропористые смолы, причем как те, так и другие с низким содержанием реакционных центров. При некоторых попытках проведения таких реакций в условиях высокого разбавления, используя полистирольные смолы со степенью сшивки 2 %, выяснилось, что значительная доля реакционных центров способна к взаимодействию даже тогда, когда функциональные группы содержатся лишь у 0,5 % феильных остатков [51].

Прочие особенности РПН будут рассмотрены при обсуждении соответствующих реакций, использующих закрепленные на полимерных носителях субстраты (ПН-субстраты), реагенты (ПН-реагенты), ПН-субстраты в сочетании с реагентами, а также закрепленные на полимерных носителях катализаторы (ПН-катализаторы) и ферменты (ПН-ферменты; иммобилизованные ферменты). Ограниченность места не позволяет подробно разобрать все эти варианты РПН, и нам придется ограничиться примерами, иллюстрирующими возможность применения РПН как в лабораторном, так и в промышленном масштабах. Следует подчеркнуть, что высказанные в разд. 27.1.4 соображения о выборе условий реакции (в частности, о важном значении растворителя) полностью справедливы и для РПН.

(1) Превращения иммобилизованных субстратов

Наиболее хорошо изученными реакциями данного типа являются превращения, используемые в твердофазном синтезе полипептидов. Этот способ синтеза разработан Меррифилдом в 1963 г.

[52]. В этом методе к хлорметилированному сшитому полистиролу присоединяли *N*-защищенное производное первой аминокислоты синтезируемого пептида (схема 33). Затем защитную группу удаляли и вводили следующий остаток *N*-замещенной аминокислоты. Эту процедуру повторяли до тех пор, пока не был получен нужный полипептид, после чего его отделяли от полимерного носителя и очищали. Применение смолы в этом случае позволяет после каждой стадии легко отделять закрепленный на ней продукт от остальных веществ, так что применение избытка растворимого реагента (для повышения выхода) не влечет за собой каких-либо трудностей при разделении и все стадии синтеза могут быть автоматизированы. В настоящее время этот метод широко используется для синтеза полипептидов [53] (см. также гл. 23.6).



(33)

полипептид

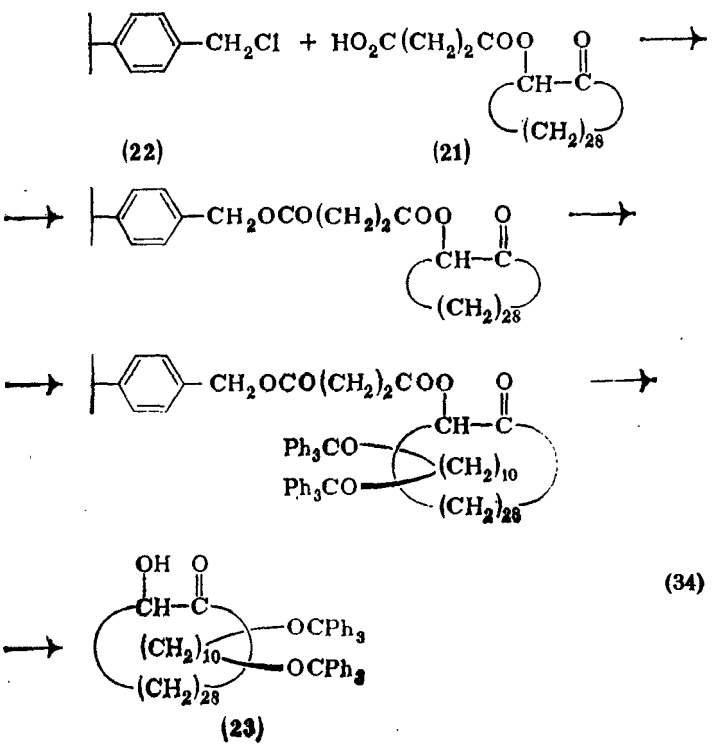
Z—*N*-защитная группировка, например *трет*-бутоксикарбонильная; *1*—присоединение первой аминокислоты к полимеру; *2*—удаление защитной группы; *3*—*N*-ацилирование; *4*—повторные снятие защитной группы и *N*-ацилирование; *5*—отщепление полипептида действием HBr в CF_3CO_2H.

Попытки разработать аналогичные методики для синтеза олигосахаридов [54] и олигонуклеотидов [55] оказались не столь успешными (см. гл. 22.4). Однако синтез этих соединений вообще более труден, чем синтез пептидов, отчасти потому, что здесь приходится оперировать с бо́льшим числом защитных групп, а отчасти потому, что соединение моносахаридных звеньев может привести к смеси эпимеров. Совершенно очевидно, что для успеха в этой области необходимы более подходящие полимерные носители.

Упомянутые выше методы можно рассматривать также как применение ПН-защитных групп; синтез пептидов на полимерных носителях убедительно показывает преимущества применения такого способа защиты функциональных групп. Закрепленные на полимерном носителе защитные группы с успехом могут быть использованы и в других областях органического синтеза. Основное ограничение метода состоит в том, что каждая реакция должна

протекать с высоким выходом без образования побочных продуктов, поскольку побочные продукты и непрореагировавший исходный ПН-субстрат не могут быть отделены от нужных продуктов до тех пор, пока все они не будут в конце синтеза отщеплены от полимерного носителя. Рассмотрим два примера успешного применения ПН-защитных групп.

Первый пример — это использование ПН-защитной группы для выделения из реакционной смеси продукта, образующегося лишь в следовых количествах [56]. Кислоту (21) присоединяли к хлорметилированной смоле (22) и в присутствии полученного таким образом сложного эфира проводили реакцию декандиола-1,10 с тритилхлоридом. Во время этой реакции небольшая часть молекул декандиола и его монотритилового эфира проходила через макроциклическое кольцо; топологически такая ситуация равноценна набрасыванию обруча на палочку при игре в серсо. Прошедшие в макроциклическое кольцо молекулы декандиола или его моноэфира, превращаясь далее в молекулы дитритилового эфира, уже не могут выйти обратно из макроциклического капкана и, таким образом, будут вместе с ним привязаны к смоле (схема 34). Затем смолу отмывали от остальных компо-

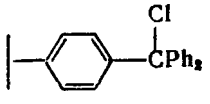


(34)

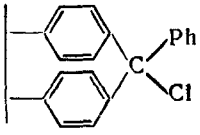
(23)

нентов реакционной смеси; тритилирование новых порций декандиола в присутствии той же смолы повторяли 70 раз для того, чтобы накопить необходимое количество нанизанного на 1,10-дитритилоксидекан макроциклического продукта. После этого смолу тщательно отмывали, отщепляли от нее полученное необычное соединение — «хуплан» (23) и очищали его.

Другой пример относится к получению монозащищенных симметричных дифункциональных соединений. Если реакционные центры на смоле с ПН-защитными группами удалены друг от друга, а смола негибкая, то ПН-защитные группы образуют с полифункциональными соединениями только монозамещенные производные. Были изучены реакции тритилхлорида [(24)] на полимерном носителе на основе полистирола, содержащего 2 % звеньев сшивающего мономера [57]. Эту смолу вводили в реакцию с различными α,ω-диолами в пиридине, затем отмывали от непрореагировавшего диола, а свободные гидроксильные группы ацетилировали. После этого продукты отщепляли от смолы и получали моноацетаты диолов с выходом 50—60 %. Во всех случаях наряду с моноацетатами выделяли 30—50 % свободного диола; это свидетельствует о том, что значительная часть молекул диола связывается со смолой по обеим гидроксильным группам. Когда же была использована другая ПН-форма тритилхлорида (25), то моноацетаты диолов получались с выходом 90 %, а свободные диолы не выделялись. Вероятно, вторая из изученных смол более жесткая, а реакционные центры в ней больше удалены друг от друга, чем в первой. Этот метод был использован [58] для получения ацетиленовых спиртов (26), которые затем превращали соответственно в *цис*-додецен-7-илацетат, *цис*-тетрадецен-9-илацетат и *цис*-тетрадецен-11-илацетат; все три соединения являются половыми аттрактантами насекомых.



(24)



(25)

$$HO-(CH_2)_n-OH \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow CH_3-(CH_2)_m-C\equiv C-(CH_2)_n-OH \quad (35)$$

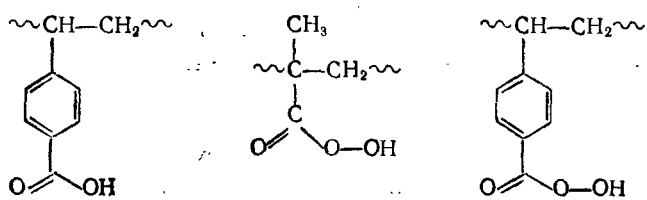
(26) $n = 3$, $m = 6$ *или* 8; $n = 1$, $m = 10$

(2) Реакции с применением иммобилизованных реагентов

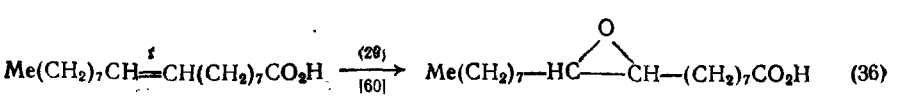
Наиболее характерным преимуществом ПН-реагентов является легкость отделения избытка реагента или продукта превращения этого реагента от реакционной смеси. Это упрощает обработку реакционной смеси и позволяет избежать таких операций как

разложение ее водой или хроматографическое разделение. Кроме того, можно применять избыток реагента, что позволяет повысить выход продуктов реакции. Описано большое число ПН-реагентов, поэтому здесь будут рассмотрены лишь некоторые из них.

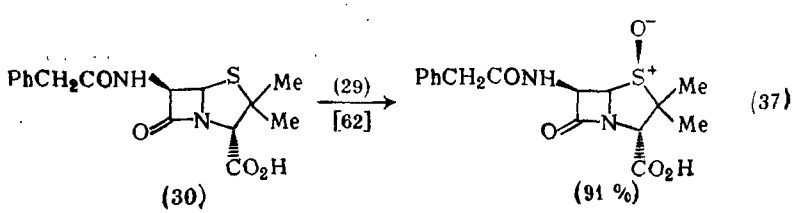
Обработка сшитой полиметакриловой кислоты или смолы (27), содержащей кислотный фрагмент, пероксидом водорода и кислотой приводит к смолам, содержащим остатки пероксикислот. В первом случае образуется смола (28), содержащая остатки алифатической пероксикислоты; эта смола взрывоопасна [59]. Во втором случае получается устойчивая смола (29), содержащая остатки ароматической пероксикислоты [60, 61]. С помощью этих полимерных пероксикислот три- и дизамещенные олефины, как правило, с высоким выходом превращаются в соответствующие эпоксиды [59, 60], а сульфиды, включая пенициллины и деацетоксицефалоспорины, легко окисляются в сульфоксиды и (или) сульфоны [59, 62] (схемы 36—38). Так, пенициллин G (30) был окислен с выходом 91 % при пропускании его ацетонового раствора через колонку со смолой (29) [62]. Дополнительное преимущество таких полимерных пероксикислот состоит в том, что их можно использовать для окисления кислых субстратов, так как при отделении кислого продукта реакции от прореагировавшей пероксикислоты не возникает тех осложнений, которые встречаются при работе с мономерными пероксикислотами. Прореагировавшая смола может быть снова превращена в активную пероксиформу действием пероксида водорода.



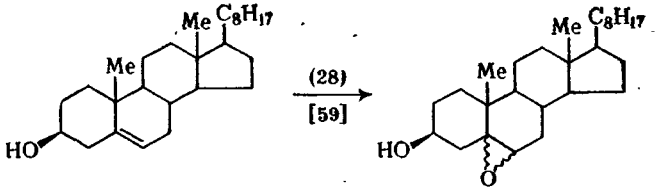
(27) (28) (29)



(36)



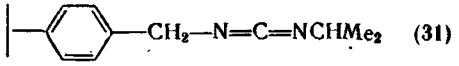
(37)



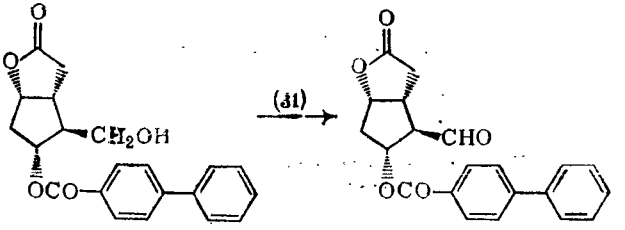
(38)

(85 %) α:β=91:9

Окислением по Моффэту (карбодиимид в ДМСО, катализатор — ионы H^+) спирты превращаются в альдегиды в очень мягких условиях, однако альдегиды трудно отделить от образующихся вместе с ними мочевин. Эту сложность, однако, удается преодолеть с помощью смолы (31) [63]. Примеры использования этой смолы приведены на схемах (39), (40). Возможна регенерация этой смолы, однако активность ее несколько уменьшается.



(31)

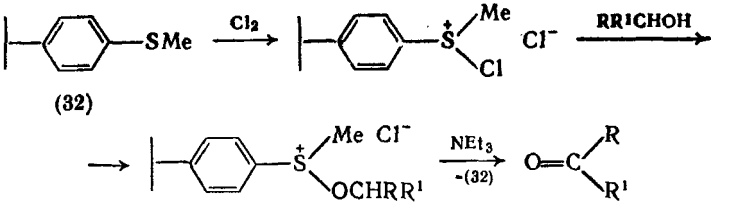


(39)

(91 %)

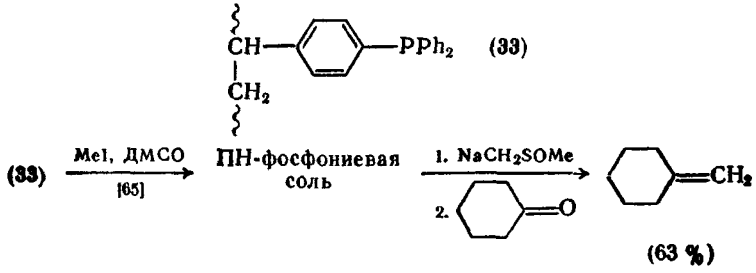
$$Me(CH_2)_{16}CO_2H \xrightarrow{(31)} [Me(CH_2)_{16}CO]_2O \quad (65\ \%) \qquad (40)$$

В мягких условиях также спирты окисляются до альдегидов или кетонов при действии тиоанизола и хлора с последующей обработкой триэтиламином. В этой реакции вместо тиоанизола можно с успехом использовать смолу (32), причем в отличие от тиоанизола полимерный сульфид не имеет неприятного запаха, а по окончании операции может быть легко регенерирован для повторного использования [64] (схема 41). Следует отметить, что субстрат присоединяется к смоле на одной стадии, а отщепляется от нее на следующей. Следовательно, если сульфидные остатки в смоле достаточно удалены друг от друга, а смола негибкая, то в субстратах, содержащих несколько гидроксильных групп, окислению будет подвергаться лишь одна из них. Это изучено на примере окисления гептандиола-1,7 на макроретикулярной (макропористой) смоле. Максимальная селективность, которой удалось достичь, соответствовала соотношению гидроксиальдегид : диальдегид = 23 : 1, но, к сожалению, выход гидроксиальдегида при этом составлял только 50 %.

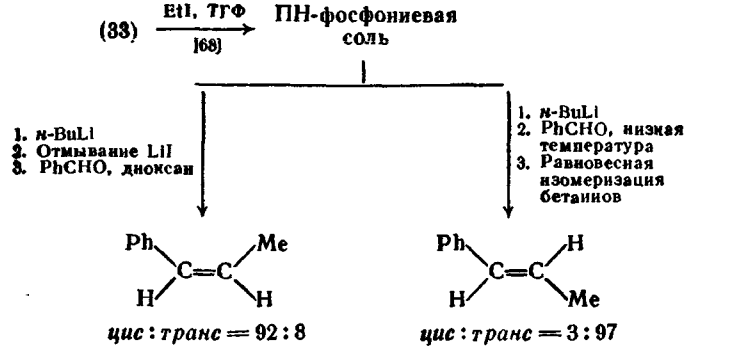


(41)

При синтезе олефинов по Виттигу часто возникают трудности с отделением олефина от образующегося вместе с ним трифенилфосфиноксида. Этого легко избежать, если вместо трифенилфосфина использовать сшитый полимер, содержащий остатки трифенилфосфина. Применение ПН-фосфоранов в реакции Виттига описано многими авторами [65—68]. Полимер (33) может быть получен из сшитого полистирола (см. схему 27) или непосредственной сополимеризацией стирола, дивинилбензола и 4-дифенилфосфинилстирола [65]. Примеры проведения реакции Виттига на полимерных носителях, в частности избирательное получение *цис*- или *транс*-олефинов [68], приведены на схемах (42), (43).



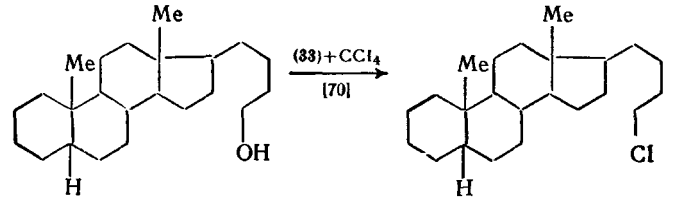
(42)



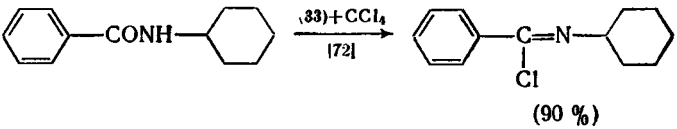
(43)

Смесь трифенилфосфина с четыреххлористым углеродом пригодна для проведения ряда превращений [69]. Как и в случае реакции Виттига, проблема отделения фосфорсодержащих побочных продуктов от целевого продукта может быть решена путем замены трифенилфосфина на полимерный фосфин (33). Таким путем спирты превращают в хлориды [70, 71], кислоты — в ацил-

хлориды [70], первичные амиды — в нитрилы, а вторичные амиды — в имидоилхлориды [72] (схемы 44, 45). Реакция полимерного фосфина и CCl_4 с карбоновыми кислотами в присутствии аминов приводит непосредственно к амидам [70, 73], что используют в синтезе пептидов.



(44)



(45)

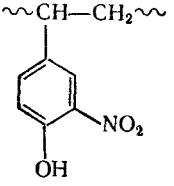
Реагент трифенилфосфин — CCl_4 реагирует со спиртами по двум механизмам (схемы 46, 47) [69]. Доказано, что соответствующая реакция с участием полимерного аналога трифенилфосфина протекает в основном по пути *б*, по крайней мере в тех случаях, когда субстратом являются спирты [74]. Для того чтобы реакция шла по пути *б*, необходимо, чтобы значительная часть фосфорсодержащих остатков могла контактировать между собой. Очевидно, в случае гибкой смолы с высоким содержанием фосфиновых фрагментов вероятность контакта между ними выше, чем при реакции с участием мономерного фосфина. Этим же можно объяснить и тот факт, что реакция с полимерным фосфином протекает примерно в 15 раз быстрее, чем с трифенилфосфином, и примерно втрое быстрее, чем с 4-дифенилфосфино-1-изопропилбензолом, который является более близким аналогом полимерного фосфина [74].

$$Ph_3P + CCl_4 + ROH \xrightarrow{а} Ph_3P{=}O + CHCl_3 + RCl \qquad (46)$$

$$2Ph_3P + CCl_4 + ROH \xrightarrow{б} Ph_3P{=}O + Ph_3\overset{+}{P}{-}CH_2Cl\ Cl^- + RCl \qquad (47)$$

Описан синтез многих иммобилизованных ацилирующих агентов, используемых в основном в синтезе пептидов [75]. Одной из лучших смол является нитрофенольная смола (34). Взаимодействие этой смолы с *N*-замещенными аминокислотами в присутствии дициклогексилкарбодиимида дает ацилирующие агенты [76], которые гладко реагируют с различными производными аминокислот и пептидов. Вводя в реакцию значительный избыток ацилирующего агента, удается получить с высоким выходом (>85 %) продукт ацилирования, который затем без труда может

быть выделен и очищен. С помощью этого метода синтезирован нонапептид брадикинин [76]. Такой способ синтеза пептидов по существу представляет собой процесс, обратный процессу Мерри-филда, так как в данном случае к полимеру прикрепляется не субстрат, а реагент.



(34)

Реакционноспособные группы в ПН-реагентах не обязательно должны быть ковалентно связаны со смолой. В качестве реагентов могут быть использованы анионообменные смолы с такими анионами, как галогениды [77], карбоксилат [78], цианид [74], периодат [74] или анионы β-дикарбонильных соединений [79]. Помимо уже упоминавшихся преимуществ ПН-реагентов, интересной особенностью макропористых анионитов является способность служить источником анионов при реакциях в таких неполярных растворителях, как циклогексан, бензол и дихлорметан. Поэтому реакции с участием полимерных анионитов можно использовать вместо реакций межфазного катализа с участием ониевых солей или краун-эфиров. Примеры реакций ПН-анионов в неполярных растворителях приведены на схемах (48)—(51) (П+ — ионообменная смола, содержащая бензилтриметиламмониевую группировку).

$$П^+\ {}^-CN + н\text{-}C_8H_{17}Br \xrightarrow[\text{[74]}]{\text{бензол}} н\text{-}C_8H_{17}CN\ \ (90\ \%) \qquad (48)$$

$$П^+\ F^- + н\text{-}C_8H_{17}Br \xrightarrow[\text{[77]}]{\text{гексан}} н\text{-}C_8H_{17}F\ \ (82\ \%) \qquad (49)$$

$$П^+\ {}^-IO_4 + \text{(циклогексан-1,2-диол)} \xrightarrow[\text{[74]}]{CH_2Cl_2} OHC(CH_2)_4CHO\ \ (87\ \%) \qquad (50)$$

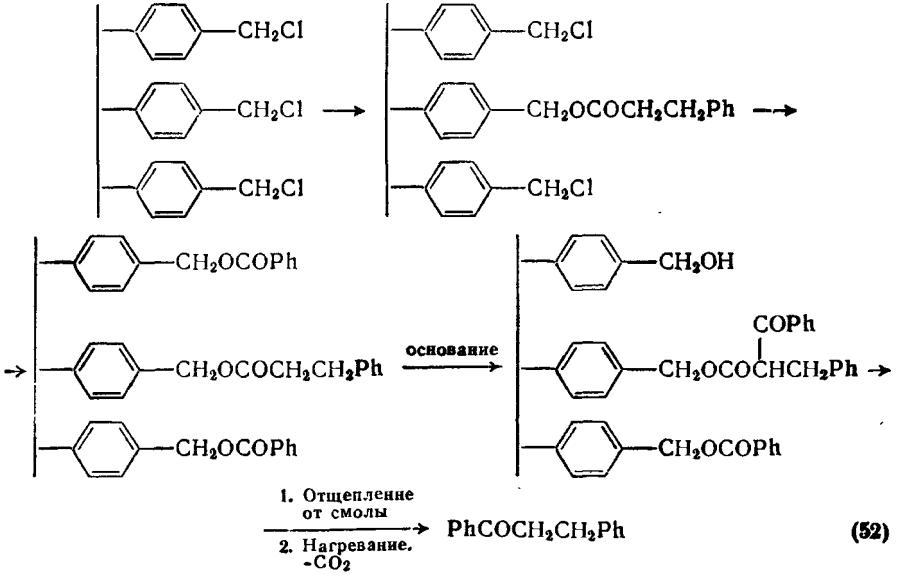
$$П^+ + MeI \xrightarrow[\text{[79]}]{\text{гексан}} \text{(2-метилциклогексан-1,3-дион)}\ \ (95\ \%) \qquad (51)$$

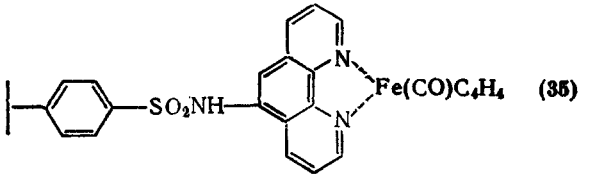
(3) Реакции с участием двух иммобилизованных реагентов

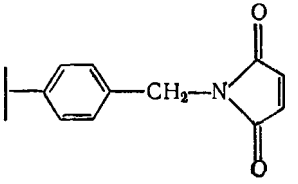
В таких реакциях реагенты могут находиться либо на одной и той же смоле, либо на разных смолах.

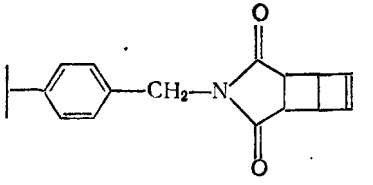
Первый путь использован в синтезе несимметричных кетонов [80]. В хлорметилированной полистирольной смоле небольшую

часть реакционных центров (эквивалентную их концентрации 0,1 ммоль/г) обрабатывают енолизующейся карбоновой кислотой (например, $PhCH_2CH_2CO_2H$). Затем атомы хлора в оставшихся хлорметильных группах (содержание которых эквивалентно ~1,0 ммоль/г) замещают на остатки неенолизирующейся кислоты (например, $PhCO_2H$). Если к обработанной таким образом смоле добавить основание, под действием которого генерируется енолят-анион, единственно доступными для реакции партнерами окажутся неенолизирующиеся сложноэфирные группировки (схема 52). Поэтому после отщепления от смолы образовавшейся β-кетокислоты и ее декарбоксилирования единственным продуктом реакции оказывается несимметричный кетон.







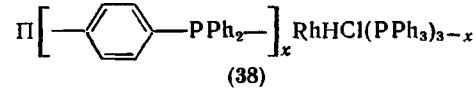


Другой путь интересен как способ выяснения механизма реакции [81]. Были приготовлены две смолы, из которых одна содержала фрагмент (35), а другая — фрагмент (36). Затем смолу (35), являющуюся предшественником циклобутадиена, обработали ионами церия(IV) в присутствии смолы (36). После обработки опыта оказалось, что в смоле (36) содержатся фрагменты типа (37). Поскольку смолы (35) и (36) не могут непосредственно реагировать друг с другом, образование таких фрагментов доказывает, что при распаде смолы (35) образуется свободный циклобутадиен.

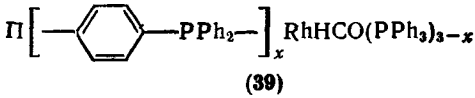
(4) Реакции с применением иммобилизованных катализаторов

Из реакций этого типа лучше всего изучены превращения с участием кислотных или основных ионообменных смол [82]. Например, катиониты в H^+-форме могут применяться как катализаторы образования и гидролиза сложных эфиров, дегидратации спиртов, инверсии сахарозы. Аниониты с сильноосновными анионами используют как катализаторы при конденсациях типа реакции Кневенагаля, при альдольных и бензоиновых конденсациях. Преимущество этих катализаторов по сравнению с растворимыми катализаторами состоит в том, что они легко отделяются от продуктов реакции, и притом, как правило, получаются более чистые продукты.

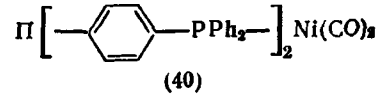
В последние годы стали известны многочисленные комплексы переходных металлов, действующие как эффективные катализаторы гидрирования, гидроформилирования, изомеризации и т. д. Многие из таких катализаторов получены в иммобилизованной ПН-форме. Преимущество иммобилизации здесь в том, что ценный катализатор легко отделяется от реакционной смеси и может быть использован повторно. Многие мономерные катализаторы на основе переходных металлов содержат трифенилфосфиновые лиганды; ПН-аналоги этих катализаторов обычно получают, заменяя один или несколько таких лигандов на остатки смолы (33). Например, если суспензию смолы (33) в толуоле перемешивать с $(Ph_3P)_3RhCl$, то образуется ПН-катализатор гидрирования (38) [83]. Реакция смолы (33) с $(Ph_3P)_3RhH(CO)$ и с $(Ph_3P)_2Ni(CO)_2$ сходным образом дает соответственно ПН-формы катализатора гидроформилирования (39) и катализатора циклоолигомеризации (40) [83]. Некоторые реакции с применением этих катализаторов показаны на схемах (53)—(55).



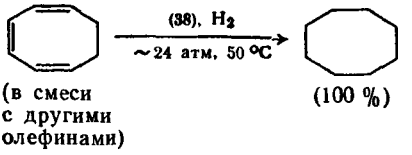
(38)



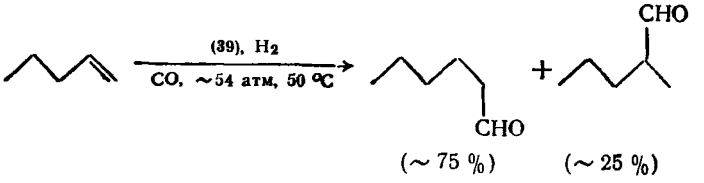
(39)



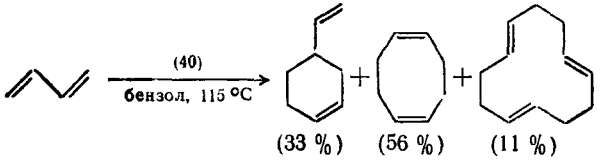
(40)



(53)



(54)

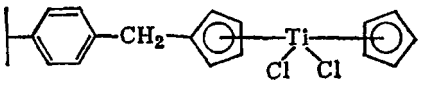


(55)

Катализаторы, не содержащие фосфиновых лигандов, присоединяются к смолам другими путями. Например, ПН-аналог катализатора гидрирования K_2PdCl_4 получеи при действии раствора этой соли на анионит в ^-OH-форме [84].

Зачастую ПН-катализаторы несколько менее активны, чем их растворимые прототипы, вероятно, потому, что субстраты должиы сначала диффундировать в глубь смолы. Процесс диффузии можио облегчить, используя линейные полимеры [85] (хотя в этом случае катализатор труднее регенерировать) или прикрепляя катализатор только к поверхности смолы или другого подходящего материала [86], хотя в этом случае катализатор будет иметь, вероятио, меньшую активность на единицу массы.

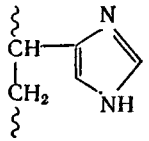
Одиако ПН-катализаторы не всегда менее активны, чем их мономерные прототипы. Катализатор, полученный обработкой ПН-производного титаноцеиа (41) *н*-бутиллитием примерно в 70 раз активиее в качестве катализатора гидрирования, чем его неиммобилизоваиный аналог. Это объясияется, вероятио, тем, что активные группы, находясь на смоле, степень сшивки которой составляет 20 %, достаточно разобщены в пространстве, и вследствие этого димеризация, приводящая к неактивным продуктам, происходит не так легко, как в растворе [87].



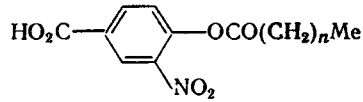
(41)

Много работ было посвящено гидролизу сложных эфиров, катализируемому линейными полимерами, отчасти потому, что такие реакции напоминают процессы ферментативного гидролиза [88]. Одним из простейших изучавшихся здесь полимеров является

поливинилимидазол (42). Этот полимер катализирует гидролиз сложных эфиров типа (43). Скорость гидролиза в этом случае зависит от используемого растворителя и от длины ацильной цепочки. Если растворителем служит водный этанол, а субстратом — эфир (43; $n = 11$), реакция, катализируемая полимером (42), протекает примерно в 1000 раз быстрее, чем при катализе имидазолом [89]. Скорость гидролиза на синтетических полимерах зависит от трех факторов: силы гидрофобных взаимодействий, кооперативного эффекта и силы электростатических взаимодействий.



(42)



(43)

(5) Иммобилизованные ферменты

Многие ферменты удается прикрепить к полимерным носителям [90]. Преимущество такой иммобилизации состоит в том, что фермент, обычно являющийся весьма дорогим реагентом, можно легко отделить от реакционной смеси и использовать повторно. Кроме того, иммобилизованные ферменты обычно более устойчивы при хранении.

Как правило, ферменты прикрепляют к гидрофильным носителям одним из трех методов. Первый метод — это присоединение с помощью ковалентной связи [см. разд. 27.4.1(4)]. Второй метод основан на принципе ловушки; в присутствии фермента проводят синтез сшитого полимера, например полиакриламида или поли(2-гидроксиэтилметакрилата). При достижении определенной степени сшивки значительная часть молекул фермента оказывается буквально «пойманной» в сеть полимера. Третий метод состоит в физической адсорбции фермента на инертном носителе или на ионообменной смоле.

В процессе иммобилизации возможна денатурация фермента. Однако даже если найден удачный способ иммобилизации фермента, кинетические характеристики ферментативного процесса все равно могут изменяться под воздействием следующих факторов: (а) изменения микросреды в непосредственной близости от активного центра фермента; (б) пространственных взаимодействий между ферментом, субстратом и носителем; (в) фактора диффузии; (г) последствий химической модификации молекулы фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. *G. Odian*, 'Principles of Polymerization', McGraw-Hill, New York, 1970.
2. 'Reactivity, Mechanism and Structure in Polymer Chemistry', ed. A. D. Jenkins and A. Ledwith, Wiley, London, 1974 [Реакционная способность, меха-

низмы реакций и структура в химии полимеров./Под ред. А. Д. Дженкинса, А. Левита. Пер. с англ. — М.: Химия, 1977].
3. *D. Braun, H. Cherdron, and W. Kern*, 'Techniques of Polymer Synthesis and Characterisation', Wiley-Interscience, New York, 1971 [*Д. Браун, Г. Шердрон, В. Керн.* Практическое руководство по синтезу и исследованию свойств полимеров. Пер. с англ. М.: Химия, 1976].
4. *W. R. Sorenson and T. W. Campbell*, 'Preparative Methods of Polymer Chemistry', 2nd edn., Interscience, New York, 1968.
5. 'Encyclopaedia of Polymer Science and Technology', ed. H. F. Mark, N. G. Gaylord, and N. M. Bikales, vols. 1—15 and a supplement to vol. 1, Interscience, New York, 1964—1976.
6. 'Kinetics and Mechanisms of Polymerization: vol. 1, Vinyl Polymerisation', ed. G. E. Ham. Edward Arnold, London, 1967.
7. *C. H. Bamford and C. F. H. Tipper*, 'Comprehensive Chemical Kinetics, vol. 14A, Free-radical Polymerisation', Elsevier, Amsterdam, 1976.
8. 'Copolymerization:, ed. G. E. Ham, Interscience, New York, 1964 [Сополимеризация./Под ред. Дж. Хэма. Пер. с англ. М.: Химия, 1971].
9. 'The Chemistry of Cationic Polymerisation', ed. P. H. Plesch, Pergamon Press, Oxford, 1963.
10. *M. Szwarc*, 'Carbanions, Living Polymers and Electron-Transfer Processes', Interscience, New York, 1968.
11. 'Block Copolymers', ed. D. C. Allport and W. H. Janes, Applied Science, London, 1973.
12. 'Block and Graft Copolymerisation', ed. R. J. Ceresa, Wiley, London, 1973.
13. *H. A. J. Battaerd and G. W. Tregear*, 'Graft Copolymers', Interscience, New York, 1967.
14. 'Coordination Polymerisation', ed. J. C. W. Chien, Academic Press, New York, 1975.
15. *L. Reich and A. Schindler*, 'Polymerisation by Organometallic Compounds', Interscience, New York, 1966.
16. *C. E. H. Bawn and A. Ledwith*, Quart. Rev., 1962, **16**, 361.
17. 'Kinetics and Mechanisms of Polymerisation: vol. 3, Step-Growth Polymerisation:, ed. D. H. Solomon, Dekker, New York, 1972.
18. См. сс. 5, vol. 7, p. 701; *K. A. Kun* and *R. Kunin*, J. Polymer Sci., Polymer Chem., 1968, **6**, 2689.
19. *A. A. K. Whitehouse, E. G. K. Pritchett*, and *G. Barnett*, 'Phenolic Resins', Iliffe, London, 1967.
20. *C. P. Vale and W. G. K. Taylor*, 'Aminoplastics' Iliffe, London, 1964.
21. 'Chemical Reactions of Polymers', ed. E. M. Fettes, Interscience, New York, 1964 [Химические реакции полимеров./Под ред. Е. Феттеса. Пер. с англ. М.: Мир, 1967].
22. 'Reactions on Polymers', ed. J. A. Moore, Reidel, Dordrecht, 1973.
23. 'Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol', Monograph No. 30, Society of Chemical Industry, London, 1968; см. также сс. 3, pp. 255, 256.
24. *P. J. Flory*, J. Amer. Chem. Soc., 1939, **61**, 1518; 1942, **64**, 177.
25. *G. D. Jones*, Ind. Eng. Chem., 1952, **44**, 2686.
26. *A. Chapiro*, 'Radiation Chemistry of Polymeric Systems', Interscience, New York, 1962, chapters 9 and 10; *D. A. Laufer, T. M. Chapman, D. I. Marlborough, V. M. Vaidya, and E. R. Blout*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, **90**, 2696.
27. *K. W. Pepper, H. M. Paisley, and M. A. Young*, J. Chem. Soc., 1953, 4097.
28. *J. A. Patterson, in* 'Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports', ed. G. R. Stark, Academic Press, New York, 1971, chapter 5.
29. См. сс. 3, p. 257.
30. *R. L. Letsinger, M. J. Kornet, V. Mahadevan, and D. M. Jerina*, J. Amer. Chem. Soc., 1964, **86**, 5163.
31. *M. J. Farrall and J. M. J. Frechet*, J. Org. Chem., 1976, **41**, 3877.
32. *C. R. Harrison, P. Hodge, J. Kemp, and G. M. Perry*, Makromol. Chem., 1975, **176**, 267.
33. *H. M. Relles and R. W. Schluenz*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 6469.

34. *J. Bonner*, in 'Biogenesis of Natural Compounds', ed. P. Bernfeld, Pergamon Press, Oxford, 1963, chapter 16.
35. *B. L. Archer, D. Barnard, E. G. Cockbain, J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, and G. Popjak*, Proc. Roy. Soc. (B), 1966, **163**, 519.
36. *D. Craig*, см. cc. 21, chapter IXC.
37. *P. Meares*, 'Polymers: Structure and Bulk Properties', Van Nostrand, London, 1965.
37a. 'Polymer Handbook', 2nd. edn., ed. J. Brandrup and E. H. Immergut, Wiley-Interscience, New York, 1975.
38. *F. A. Bovey*, 'High Resolution NMR of Macromolecules', Academic Press, New York, 1972 [*Ф. А. Бови.* ЯМР высокого разрешения макромолекул. Пер. с англ. М.: Химия, 1977]; 'Sructural Studies of Macromolecules by Spectroscopic Methods', ed. K. J. Wiley, London, 1976.
39. 'Gel Permeation Chromatography', ed. K. H. Altgelt and L. Segal, Dekker, New York, 1971.
40. *J. Reiland*, in 'Methods in Enzymology', ed. W. B. Jakoby, Academic Press, New York, 1971, vol. 22, p. 287.
41. *F. Helfferich*, 'Ion Exchange', McGraw-Hill, New York, 1962 [*Ф. Гельферих.* Иониты: основы ионного обмена. Пер. с нем. М.: Издатинлит, 1962].
42. *J. Inczedy*, 'Analytical Applications of Ion Exchangers', Pergamon Press, Oxford, 1966.
43. *D. H. Spackman, W. H. Stein, and S. Moore*, Analyt. Chem., 1958, **30**, 1190.
44. *G. Gabrielson and O. Samuelson*, Svensk kem. Tidskr., 1950, **62**, 214: 1952, **64**, 150 (Chem. Abs., 1951, **45**, 4168; 1952, **46**, 9018).
45. См. cc. 42, chapter 10; *G. Schmuckler*, Talanta, 1965, **12**, 281; *A. Patchornik and M. A. Kraus*, см. cc. 5, supplement to vol. 1, p. 471.
46. *D. K. Hale*, Research, 1956, **9**, 104.
47. *G. Dotsevi, Y. Sogah, and D. J. Cram*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 3038.
48. *H. Guilford*, Chem. Soc. Rev., 1973, **2**, 249.
49. *C. G. Overberger and K. N. Sannes*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1973, **13**, 99; *C. C. Leznoff*, Chem. Soc. Rev., 1974, **3**, 65; *L. P. Ellinger*, Ann. Reports (B), 1973, 322; *A. Patchornik and M. A. Kraus*, см. cc. 5, supplement to vol. 1, p. 468.
50. *J. I. Crowley and H. Rapoport*, Accounts Chem. Res., 1976, **9**, 135.
51. *J. I. Crowley, T. B. Harvey, and H. Rapoport*, J. Macromol. Sci. Chem., 1973 **A7**, 1117.
52. *R. B. Merrifield*, J. Amer. Chem. Soc., 1963, 85, 2149.
53. *G. R. Marshall and R. B. Merrilield*, см. cc. 28, chapter 3.
54. *J. M. J. Frechet and C. Schuerch* J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 604; *R. D. Guthrie, A. D. Jenkins, and J. Stehlicek*, J. Chem. Soc. (C), 1971, 2690.
55. *H. Köster and F. Cramer*, Annalen, 1974, 946.
56. *I. T. Harrison and S. Harrison*, J. Amer. Chem. Soc., 1967, **89**, 5723.
57. *T. M. Fyles and C. C. Leznoff*, Canad. J. Chem., 1976, **54**, 935.
58. *C. C. Leznoff, T. M. Fyles, and J. Weatherston*, Canad. J. Chem., 1977, **55**, 1143.
59. *T. Takagi*, J. Appl. Polymer Sci., 1975, **19**, 1649.
60. *C. R Harrison and P. Hodge*, J. C. S. Perkin I, 1976, 605.
61. *J. M. J. Frechet and K. E. Haque*, Macromolecules, 1975, **8**, 130.
62. *C. R. Harrison and P. Hodge*, J. C. S. Perkin I, 1976, 2252.
63. *N. M. Weinshenker and C. M. Shen*, Tetrahedron Letters, 1972, 3281, 3285.
64. *G. A. Crosby, N. M. Weinshenker, and H.-S. Uh*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 2232.
65. *S. V. McKinley and J. W. Rukshys*, J. C. S. Chem. Comm., 1972, 134.
66. *W. Heitz and R. Michels*. Angew. Chem. Internat. Edn., 1972, **11**, 298.
67. *F. Camps, J. Castells, J. Font, and F. Vela*, Tetrahedron Letters, 1971, 1715.
68. *W. Heitz and R. Michels*, Annalen, 1973, 227.
69. *R. Appel*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1975, **14**, 801.
70. *P. Hodge and G. Richardson*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 622.

71. *S. L. Regen and D. P. Lee*, J. Org. Chem., 1975, **40**, 1669; *D. C. Sherrington, D. J. Craig, J. Dagleish, G. Domin, J. Taylor, and G. V. Meehan*, European Polymer J., 1977, **13**, 73.
72. *C. R. Harrison, P. Hodge, and W. J. Rogers*, Synthesis, 1977, 41.
73. *R. Appel, W. Strüver, and L. Willms*, Tetrahedron Letters, 1976, 905.
74. *C. R. Harrison and P. Hodge*, неопубликованные данные.
75. *A. Patchornik and M. A. Kraus*, см. сс. 5, supplement to vol. 1, p. 471.
76. *M. Fridkin, A. Patchornik, and E. Katchalski*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, **90**, 2953.
77. *G. Cainelli, F. Manescalchi, and M. Panunzio*, Synthesis, 1976, 472.
78. *G. Cainelli, and Manescalchi*, Synthesis, 1975, 723.
79. *G. Gelbard and S. Colonna*, Synthesis, 1977, 113.
80. *M. A. Kraus and A. Patchornik*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 7325.
81. *J. Rebek and F. Gavina*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 3453.
82. *F. Helfferrich*, Angew. Chem., 1954, **66**, 241, 327.
83. *C. U. Pittman, L. R. Smith, and R. M. Hanes*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 1742.
84. *R. L. Lazcana and J.-E. Germain*, Bull. Soc. chim. France, 1971, 1869.
85. *E. Bayer and V. Schurig*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1975, **14**, 493.
86. *K. G. Allum, R. D. Hancock, S. McKenzie, and R. C. Pitkethly*, in 'Proceedings of 5th International Congress on Catalysis, Miami Beach, 1972', North-Holland, Amsterdam, 1973, p. 477.
87. *W. D. Bonds, C. H. Brubaker, E. S. Chandrasekaran, C. Gibbons, R. H. Grubbs, and L. C. Kroll*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 2128.
88. *J. H. Fendler and E. J. Fendler*, 'Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems', Academic Press, New York, 1975, p. 451; *C. G. Overberger and J. C. Salamone*, Accounts Chem. Res., 1969, **2**, 217.
89. *C. G. Overberger, M. Morimoto, I. Cho, and J. C. Salamone*, Macromolecules, 1969, **2**, 553.
90. *R. Goldman, L. Goldstein, and E. Katchalski*, in Ref. 28, chapter 1; *K. Mosbach*, Sci. Amer., 1971, **224**, (3), 26

ЧАСТЬ 28
БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

28.1. БИОСИНТЕЗ

P. TOMAC (University of Surrey)

28.1.1. ВВЕДЕНИЕ

Настоящий раздел представляет собой введение в изучение биосинтеза и поэтому его первейшая задача заключается в рассмотрении самых общих вопросов предмета. Результатом развития этой сравнительно новой научной дисциплины является понимание путей происхождения природных соединений и взаимосвязей между ними (часто довольно простых, но иногда интригующе запутанных), которые будут проиллюстрированы ниже на ряде примеров. В последующих главах несколько более детально описаны биосинтетические пути, ведущие к основным индивидуальным классам природных соединений.

Вкратце будут также рассмотрены исторические аспекты развития биосинтетических исследований и техника эксперимента, которая до последнего времени базировалась в основном на применении меченных изотопами промежуточных соединений. Особенно успешно взаимосвязи между соединениями-предшественниками и продуктами биосинтеза изучались в последние годы. На основе полученных данных создана простая биосинтетическая классификация природных соединений, которая во многом совпадает с разработанной ранее традиционной системой структурной классификации, но в ряде случаев решительно расходится с ней.

В некоторых ранних работах меченные радиоактивными изотопами предшественники использовали для обнаружения промежуточных продуктов метаболизма с помощью ауторадиографии; например, при изучении хлорофиллзависимых путей фиксации углерода растения на короткое время помещали в атмосферу $^{14}CO_2$ [1]. Однако в большинстве работ по биосинтезу природных соединений исследовалось специфическое включение более сложных промежуточных веществ. Выбор вероятных предшественников обычно основывается на предварительном рассмотрении принципиально возможных схем биосинтеза. Последние, в свою очередь, вытекают из анализа структуры изучаемого природного соедине-

ния, который позволяет выявить природу его наиболее ранних предшественников. Выбор гипотетической схемы биосинтеза облегчается в тех случаях, когда наряду с изучаемым объектом известны другие, находящиеся с ним в близком структурном родстве соединения, пути биосинтеза которых уже установлены. Ниже приведены примеры такого чисто умозрительного подхода.

Успешное выяснение различных путей биосинтеза, подчас даже его мелких деталей, неизбежно должно было стимулировать разработку аналогичных не катализируемых ферментами, так называемых биомиметических реакций. В ряде случаев в результате химических превращений гипотетических биосинтетических промежуточных соединений удалось с умеренным выходом получить ожидаемые природные соединения. Однако в отсутствие ферментативного контроля такое биогенетическое свидетельство в пользу какой-либо предполагаемой схемы биосинтеза в лучшем случае не убедительно и может даже ввести в заблуждение.

28.1.2. ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ БИОСИНТЕЗА

Природными соединениями называют органические вещества, находящиеся в любом живом организме, будь то растение, животное или микроорганизм. В течение последнего столетия выделено несколько тысяч таких соединений и определена их структура; бóльшая часть этих соединений обнаружена в растениях или микроорганизмах. Природные соединения образуются в результате метаболических процессов, обычно управляемых ферментами.

Интерес к изучению биосинтеза природных веществ развивался параллельно с накоплением данных по их строению. Уже в самых ранних работах (например, в классическом синтезе Велером в 1828 г. мочевины — хорошо известного продукта метаболизма животных — путем пиролитической перегруппировки цианата аммония) было показано, что в принципе природные соединения образуются в результате обычных химических реакций. Это важное открытие развеяло окружавший природные соединения миф об их сверхъестественном происхождении с помощью некоей жизненной силы. Виталистическая концепция была окончательно развеяна Пастером, который в середине прошлого столетия показал, что микроорганизмы, в том числе бактерии и дрожжи, не возникают самопроизвольно из ничего, и что они ответственны за образование таких известных продуктов брожения, как спирт, уксусная и масляная кислоты.

С тех пор темпы работ по выделению и установлению структуры новых природных соединений, имеющих часто весьма сложное строение, все более и более ускорялись, хотя иногда выяснение полной структуры соединения затягивалось на чрезвычайно долгое время. Например, строение хорошо известного растительного алкалоида стрихнина, выделенного в 1818 г., было окончательно установлено только в 1946 г. В 1964 г. осуществлен полный

синтез этого сложного гептациклического соединения с несколькими центрами хиральности [2], а за последние годы в значительной мере выяснены пути его биосинтеза.

После 1940 г. произошел качественный скачок в разработке новых методов разделения, пригодных для разделения даже микроколичеств близких по строению веществ. Стало возможным, например, выделение минорных компонентов из экстрактов природного происхождения с помощью различных видов хроматографии, в частности, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Со все возрастающей интенсивностью увеличивается число известных структур природных соединений, что обусловлено развитием спектроскопических методов исследования (УФ- и ИК-спектроскопии, спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии), а также рентгеноструктурного анализа.

Для биосинтетических исследований особенно благоприятным было одновременное развитие ядерной химии, предоставившей в распоряжение ученых меченые соединения. Применение последних в изучении путей метаболизма оказалось настолько плодотворным, что теперь биосинтез можно рассматривать как составную часть химии природных соединений. Кроме того, химики, работающие в области природных соединений, взяли на вооружение приемы, ранее использовавшиеся только в более традиционных сферах биохимии и генетики (использование ферментов и мутантов).

Несмотря на эти успехи в настоящее время мы располагаем лишь весьма фрагментарными данными о путях биосинтеза важнейших групп природных соединений. Однако развитие и совершенствование методов эксперимента и приборов должно привести к повышению уровня наших знаний о биогенезе вообще и о тонких деталях механизмов путей биосинтеза, в частности.

28.1.3. БИОСИНТЕТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Одним из важнейших источников органических соединений в природе является глюкоза, которая образуется в растениях и аутотрофных микроорганизмах путем восстановления CO_2. Из глюкозы в результате различных ферментативных превращений образуется несколько типов универсальных биосинтетических единиц, из которых в процессе ряда последовательных катализируемых ферментами реакций формируются углеродные скелеты большинства природных соединений. Эти взаимосвязанные последовательности метаболических превращений составляют основу биосинтетической классификации, согласно которой все природные соединения несколько произвольно подразделяются на две осиовные группы — первичные и вторичные метаболиты.

К *первичным метаболитам* относят: а) продукты общего метаболизма; б) вещества, широко распространенные в растениях,

животных и микроорганизмах, например, аминокислоты, ацетил-КоА, моносахариды, мевалоновую кислоту, нуклеотиды.

Вторичными метаболитами являются: а) продукты специализированных путей биосинтеза; б) соединения, образующиеся из первичных метаболитов; в) вещества, имеющие ограниченную сферу распространения, главным образом в растениях и микроорганизмах (часто характерны для отдельного рода, вида или штамма), например, алкалоиды, терпены, фенолы, олигосахариды, флаваноиды, антибиотики.

В основу этой классификации положены в первую очередь биогенетические соображения и лишь в меньшей степени биохимические функции рассматриваемых соединений.

К первичным метаболитам относятся также биополимеры — обычные полисахариды, белки и нуклеиновые кислоты. Небольшая часть первичных метаболитов выполняет роль предшественников для всех других природных веществ. К вторичным метаболитам относится подавляющее большинство природных соединений (см. табл. 28.1.1), которые часто имеют очень сложное строение.

Термин «вторичные метаболиты» едва ли справедлив по отношению ко многим из этих соединений, строение которых чрезвычайно разнообразно и зачастую весьма сложно. В то же время традиционная, чисто химическая классификация очень неудобна для описания биогенеза подобных молекул. В настоящее время биохимическая функция большинства вторичных метаболитов неизвестна, но это, вероятно, временное явление, поэтому нецелесообразно возводить наше незнание в ранг постоянного классифика-

Таблица 28.1.1. Биосинтетическая классификация вторичных метаболитов

Простейшие предшественники	Вторичные метаболиты
Аминокислоты	Алкалоиды; производные пептидов (например, олигопептиды, дикетопиперазины и пенициллины); не содержащие азот соединения (например, производные коричной кислоты)
Мевалоновая кислота $[HOCH_2CH_2C(CH_3)(OH)CH_2COOH]$	Терпены, стероиды, каротиноиды и другие полиизопреноиды
Глюкоза	Гликозиды, модифицированные сахара (например, койевая кислота) и олигосахариды (например, стрептомицин)
Ацетил-КоА и пропионил-КоА	Поликетиды (производные жирных кислот, полиацетилены, макролиды и различные фенолы)
C_1-Звенья (из формиата и метионина)	Группы —OMe, —SMe, $>$NMe, $-$CMe, $-$CCH$_2$OH и т. д.

ционного признака. Тем не менее предложение классифицировать первичные и вторичные метаболиты соответственно как «биохимические реактивы» и «химические реактивы» [3] при современном состоянии наших знаний представляется разумным.

Самой, может быть, важной характеристикой многих вторичных метаболитов является их сравнительно ограниченная область распространения. Не являясь, по определению, общими метаболитами, эти соединения отражают индивидуальность организма-продуцента. Продуцирование вторичных метаболитов в некоторых случаях является прямой причиной, а не косвенным следствием тех отличий, которые обеспечивают выживаемость отдельных видов в ходе естественного отбора.

Некоторым из так называемых вторичных веществ были приписаны разнообразные функции, связанные с их действием на другие биологические виды, сосуществующие с организмом-продуцентом в общем биоценозе. В этом отношении вторичные вещества организма-продуцента играют роль аллелохимических агентов [4], которые могут очень сильно влиять на рост, здоровье, поведение и размножение других биологических видов.

Вероятно, лишь малая часть природных соединений не выполняет никаких биологических функций или является просто эволюционным атавизмом; подавляющее их большинство, по-видимому, биологически важно в метаболическом, экологическом или каком-либо другом отношении. Истинная природа биологической роли вторичных метаболитов выяснится только после тщательного изучения биохимических процессов, определяющих индивидуальность видов и особей.

28.1.4. ЗАДАЧИ И ТРУДНОСТИ ХИМИИ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Изучение природного соединения обычно протекает в следующей последовательности: обнаружение — выделение — установление строения. К этим трем основным этапам в последние годы все чаще добавляют изучение биосинтеза. Это видно из публикаций по химии природных соединений; в настоящее время крайне редко описываются новые вещества без анализа возможных путей их происхождения или взаимосвязей с другими соединениями.

Поскольку как критерии обнаружения (цвет, антибиотическая активность и т. д.), так и методы выделения тесно связаны с общими типами структур выделяемых соединений, крайне мало вероятно, чтобы известные на сегодняшний день классы природных соединений, получаемые такими ограниченными, высокоселективными и зачастую произвольными способами, представляли бы весь спектр биосинтетической активности живых организмов. Не исключено открытие совершенно новых классов природных соединений, хотя, судя по масштабам исследований в этой области в течение

последнего столетия, весьма вероятно, что любая новая группа будет состоять из минорных в колнчественном отношении компонентов.

Необходимым предварительным условнем для любого систематического поиска принципиально новых типов природных соединений является наличие универсального метода детектирования. Такой метод — аутoрадиография (илн, как ее иногда называют, радиоаутография) — существует. Область применения этого простого и вместе с тем чрезвычайно ценного метода рассмотрена ниже.

Описано несколько тысяч природных соединений, разделенных на группы по структурным или таксономическим признакам. Точное число известных природных соединений определить крайне трудно из-за отсутствия едннх каталогов и единой системы сбора и обработкн новой информацнн, поток которой постоянно расширяется.

Все возрастающее значение природных соединений для промышленности, медицины и сельского хозяйства делает необходимым создание как нсчерпывающего их каталога, так и специальной информационной системы, обеспечивающей выявление полезных корреляций (например, корреляции между строением н биологической актнвностью фармакологнчески активных метаболитов), а также общнх структурных элементов, соответствующих определенным путям биосинтеза [например, звеньев нсходных биосинтетических предшественников с характерными углеродными скелетами (см. табл. 28.1.1)].

Очевидно, работа по компиляции этих данных будет очень трудоемкой. В то же время необходимая информация большей частью уже содержится в существующей лнтературе; ее систематический анализ и выявленне необходимых данных не представляют принципиальных трудностей и могли бы выполняться стандартной автоматической системой хранения данных с соответствующей программой поиска информации, использующей перекрестные ссылки. Особая ценность такой системы как вспомогательного средства в биосинтетических исследованиях заключается в том, что ее можно нспользовать, во-первых, для логического анализа структуры природных соеднненнй с целью выявления звеньев первичных предшественнннков и, во-вторых, для установления таксономической корреляции индивндуальных соединений со сходными метаболитами нз другнх природных источников. Корреляции такого типа составляют основу гипотетических схем биосинтеза, которые затем проверяются экспериментально, обычно с помощью меченных изотопами предполагаемых предшественников. В настоящее время этн корреляции, как и структурный анализ, выполняются только путем кропотлнвого и длительного изучения множества нсточников информацин, которые редко полностью доступны каждому исследователю.

28.1.5. МЕТОДЫ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Как отмечалось выше, детальное изучение путей биосинтеза возможно только при сотрудничестве представителей многих научных дисциплин. Для более или менее полного описания происхождения и превращений любого природного соединения необходимо выяснение структур его метаболических предшественников и механизмов их взаимопревращений. Кроме того, желательно иметь представление о структуре, механизме действия и механизме регуляции активности каждого из ферментов, а также располагать генетическими картами генов, ответственных за биосинтез этого метаболита и регуляцию всех ферментов.

Столь необходимое сотрудничество химиков, энзимологов, генетиков, физиологов, таксономистов и представителей других специальностей остается до сих пор несбыточной мечтой, особенно при исследовании вторичных метаболитов. Отчасти это обусловлено отсутствием данных о метаболической значимости большинства вторичных метаболитов.

В этой связи кажется поразительным, как с помощью, в сущности, единственного метода — использования меченых предшественников и несложных приемов их биологического включения — оказалось возможным выяснить общие пути, ведущие от небольшого числа общих предшественников ко всем известным основным классам природных соединений. Главную роль здесь сыграло применение сложных химических и физических методов, делающих возможным определение положения как стабильных, так и радиоактивных изотопов (преимущественно ^{2}H, ^{3}H, ^{13}C, ^{14}C, ^{15}N, ^{18}O и ^{35}S) в молекулах природных соединений, образовавшихся из специфически меченных предшественников.

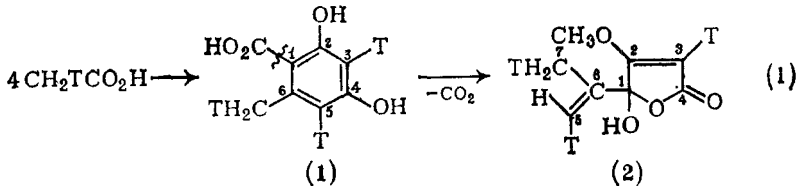
В случае растений введение предшественников [5] обычно осуществляется подпиткой всего растения или его отдельных тканей раствором, а в случае микроорганизмов — добавлением раствора к культуральной жидкости во время фазы максимального продуцирования изучаемого метаболита. Предварительно определяют оптимальную эффективность включения; это особенно важно при работе с теми стабильными изотопами, природное содержание которых достаточно велико (например, для ^{13}C оно равно 1,1 %), т. е. когда необходимо добиться минимального разведения вводимой изотопной метки. При использовании меченых предшественников этот фактор не всегда является решающим, поскольку получающийся метаболит обычно достаточно активен, чтобы его можно было затем развести немеченым («холодным») соединением и далее подвергнуть последовательному химическому расщеплению с целью определения распределения метки в молекуле. В стандартных методиках количественного определения радиоактивных изотопов применяются чувствительные счетчики типа Гейгера — Мюллера или, чаще, сцинтилляционные счетчики. Эти приборы исполь-

зовались в самых первых работах и наиболее широко распространены до сегодняшнего дня.

Позднее были разработаны не требующие химической деградации методы локализации меченых атомов [6], основанные на идентнфикации изотопов с помощью спектроскопии ЯМР. Сначала этот прямой метод с большим успехом применяли для обнаружения ^{13}C, затем ^{3}H и ^{15}N и даже ^{2}H (в последнем случае требуются модифицированные приборы [7]). С помощью метода ЯМР можно даже доказать стереоспецифический характер введения метки в данный прохиральный центр, где оба химически идентичных заместителя магнитно не эквивалентны.

Применение меченных ^{13}C предшественников сейчас стало обычным методом при изучении биосинтеза микробных метаболитов, так как быстрый рост микроорганизмов обеспечивает высокую эффективность включения меченых предшественников. Эффективность включения является фактором, ограничивающим применимость метода ЯМР; существенно, чтобы изотопное обогащение заметно превышало природную концентрацию ^{13}C. По этой причине использование метода ЯМР для изучения биосинтеза метаболитов растений пока еще ограничено.

Хотя метод ЯМР ^{3}H сравнительно нов, в качестве иллюстрации применения ЯМР на рис. 28.1 приведены спектры ЯМР ^{1}H пенициллновой кислоты и ЯМР ^{3}H [^{3}H]пенициллновой кислоты (2), [8, 9], которая образуется из меченой уксусной кислоты с промежуточным образованием орселлиновой кислоты (1) (схема 1). Сравнение этих спектров позволяет однозначно определить положение атомов ^{3}H в молекуле. Очевидны некоторые из преимуществ этого изотопа: легко и с достаточной точностью предсказуемые значения химических сдвигов и констант взаимодействия, а также пропорциональность площади сигнала концентрации соответствующего изотопа. Спектр также свидетельствует о стереоспецифичном характере введения метки в метиленовую группу С-5, причем пониженная по сравнению с другими интенсивность этого сигнала говорит о частичной потере трития; это позволило высказать интересные соображения о механизме биосинтеза пенициллновой кислоты (2) [8].



(1)

Развитием прямого метода определения ^{13}C с помощью ЯМР явилось использование $^{13}C—^{13}C$-спин-спинового взаимодействия. Обусловленное этим взаимодействием расщепление сигнала в спектре метаболита, образовавшегося из предшественника с двумя

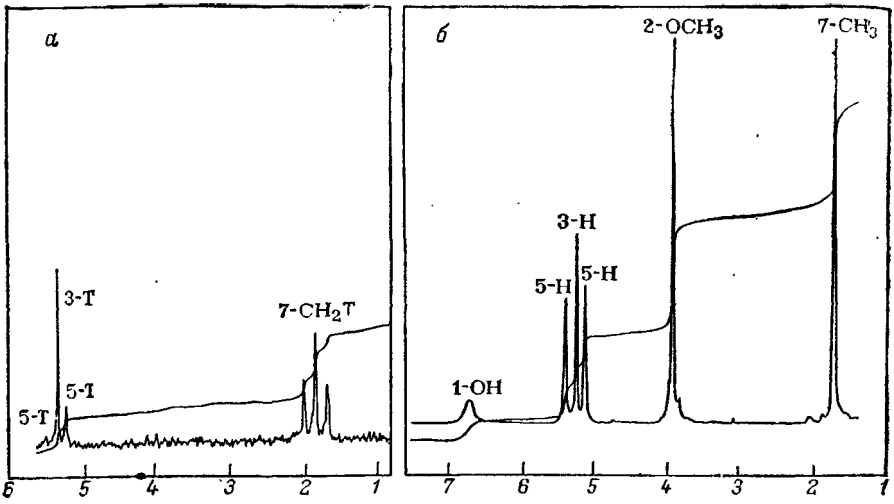
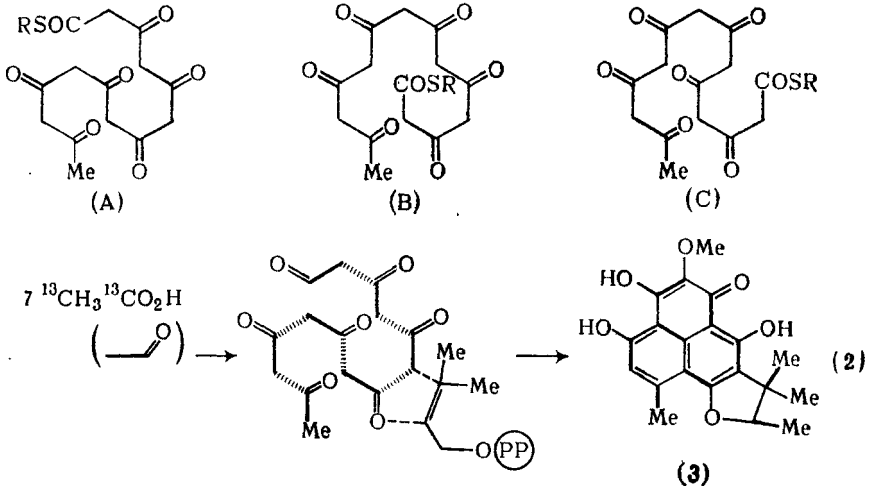


Рис. 28.1.1. Спектры ЯМР ^3H (*а*) и ЯМР ^1H (*б*) пенницилловой кислоты

соседними атомами ^{13}C, является прямым указанием на специфическое включение этого предшественника без расщепления углерод-углеродной связи. Особенно изящным примером использования этой методики служит выбор между альтернативными способами циклизации поликетидной цепи (A, B и C) [36] при биосинтезе продуцируемого грибами феналенона — дезоксигеркеинона **(3)** [10] (схема 2).



Иногда ^{13}C—^{13}C-взаимодействие неожиданно наблюдается в спектрах ЯМР метаболитов, предшественники которых имели только одну метку. Причиной этого может являться резкое повы-

шение вероятности биосинтеза молекул, содержащих более одного звена предшественника, вследствие высокой концентрации последнего. Этот факт был остроумно использован для выяснения конформации фарнезилпирофосфата (предшественника дигидроботридиаля) непосредственно перед его циклизацией и перегруппировкой [11].

Явление спин-спинового взаимодействия потенциально может дать ценную информацию и в случае некоторых других комбинаций изотопов, например ^{13}C—^{3}H. Эта пара изотопов может оказаться полезной, в частности, при изучении механизмов гидридного сдвига, например, при биосинтезе некоторых терпеноидов; для этого потребуется соответствующим образом меченная мевалоновая кислота или даже ^{13}C, ^{3}H-меченный ацетат.

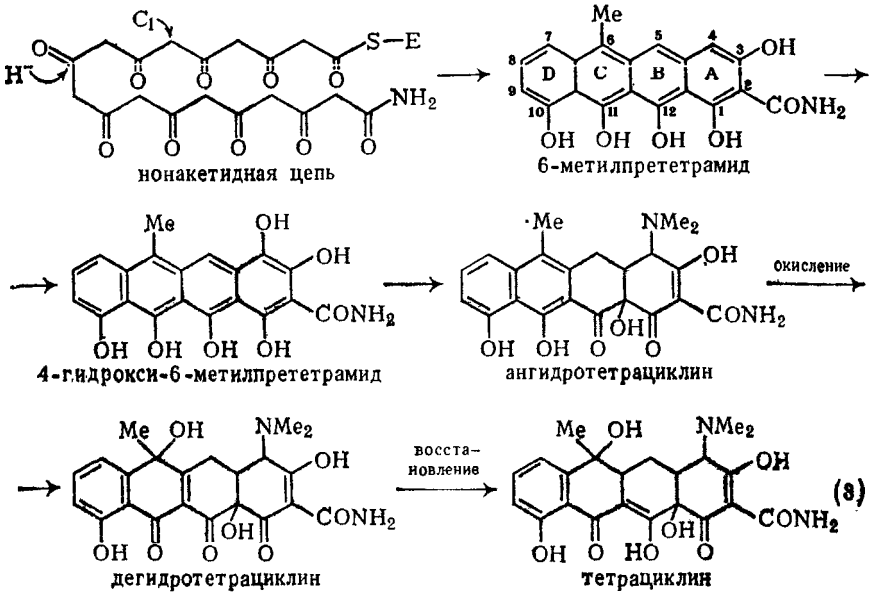
Введение двух различных меток в одну молекулу предшественника широко применяется и в более традиционных биосинтетических исследованиях. Существуют хорошо отработанные методики сравнения отношения двух различных изотопов в предшественнике и в продукте метаболизма без химической деградации и, следовательно, без разделения изотопов. К примерам использования этого метода относится применение [^{14}C, $^{2}H_3$]метионина для выяснения деталей механизма метилирования [12], изучение механизма включения [^{14}C, ^{15}N]аминокислот в алкалоиды [13] и [^{14}C, ^{18}O]ацетата в орселлиновую кислоту [14].

Большинство работ по изучению биосинтеза природных соединений проводилось на целых растениях и интактных микробных клетках. Такой подход обычно применим для ряда простых предшественников, которые легко преодолевают барьер клеточных стенок; однако иногда, особенно в случае сложных предшественников, например олигопептидов, проницаемость клеточных мембран может стать серьезным ограничением. Даже если этот фактор не стал лимитирующим, сложные промежуточные соединения внутри клетки могут подвергаться действию других ферментов, помимо ферментов, участвующих в исследуемом биосинтетическом пути. В этой связи понятно, что дальнейший прогресс в изучении биосинтеза невозможен без привлечения специальных биохимических методов, в особенности техники работы в бесклеточных системах и с фракционированными ферментами. В последние годы в этом направлении наметились определенные сдвиги [15].

Для выяснения основных путей метаболизма в микроорганизмах, например для идентификации промежуточных веществ в синтезе ароматических аминокислот тирозина и триптофана (см. разд. 30.3) с успехом применялся метод ауксотрофных мутантов, т. е. изучение штаммов, утративших способность синтезировать одно из необходимых для их роста веществ. К сожалению, такой подход нельзя непосредственно применить для изучения большинства метаболитов микроорганизмов, так как эти метаболиты обычно не являются необходимыми для репликации клеток, и, следовательно, соответствующие генетические блоки, прерывающие их

биосинтез, не летальны. Конечно, могут быть получены и другие полезные мутанты микроорганизмов, но их селекция и выделение гораздо более трудоемки, чем в случае ауксотрофных организмов.

При изучении биосинтеза тетрациклиновых антибиотиков *Streptomyces aureofaciens* было отмечено [16], что некоторые мутанты, каждый из которых в отдельности не способен продуцировать активные тетрациклины, приобретают эту способность при совместном росте в одной культуральной среде. Такое поведение микроорганизмов рассматривалось как проявление перекрытия генетической информации отдельных мутантов: если штамм А имеет генетический блок на более поздней стадии биосинтеза, чем штамм Б, а нужный промежуточный продукт легко диффундирует, то штамм Б «заимствует» его у штамма А и превращает в тетрациклин. МакКормик и сотр. [16], получив множество мутантов, выделили большое число новых метаболитов, одни из которых были прямыми предшественниками тетрациклинов, а другие участвовали в параллельных биосинтетических процессах. Выясненная в результате этих работ последовательная схема биосинтеза тетрациклинов (в сокращенном виде приведенная на схеме 3) до сих пор представляет собой образец наиболее тщательно изученного пути биосинтеза сложного природного соединения.



(3)

Интересно отметить, что в ходе этих работ не было обнаружено ни одного соединения, содержащего менее четырех циклов; эти данные согласуются с гипотезой, согласно которой сначала образуется линейный поликетидный предшественник (в данном случае,

вероятно, из девяти малонатных звеньев), претерпевающий затем циклизацию без образования не связанных с ферментом промежуточных соединений.

28.1.6. СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И УСТАНОВЛЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ МЕЖДУ НИМИ

Большое число продуктов метаболизма растений и микроорганизмов выделено и идентифицировано задолго до начала экспериментального изучения биосинтеза природных соединений; это позволило создать классификацию, основанную на сходстве химических структур. Основные классы природных соединений (терпены, стероиды, алкалоиды, фенолы, углеводы, пигменты и т. д.) формировались по признаку наличия в их молекулах тех или иных характерных группировок.

Таким путем были выявлены некоторые фундаментальные структурные взаимосвязи; часто высказывались даже довольно удачные предположения относительно природы первичных соединений-предшественников. Среди наиболее известных ученых, внесших свой вклад в создание теории биогенеза на самых ранних этапах ее развития, следует упомянуть Л. Ружичку, привлекшего внимание к полиизопреноидной структуре терпенов и стеринов [17], а также Р. Робинсона, успешно работавшего во многих областях химии природных соединений, особенно в химии алкалоидов [18]. Первые постулаты этой теории основывались на наличии общих элементов структуры в молекулах исследуемых соединений и на принципиальной возможности осуществления тех или иных реакций сборки в физиологических условиях.

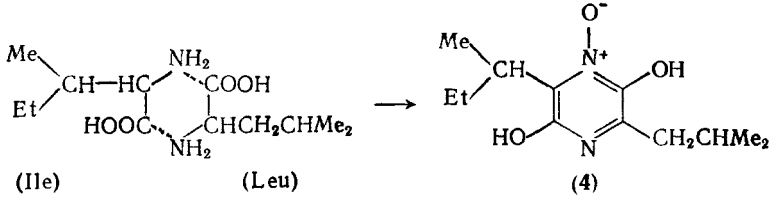
С биосинтетической точки зрения так называемый структурный анализ представляет собой всего лишь химическую головоломку; его целью является обнаружение элементов структуры, которые могли бы образоваться из известных первичных предшественников (см. табл. 28.1.1). Примеры структурного анализа различных продуктов метаболизма микробов и растений приведены в разд. 28.1.6.1—28.1.6.5. Происхождение большинства из этих соединений было доказано путем включения соответствующих меченых предшественников.

В случае биополимеров обоснованность такого подхода очевидна; у полипептидов, полисахаридов и нуклеиновых кислот повторяющиеся звенья мономеров разделены гетероатомами, входящими в состав амидных, полуацетальных или сложноэфирных групп, соответственно.

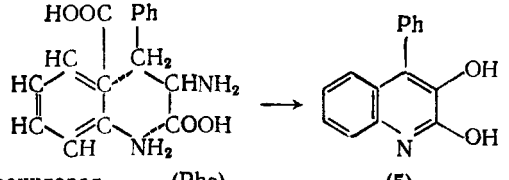
28.1.6.1. Метаболиты аминокислот

У метаболитов с небольшой молекулярной массой звенья первичных предшественников иногда очевидны; примером может служить образующийся из аминокислот дикетопиперазин аспергилло-

вая кислота (4) (из Aspergillus spp.), в структуре которой сохранены оба атома азота дипептида-предшественника. Однако природа звеньев соединений-предшественников может быть замаскирована, например, в результате окислительных реакций, как в случае образующегося из валина C_5-фрагмента антибиотика цефалоспорина С (8; *D*-δ-аминоадипоил-7-АЦК) (из Cephalosporium spp.), путем образования новых углерод-углеродных связей или посредством потери аминного атома азота, например, в виридикатине (5) (из *Penicillium viridicatum*) и атроментине (6) (из *Paxillus atromentosus*). Метаболиты, построенные на основе аминокислот, приведены на схемах (4)—(7)*. Биосинтетические реакции типа молекулярных перегруппировок или расщепления углерод-углеродных связей еще более маскируют природу исходных предшественников, так что звенья последних часто изменяются до неузнаваемости. В качестве примеров приведены представители большой группы растительных индольных алкалоидов, в том числе коринантеин (19) и иохимбин (20), а также продуцируемые грибами поликетиды афлатоксины, обладающие сложными гетероциклическими структурами (см. схему 24). Ключ к биосинтетическому происхождению последних был подобран посредством изучения возможных структурных взаимосвязей с другими природными соединениями, биогенез которых более очевиден, особенно с продуктами метаболизма таксономически близких видов или родов.



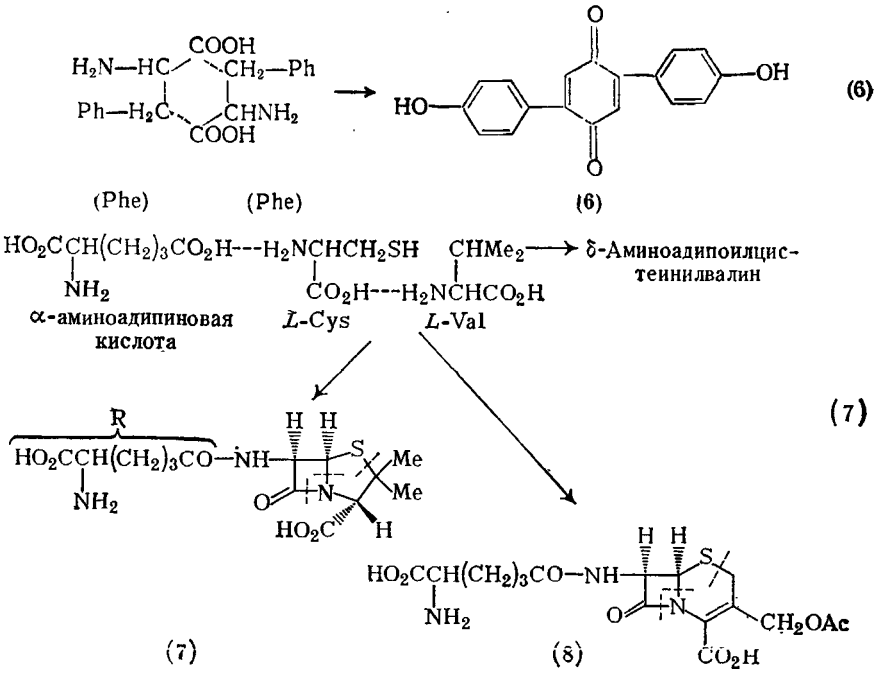
(Ile) (Leu) (4) (4)



(антраниловая кислота) (Phe) (5) (5)

---

* Кроме пенициллина N (7; *D*-δ-аминоадипоил-6-АПК) (из Cephalosporium spp. и *Penicillium chrysogenum*) продуктами метаболизма *P. chrysogenum* [49] являются также пеницилли F (7; R = MeCH=CHCH$_2$CH$_2$; предшественник — ацетил-КоА), пеницилли G (7; R = PhCH$_2$; предшественник — фенилуксусная кислота), а также пенициллины (7, R = MeSCH$_2$CH$_2$; предшественник — MeSCH$_2$CH$_2$CHNH$_2$CO$_2$H) и (7; R = EtSCH$_2$; предшественник — EtSCH$_2$CHNH$_2$CO$_2$H).

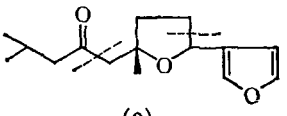


28.1.6.2. Метаболиты мевалоновой кислоты

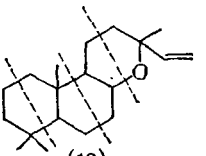
Полиизопреноидный характер терпенов и стеринов, впервые отмеченный Ружичкой в 1922 г., показан на примере различных грибных изопреноидов. Простой сесквитерпен ипомеамарон (9) образуется из общего предшественника всех триизопреноидов — фарнезилпирофосфата, а дитерпен маноилоксид (10), вероятно, синтезируется из соответствующего промежуточного тетраизопреноида геранилгеранилпирофосфата, претерпевающего ряд реакций циклизации, не осложненных столь обычными в случае других терпенов перегруппировками. Эхинулин и агроклавин (12) служат примером соединений смешанного биосинтетического происхождения; относительно сложная структура эхинулина (11) легко поддается структурному анализу, показавшему, что он образуется из триптофана, аланина и трех изопреновых звеньев.

Природа моноизопреноидных промежуточных соединений изопентенилпирофосфата (14) и диметилаллилпирофосфата (15) была выяснена только после идентификации их общего биосинтетического предшественника — мевалоновой кислоты. Мевалоновая кислота довольно неожиданно была открыта в 1956 г. микробиологами [19], которые хотели идентифицировать вещество, заменявшее ацетат в качестве фактора роста бактерий. Обычно мевалоновая кислота образуется при конденсации трех молекул ацетилкофер-

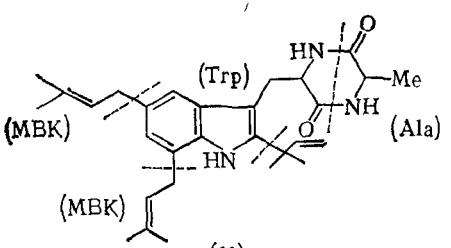
мента А, но известно, что она получается и из β-метилкротонилкофермента А — промежуточного вещества в метаболизме аминокислоты лейцина. Превращение β-метилкротонилкофермента А в соединение (13) включает стадию присоединения молекул CO_2; этот



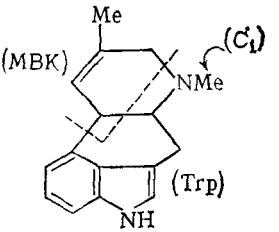
(9)



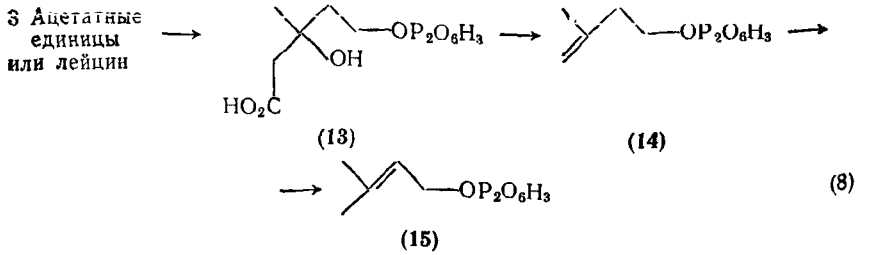
(10)



(11)

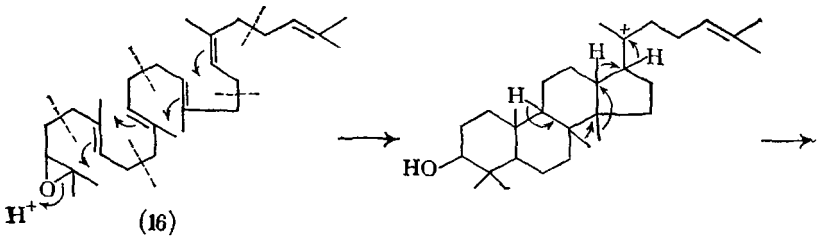


(12)

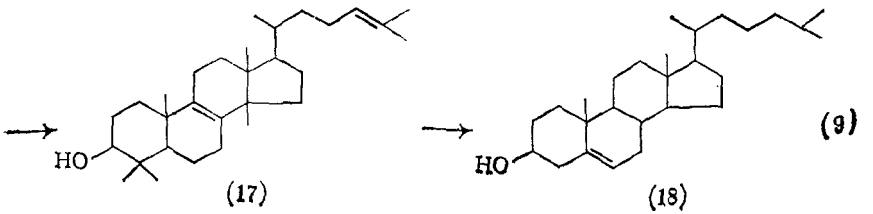


(13) (14) (15)

(8)



(16)



(17) (18)

(9)

процесс аналогичен биотинзависимому карбоксилированию ацетилкофермента А, в результате которого образуется малонилкофермент А — промежуточное соединение в биосинтезе поликетидов.

В отличие от большинства других изученных групп природных соединений, к полиизопреноидам относится значительное число продуктов метаболизма животных: от хорошо известных стероидов, например холестерина, обнаруженного у высших животных, до иридоидов (циклопентаноидных монотерпенов) муравьев, например иридодиаля (24) [20]. В морских организмах обнаружены галогенсодержащие вещества необычного строения, например монотерпен виолацен (29) [20а].

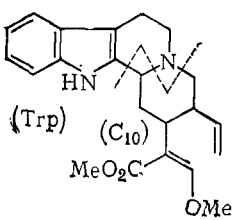
Упоминавшиеся выше осложнения, которые возникают в результате образования углерод-углеродных связей и молекулярных перегруппировок, хорошо видны на примере холестерина (18). В данном случае эти превращения осуществляются в ходе циклизации промежуточного гексаизопреноида скваленоксида (16) до ланостерина (17), который затем претерпевает окислительное элиминирование трех метильных групп (см. схему 9). Выяснение этого пути биосинтеза является блестящей иллюстрацией успешного использования методологии меченых соединений: сначала с применением дейтерия, а затем — трития и ^{14}C. Многочисленные тонкие детали механизма биосинтеза холестерина установлены в ходе ряда изящных экспериментов, которые были выполнены главным образом тремя группами исследователей, возглавлявшихся Блохом [21], Корнфортом и Попчаком [22] и Линеном [23]. Предположение о роли углеводорода сквалена как позднего ациклического предшественника холестерина было высказано Робинсоном еще в 1934 г. [24]; в то время не было установлено строение тритерпенов типа ланостерина. Этот пример наглядно показывает, какое значение может иметь чисто логический структурный анализ в качестве вспомогательного средства при выявлении биосинтетических взаимосвязей. Первоначально предложенная Робинсоном гипотетическая схема циклизации впоследствии подвергалась некоторым незначительным уточнениям, но в целом роль сквалена как предшественника холестерина была правильно предсказана еще за 20 лет до ее экспериментального доказательства.

28.1.6.3. Метаболиты смешанного генезиса

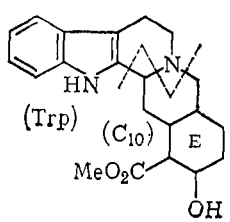
Как было показано выше на примере грибных алкалоидов эхинулина (11) и агроклавина (12) [25], существуют биосинтетические пути, в которых участвуют различные предшественники; структурный анализ этих соединений не представляет затруднений. Менее очевидно доказанное участие триптофана и мевалоновой кислоты в биосинтезе большой и сложной в структурном отношении группы растительных индольных алкалоидов. Представителями двух главных подгрупп индольных оснований являются иохимбин (20), имеющий пентациклическую структуру, и родствен-

ный тетрациклический алкалоид коринантеин (19), в молекуле которого отсутствует карбоциклическое кольцо E. При сравнении структур хинолинового алкалоида эметина (21) и коринантеина (19) видна связь между C_9-фрагментом эметина и соответствующим C_{10}-звеном коринантеина.

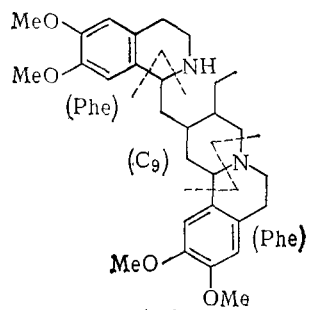
Несмотря на значительно более сложные, чем в случае эхинулина или агроклавина, пути биосинтеза этих алкалоидов, методами обычного структурного анализа было предсказано, что их общим предшественником служит триптофан [26]. Предположение о происхождении необычного C_{10}-звена, соответствующего нетриптаминовым фрагментам (22) и (23), было высказано на основе родства его углеродного скелета с некоторыми монотерпенами, распространенными в близких семействах растений и даже в таком таксономически чрезвычайно далеком источнике, как *Irydomyrmex*, одном из родов муравьев. Сравнение структур монотерпеноидов ряда циклопентана, иридоидов и их аналогов с расщепленным циклопентановым кольцом, секоиридоидов [к которым относятся растительные лактоны свертеамарин (25) и эритроценаурин (26)], позволило высказать биогенетическую гипотезу, изображенную на схеме (10) [27, 28]. Позднее эта гипотеза подтвердилась, когда среди сопутствующих стрихнину метаболитов был найден логанин (27), обладающий необходимым углеродным скелетом циклопентаноидного монотерпена и рассматриваемый как вероятный предшественник этого алкалоида [29]. В целом гипотеза была доказана в ряде сложных экспериментов с мечеными соединениями независимыми группами исследователей во главе с Аригони, Баттерсби и Скоттом [30]. В частности, ими было показано, что логанин (27) и секологанин (28) включаются в индольные алкалоиды *Vinca rosea*.



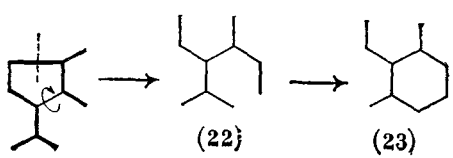
(19)



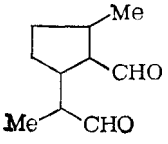
(20)



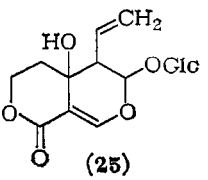
(21)



(22) (23) (10)

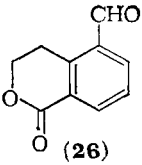


(24)



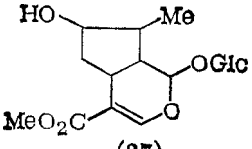
(25)

β-эмульсин

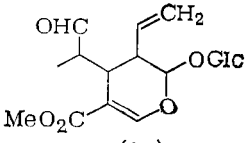


(11)

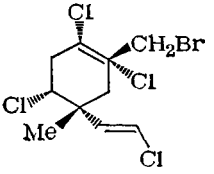
(26)



(27)



(28)



(29)

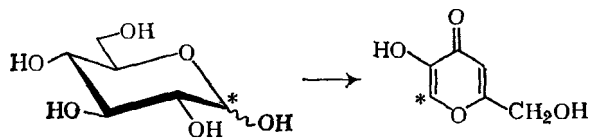
Интересно сравнить процесс циклизации (22)→(23) в циклопентаноидно-монотерпеновой гипотезе с обратной реакцией, явившейся основой другого, в высшей степени оригинального предположения, высказанного ранее. В первых работах по биосинтезу индольных алкалоидов Барджер [31] и Хан [32] предположили, что нетриптаминовое C_{10}-звено иохимбина (20) (включая кольцо Е) образуется из остатка дизамещенного фенилаланина. Вскоре после установления строения стрихнина Вудвард [33] предложил оригинальную биосинтетическую схему, включавшую окислительное расщепление кольца промежуточного соединения, родственного 3,4-дигидроксифенилаланину (ДОФА). Эта любопытнейшая гипотеза непосредственно вытекала из работ Робинсона по выяснению строения эметина (21) [34]; считалось, что полученные при этом результаты, как и последовавшее затем установление структур большого числа алкалоидов. относящихся к соединениям коринантеиновой группы с «секо-кольцом Е», подтверждают предположение Вудварда. С ретроспективной точки зрения выдающееся значение гипотезы Вудварда заключается в том, что в ней впервые было высказано предположение о взаимосвязи типа «предшественник — продукт» между алкалоидами коринантеиновой и иохимбиновой групп.

В настоящее время считается, что более многочисленная «секогруппа» биосинтетически предшествует алкалоидам другой группы с карбоциклическим кольцом Е, причем механизм циклизации, вероятно, аналогичен превращению свертеамарина (25) в эритроценаурин (26) с последующим ферментативным расщеплением гликозидной связи эмульсином (схема 11). Реакция циклизации может протекать через промежуточную стадию ациклического диена; диеновой структурой обладают, в частности, коринантеин (19) и секологанин (28). Но истинный механизм образования алициклического кольца Е иохимбина еще не выяснен. Специфические взаимосвязи между различными группами индольных алкалоидов

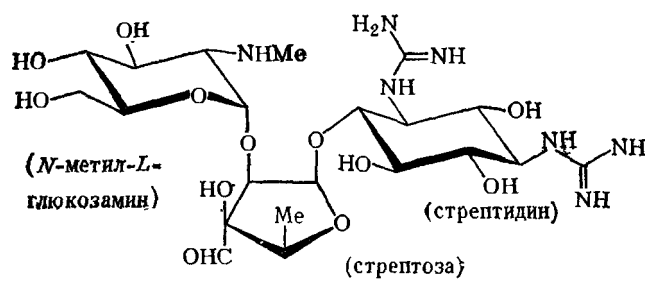
в значительной степени были выяснены в результате исследований с применением меченых соединений; они рассматриваются в гл. 30.1 и в обзоре [30].

28.1.6.4. Метаболиты глюкозы

Повсеместно распространенный углевод глюкоза, как уже отмечалось, может являться косвенным источником всех первичных и, следовательно, всех вторичных метаболитов. Глюкоза служит и прямым предшественником различных веществ, например многочисленных глюкозидов, а после некоторых модификаций и необычных гликозидов, которые часто встречаются в антибиотиках, продуцируемых стрептомицетами, например в эритромицине (**40**) [48] (см. схему 15; поликетиды на основе пропионата). Установлено, что глюкоза выполняет функции прямого предшественника метаболита Aspergillus spp., койевой кислоты (**30**), образующейся, очевидно, без разрыва углерод-углеродных связей глюкозы. Глюкоза может также непосредственно использоваться в биосинтезе некоторых олигосахаридов, например антибиотиков стрептомицина (**31**) [48] и неомицина [35]; в этих случаях для ее превращения в остаток стрептозы с разветвленной цепью необходима перегруппировка первоначального углеродного скелета.



(12)



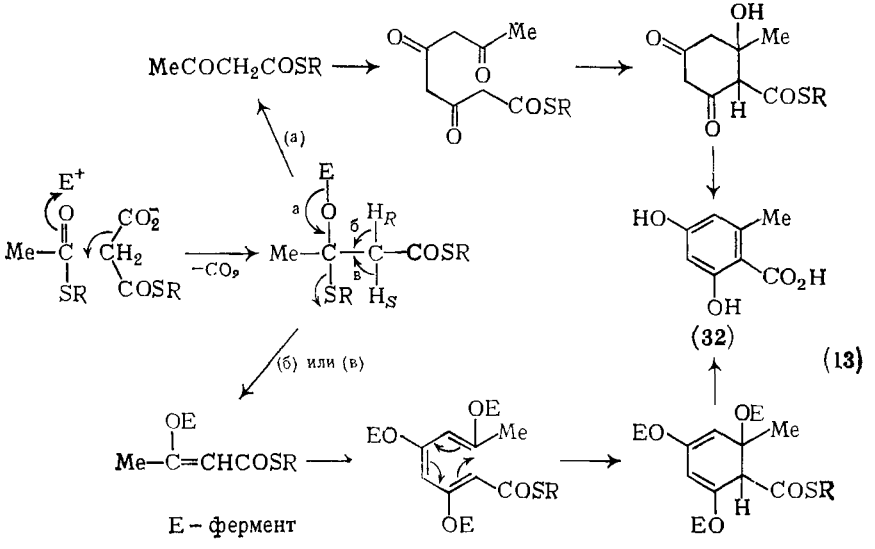
(31) [18б]

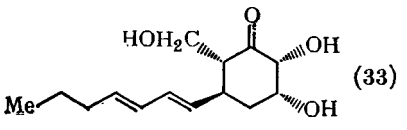
28.1.6.5. Поликетиды, построенные на основе ацетатных и пропионатных звеньев

Установлено, что двууглеродный первичный предшественник — уксусная кислота, обычно использующаяся в виде ее тиоэфира с коферментом А, участвует в биосинтезе большого числа разнообразных природных соединений. Так, с помощью меченых соедине-

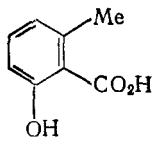
ний было показано, что многие типы соединений (например, жирные кислоты, некоторые фенолы, а иногда даже алкалоиды) образуются из полиацетатов, обычно называемых поликетидами; этот термин был предложен Колли [39] для синтетических соединений, полученных им из β-дикетонов и β-кетоэфиров.

Ацетатный путь биосинтеза, подробно рассматриваемый в следующей главе (см. гл. 29.1), схематично изображен на схеме (13). Типичный тетракетид орселлиновая кислота (32), впервые описанная в 1959 г., образуется, вероятно, путем последовательного взаимодействия по типу конденсации Клайзена стартового ацетатного звена с тремя малонатными звеньями; в результате последовательно образуются связанные с ферментом тиоэфиры ацетоуксусной, триуксусной и тетрауксусной кислот. Считается, что последний претерпевает затем циклизацию в реакции типа альдольной конденсации с последующим элиминированием воды (см. схему 13). Вследствие промежуточного образования поли-β-кетонов кислородсодержащие заместители в продукте циклизации могут размещаться у каждого второго атома углерода; поэтому образующиеся таким путем ароматические соединения, например альтернариол (35), преимущественно являются производными резорцина. Характерное распределение атомов кислорода в молекуле часто маскируется в результате окислительных и восстановительных процессов, которые, в частности, приводят к таким метаболитам орсел-

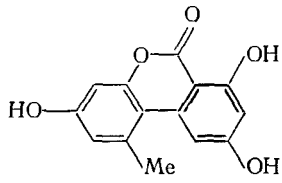




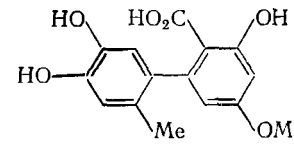
линовой кислоты и альтернариола, как 6-метилсалициловая кислота (34) и альтенузин (36); поликетидная природа последних уже не столь очевидна.



(34)



(35)



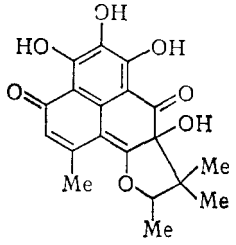
(36)

Альтернативный гипотетический механизм включения ацетатных и малонатных звеньев в орселлиновую кислоту также показан на схеме (13) [36]. В этом механизме промежуточные кетоны заменены стабилизированными ферментами полиенолятами; при соответствующем расположении *цис-* и *транс*-двойных связей последние могут превратиться в орселлиновую кислоту путем прямой электроциклической перегруппировки. У высших поликетидов, из которых образуются поликарбоциклические соединения, индивидуальные типы циклических систем предопределяются специфическими последовательностями двойных *цис-* и *транс*-связей.

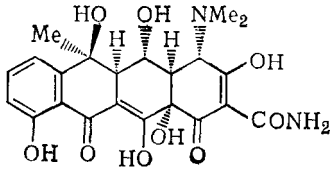
Выполненные в самом начале столетия синтетические исследования Колли предполагали существование многочисленных природных поликетидов фенольной и гетероциклической природы; однако в то время было выделено крайне мало соединений такого рода и поэтому потенциальная ценность этой важной биогенетической гипотезы в сущности осталась незамеченной. Интересно отметить, однако, что еще в 1919 г. Рэйстрик и Кларк, подтвердив более ранние данные Вемера об образовании лимонной кислоты в грибах, использовали поликетидную концепцию Колли для создания подтвердившейся позднее гипотезы о механизме биосинтеза лимонной кислоты путем альдольной конденсации звеньев оксалоуксусной и уксусной кислот [37].

Основополагающие работы Рэйстрика по метаболитам грибов, выполненные в течение последующих четырех десятилетий, привели к выделению большого числа моно-, ди- и трициклических фенолов, многие из которых, как было показано позднее, являются поликетидами; однако в 1949 г. в своей лекции, посвященной обзору работ в этой области, Рэйстрик [38] не счел необходимым сослаться на работу Колли. Вскоре после этого (1953 г.) в ходе изучения биосинтеза некоторых продуцируемых грибами фенолов Берчем и Донованом [39] было получено экспериментальное подтверждение ацетатной гипотезы, объясняющей происхождение этого большого класса природных соединений. Позднее Робинсон упомянул работу Колли в одной из лекций той же серии и справедливо постулировал, что тетрациклиновые антибиотики также относятся к этой биосинтетической группе [40]. Берч и сотр. [41]

на примере 6-метилсалициловой кислоты (34) впервые продемонстрировали специфическое включение меченного ^{14}C ацетата в поликетид. Поликетидная гипотеза вскоре нашла подтверждение в многочисленных работах как группы Берча, так и других исследователей [42], изучавших биосинтез продуктов метаболизма плесеней. Примерами различных циклических поликетидов микробного происхождения являются палитантин (33) [43], альтернариол (35) [44], норгеркеинон (37) [45] и антибиотик тетрациклин (38) [46].



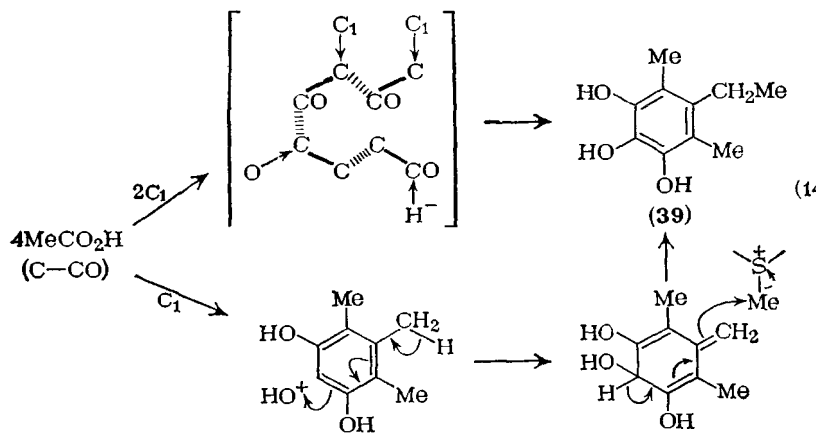
(37)



(38)

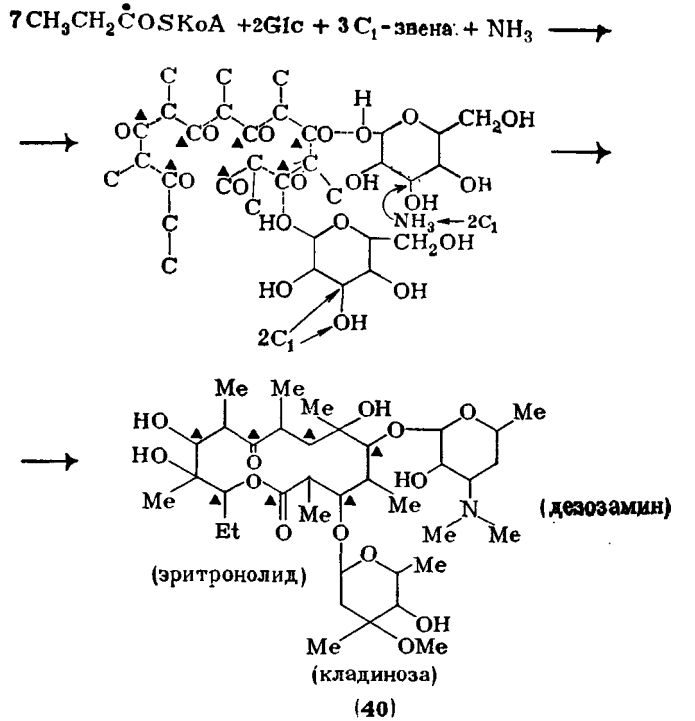
Норгеркеинон и тетрациклин помимо поликетидной кольцевой системы содержат изопентенильный и метильный заместители, соответственно, и, таким образом, являются примерами метаболитов с несколькими предшественниками. В случае норгеркеинона было показано, что вторым предшественником является типичное изопреноидное звено, образовавшееся из мевалоновой кислоты [45]. Это звено присоединено к феналеноновому кольцу своим разветвленным атомом углерода, что представляет собой сравнительно редкий тип связи; выше был приведен другой пример грибного индольного алкалоида эхинулина (11), в котором один из трех изопентенильных заместителей имеет тот же тип связи. *C*-Метильная и *N*-диметильные группы тетрациклинов служат примерами использования C_1-звеньев (ср. табл. 28.1.1), образующихся из *S*-метильной группы метионина или из формиата. В соответствии с механизмом ферментативной реакции нуклеофильного замещения метильной группы, связанной с положительно заряженным атомом серы донорной молекулы *S*-аденозилметионина, внедрение этих групп в поликетиды с образованием углерод-углеродных связей осуществляется у потенциального анионного атома углерода, образовавшегося из метильной группы ацетата. Имеется большое число экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что описанное выше замещение происходит до циклизации поликетидной цепи. Так, полностью ароматический тетрациклический предшественник тетрациклинов 6-метилпрететрамид (см. схему 3) не может быть заменен самим прететрамидом, который, как установлено, является предшественником антибиотиков ряда 6-деметилтетрациклина [16].

C_1-Замещение линейных поликетидов, являющихся продуктами конденсации ацетатных звеньев, представляет собой самый обычный процесс, однако эта реакция, по-видимому, не используется как путь биосинтеза пропионата из ацетата или малоната, хотя такая реакция вполне вероятна; если же учесть связь пропионата через сукцинат с циклом трикарбоновых кислот, то здесь природа, кажется, упустила очень благоприятную возможность. C_1-Замещение у стартового, инициирующего построение цепи ацетатного звена, по-видимому, имеет место в биосинтезе интересного продуцируемого грибами фенола барнола (**39**) [47] (схема 14); симметрия структуры последнего, между прочим, существенно осложняет структурный анализ, обычно не представляющий затруднений в случае моноядерных ароматических поликетидов. Конечно, такое метилирование могло бы осуществляться и после ароматизации и окислительного введения гидроксигруппы в *пара*-положение (как показано на схеме), однако результаты последних работ свидетельствуют в пользу более обычного введения двух C_1-звеньев до ароматизации [50].



В отличие от грибов, актиномицеты выполняют не только описанное выше C_1-замещение поликетидов (например, в биосинтезе тетрациклинов), но и непосредственно используют пропионат как прямой предшественник звеньев поликетидной цепи. Наглядным примером является биосинтез антибиотика эритромицина (**40**) у *Streptomyces* (схема 15) [48].

Биосинтетическая «стенография», применяющаяся для обозначения первичных предшественников, достаточно наглядно демонстрирует ряд интересных моментов биосинтеза эритромицина. Например, гептакетидный агликон синтезируется из семи пропионатных звеньев; посредством гликозидных связей он соединен с двумя моносахаридными остатками, образовавшимися из глюкозы. Один



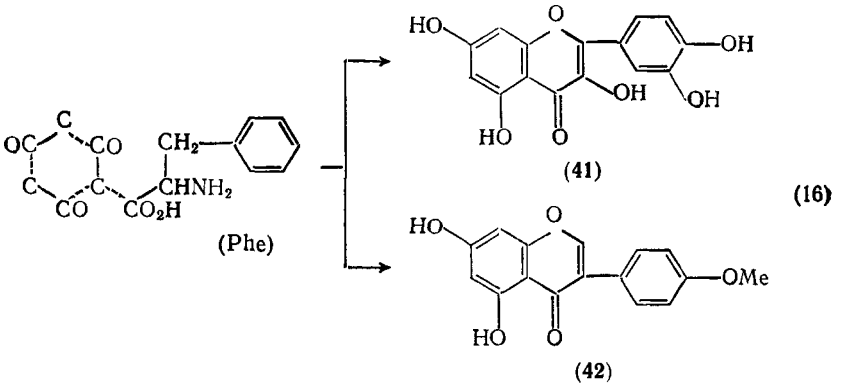
(40) (15)

из этих моносахаридов, дезозамин, имеет C_1-заместитель при атоме азота, а другой, кладиноза, обладающая разветвленной цепью из семи углеродных атомов, имеет C_1-заместители как при атоме кислорода, так и при атоме углерода.

До сих пор не было зафиксировано, по-видимому, ни одного случая использования пропионатных звеньев для реализации альтернативного пути биосинтеза ароматических или алициклических соединений с C_1-заместителем. Во всех многочисленных изученных соединениях такого типа C_1-заместитель всегда, даже в продуктах метаболизма *Streptomyces*, образуется из формиата или метионина, но не из пропионата. Интересно выяснить, не отражает ли эта тенденция какие-либо связанные с механизмом ограничения на стадии циклизации промежуточных поликетидов, образовавшихся из пропионата.

Как и другие рассмотренные ранее первичные предшественники, ацетат и пропионат могут участвовать в биосинтезе соединений смешанного генезиса. Особенно представительной группой такого рода соединений являются флавоноидные растительные пигменты, например кверцетин (41) и формононетин (42), биосинтез которых рассматривается в гл. 29.1. Образование изофлавоноидов типа формононетина (42) [48] служит примером типичной перегруппировки

остатка фенилаланина (см. также схему 29).



(16)

Флавоноиды часто обозначают как C_6-C_3-C_6-соединения; это обозначение имеет чисто биогенетическую основу и указывает на образование углеродного скелета звена C_6—C_3 из фенилаланина, коричной кислоты или какого-либо их метаболического эквивалента, биосинтезирующегося из шикимовой кислоты. Второе звено C_6 отвечает трикетиду или, точнее, образовавшейся из ацетата флороглюциновой группировке.

28.1.7. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Чисто умозрительные упражнения типа структурного анализа и выявления потенциально важных биосинтетических взаимосвязей, несомненно, представляют особый интерес для химика, специализирующегося в области природных соединений. Однако, как ни интересна эта сторона исследования, ее конечная цель заключается, разумеется, в использовании этих гипотетических соображений в качестве основы для планирования разумной экспериментальной проверки возможных путей биосинтеза.

28.1.7.1. Ауторадиография

Как уже отмечалось выше, современные знания о структуре природных соединений многих классов являются результатом исследований, длившихся более ста лет и носивших сугубо эмпирический характер. При этом наиболее важные или, по меньшей мере, наиболее яркие открытия были сделаны в самом начале исследований. Теперь поиск новых природных соединений становится все более и более сложным, но нисколько не менее плодотворным занятием. В этой связи становится очевидной необходимость систематизации дальнейших поисков. Один из наиболее простых и не требующих дорогого оборудования подходов к решению этой за-

дачи заключается в ауторадиографическом анализе экстрактов растений, животных и микроорганизмов, развивавшихся в присутствии определенных первичных предшественников, меченных радиоактивными изотопами.

У этого метода много преимуществ, главным из которых является высокая чувствительность детектирования, не зависящая от химического строения или каких-либо других свойств соединений, кроме тех, которые определяют их характеристическую подвижность в различных хроматографических или зонно-электрофоретических системах. Кроме того, выделение искомых соединений, по крайней мере на начальных этапах исследования, т. е. в небольших количествах, осуществляется непосредственно в процессе детектирования; это зависит от эффективности хроматографической или электрофоретической методики, применяемой для разделения смеси на индивидуальные компоненты. Наконец, поскольку первичные предшественники известны, то искомые метаболиты можно сразу отнести к определенному биосинтетическому классу (ср. табл. 28.1.1), что дает полезную информацию об их структуре.

Этот подход, очевидно, имеет также определенную таксономическую значимость, которую можно рассматривать в двух аспектах. Первый из них не связан с какими-либо структурными характеристиками новых метаболитов и представляет собой получение сугубо индивидуальной для каждого вида общей картины суммы соединений, образующихся из данного предшественника. На этой основе может быть создан новый простой метод таксономической классификации больших групп микроорганизмов, хранящихся в настоящее время в коллекциях культур. Метод может быть также применен для непосредственного изучения растений путем кратковременной инкубации их отдельных тканей на различных этапах роста.

Простота эксперимента и малые количества необходимых веществ и биологического материала делают этот метод идеальным для применения в качестве методики общего скрининга. Так, удовлетворительные ауторадиограммы легко могут быть получены путем встряхивания в течение ночи менее одного грамма («влажная» масса) свежевыросших микробных клеток с 2 мл (или меньшим количеством) буферного раствора, содержащего небольшое количество (например, 10 мкКи) меченного ^{14}C предшественника типа ацетата, мевалоната или аминокислоты. Такая методика позволяет селективно обнаруживать метаболиты индивидуальных предшественников; ее использовали при изучении многих продуктов метаболизма микробов, в том числе пенициллинов [49], тетрациклинов [54], альтернариола [51] и грибных феналенонов [52].

Эта же методика применялась и для исследования растений, например, для предварительного изучения трех видов *Haemodorum* (австралийское однодольное) с целью определения оптимальных условий продуцирования меченого гемокорина [53]. Для этого свежие срезы корней *H. corymbosum, H. planifolium* и *H. spicatum*

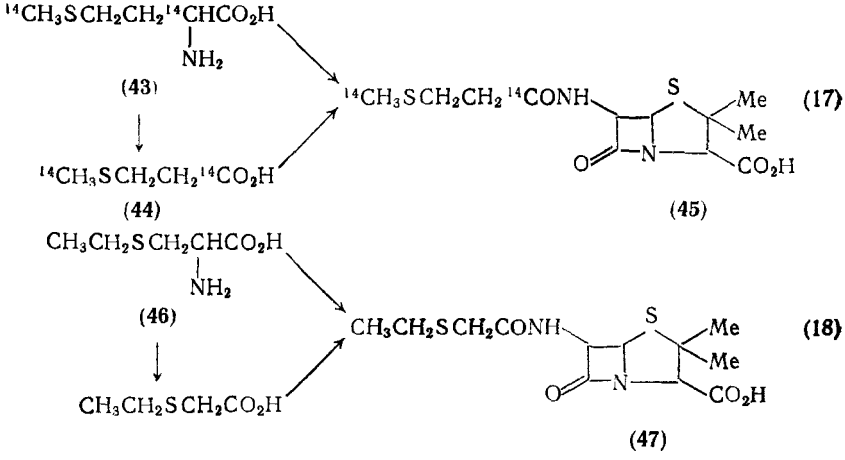
инкубировали в течение ночи с растворами меченных ^{14}C предшественников (ацетата, фенилаланина и тирозина), а затем метанольный экстракт исследовали с помощью хроматографии на бумаге в 70 %-ном пропаноле. На полученных ауторадиограммах было обнаружено большое число компонентов; некоторые из них (в том числе гемокорин и другие неизвестные пигменты) были характерны для всех трех видов. Таким образом, эти соединения, в которые с различной эффективностью включаются все три предшественника, можно считать характерными для рода *Haemodorum*. Другие компоненты типичны для индивидуальных видов и, следовательно, представляют собой полезные таксономические индикаторы вида.

При инкубации свежего среза коры *Strychnos lucida* с [1-^{14}C]-ацетатом также выделено [54] несколько компонентов, один из которых идентифицирован хроматографически как алкалоид бруцин; впоследствии он был выделен из смеси в свободном состоянии.

Этот биосинтетический подход к хемотаксономической классификации легко превратить в методику общего скрининга путем применения стандартных меченных ^{14}C предшественников, а также определенного набора хроматографических систем или условий зонного электрофореза. Поскольку метаболиты непосредственно характеризуются их хроматографической или электрофоретической подвижностью, эти характеристики, например значения R_f, могут быть использованы для их классификации, что облегчает сбор и поиск информации.

Второй аспект использования биосинтетических и таксономических потенциальных возможностей ауторадиографии состоит в поиске специфических типов метаболитов. В качестве простого примера можно привести работу по утилизации аминокислоты метионина в биосинтезе пенициллинов *Penicillium chrysogenum* [49]. Разделенные хроматографически пенициллины можно обнаружить специфическим окрашивающим реагентом [55], а также стандартным биоауторадиографическим методом обнаружения хроматографических зон, обладающих антибактериальной активностью. Эти зоны видны и в ауторадиограммах экстрактов продуктов инкубации плесени с [^{35}S]сульфатом, который служит источником атома серы тиазолидинового кольца пенициллинов. Было установлено, что рост плесени в присутствии метионина приводит к образованию нового пенициллина, который удалось идентифицировать ауторадиографически после введения в культуральную жидкость меченой аминокислоты. Более того, оказалось, что хроматографическая зона, отвечающая новому пенициллину (**45**), радиоактивна только тогда, когда мицелий инкубируется с [^{14}C]метионином (**43**), меченным при С-2 и в метильной группе, но не в случае метионина, меченного при С-1. Таким образом было показано, что в молекулу пенициллина включается вся молекула метионина (между С-2 и концевой метильной группой) за исключением карбоксильной группы. Эти выводы впоследствии были подтверждены путем замены метионина продуктом его дезаминирования — *S*-метилмеркаптопро-

пионовой (3-(метилтио)пропионовой] кислотой (44), из которой синтезировался хроматографически не отличимый пенициллин (схема 17). Аналогичным образом изомер метионина, *S*-этилцистеин (46), был превращен в необычный пенициллин, выделенный и структурно охарактеризованный в виде натриевой соли 6-[(этилтио)ацетамидо]пенициллановой кислоты (47) (схема 18).

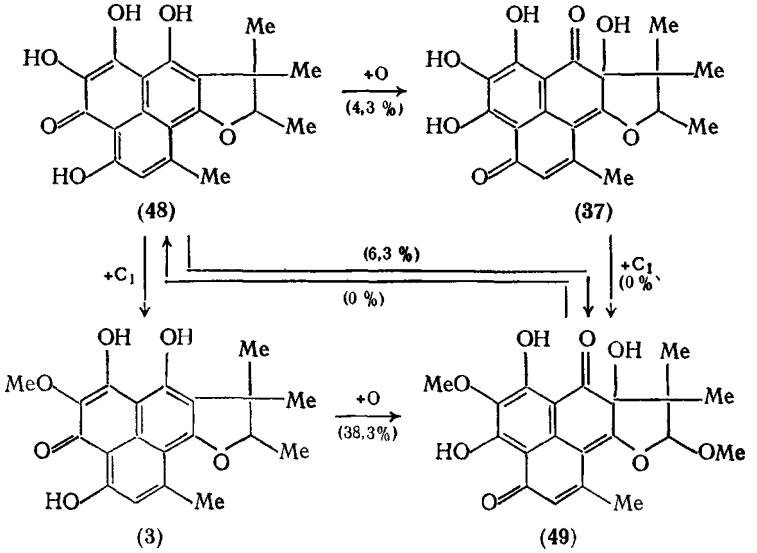


В ходе этих и ряда других работ по биосинтезу новых пенициллинов и цефалоспоринов было показано, что [^{14}C]валин, [^{35}S]метионин (источник входящего в цикл атома серы) и [^{14}C]ацетат (источник α-аминоадипиновой кислоты в грибах) включаются не только в пенициллин N и цефалоспорин C, но и в некоторые другие неизвестные соединения, возможно, представляющие собой трипептиды. Приведенные данные достаточно убедительно демонстрируют ценность этого простого способа детектирования специфических типов промежуточных соединений, образующихся из данного предшественника.

Другим примером применения ауторадиографического метода является поиск новых феналенонов и их предшественников, продуцируемых *P. herquei*. До выполнения описываемой работы были известны три структурно родственных соединения: атровенетин (48), геркеинон (49) и норгеркеинон (37). Ранее было показано, что пигмент (37) является поликетидом с изопреноидным заместителем [45].

С помощью одного из вариантов ауторадиографического метода, аналогичного описанному выше, при хроматографическом разделении в тонком слое экстрактов изучаемого биологического материала, меченных [^{14}C]ацетатом и [^{14}C]мевалоновой кислотой, была обнаружена радиоактивная зона, содержавшая неизвестный метаболит, имевший, по-видимому, изопреноидно-поликетидную структуру. Известный спутник феналенонов, фисцион (7-*O*-метилэмодин) (55) должен включать меченные ^{14}C ацетат и формиат,

но не [^{14}C]мевалоновую кислоту; поэтому его, как и другие соединения, включающие только ацетатный предшественник, следовало исключить из числа кандидатов на роль близкого предшественника геркеинона. Впоследствии новый пигмент был выделен с помощью препаративной тонкослойной хроматографии; он оказался дезоксигеркеиноном (3). Приведенный пример является еще одной иллюстрацией достоинств ауторадиографии как метода селективной идентификации метаболитов, образовавшихся из нескольких предшественников. Взаимопревращения грибных феналенонов приведены на схеме (19).



(19)

Как показано на схеме (19), дезоксигеркеинон (3) представляет собой наиболее вероятное промежуточное звено между атровенетином (48) и геркеиноном (49), что и было доказано определением эффективности взаимопревращений всех четырех меченных ^{14}C феналенонов [52]. Оказалось, что норгеркеинон, считавшийся ранее промежуточным соединением, является тупиковым параллельным метаболитом атровенетина.

28.1.7.2. Биосинтетический подход к определению структуры

Успешное применение критериев структурного анализа, основанного на предсказуемой сборке ограниченного числа молекул первичных предшественников, для объяснения путей образования большинства известных природных соединений заставило химиков усомниться в справедливости любых структур, не поддающихся прямой биогенетической интерпретации. В ряде случаев, особенно в области полиизопреноидов и поликетидов, это привело к пересмотру ошибочно приписанных структур.

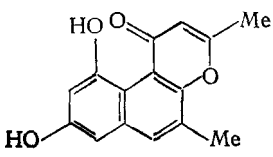
Ценность биогенетической информации для выяснения строения природных соединений заключается прежде всего в том, что идентификация в молекуле неизвестного вещества определенных звеньев его простейших биогенетических предшественников (с помощью меченых соединений) позволяет соотнести данное вещество с той или иной биогенетически родственной ему группой соединений. Затем меченый метаболит подвергают селективному расщеплению до перекрывающихся фрагментов, корреляция специфических активностей которых резко ограничивает число возможных альтернативных комбинаций и может привести к однозначному определению углеродного скелета метаболита. Такой подход к определению строения дает особенно хорошие результаты в случае метаболитов, образовавшихся из нескольких предшественников.

Примером первого подхода является пересмотр Берчем и Доноваком структуры (**50**), предложенной для элеутеринола — выделенного из растений производного нафталина. Структура (**50**) для этого очевидного поликетида биогенетически аномальна; напротив, альтернативная структура (**51**) обладает типичным чередующимся расположением кислородсодержащих заместителей. Последующее изучение подтвердило справедливость первоначально чисто умозрительной структуры (**51**) [56]. Это первое успешное применение общей гипотезы к пересмотру строения конкретного соединения имело тем больший резонанс, что оно непосредственно предшествовало первым экспериментам тех же авторов с мечеными соединениями на примере ранее упоминавшегося поликетида 6-метилсалициловой кислоты (**34**) [41].

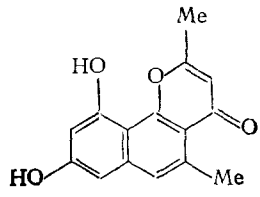
По аналогичным соображениям вызвала сомнение структура (**52**), предложенная для атровенетина [57]; более типичная поликетидная структура (**48**) требовала иной ориентации гетероциклического кольца. Правильность модифицированной структуры (**48**) подтверждена позднее с помощью рентгеноструктурного анализа [58].

Другим примером использования такого же подхода служат работы по установлению строения двух метаболитов дезоксифициона, которые наряду с дезоксигеркеиноном были выделены в ходе уже упоминавшегося выше изучения *P. herquei* [52]. Их химические и физические свойства соответствовали антранолам А [(**53**) или (**54**)] и В [(**54**) или (**53**)], описанным еще в 1939 г. в качестве компонентов красящих веществ *Aspergillus glaucus* [59]. Основанием для предложенных структур послужили еще более ранние работы Перкина и Гумбеля (1894 г.) по изучению двух изомерных веществ, обнаруженных в растении *Ventilago madraspatana* [60]. Структура (**54**) согласуется с поликетидным происхождением этого соединения, а для образования структуры (**53**) требуется нетипичное восстановление фициона при С-10. Изучение продуктов метаболизма *P. herquei* с помощью спектроскопии ЯМР, а также тот факт, что метаболит, отвечающий так называемому фисционовому антранолу В (т. пл. 181 °С), в щелочной среде спо-

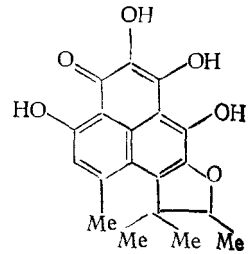
собен необратимо превращаться в антранол А (т. пл. 260 °С), свидетельствовали о том, что строение антранола А выражается формулой (**54**); сопутствующее ему соединение (т. пл. 181 °С) представляет собой кетоизомер — производное антрона (**56**) [61]. Это заключение, вероятно, справедливо и в отношении соединений, описанных сначала группой Перкина, а затем Рэйстриком.



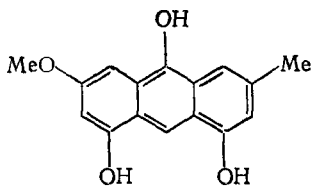
(**50**)



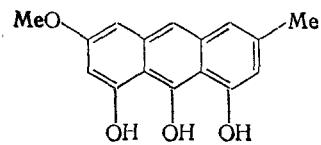
(**51**)



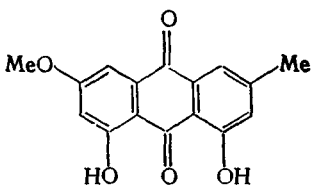
(**52**)



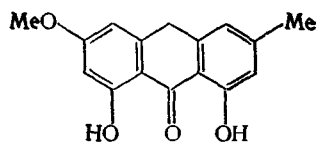
(**53**)



(**54**)



(**55**)



(**56**)

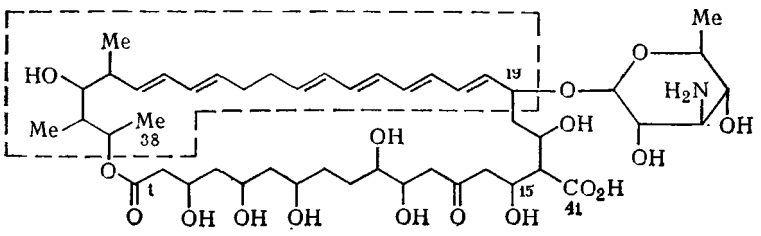
Хотя умозрительные выводы такого типа в ряде случаев привели к внесению незначительных исправлений в предложенные ранее структуры, сами по себе соображения о биогенетической целесообразности, конечно, могут дать только косвенное подтверждение правильности той или иной формулы. Так, альтернариол (**35**), первый из охарактеризованных полифенолов *Alternaria alternata* [62], представляет собой классический гептакетид; в самом деле, для его биосинтеза из ацетата не требуется ни перегруппировок, ни восстановления, ни окисления. Однако если бы установлению строения альтернариола предшествовали работы по изучению структуры сопутствующего соединения альтенузина (**36**) [63, 64], в котором типичное резорциновое кольцо А заменено на пирокате-

хиновое, тогда по биогенетическим соображениям можно было бы усомниться в *орто*-расположении двух гидроксильных групп альтенузина (**36**). В данном случае наиболее вероятна гипотеза об образовании альтенузина из альтернариола посредством реакции, заключающейся в катализируемой ферментами изомеризации типичного для поликетидов резорцинового кольца в производное пирокатехина.

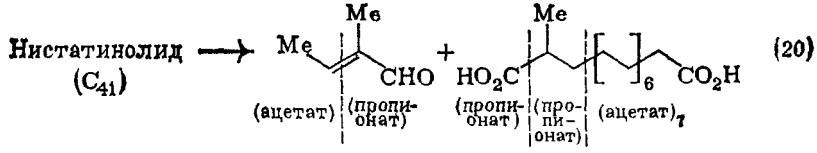
Второй подход к применению биогенетических критериев для уточнения структуры, как упоминалось выше, заключается в сравнении специфических активностей природного соединения, образовавшегося из известных первичных предшественников, и химически охарактеризованных продуктов его деградации. Примером такого подхода является уточнение некоторых деталей структуры антигрибкового метаболита *Streptomyces noursei*, нистатина A_1 (**57**) [65].

До начала этих работ агликон нистатинолид считали полиизопреноидом; в пользу такого предположения свидетельствовала легкость включения [^{14}C]ацетата, однако неоднократные попытки включить [^{14}C]мевалонат не привели к успеху. Между прочим, насколько известно автору настоящего обзора, не было описано ни одного случая успешного включения этого характерного изопреноидного предшественника в метаболиты, продуцируемые *Streptomyces*.

Впоследствии было показано, что происхождение неацетатных атомов углерода обусловлено включением C_3-предшественника — пропионата; таким образом была доказана полностью поликетидная природа агликона. Сравнение удельной радиоактивности нистатина и продуктов его расщепления позволило установить, что агликон (C_{41}) образуется из шестнадцати ацетатных и трех пропионатных звеньев, а строение фрагмента С-19—С-37 определяется последовательностью (ацетат)-(пропионат)$_2$-(ацетат)$_7$ (схема 20). Теперь оставалось только найти место для одного частично окисленного пропионатного звена среди оставшихся восьми ацетатных звеньев. Полная структура нистатина (**57**) позднее была установлена обычными химическими методами [66], что подтвердило данные, основанные на описанном выше биосинтетическом подходе; третьему пропионатному звену соответствовали атомы С-15, С-16 и С-41.



(**57**)

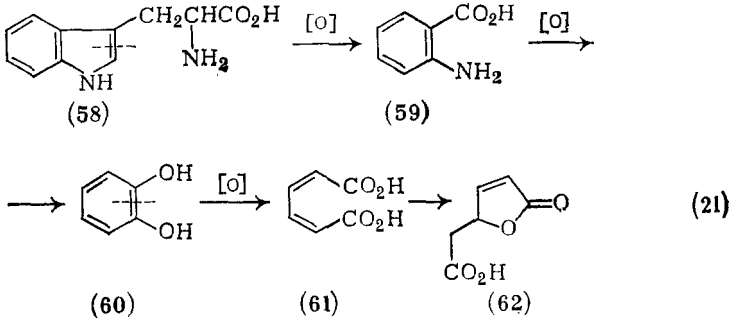


(20)

28.1.7.3. Реакции расщепления кольца и молекулярные перегруппировки

Число путей биосинтеза значительно расширяется за счет реакций расщепления или перегруппировок углерод-углеродных связей. Если расщеплению подвергается циклическая структура, то, очевидно, в первый момент из нее не будут элиминнроваться фрагменты углеродного скелета. Процессы фрагментации и перегруппировки могут через очень ограниченное число стадий приводить к чрезвычайно сложным молекулам, которые зачастую имеют мало сходства со структурами своих непосредственных предшественников.

Установлено, что как перегруппировки, так и реакции окисления сопровождают самые различные первичные биосинтетические превращения. Примером реакции расщепления кольца может являться превращение триптофана (**58**) через промежуточно образующиеся антраниловую кислоту (**59**) и пирокатехин (**60**) в *цис,цис*-муконовую кислоту (**61**) и муконолактон (**62**); здесь последовательно расщепляются пиррольное и бензольное кольца (схема 21).



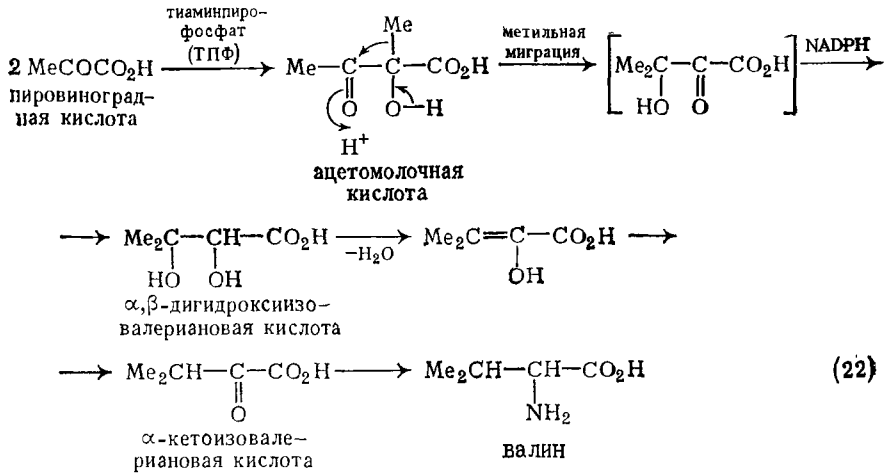
(58) (59) (60) (61) (62)

(21)

Выше уже было рассмотрено расщепление алициклнческого циклопентанового кольца при превращении иридоидных монотерпенов в секоиридоиды, например превращение логаннна (**27**) в секологанин (**28**).

Перегруппировки среди полиизопреноидов также представляют собой довольно общее явление. Уже классическим стал пример 1,2-миграции двух метильных заместителей в ходе циклизации скваленоксида (**16**) в ланостерин (**17**); этот процесс сопровождается двумя 1,2-гидридными сдвигами. Более простым примером является перегруппировка пинаколинового типа у предше-

ственника валина — ацетомолочной кислоты (схема 22) [67].

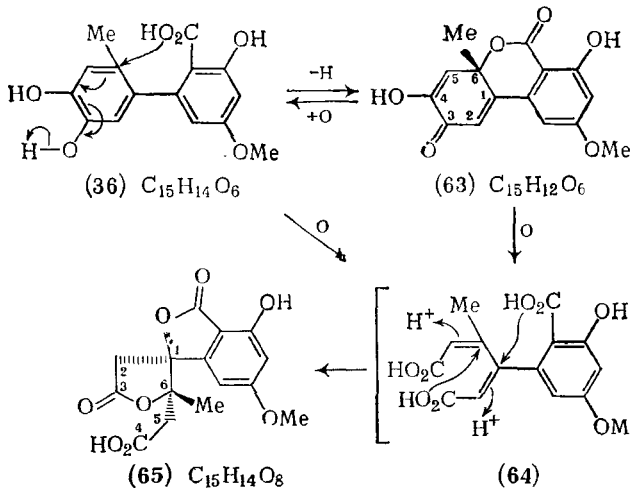


(22)

В обзоре [29] подробно рассмотрены различные аспекты влияния реакций расщепления кольца на общие пути биосинтеза алициклических и ароматических природных соединений. Ранее уже упоминался простой, но необычный тип расщепления фенольного поликетида орселлиновой кислоты, в результате которого образуется пеницилловая кислота (см. схему 1). В отличие от большинства известных случаев расщепления углерод-углеродных связей, когда результатом окисления являются две карбонильные (или две карбоксильные, как при расщеплении пирокатехина) группы, в синтезе пеницилловой кислоты окисление не заходит так далеко. Теоретически пеницилловая кислота может образоваться путем разрыва связи С-1—С-2 или С-4—С-5 в орселлиновой кислоте; практически реализуется преимущественно последний путь, что было доказано тремя различными экспериментами с мечеными соединениями. Так, включение специфически меченной ^{14}C орселлиновой кислоты изучалось стандартными методами деградации [68], включение [^{3}H]ацетата — методом ЯМР ^{3}H [8, 9], а утилизация [1,2-$^{13}C_2$]ацетата — теперь уже рутинным методом ^{13}C—^{13}C-спин-спинового взаимодействия [69].

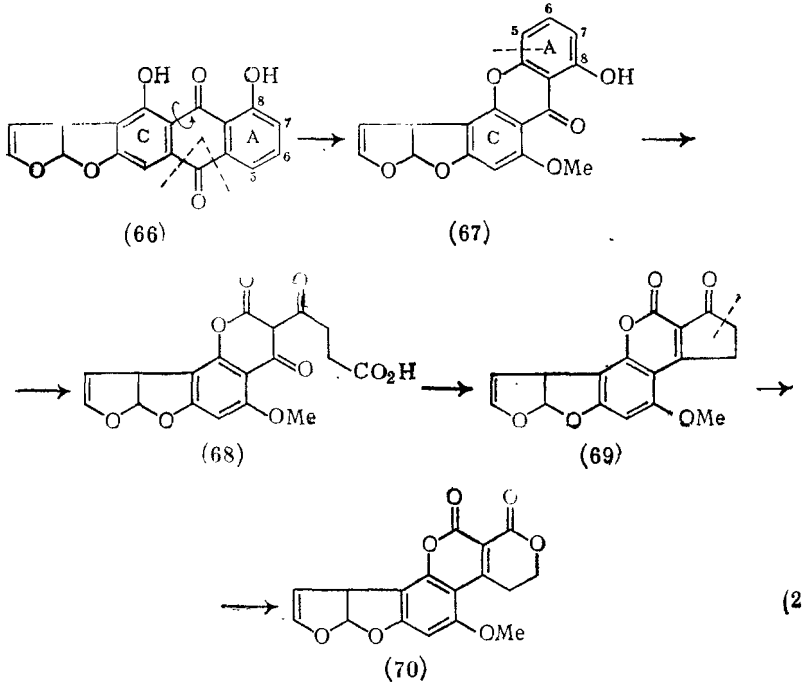
Процесс, аналогичный окислительному расщеплению пирокатехина до муконовой кислоты, наблюдается и в случае вторичных метаболитов из культуральной жидкости *Alternaria*: альтенузина (**36**) [63, 64] и альтенуевой кислоты II (**65**) [70]. Последняя, по-видимому, спонтанно образуется из арилзамещенной муконовой кислоты (**64**), возможно, через дегидроальтенузин (**63**) [ср. превращение муконовой кислоты (**61**) в муконолактон (**62**)]. В исчерпывающем обзоре [71] рассматривается роль различных оксигеназ, участвующих в реакциях окислительного расщепления кольца. Возможные биогенетические взаимосвязи между альтенузином (**36**),

дегидроальтенузином (**63**) и альтенуевой кислотой II (**65**) показаны на схеме (23).



(36) $C_{15}H_{14}O_6$ (63) $C_{15}H_{12}O_6$ (65) $C_{15}H_{14}O_8$ (64) (23)

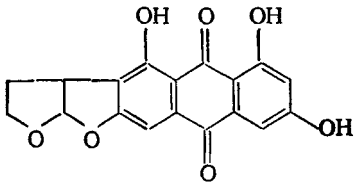
Группа продуцируемых грибами *Aspergillus* афлатоксинов, таких, как афлатоксины B_1 (**69**) и G_1 (**70**), может служить интересным примером осуществления в ходе одного процесса биосинтеза как нескольких реакций расщепления кольца (схема 24), так и



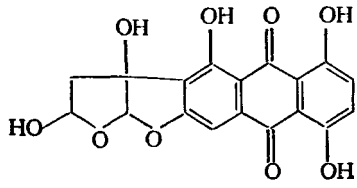
(66) (67) (68) (69) (70) (24)

новой перегруппировки (схема 25). Вопрос о взаимосвязях между афлатоксинами подробно рассматривается в гл. 29.1.

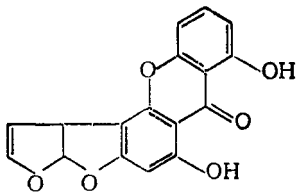
С помощью меченых соединений [72] подтверждено предсказанное ранее образование фрагмента молекулы афлатоксинов, не содержащего фурановых колец, из бис(фурано)антрахинона (**66**) путем расщепления одного из колец последнего [29]. Впоследствии это гипотетическое промежуточное соединение, 6-дезоксиверзиколорин А, было выделено наряду с ксантоном деметилстеригматоцистином (**73**) из продуктов метаболизма *Aspergillus versicolor* [73]. Схему биосинтеза подсказало прежде всего наличие необычного бис(фураноидного) элемента структуры как в афлатоксинах, так и в стеригматоцистине (**67**); последний после первоначально отрицательных результатов в экспериментах с мечеными атомами [74] позднее был идентифицирован как предшественник афлатоксина B_1 (**69**) [75]. Аналогично, полусинтетический 5-гидроксидигидростеригматоцистин (**74**) является предшественником ряда дигидроафлатоксинов (B_2 и G_2) [73].



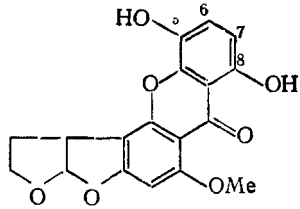
(71)



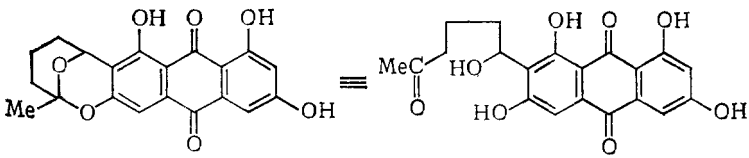
(72)



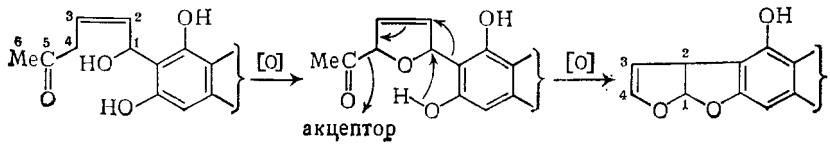
(73)



(74)



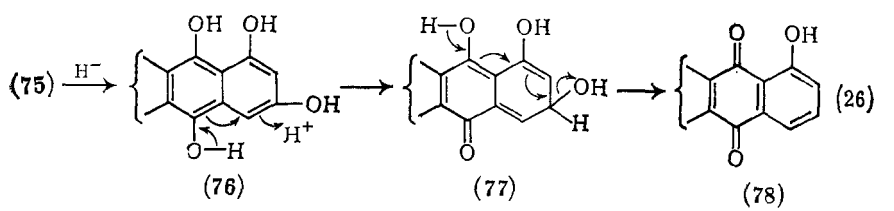
(75)



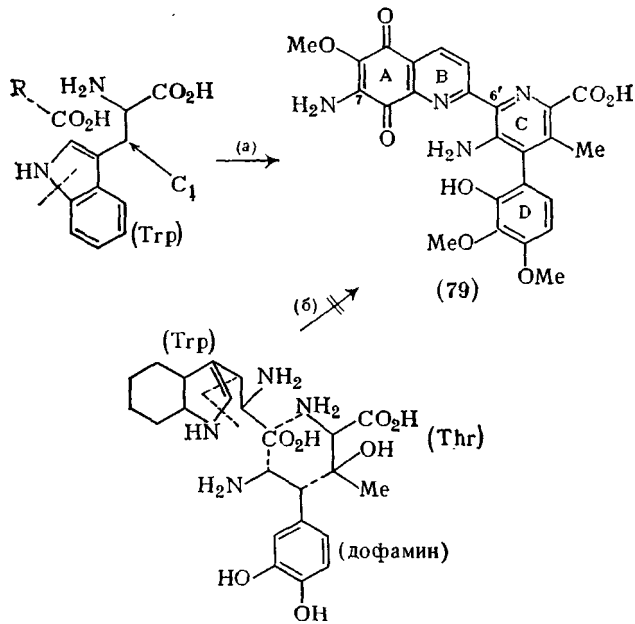
(25)

Предположение об образовании бис(фураноидной) группировки в результате новой окислительной перегруппировки линейной боковой C_6-цепи, сходной с боковой цепью в молекуле аверуфина (**75**) [76], было подтверждено утилизацией меченного ^{14}C аверуфина в качестве предшественника афлатоксинов [77, 78].

В ходе превращения аверуфина в афлатоксины одна из гидроксильных групп (при С-6 резорцинового кольца А), казалось бы, должна отщепляться в результате восстановительного процесса; действительно, этой группы нет ни в известном промежуточно образующемся стеригматоцистине (**67**) [75], ни в его 5-гидроксипроизводном (**74**) [75], также являющемся предшественником афлатоксинов [73]. Сравнение картины распределения гидроксильных групп в родственных антрахинонах, например, в верзиколорине С (**71**), с типично поликетидным чередованием кислородсодержащих заместителей в 6-дезоксиверзиколорине А (**66**) и дотистромине (**72**) выявило возможность альтернативного превращения, заключающегося в прямом элиминировании гидроксильных групп (по крайней мере, в ряду полициклических хинонов). В этом превращении восстановительное элиминирование гидроксильной группы представляет собой один из вариантов обычного превращения антрахинона в антрахинол и далее в антранол. Так, аверуфин (**75**) после восстановления до соответствующего антрахинола (**76**), по-видимому, может претерпевать перегруппировку через промежуточно образующееся соединение (**77**), из которого путем элиминирования воды образуется 6-дезоксиаверуфин (**78**) (схема 26). Изучение мутантных штаммов *Verticillium dahliae* показало, что превращение 1,3,8-тригидроксинафталина в 1,8-дигидроксинафталин осуществляется путем восстановительного отщепления гидроксильной группы [79].



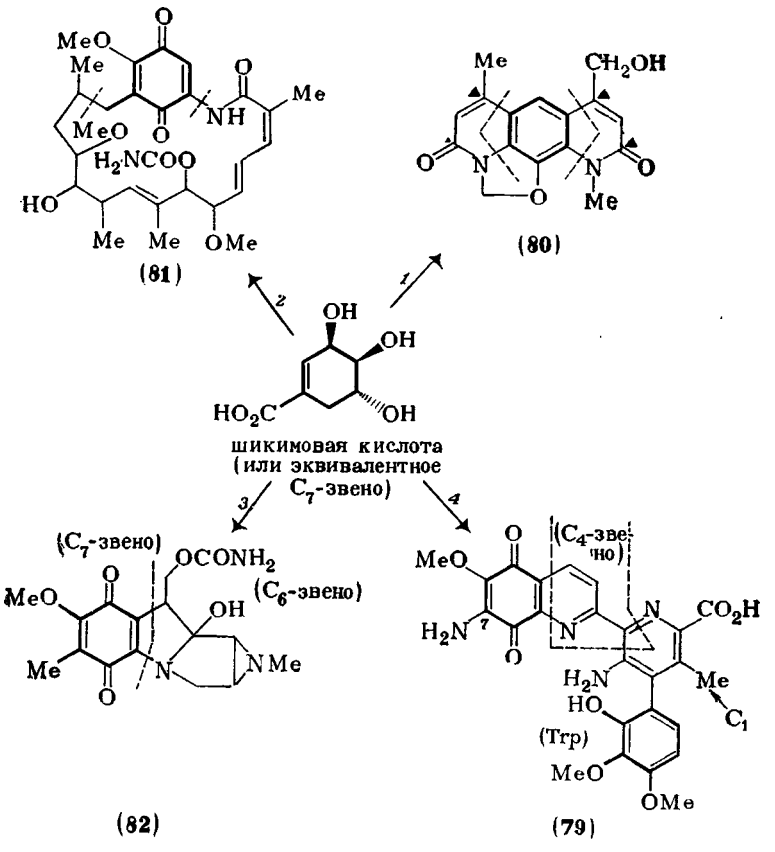
Показано, что в ходе биосинтеза антибиотика из *Streptomyces* стрептонигрина (**79**) происходит необычное расщепление триптофанового кольца [80]. Схема образования колец С и D стрептонигрина (схема 27; путь *а*) была доказана изучением меченых соединений с помощью ЯМР ^{13}C. За исключением атома С-6′, оба кольца образуются из одной молекулы триптофана посредством неокислительного расщепления индольного кольца между пиррольным атомом азота и бензольным кольцом. *С*-Метильный заместитель и три *О*-метильные группы образуются из метионина.



(27)

Как ни странно, меченый триптофан не включался в кольца A и B, хотя хорошо известна роль этой аминокислоты как источника хинолиновой системы в других природных соединениях [34]. Эти данные еще раз подчеркивают необходимость экспериментальной проверки биогенетических схем, даже если структурный анализ указывает на возможность осуществления одного из самых типичных путей биосинтеза. В случае стрептонигрина можно было бы предложить, например, вполне разумную схему (схема 27; путь *б*), в которой предшественниками являются аминокислоты триптофан (кольца A и B), тирозин или дофамин (кольцо D и часть кольца C) и треонин (оставшийся кротонильный фрагмент кольца C и атом азота).

Другим производным хинолина является необычный 1,8-диазаантраценовый антибиотик нибомицин (**80**), трициклическая система которого образуется из ацетата и предшественников типа шикимовой кислоты (схема 28) [81]. Полностью замещенное бензохиноновое кольцо A стрептонигрина альтернативно может возникать из более прямого предшественника углеводного типа; действительно, расположение аминных заместителей при C-1 и C-3 и четырех кислородсодержащих заместителей напоминает структуру остатка стрептидина в стрептомицине (**31**) и сходный фрагмент дезоксистрептамина в неомицине [35]. Аминобензохиноновый фрагмент стрептонигрина структурно аналогичен соответствующим группировкам в антибиотиках ансамициновой группы, например, в гельдамицине (см. схему 28).



(28)

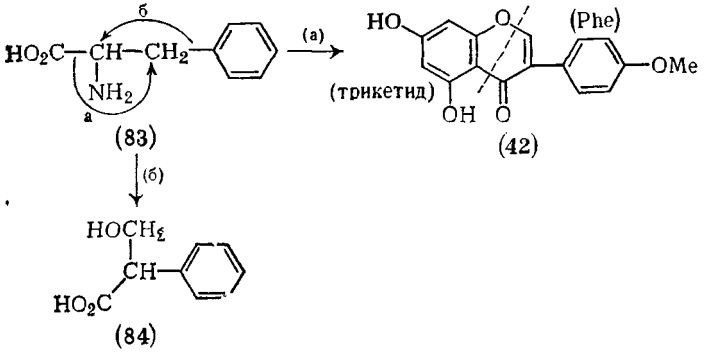
1–Me$\overset{\blacktriangle}{C}O_2H$, *2*–поликетидные звенья, *3*–C_6-звено (напр. *D*-глюкозамин) *4*– Trp + C_4-звено (Glu или ацетоацетат)

Образование ансамицинов, по-видимому, протекает очень своеобразным путем. Широкое изучение гельдамицина (**81**) [82] и рифамицинов [83] с помощью меченых соединений показало, что хиноидное C_7-звено, вероятно, возникает из предшественника типа шикимовой кислоты; однако включение самой шикимовой кислоты в эти антибиотики доказать не удалось. Хиноидное кольцо соединено с поликетидной цепью (в основном полипропионатной); в результате получается большое число макроциклических структур.

Другой антибиотик из *Streptomyces*, митомицин В (**82**) [83а], представляет собой замещенный толухинон, происхождение которого может иметь много общего с происхождением C_7-звена ансамицинов. Заместитель из шести углеродных атомов, очевидно, образуется непосредственно из *D*-глюкозамина [84].

Если бензохиноновое кольцо А стрептонигрина также образуется из циклогексанового кольца C_7-предшественника типа шикимовой кислоты (шикимата), то оно должно быть соединено с кольцами С и D, возникающими из триптофана, посредством звена, состоящего из одного атома азота и четырех атомов углерода (см. схему 28). Источником последних может служить аминокислота, например, глутаминовая (с потерей CO_2), или поликетидное (ацетоацетатное) звено; в последнем случае аналогия с ансамицинами еще более углубляется (ср. с рифамицином). Разнообразным путям биосинтеза хинонов, в том числе и ансамицинов, посвящен обстоятельный обзор Бентли [84].

Молекулярные перегруппировки протекают в ходе биосинтеза не только описанных выше полиизопреноидов и поликетидов, но и многих других типов природных соединений, в том числе углеводов, например стрептозы, входящей в состав молекулы стрептомицина (**31**) [48], изофлавоноидов, а также алкалоидов. Особо следует отметить образование формононетина (**42**) [48] и троповой кислоты (**84**) [85]; атропиновый фрагмент их молекул образуется в результате различных скелетных перегруппировок одного и того же C_6—C_3-предшественника, *L*-фенилаланина (**83**) (схема 29).



(29)

1,2-Миграции подобного типа широко распространены в процессах первичного метаболизма аминокислот, например, в кофермент-B_{12}-зависимой трансформации глутаминовой кислоты в β-метиласпартат [86], в превращении сукцината в метилмалонат [87] или, как уже отмечалось выше, при образовании предшественника валина, диметилпировиноградной кислоты, путем «пинаколиновой» перегруппировки α-ацетолактата (см. схему 22) [67]. Наряду с ароматическими аминокислотами валин представляет собой одни из наиболее широко распространенных предшественников природных соединений [88], как это было показано выше на примере пенициллинов и цефалоспоринов (см. схемы 6 и 7).

Если таксономически близкие виды продуцируют соединения, обладающие общими главными элементами структуры, то основной биогенетический принцип требует прежде всего рассмотреть возможность их образования из общего, уже достаточно сложного

предшественника. Это положение представляет собой, в сущности, распространение на биосинтез известного «принципа Оккама» («бессмысленно затрачивать больше усилий на то, что может быть достигнуто меньшими»)*. Примером является взаимосвязь кольцевых систем пенициллинов и цефалоспоринов. Эти элементы структуры являются общими не только для продуктов метаболизма некоторых видов грибов, но и для таксономически далеких актиномицетов.

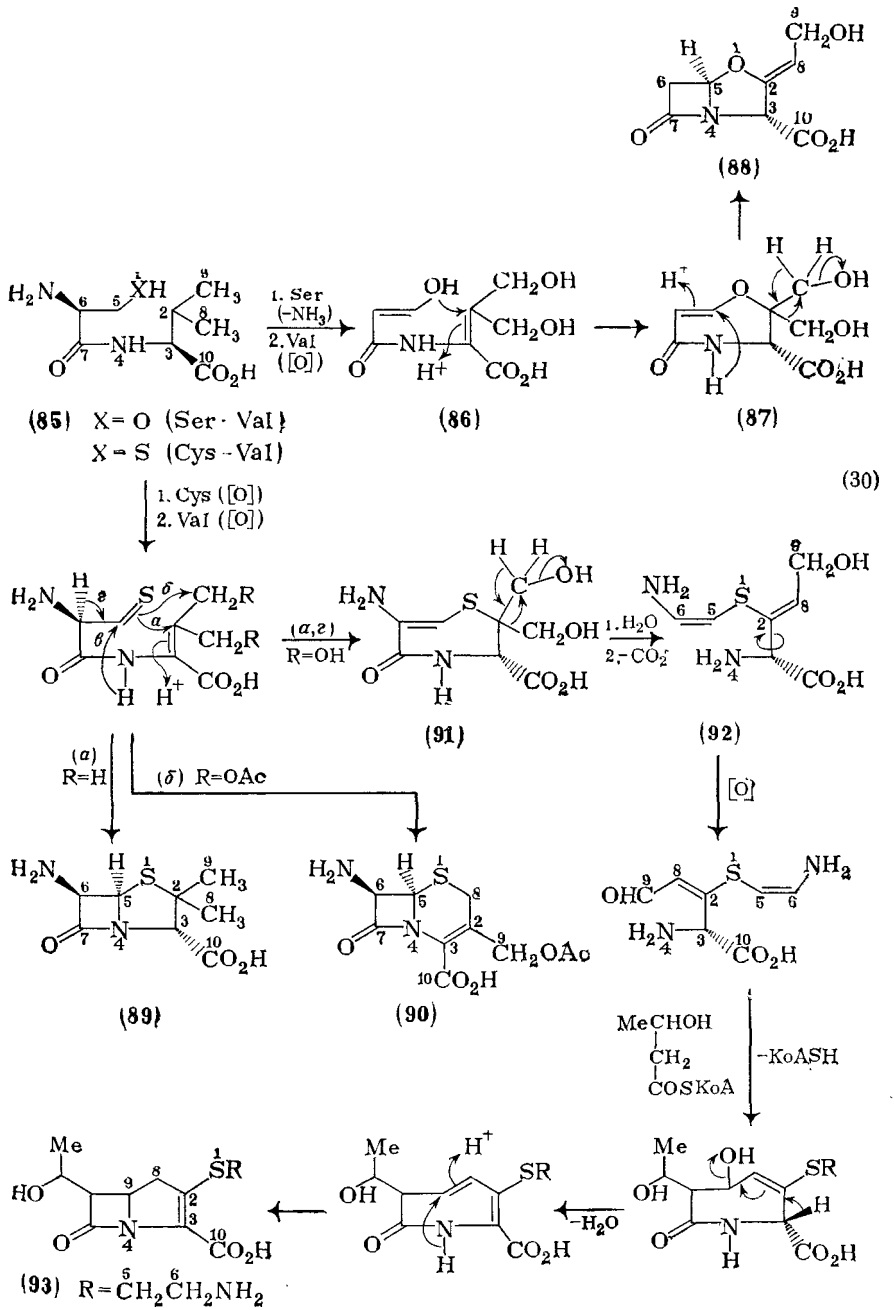
Характерное для пенициллинов β-лактамное кольцо обнаружено в двух других типах метаболитов *Streptomyces*, а именно в клавулановой кислоте (88) [89] и в оливановых кислотах, например в тиенамицине (**93**) [90]. Анализ структуры этих соединений не свидетельствует о наличии биогенетических взаимосвязей между ними и кольцевой системой пенициллинов, образующейся из цистеинилвалина; тем не менее здесь уместно использовать упоминавшийся выше биогенетический принцип. Помимо сходства бициклических систем, наличие C_3- и C_5-звеньев в их четырех- и пятичленных гетероциклических кольцах, соответственно, указывает на возможность образования из одного дипептида как 6-аминопенициллановой кислоты (**89**; 6-АПК), так и клавулановой кислоты (88). Основное различие между C_5-звеньями пенициллановой и клавулановой кислот заключается в том, что в пенициллановой кислоте оно сохраняет углеродный скелет своего предшественника валина, а в клавулановой кислоте это звено имеет линейную структуру. Следовательно, его образование из валина должно включать перегруппировку, аналогичную известной 1,2-миграции, происходящей при синтезе этой аминокислоты из ацетолактата (см. схему 22) [67].

Гипотетические взаимосвязи 6-аминопенициллановой (**89**), 7-аминоцефалоспорановой (**90**; 7-АЦК), клавулановой (88) кислот и тиенамицина (**93**) приведены на схеме (30). Валин сначала окисляется до той же степени, как и в случае остатка соответствующей 7-аминоцефалоспорановой кислоты в цефалоспорине С. Таким путем промежуточно образуется соединение (**87**), перегруппировка которого по пинаколиновому типу непосредственно приводит к линейному C_5-фрагменту клавулановой кислоты (88).

Согласно этой схеме, 6-АПК, 7-АЦК, клавулановая кислота и тиенамицин синтезируются из однотипных исходных предшественников-дипептидов. В случае пенициллинов β-лактамное кольцо образуется из остатка цистеина (с сохранением аминогруппы), а в случае клавулановой кислоты остаток цистеина в дипептиде-предшественнике заменен на метаболически эквивалентный ему серин. Под действием соответствующей аммиак—лиазы аминогруппа серилвалина отщепляется, а последующее окисление валинового остатка приводит к ненасыщенному амиду (86), из которого, ве-

---

* Оккам, Уильям (ок. 1300—1350 гг.), английский философ и богослов, представитель школы номинализма. — *Прим. перев.*


(85) X= O (Ser · Val)
X = S (Cys - Val)
1. Ser (-NH3)
2. Val ([O])
(86)
(87)
(88)
(30)
1. Cys ([O])
2. Val ([O])
(a,2) R=OH
1. H2O
2. -CO2
(91)
(92)
(a) R=H
(δ) R=OAc
[O]
(89)
(90)
MeCHOH
CH2
COSKoA
-KoASH
-H2O
(93) R=CH2CH2NH2

роятно, далее образуется β-лактамный фрагмент клавулановой кислоты [(86)→(87)→(88)].

Применение концепции общих предшественников к тиенамицину (**93**) связано с бóльшими трудностями, однако и в этом случае можно представить себе путь биосинтеза, в котором цистеинилвалин является источником пирролиновой тиоэфирной группировки. Образование β-лактамного кольца требует участия еще одного C_4-звена (например, треонина или ацетоацетата). Общим элементом механизма здесь является гипотетическая окислительная перегруппировка окисленного валинового фрагмента в аналогичное клавулановой кислоте ациклическое ненасыщенное соединение [ср.: (**87**)→(**88**) и (**91**)→(**92**)].

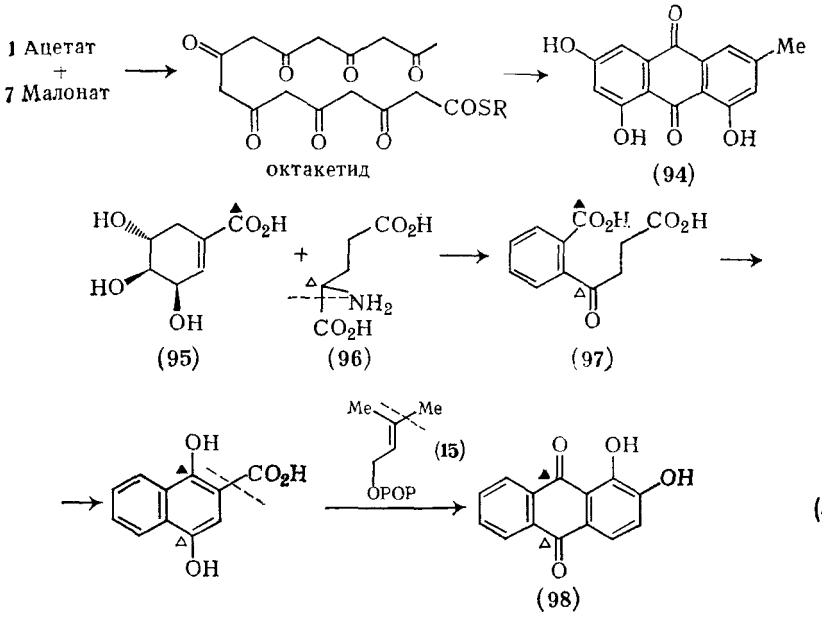
Гипотетические схемы биосинтеза могут служить основой для экспериментального изучения утилизации первичных предшественников и идентификации более сложных промежуточных соединений.

28.1.7.4. Альтернативные пути образования полициклических фенолов

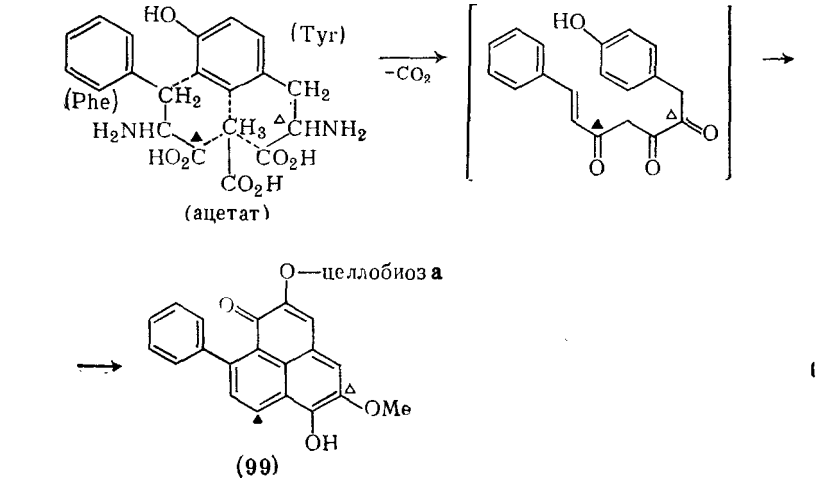
Образование любого конкретного метаболита по нескольким биосинтетическим путям является скорее исключением, чем правилом, хотя такие случаи известны, особенно среди сравнительно небольших молекул первичных метаболитов. Установлено, например, что аминокислота лизин синтезируется различными путями в грибах и в растениях [91], а предшественник мевалоната β-гидрокси-β-метилглутарат, как уже упоминалось, может образовываться как из трех ацетатных звеньев, так и из лейцина. Однако не известно ни одного достоверного случая образования вторичного метаболита по нескольким путям. Исключением являются конечные продукты метаболической деградации, например, оксибензойные кислоты.

В то же время структурно близкие, но не идентичные фенолы и хиноны часто образуются несколькими путями. Показано, например, что замещенные нафтохиноны синтезируются четырьмя различными способами [92], а окисленные производные бензола — еще бóльшим числом способов, хотя биосинтез большинства соединений такого рода протекает по шикиматному (см. гл. 30.3) и поликетидному (см. гл. 29.1) путям.

Производные антрахинона эмодин (**94**) и ализарин (**98**) встречаются в растениях. Было показано [93], что эмодин образуется из ацетатных и малонатных звеньев (подобно грибным антрахинонам [94]) (схема 31). При биосинтезе ализарина используются три различных первичных предшественника — шикимат (**95**), глутамат (**96**) и мевалонат (схема 32); в данном случае утилизируются все семь углеродных атомов шикимата, но только три центральных атома углерода глутамата. Было показано [95], что в биосинтезе ализарина промежуточно образуется 2-сукцинилбензоат (**97**) [84].

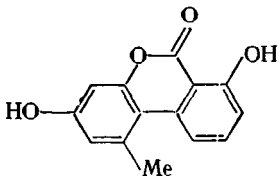


Феналеноновые пигменты, сравнительно редко встречающиеся в природных объектах, были выделены как из растений, например целлобиозид гемокорин (**99**), так и из грибов, например из *Penicillium herquei* (см. схему 19). Оказалось, что биосинтез этих пигментов необычной структуры совершенно различен. Так, в растениях образование феналенонов протекает преимущественно по

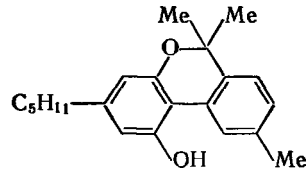


шикиматному пути; их углеродный C_{19}-скелет включает два звена $C_6 - C_3$ и один атом углерода из ацетатного звена [36, 53, 96] (схема 33). Напротив, грибные феналеноны возникают из гептакетидов, циклизации которых [10] протекают, вероятно, в конформации, условно изображенной на схеме (2).

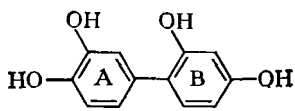
Бифенильная группировка также не часто встречается в природе, но все же производные бифенила — альтернариол (**35**), альтенузин (**36**), аутумнариол (**100**), каннабинол (**101**), саппанин (**102**), эллаговая кислота (**103**), а также соединения (**104**) и (**105**) — обнаружены среди продуктов метаболизма грибов, растений и даже млекопитающих. Первым из соединений такого типа был выделен грибной дибензо-α-пирон альтернариол (**35**) [97], представляющий собой гептакетид [44, 98]; гептакетидом является, вероятно, и его дезоксипроизводное — аутумнариол (**100**) [99], неожиданно обнаруженный в высших растениях (*Eucomis autumnalis*). Хорошо изученные продукты метаболизма растений каннабиноиды, например каннабинол (**101**), очевидно, имеют смешанное ацетат-мевалонатное происхождение [100]; биогенез саппанина (**102**) [101], также выделенного из растений, до конца не выяснен. На основании структурного анализа логично предположить, что кольцо А образуется из шикимата, в построении резорцинового кольца участвуют ацетатные звенья. Однако вполне удовлетворительны и гипотезы о его полностью поликетидном происхождении [считают, например, что альтенузин (**36**), в молекуле которого имеются пирокатехиновый и резорциновый фрагменты, имеет поликетидное происхождение] или о полностью шикиматном пути биосинтеза посредством окислительной конденсации и декарбоксилирования соответствующих гидроксибензойных кислот; ср. структуры (**103**), (**104**) и (**105**).



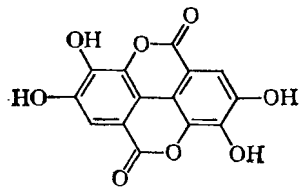
(**100**)



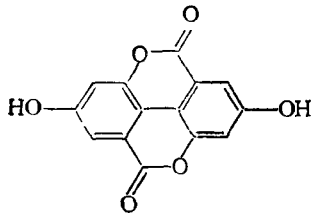
(**101**)



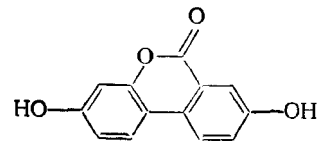
(**102**)



(**103**)

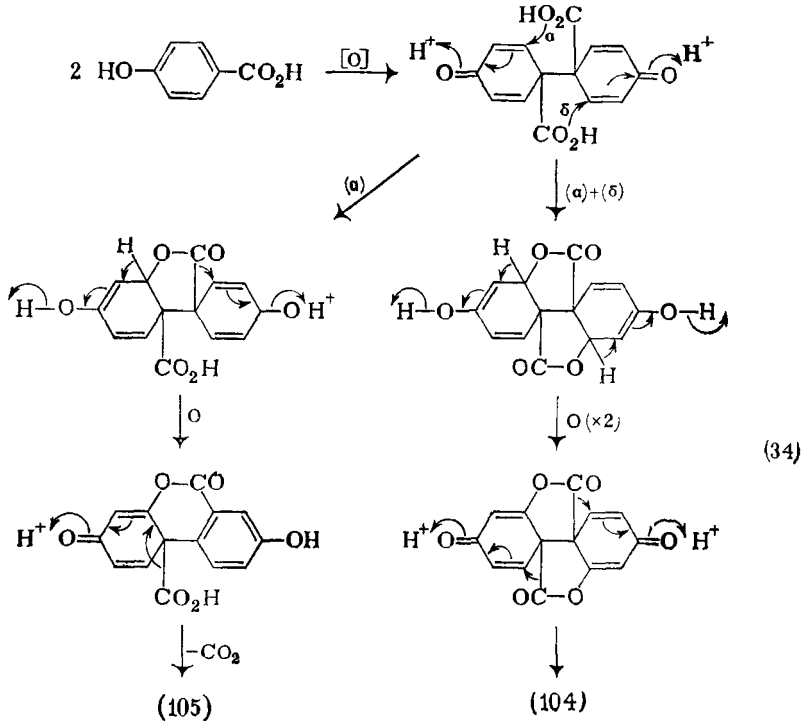


(104)



(105)

Составная часть растительного таннина эллаговая кислота (**103**) почти наверняка имеет чисто шикиматное происхождение, причем симметрия ее структуры, как принято считать, обусловлена окислительной конденсацией двух идентичных звеньев галловой кислоты. Структурно близкие компоненты (**104**) и (**105**) пахучих желез бобра *Castor fiber* [102], очевидно, биогенетически связаны с эллаговой кислотой и, по-видимому, также являются продуктами окислительной конденсации двух молекул гидроксибензоата, образующегося по шикиматному пути. В то же время возможно, что несимметричная структура (**105**) образуется путем конденсации двух различных звеньев, а соединение (**104**) по аналогии с эллаговой кислотой может образоваться из двух молекул

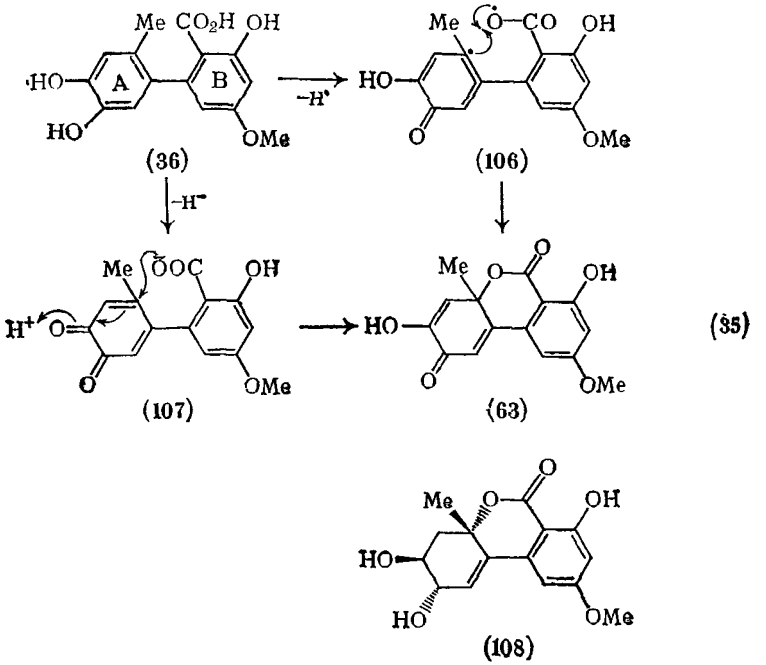


(34)

2,4-дигидроксибензойной кислоты. Кроме того, согласно «принципу Оккама», предпочтителен путь, при котором оба компонента желез бобра имеют один и тот же предшественник. Гипотетический путь биосинтеза соединений (104) и (105) посредством окислительной конденсации *п*-гидроксибензойной кислоты показан на схеме (34). Промежуточно образующийся бисгемихинон может затем, как показано на схеме, претерпевать либо элиминирование карбоксильной группы, либо β-присоединение к ненасыщенному кетону с образованием γ-лактона и его последующим окислением и перегруппировкой до δ-лактона. Осуществляющаяся в последнем варианте 1,2-миграция карбоксильной группы аналогична упоминавшейся ранее перегруппировке фенилаланина до троповой кислоты (84) (ср. схему 29).

28.1.7.5. Рацемические фенольные метаболиты

Метаболиты *Alternaria* — (±)-дегидроальтенузин (63) и (±)-альтернуен (108) являются продуктами трансформации производных бифенила и, очевидно, образуются из альтенузина (36), в котором ароматичность кольца А теряется соответственно в результате окисления и восстановления (схема 35). Интересно, что оба соединения в природных источниках находятся в виде рацемических смесей (несмотря на наличие в альтернуене трех цент-



(35)

ров хиральности). Обычно образование рацематов указывает на спонтанный (т. е. не ферментативный) характер процесса образования центра хиральности.

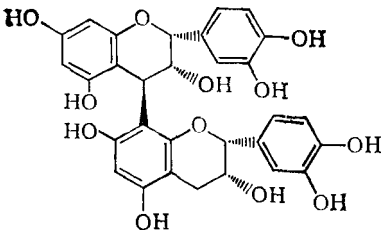
Известно, что образование соединения (63) путем окисления пирокатехинового кольца альтенузина (36) протекает очень легко, например, при действии водного раствора хлорида железа(III). Считается, что при этом промежуточно образуется свободный радикал типа (106). Возможным эквивалентом в таком же катализируемом ферментами процессе мог бы являться промежуточный *о*-хинон (107), из которого затем посредством спонтанного β-присоединения карбоксильной группы кольца В образуются оба энантиомера кросс-сопряженного диенона дегидроальтенузина (63). В отличие от обычно нестереоспецифического свободнорадикального окисления (см. разд. 28.1.7.6) этот окислительный процесс имеет обычный ионный характер.

Если дегидроальтенузин является нормальным предшественником альтернуена, то для введения двух соседних центров хиральности с конфигурациями, указанными в формуле (108), необходимо катализируемое ферментом стереоспецифическое восстановление. Если этот фермент способен использовать в качестве субстратов оба антипода (±)-дегидроальтенузина (63), то таким образом объясняется продуцирование двух энантиомеров (±)-альтернуена.

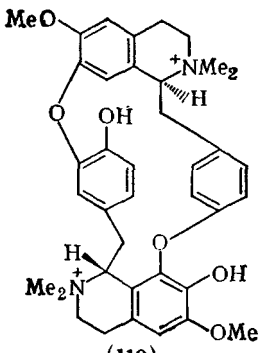
Альтенузин или дегидроальтенузин являются, вероятно, предшественниками трех сосуществующих оптически неактивных альтенуевых кислот I, II и III [103], одна из которых, (±)-альтенуевая кислота II (65) [70], как было показано, содержит два центра хиральности. Упоминавшееся выше наиболее правдоподобное объяснение этого факта заключается в том, что ферментативным путем на самом деле синтезируется соответствующая 3-арилзамещенная муконовая кислота (64), которая затем претерпевает спонтанное β-присоединение карбоксильной группы, образуя все три изомера оптически неактивных альтенуевых кислот.

28.1.7.6. Окислительная конденсация и биомиметический синтез

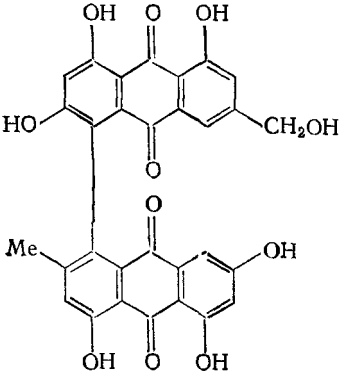
Многие природные соединения, в частности, бисфлавоноиды, бисантрахиноны, лигнаны, бистерпеноиды и димерные алкалоиды существуют в димерной форме. Путем окислительного сочетания образуются такие димерные природные соединения, как процианидин B_2 (109), тубакурарин (110), гидроксискирин (111), (±)-сирингарезинол (112), госсипол (113), усниновая кислота (114). Мономерное звено как предшественник димера впервые было использовано Бартоном и сотр. в лабораторном синтезе усниновой кислоты (114), имитирующем биогенетическую схему на основе окислительной конденсации фенолов.



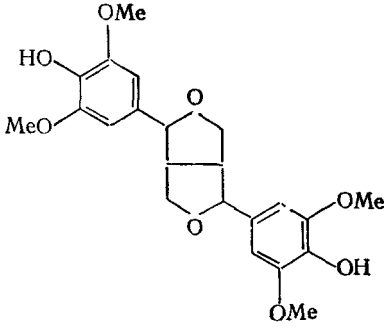
(109)



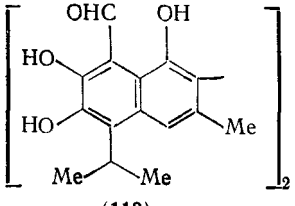
(110)



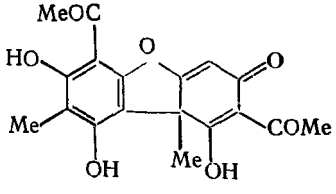
(111)



(112)



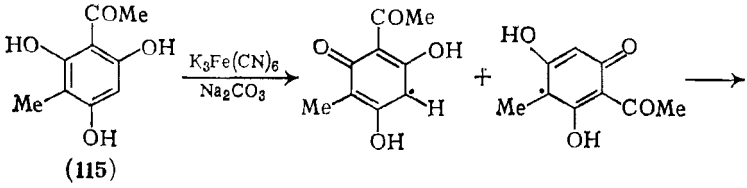
(113)



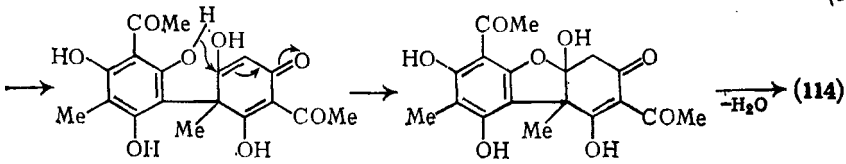
(114)

Усниновая кислота (**114**), содержание которой в некоторых лишайниках достигает 20 % (от «сухой» массы), была синтезирована всего в две стадии путем непосредственного окисления 2,4,6-тригидрокси-3-метилацетофенона (метилфлорацетофенона) (**115**) трикалийгексацианоферратом [104]. Предложенный механизм реакции включает радикальное окисление исходного фенольного тетракетида с последующей конденсацией двух промежуточно образующихся свободных радикалов (схема 36). Считают, что он достаточно точно отражает процесс синтеза этой кислоты в лишайниках; это подтверждается осуществленным позднее фермен-

тативным синтезом усниновой кислоты путем окисления того же поликетидного предшественника в присутствии пероксидазы [105].

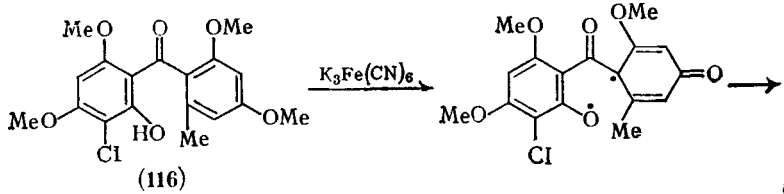


(36)

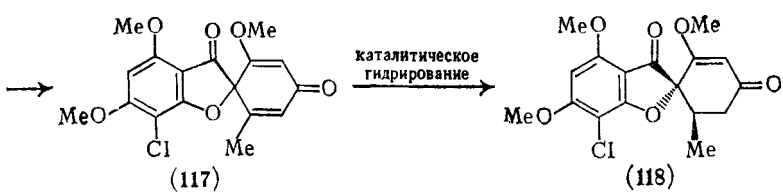


Как и в других случаях окисления пероксидазами *in vitro*, полученное соединение оказалось рацематом, тогда как природная усниновая кислота была выделена как в оптически активной, так и в рацемической форме.

Аналогичная реакция внутримолекулярной окислительной конденсации полифенолов применялась также в биомиметическом синтезе противогрибкового антибиотика гризеофульвина (**118**) из гризеофенона А (**116**) [106] (схема 37). Кросс-сопряженная диеноновая система промежуточно образующегося фульвина (**117**) аналогична такому же элементу структуры дегидроальтенузина (**63**), который, как отмечалось выше, легко образуется окислением пирокатехинового кольца альтенузина ионами железа(III) (см. схему 35).



(37)



В лабораторном синтезе природных соединений успешно использовались также представления о механизмах и других био-

синтетических и метаболических реакций. Были разработаны зачастую достаточно эффективные методы синтеза ряда алкалоидов [107], терпенов [108] и поликетидов [109]. Успехи в этом направлении нашли свое отражение в термине «биомиметический синтез», принятом в настоящее время для обозначения синтеза природных соединений по схемам, имитирующим происходящие в природе процессы.

В заключение следует подчеркнуть, что как бы остроумен и эффективен ни был биомиметический синтез, он в лучшем случае может являться лишь косвенным доводом в пользу той биогенетической теории, на которой базируется.

28.1.8. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

За последнюю четверть столетия наше понимание биосинтетического происхождения природных соединений значительно продвинулось вперед; в некоторых областях, например в химии стероидов, тетрациклинов и индольных алкалоидов, достигнуты поразительные успехи. Пути биосинтеза соединений других групп изучены недостаточно. Например, мы до сих пор еще очень мало знаем о деталях механизма циклизации трипептидного предшественника в бициклическую кольцевую систему пенициллина. Надежды на то, что и в этой области в ближайшем будущем будет достигнут прогресс, связаны с некоторыми последними достижениями, в том числе с выяснением стереохимии включения прохиральных β-углеродных атомов цистеина [110, 111] и валина [112, 113], а также с применением методов работы с протопластами и бесклеточными ферментными системами [114, 116]. Путем выделения и изучения соответствующих ферментов или ферментных систем удалось добиться определенных успехов и в выяснении биогенеза других классов вторичных метаболитов [115].

Сейчас без труда можно ответить на вопрос о том, какие типы вторичных структур синтезируются в природе и (по крайней мере, в рамках известных механизмов) как они образуются из очень ограниченного круга первичных предшественников. Без сомнения, в будущем предстоит прежде всего найти ответ на вопрос о причинах их образования. Обладают ли вторичные метаболиты какой-либо полезной функцией, и если нет (и, следовательно, если они представляют собой только эволюционный атавизм или другую «метаболическую фикцию»), то почему они и продуцирующие их организмы сумели выжить в течение столь долгого времени в обстановке жестокой конкуренции, когда недостаточная степень утилизации ресурсов организма обычно оказывается гибельной? Ответ на этот ключевой вопрос, возможно, будет получен путем сопоставления биохимической природы таксономически родственных видов с условиями, необходимыми для сохранения их индивидуальности.

До настоящего времени изучение природных соединений было чрезвычайно успешным, и все же те сведения, которыми мы располагаем, неизбежно фрагментарны, поскольку методы обнаружения и выделения природных соединений носят более или менее случайный характер. Следовательно, доступная сейчас информация скорее всего не отражает истинного положения ни в качественном разнообразии структур, ни в количественном (относительное содержание индивидуальных метаболитов и промежуточных веществ на каждой стадии роста организма) отношении. Очевидно, необходим более систематический поиск новых соединений. Один из возможных подходов (см. разд. 28.1.7.1) заключается в применении простой экспериментальной методики, которая основана на включении меченных радиоактивными изотопами первичных предшественников во вторичные метаболиты; образование последних может контролироваться обычными методами ауторадиографии. Это позволило бы исследовать весь спектр метаболической активности индивидуальных организмов как в качественном, так и в количественном отношении. Однако сейчас все еще господствует случайный подход, когда для изучения выбирают только несколько основных соединений со специфическими химическими или биологическими свойствами.

Следует чаще публиковать обзоры, посвященные практическому использованию быстро растущей информации о продуктах вторичного метаболизма. Поддается ли, например, контролю количество и многообразие продуцируемых вторичных метаболитов или каковы пределы эффективного полусинтетического получения новых веществ путем микробных трансформаций, уже давно успешно применяющихся, например, для модификации стероидов?

Определенные пока еще нереализованные возможности существуют также в области разработки высокоселективных ингибиторов вторичных путей метаболизма; здесь основой должны служить поиски целенаправленно модифицированных сложных промежуточных соединений, способных выполнять функции антиметаболитов, как, например, в случае сульфонамидных антагонистов фолиевой кислоты. Так, предварительные опыты [117] показали возможность ингибирования синтеза пенициллановой кислоты 5-замещенными орселлиновыми кислотами в концентрациях, не влияющих в заметной степени на рост или общий метаболизм организмов. Оказалось, что эти ингибиторы эффективно блокируют ферментативное расщепление С-4—С-5-связи орселлиновой кислоты (ср. схему 1) и приводят, таким образом, к накоплению этого промежуточного соединения при биосинтезе пенициллановой кислоты [118]. Аналогичная ситуация часто встречается в ходе изучения блокированных путей метаболизма у специфических ферментдефицитных мутантов. В самом широком смысле этот подход может быть использован для селективного ингибирования биосинтеза нежелательных метаболитов типа микробных токсинов (фитотоксинов, афлатоксинов и т. д.). Представляется реальным его

применение для увеличения выхода антибиотиков или специфических промежуточных соединений путем блокирования альтернативных путей биосинтеза, конкурирующих в отношении источников необходимых предшественников, или путем ингибирования биосинтетических путей, ответственных за дальнейший метаболизм нужного промежуточного соединения. Выбор селективного ингибитора данного специфического пути биосинтеза требует знания строения хотя бы одного необходимого сложного предшественника (например, превращение орселлиновой кислоты в пенициллловую кислоту блокируется 5-хлорорселлиновой кислотой).

Дальнейшее выяснение природы отдельных путей биосинтеза и возможностей их регулирования, несомненно, потребует более глубокого изучения участвующих в этом ферментов и их генетического контроля. Эта важная область исследований сейчас привлекает все большее внимание как в промышленных, так и в академических лабораториях.

Для расширения достигнутого в течение двух-трех последних десятилетий уровня знаний о результатах перманентной биосинтетической эволюции, продолжающейся уже более двух миллиардов лет, важно постоянно критически оценивать перспективы и хранить полученные результаты в таком виде, чтобы можно было максимально облегчить внесение любых существенных корреляций. В этом отношении необходимым условием эффективного прогресса является, как уже указывалось, создание исчерпывающего каталога, снабженного соответствующими системами хранения и выдачи информации.

Не приходится сомневаться, что будущее такой сравнительно молодой науки, как биосинтез, будет ознаменовано не менее успешными и блестящими открытиями, чем ее короткое прошлое.

ЛИТЕРАТУРА

1. *M. Calvin and J. A. Bassham*, 'The Photosynthesis of Carbon Compounds', Benjamin, New York, 1962.
2. *R. B. Woodward, M. P. Cava, W. D. Ollis, A. H. Hunger, H. U. Daeniker, and K. Schenker*, J. Amer. Chem. Soc., 1954, **76**, 4749.
3. *J. D. Bu'Lock*, 'The Biosynthesis of Natural Products', McGraw-Hill, London, 1965, p. 2.
4. *R. H. Whittaker and P. P. Feeny*, Science, 1971, **171**, 757.
5. Общий обзор см.: *S. A. Brown*, in 'Biosynthesis', ed. T. A. Geissman, Specialist Periodical Reports, The Chemical Society, London. 1972, vol. 1, p. 1.
6. Общий обзор см.: *M. Tanabe*, in 'Biosynthesis', ed. T. A Geissman, Specialist Periodical Reports, The Chemical Society, London, 1973, vol. 2, p. 241.
7. *Y. Sato and T. Oda*, J. C. S. Chem. Comm., 1977, 415; *H. H. Mantsch, H. Saito, and I. C. P. Smith*, Prog. N. M. R. Spectroscopy, 1977, **11**, 211.
8. *J. M. A. Al-Rawi, J. A. Elvidge, D. K. Jaiswal, J. R. Jones, and R. Thomas*, J. C. S. Chem. Comm., 1974, 220.
9. *J. A. Elvidge, D. K. Jaiswal. J. R. Jones, and R. Thomas*, J. C. S. Perkin I, 1977, 1080.
10. *T. J. Simpson*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 258.
11. *A. P. Bradshaw, J. R. Hanson, and M. Siverns*, J. C. S. Chem. Comm., 1977, 819.

12. *L. J. Goad and T. W. Goodwin*, Prog. Phytochem., 1972, **3**, 113.
13 *N. Castagnoli, K. Corbett, E. B. Chain and R. Thomas*, Biochem. J., 1970, **117**, 450.
14. *S. Gatenbeck and K. Mosbach*, Acta Chem. Scand 1959, **13**, 1561.
15. *P. Dimroth, H. Walter, and F. Lynen*, European J. Biochem., 1970, **13**, 98.
16. *J. R. McCormick*, in 'Biogenesis of Antibiotics', ed. Z. Vaněk and Z. Hŏstălek, Czech. Acad Sci., Prague, 1965, p. 73.
17. *L. Ruzicka, A. Eschenmoser, and H. Heusser*, Experientia, 1953, **9**, 357.
18. *R. Robinson*, 'Structural Relations of Natural Products', Clarendon, Oxford, 1955.
18a. *H. R. V. Arnstein and R. Bentley*. Biochem J., 1956, **62**, 403.
18б. *J. Bruton, W. H. Horner, and G. A. Russ*. J. Biol. Chem., 1967, **242**, 813.
19. *K. Folkers, C. H. Shunk, B. O. Linn, F. M. Robinson, P. E. Wittreich, J. W. Huff, J. L. Gilfillan, and H. R. Skeggs*, 'CIBA Foundation Symposium: Biosynthesis of Terpenes and Sterols', ed. G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor, Little, Brown, Boston, 1959, p. 20.
20. *G. W. K. Cavill*, Rev. Pure Appl. Chem., 1960, **10**, 169.
20a. *D. Van Engen, J. Clardy, E. Kho-Wieseman, P. Crews, M. D. Higgs, and D. J. Faulkner*, Tetrahedron Letters, 1978, 29
21. *K. Bloch*, 'CIBA Foundation Symposium: Biosynthesis of Terpenes and Sterols', ed. G E. W. Wolstenholme and M. O'Connor, Little, Brown, Boston, 1959, p. 4.
22. *J. W. Cornforth and G. Popjak*, Adv. Enzymol., 1960, **22**, 281.
23. *F. H. Lynen, H. Eggerer, U. Henning, I. Kessel, and E. Ringelman*, 'CIBA Foundation Symposium: Biosynthesis of Terpenes and Sterols', ed. G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor, Little, Brown, Boston, 1959, p. 95.
24. *R. Robinson*, Chem. and Ind. (London), 1934, 53, 1062.
25. *R. Thomas and R. A. Bassett*, Prog. Phytochem. 1972, **3**, 47.
26. *E. Leete*, Chem. and Ind. (London), 1960, 692.
27. *R. Thomas*, Tetrahedron Letters, 1961, 544.
28. *E. Wenkert*, J. Amer. Chem. Soc., 1962, **84**, 98.
29. *R. Thomas*, in 'Biogenesis of Antibiotics', ed. Z. Vaněk and Z. Hŏstălek, Czech. Acad. Sci., Prague, 1965, p. 155.
30. *A. I. Scott*, Accounts Chem. Res., 1970, **3**, 151.
31. *G. Barger and C. Scholz*, Helv. Chim. Acta, 1933, **16**, 1343.
32. *G. Hahn and H. Werner*, Annalen, 1935, **520**, 123.
33. *R. B. Woodward*, Nature, 1948, **162**, 155.
34. *R. Robinson*, Nature, 1948, **162**, 524.
35. *K. L. Rinehart, J. M. Malik, R. S. Nystrom, R. M. Stroshane, S. T. Truitt, M. Taniguchi, J. P. Rolls, W. J. Haak, and B. A. Ruff*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 2263.
36. *R. Thomas*, Pure Appl. Chem., 1973, **34**, 515.
37. *H. Raistrick and A. B. Clark*, Biochem. J., 1919, 13, 329.
38. *H. Raistrick*, Proc. Roy. Soc., 1949, A**199**, 141.
39. *A. J. Birch and F. W. Donovan*, Austral. J. Chem., 1953, **6**, 360.
40. *R. Robinson*, 'Structural Relations of Natural Products', Clarendon, Oxford, 1955, p. 7.
41. *A. J. Birch, R. A. Massy-Westropp, and C. J. Moye*. Chem. and Ind. (London), 1955, 683.
42. *A. J. Birch*, Proc. Chem. Soc., 1962, 3.
43. *P. Chaplen and R. Thomas*, Biochem. J., 1960, **77**, 91.
44. *R. Thomas*, Biochem. J., 1961, **78**, 748.
45. *R. Thomas*, Biochem. J., 1961, **78**, 807.
46. *S. Gatenbeck*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1962, **6**, 422.
47. *I. Ljungcrantz and K. Mosbach*, Biochem. Biophys. Acta, 1964, **86**, 203.
48. *H. Grisebach*, in 'Biosynthetic Patterns in Microorganisms and Higher Plants'. Wiley, New York, 1967.
49. *E. Albu and R. Thomas*, Biochem J., 1963, **87**, 648.
50. *J. Better and S. Gatenbeck*, Acta Chem Scand., 1977, **B31**, 391.
51. *J. W. Sime*, Ph. D. Thesis, University of London, 1969, p. 98.

52. *A. Kreigler and R. Thomas*, Chem Comm., 1971, **738**.
53. *R. Thomas*, Chem. Comm., 1971, 739.
54. *R. Thomas*, неопубликованные данные.
55. *R. Thomas*, Nature, 1961, **191**, 1161.
56. *A. J. Birch and F. W. Donovan*, Austral. J. Chem., 1953, **6**, 373.
57. *D. H. R. Barton, P. de Mayo, G. A. Morrison, W. H. Schaeppi, and H. Rai strick*, Chem. and Ind. (London), 1956, 552.
58. *I. C. Paul and G. A. Sim*, J. Chem. Soc., 1965, 1097.
59. *J. N. Ashley and H. Raistrick*, Biochem. J., 1939, **33**, 1291.
60. *A. G. Perkin and J. J. Hummel*, J. Chem. Soc., 1894, **65**, 923.
61. *A. Kreigler and R. Thomas*, неопубликованные данные.
62. *H. Raistrick, C. E. Stickings, and R. Thomas*, Biochem. J., 1953, **55**, 421.
63. *D. Rogers, D. J. Williams, and R. Thomas*, Chem. Comm., 1971, 393.
64. *R. G. Coombe, J. J. Jacobs, and T. R. Watson*, Austral. J. Chem., 1970, **23**, 2343.
65. *A. J. Birch, C. W. Holzapfel, R. W. Rickards, C. Djerassi, M. Suzuki, J. Westley, J. Dutcher, and R. Thomas*, Tetrahedron Letters, 1964, 1485.
66. *E. Borowski, J. Zielinski, L. Falkowski, T. Ziminski, J. Golik, P. Kolodziejczyk, E. Jereczek, M. Gdulewicz, Yu. D. Shenin, and T. V. Kotienko*, Tetrahedron Letters, 1971, 685.
67. *H. R. Mahler and E. H. Cordes*, 'Biological Chemistry', Harper and Row, New York, 1966, p. 677.
68. *K. Mosbach*, Acta Chem. Scand., 1960, **14**, 457.
69. *H. Seto, L. W. Carey, and M. Tanabe*, J. Antibiotics, 1974, **27**, 558.
70. *D. J. Williams and R. Thomas*, Tetrahedron Letters, 1973, 639.
71. *T. Matsuura*, Tetrahedron, 1977, **33**, 2869.
72. *M. Bollaz, G. Büchi, and G. Milne*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 1035.
73. *G. C. Elsworthy, J. S. E. Holker, J. M. McKeown, J. B. Robinson, and L. J. Mulheirn*, Chem. Comm., 1970, 1069.
74. *J. S. E. Holker and J. G. Underwood*, Chem. and Ind. (London), 1964, 1865.
75. *D. P. H. Hsieh, M. T. Lin, and R. C. Yao*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1973, 52, 922.
76. *R. Thomas*, частное сообщение, цит. по: *M. O. Moss*, in 'Phytochemical Ecology', ed. J. B. Harborne, Academic, London, 1972, p. 140.
77. *M. T. Lin, D. P. H. Hsieh, R. C. Yao, and J. A. Donkersloot*, Biochemistry, 1973, 12, 5167.
78. *D. P. H. Hsieh, R. C. Yao, D. L. Fitzell, and C. A. Reece*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 1020.
79. *R. D. Stipanovic and A. A. Bell*, J. Org. Chem., 1976, 41, 2468.
80. *S. J. Gould and C. C. Chang*, J. Amer. Chem. Soc., 1977, **99**, 5496.
81. *W. M. J. Knöll, R. J. Huxtable, and K. Rinehart*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 2703; *A. M. Nadzan and K. L. Rinehart*, ibid., 1976, **98**, 5102.
82. *R. D. Johnson, A. Haber, and K. L. Rinehart*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 3316.
83. *R. J. White and E. Martinelli*, FEBS Letters, 1974, **49**, 233.
84. *R. Bentley*, in 'Biosynthesis', ed T. A. Geissman, Specialist Periodical Reports, The Chemical Society, London, 1974, vol. 3, p. 181.
85. *E. Leete*, in 'Biosynthesis', ed. T. A. Geissman, Specialist Periodical Reports, The Chemical Society, London, 1973, vol. 2, p. 106.
86. *A. A. Iodice and H. A. Barker*, J. Biol. Chem., 1963, 238, 2094.
87. *P. Overath, G. M. Kellerman, and F. Lynen*, Biochem. Z., 1962, 335, 500.
88. *R. Thomas and R. A. Bassett*, Prog. Phytochem., 1972, 3, 91.
89. *T. T. Howarth, A. G. Brown, and T. J. King*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 266.
90. *A. G. Brown, D. F. Corbett. A. J. Eglington, and T. T. Howarth*, J. C. S. Chem. Comm., 1977, 523.
91. *H. R. Mahler and E. H. Cordes*, 'Biological Chemistry', Harper and Row, New York, 1966, p. 675.
92. *J. B. Harborne*, in 'Biosynthesis', ed. T. A. Geissman, Specialist Periodical Reports, The Chemical Society, London, 1972, vol. 1, p. 119.
93. *E. Leistner*, Phytochemistry, 1971, **10**, 3015.

94. *S. Gatenbeck*, Acta Chem. Scand., 1958, **12**, 1211.
95. *E. Leistner*, Phytochemistry, 1973, **12**, 337.
96. *A. D. Harmon, J. M. Edwards, and R. J. Highet*, Tetrahedron Letters, 1977, 4471.
97. *H. Raistrick, C. E. Stickings, and R. Thomas*, Biochem. J., 1953, **55**, 421.
98. *R. Thomas*, Proc. Chem. Soc., 1959, 88.
99. *W. T. L. Sidwell, H. Fritz, and Ch. Tamm.*, Helv. Chim. Acta, 1971, **54**, 207.
100. *O. E. Schultz and G. Haffner*, Arch. Pharm., 1960, **293**, 1.
101. *E. Spath and K. Gibian*, Monatsh., 1930, **55**, 342.
102. *E. Lederer*, Nature, 1946, **157**, 231.
103. *T. Rosett, R. H. Sankhala, C. E. Stickings, M. E. U. Taylor, and R. Thomas*, Biochem. J., 1957, **67**, 390.
104. *D. H. R. Barton, A. M. Deflorin, and O. E. Edwards*, J. Chem. Soc., 1956, 530.
105. *A. Penttilla and H. M. Fales*, Chem. Comm., 1966, 656.
106. *A. I. Scott*, in 'Oxidative Coupling of Phenols', ed. W. I. Taylor and A. R. Battersby, Dekker, New York, 1967, p. 95.
107. *D. H. R. Barton, G. W. Kirby, W. Steglich, and G. M. Thomas*, Proc. Chem. Soc., 1963, 203.
108. *D. Goldsmith*, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, 1971, **29**, 363.
109. *T. M. Harris and C. M. Harris*, Tetrahedron, 1977, **33**, 2159.
110. *D. J. Morecombe and D. W. Young*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 198.
111. *D. J. Aberhart, J. Y. R. Chu, and L. J. Lin*, J. C. S. Perkin I, 1975, 2517.
112. *N. Neuss, C. H. Nash, J. E. Baldwin, P. A. Lemke, and J. B. Grutzner*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 3797.
113. *H. Kluender, C. H. Bradley, C. J. Sih, P. Fawcett, and E. P. Abraham*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 6149.
114. *P. A. Fawcett and E. P. Abraham*, in 'Biosynthesis', ed. J. D. Bu'Lock, Specialist Periodical Reports, The Chemical Society, London, 1976, vol. 4, p. 248.
115. *E. Leete*, in 'Biosynthesis', ed. J. D. Bu'Lock, Specialist Periodical Reports, The Chemical Society, London, 1977, vol. 5, p. 136.
116. *D. J. Aberhart*, Tetrahedron, 1977, **33**, 1545.
117. *E. Babaie, J. Lari, and R. Thomas*, неопубликованные данные.
118. *J. Better and S. Gatenbeck*, Acta Chem. Scand., 1976, **B30**, 368.

28.2. ФОТОСИНТЕЗ, ФИКСАЦИЯ АЗОТА И ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ

Э. ХАСЛАМ (University of Sheffield)

28.2.1. ВВЕДЕНИЕ

Промежуточный метаболизм представляет собой сложное переплетение химических реакций, в ходе которых расщепляются, взаимопревращаются и синтезируются органические природные соединения. Такая интенсивная химическая деятельность преследует две цели: высвобождение энергии для выполнения полезной работы и создание нового клеточного вещества. Согласно удобной и часто используемой классификации, эти химические реакции формально разделяют на две группы: 1) реакции, идущие с выделением энергии, и 2) реакции, приводящие к новым метаболитам (так называемые биосинтетические реакции). Следует, однако, иметь в виду, что многие являющиеся промежуточными соединения в классических путях деградации, при которых выделяется

энергия (например, при гликолизе или в цикле Кребса), одновременно служат исходными веществами при биосинтезе других компонентов клетки.

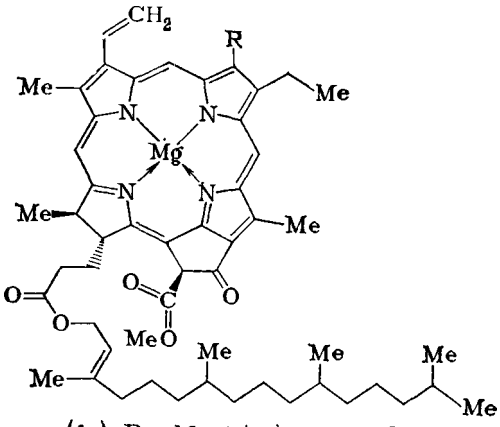
В течение нескольких последних десятилетий химики и биохимики поделили сферы интересов в области молекулярных аспектов биологии. Сферой биохимиков стала динамика живой клетки, ее отдельные функции и их контроль. Интересы химиков-органиков сфокусировались на изучении аккумулирующихся в клетках метаболитов: первичных метаболитов (углеводов, белков, нуклеиновых кислот, липидов, стероидов) и множестве вторичных метаболитов (алкалоидов, терпенов, фенолов, хинонов и разнообразных микробных антибиотиков). Это разделение сфер интересов не должно заслонять общие цели. Поэтому, хотя в последующих главах и в тексте всей книги основное внимание при обсуждении биосинтеза уделяется темам, представляющим особый интерес для химиков, мы считаем необходимым рассматривать результаты исследований прежде всего исходя из наших знаний о промежуточном метаболизме и двух фундаментальных биосинтетических процессах — фотосинтеза и фиксации азота, являющихся исходным пунктом и основой для последующего анализа путей биосинтеза.

28.2.2. ФОТОСИНТЕЗ

Биосинтез начинается с фотосинтеза [1]. Вся жизнь на Земле зависит от способности некоторых организмов (зеленых растений, водорослей и фотосинтезирующих бактерий), содержащих характерные фотосинтезирующие пигменты, использовать энергию солнечной радиации для синтеза органических молекул из неорганических веществ — диоксида углерода, азота и серы. Продукты фотосинтеза служат затем не только исходными веществами, но и источником химической энергии для всех последующих биосинтетических реакций. Обычно принято описывать фотосинтез только как процесс образования углеводов; в некоторых случаях основными продуктами фотосинтеза, действительно, являются исключительно крахмал, целлюлоза и сахароза, однако в других организмах на синтез углеводов идет, быть может, всего лишь третья часть углерода, связываемого и восстанавливаемого в процессе фотосинтеза. При ближайшем рассмотрении оказывается, что нельзя провести четкую границу между образованием продуктов фотосинтеза и другими биосинтетическими реакциями в клетке, в которых могут участвовать промежуточные вещества фотосинтетического цикла восстановления углерода.

Энергия падающего света поглощается фотосинтезирующими пигментами в органеллах, называемых фоторецепторами (хлоропласты в высших растениях, пластиды в водорослях, хроматофоры в фотосинтезирующих бактериях). Преобладающим пигментом является хлорофилл; любой организм, способный осуществлять фотосинтез, содержит по меньшей мере одну разновидность хлоро-

филла. Зеленые растения, например, содержат хлорофилл *a* (**1а**), хлорофилл *b* (**1б**), а также хлорофиллы P700 и P670, которые, как полагают, весьма важны для фотосинтеза. В состав фотосинтезирующего аппарата могут входить и другие пигменты, играющие вторичную роль в акте фотосинтеза. Типичными примерами являются желто-бронзовые каротиноиды высших растений и сине-красные фикобилины фотосинтезирующих водорослей.



(**1а**) R = Me ; (**1б**) R = CHO

Процесс фотосинтеза может быть выражен суммарным уравнением (1), которое отражает тот хорошо известный факт, что для осуществления в растениях фотосинтеза необходима вода и что в качестве побочного продукта реакции выделяется кислород (из воды). В фотосинтезирующих бактериях кислород не образуется и используются другие доноры водорода [H_2X; например, H_2S или лактат $CH_3CH(OH)CO_2^-$; см. уравнение (2)). Хилл в 1937 г. и Арнон в 1954 г. показали, что образование NADPH и ATP, необходимых для связывания диоксида углерода, не зависит от их использования в фотосинтетическом цикле восстановления углерода. Эти наблюдения позволили формально разделить реакцию фотосинтеза на световую реакцию (образование NADPH и ATP) и темновую реакцию, в которой диоксид углерода превращается в углевод.

$$2H_2O + CO_2 \longrightarrow [CH_2O] + H_2O + O_2 \qquad (1)$$

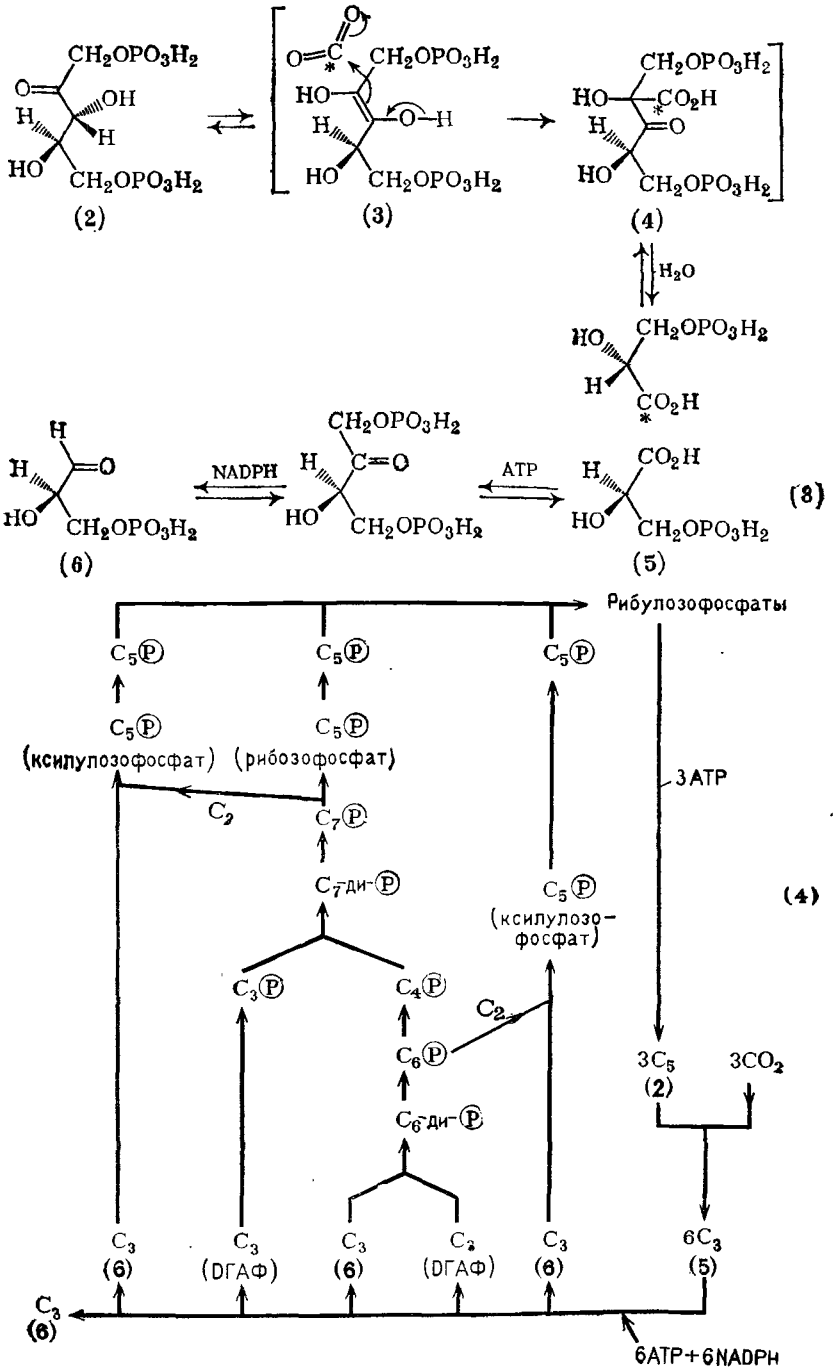
$$2H_2X + CO_2 \longrightarrow [CH_2O] + H_2O + 2X \qquad (2)$$

Хотя многие физико-химические детали световой реакции еще не выяснены, можно вкратце привести общую последовательность превращений. Первичная реакция заключается в возбуждении молекулы хлорофилла посредством захвата электрона и ее перевода на более высокий энергетический уровень. В конце концов

эта энергия возбуждения достигает реакционного центра, где она может быть использована для синтеза ATP из ADP или для восстановления NADP до NADPH (для восстановления каждой молекулы диоксида углерода требуется приблизительно три молекулы ATP и две молекулы NADPH). В суммарной реакции принимает участие вода (или H_2X) и выделяется кислород (или 2X).

Последовательность реакций, в которых диоксид углерода связывается в процессе фотосинтеза, была впервые предложена в 50-х годах Кальвином; ее часто называют циклом Кальвина или фотосинтетическим циклом восстановления углерода (см. схему 4). В отличие от световой реакции, свойственной только фотосинтезирующим тканям, синтез углеводов из диоксида углерода имеет много общего с реакциями, используемыми для синтеза углеводов в нефотосинтезирующих организмах. Тем не менее поражают масштабы этого процесса в зеленых растениях; по самым минимальным оценкам растения ежегодно связывают около $35 \cdot 10^{15}$ кг углерода, причем для получения каждого грамма связанного углерода растение должно переработать более 6250 л воздуха. Хотя 99 % диоксида углерода, усваиваемого растениями из воздуха, связывается в процессе фотосинтетических реакций на свету, существуют и процессы темнового карбоксилирования [2], отличающиеся высокой скоростью и вносящие значительный вклад в общее количество связываемого углерода некоторых растений, в особенности суккулентов (сем. *Crassulaceae*).

Ключевой первичной стадией является реакция, в процессе которой диоксид углерода входит в фотосинтетический цикл восстановления углерода путем карбоксилирования рибулозо-1,5-дифосфата (**2**); при этом, вероятно, образуется промежуточное соединение (**4**), которое гидролизуется далее до двух молекул 3-фосфоглицериновой кислоты (**5**). Катализирующий эту реакцию фермент (субстрат при этом находится, по-видимому, в енольной форме) — рибулозо-1,5-дифосфат-карбоксилаза (КФ 4.1.1.39) — был выделен и очищен [3]. Затем две молекулы 3-фосфоглицериновой кислоты (**5**) восстанавливаются до глицеральдегид-3-фосфата (**6**); этот процесс протекает в две стадии и требует участия NADPH и ATP (схема 3). Можно считать, что за один «оборот» цикла эти реакции карбоксилирования и восстановления происходят трижды, так что три молекулы рибулозо-1,5-дифосфата (**2**) карбоксилируются тремя молекулами CO_2, в результате чего образуются шесть молекул фосфорилированной триозы (**6**) (схема 4). Пять из этих шести молекул триозы претерпевают затем ряд реакций конденсации и молекулярного переноса; в конце концов образуются три молекулы рибулозо-1,5-дифосфата (**2**) — рецептора, связывающего диоксид углерода. Таким образом, с каждым новым циклом появляется одна «лишняя» молекула триозы; она может быть выведена из цикла в виде 3-фосфоглицериновой кислоты или какого-либо другого фосфорилированного углевода для хранения или для биосинтетических целей.



ДГАФ — дигидроксиацетонфосфат

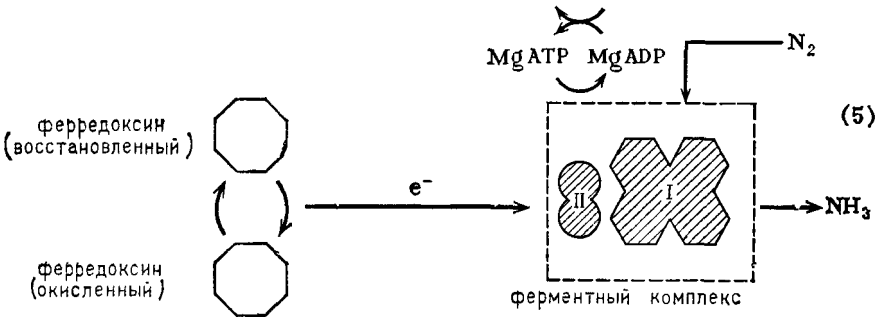
28.2.3. ФИКСАЦИЯ АЗОТА

Азот необходим для всех форм жизни, однако азот, находящийся в воздухе, инертен, и лишь небольшая группа организмов способна превращать молекулы азота в связанную форму (аммиак). В результате биологической фиксации связывается приблизительно две трети всего количества азота, что составляет около $178 \cdot 10^9$ кг в год. Кроме того, еще около половины такого количества азота связывается физическими и химическими методами. В результате ионизирующей радиации, сжигания топлива и электрических разрядов в атмосфере образуются оксиды азота, а способом Габера азот связывается в виде аммиака. Следует заметить, что из всех недавних примеров вмешательства человека в круговорот элементов в природе промышленное связывание азота для нужд сельского хозяйства по своему размаху намного превосходит все другие.

Биологическое связывание азота осуществляется определенными организмами (прокариотами) — бактериями и сине-зелеными водорослями. Связывающие азот бактерии могут быть свободно живущими или могут существовать в симбиотической связи с растениями. Из последней категории особенно важен род Rhizobium, который образует способные связывать азот клубеньки на корнях важных сельскохозяйственных бобовых культур (сои, клевера и люцерны). В этом симбиозе специфичностью обладают как растения, так и бактерии, хотя биохимическая основа их симбиотического взаимодействия не ясна. Считают, что бактерия содержит всю генетическую информацию, необходимую для синтеза фермента нитрогеназы, который катализирует процесс связывания азота. После того, как бактерии рода Rhizobium поселяются на корнях растения-хозяина, они вскоре превращаются в увеличенные клетки, не способные к репродукции (бактериоиды); заключенные в мембрану, они живут в цитоплазме клетки растения-хозяина.

Основной скачок в понимании биохимии и химии фиксации азота был сделан в 1960 г., когда из свободно живущих анаэробных бактерий *Clostridium pasteurianum* впервые был получен бесклеточный экстракт фермента нитрогеназы [4]. С тех пор этот фермент был выделен по меньшей мере из 16 других организмов и подробно исследован [5, 6]. Однако конкретный механизм восстановления и фиксации азота все еще остается загадкой. Нитрогеназа отличается чрезвычайно высокой чувствительностью по отношению к кислороду; ферментный комплекс состоит из двух компонентов: I — белок, содержащий молибден и железо (Mo-Fe-белок, молибдоферредоксин, или азофермо), и II — железосодержащий белок (Fe-белок, азоферредоксин, или азофер). Компонент I имеет молекулярную массу 200 000—230 000, содержит 15—30 атомов железа, приблизительно столько же неустойчивых в кислой среде атомов серы и два атома молибдена; по-видимому,

он построен из четырех субъединиц двух типов. Компонент II состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 55 000—60 000, содержит четыре атома железа и четыре лабильных в кислой среде атома серы. Для проявления нитрогеназной активности важны оба компонента; они образуют эквимолекулярный комплекс, представляющий собой собственно фермент. Современное состояние знаний о механизме его действия согласуется с гипотезой, согласно которой электроны переходят от внешнего восстановительного агента, например ферредоксина, к Fe-белку II, затем к Mo-Fe-белку I и, наконец, к субстрату, т. е. к азоту (схема 5). Как в промышленном способе Габера, так и при биологической фиксации азота расходуется очень много энергии (для переноса каждых двух электронов требуется не менее четырех молекул ATP). В случае нитрогеназы перенос энергии связан с гидролизом ATP до ADP. В виде магниевого комплекса ATP связывается с Fe-белком II, однако точное место и момент его связывания и гидролиза в последовательности реакций, ведущих к переносу электронов к азоту, неизвестны. Точно так же неизвестна и природа активного центра фермента; некоторые косвенные данные указывают на наличие в его составе атома металла (возможно, молибдена), но его роль пока не ясна.

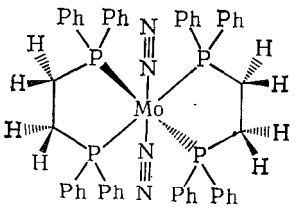


Ферментативная активность выделенной нитрогеназы может быть определена путем замены восстанавливаемого субстрата дитионитом натрия и использования в качестве источника ATP комплексной системы креатинфосфат — креатинкиназа — ADP. Фермент *in vitro* не отличается высокой специфичностью; установлено, что нитрогеназа восстанавливает ряд молекул и ионов, содержащих кратные связи: N_3^- ($\longrightarrow NH_3 + N_2$), N_2O ($\longrightarrow N_2 + H_2O$), MeCN ($\longrightarrow NH_3 + C_2H_6$ + другие продукты), MeNC ($\longrightarrow MeNH_2 + CH_4$ + другие продукты) и ацетилен ($\rightarrow C_2H_4$). Открытие способности нитрогеназы восстанавливать ацетилен до этилена послужило основой для создания очень чувствительного (в сочетании с газовой хроматографией) метода определения активности фермента *in vitro*. С точки зрения механизма действия фермента существенно, что ацетилен восстанавливается только до этилена, а в тяжелой воде — до *цис*-1,2-дидейтероэтилена [7].

В отсутствие субстрата бесклеточная ферментная система восстанавливает протоны до молекулярного водорода; эта реакция обычно сопровождает и восстановление азота. В обзорах [8] указывается, что выделение свободного водорода представляет собой общее явление, тесно связанное с фиксацией азота в клубеньковых азотфиксирующих симбионтах, и что обусловленные этим энергетические потери, сказывающиеся на процессе переноса электронов к азоту при посредстве нитрогеназы, могут серьезно снижать эффективность фиксации азота многими бобовыми растениями. Интересно, что монооксид углерода ингибирует все реакции нитрогеназы кроме образования водорода.

Механизм фиксации азота долгие годы был интригующей химической и биохимической проблемой отчасти из-за характерной химической инертности молекулы азота. Самая старая и самая общепринятая гипотеза была выдвинута Виландом еще в 1922 г.; согласно этой гипотезе, молекула азота восстанавливается в три стадии (схема 6). Однако в процессе восстановления азота не было обнаружено ни одно из предполагаемых промежуточных соединений (диимин и гидразин). Более того, диимин вообще не восстанавливается этим ферментом, хотя гидразин при действии нитрогеназы превращается в аммиак. В последние годы предпринимались попытки решить эту проблему с помощью химических исследований. Так, Чатт и сотр. [9] показали, что комплекс металл — азот типа $M(N_2)_2(PR_3)_4$ (где M = Mo или W) при обработке серной кислотой в метаноле образует аммиак с выходом до 90 %. Этим исследователям удалось, используя различные лиганды фосфиновой природы и различные кислоты, получить вольфрамовые и молибденовые комплексы, в состав которых входят содержащие азот лиганды (N_2H, N_2H_2 и N_2H_3), соответствующие различным стадиям восстановления азота. В аналогичных исследованиях Ван Тамелен и Брюле [10] нашли, что молибденовое комплексное соединение (7) при обработке бромоводородной кислотой в *N*-метилпирролидоне образует аммиак (0,36 моль на 1 моль комплекса).

$$N_2 \xrightarrow[2H^+]{2e^-} NH{=}NH \xrightarrow[2H^+]{2e^-} H_2N{-}NH_2 \xrightarrow[2H^+]{2e^-} 2NH_3 \qquad (6)$$



(7)

Другая система, моделирующая действие нитрогеназы в водной среде, разработана Шраузером и сотр. [11, 12]. Им удалось воспроизвести известные *in vitro* реакции изолированного фер-

мента в системе, состоящей из молибдата щелочного металла, содержащих серу лигандов, например *L*-цистеина, моделирующего ферредоксин соединения типа $[Fe_4S_4(SR)_4]^{2-}$ и восстанавливающего агента ($Na_2S_2O_4$ или $NaBH_4$). Изучение этих модельных систем позволило сформулировать гипотезу, согласно которой в активном центре фермента *in vitro* молекула азота образует необычный лабильный комплекс с молибденом, в котором связь N—Mo осуществляется лишь одним из двух атомов молекулы N_2 таким образом, что атомы молибдена и оба атома азота лежат на одной прямой («боковая связь»). Далее молекула азота подвергается *цис*-восстановлению (аналогично восстановлению ацетилена) до диимина. Затем диимин диссоциирует на азот, водород и гидразин, восстанавливаемый ферментом до аммиака.

Аммиак, хотя и является продуктом биологической фиксации азота, не накапливается в организмах, способных выполнять этот процесс. Если азотфиксирующий организм связан с высшим растением, аммиак может храниться в виде аминокислот аспарагина и глутамина. В других случаях связанный азот в виде аммиака выделяется в окружающую среду, где его могут непосредственно использовать другие организмы, не способные к самостоятельной фиксации азота. Аммиак может быть также подвергнут процессу нитрификации, в котором нитрифицирующие бактерии окисляют его до нитрат-иона (схема 7).

$$NH_3 \xrightarrow{\text{Nitrosomonas spp.}} NO_2^- \xrightarrow{\text{Nitrobacter spp.}} NO_3^- \qquad (7)$$

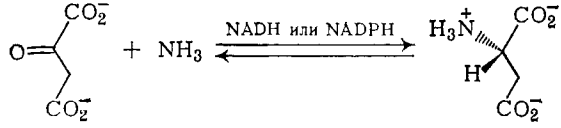
Подавляющая часть азота в почве находится в виде нитрата; растения и почвенные организмы обычно усваивают нитрат путем его восстановления до аммиака с помощью ферментов нитратредуктазы (*1*), нитритредуктазы (*2*), гипонитритредуктазы (*3*) и гидроксиламинредуктазы (*4*) (схема 8).

$$NO_3^- \xrightarrow{1} NO_2^- \xrightarrow{2} N_2O_2^{2-} \xrightarrow{3} NH_2OH \xrightarrow{4} NH_3 \qquad (8)$$

Некоторые микроорганизмы, например *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*, используют нитрат-ион вместо кислорода в качестве конечного акцептора электронов и таким образом восстанавливают нитрат до аммиака в процессе, называемом нитратным дыханием. Ряд бактерий в результате нитратного дыхания восстанавливает нитрат не до аммиака, а до азота, который возвращается в атмосферу.

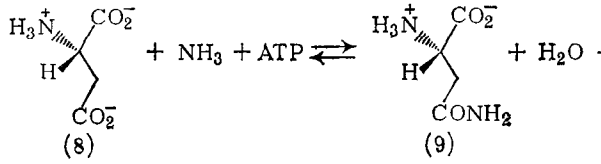
Существуют три основные реакции, с помощью которых в природе аммиак внедряется в органические молекулы (схемы 9—11). Во многих организмах единственной реакцией, позволяющей перейти от неорганического азота к α-аминогруппе аминокислоты, является восстановительное аминирование α-кетоглутарата, в результате которого образуется *L*-глутаминовая кислота (8) (схема 9). Впоследствии аминогруппа *L*-глутаминовой кислоты может использоваться для создания аминогрупп других аминокислот

с помощью реакции переаминирования, в которой кофактором служит пиридоксальфосфат.

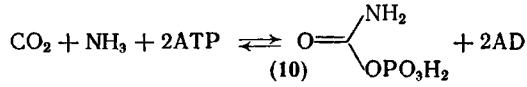


(8) (9)

Аминокислота *L*-глутамин (9) является хранилищем и донором аминогрупп и одновременно средством транспорта аммиака внутри клетки. Синтез *L*-глутамина из *L*-глутаминовой кислоты (8) представляет собой второй основной путь фиксации аммиака в органических молекулах (схема 10). В третьей реакции фиксации аммиака из диоксида углерода, аммиака и АТР образуется карбамоилфосфат (10) (схема 11; Pi — неорганический фосфат); он является промежуточным соединением в синтезе мочевины и пиримидинов.



(8) (9) (10)



(10) (11)

Эти три реакции представляют собой основные способы удовлетворения потребности в азоте для биосинтетических реакций, протекающих в различных организмах.

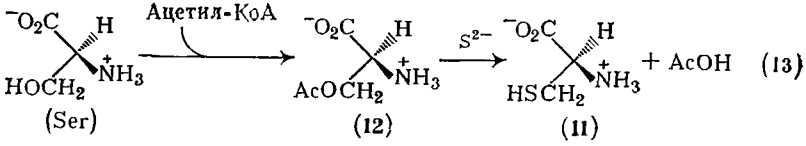
28.2.4. ЦИКЛ СЕРЫ

Сера входит в состав многих важных природных соединений, поэтому здесь уместно вкратце рассмотреть пути включения этого элемента в общий метаболизм. В неорганическом мире атомы серы существуют в различных состояниях, отличающихся степенью окисления. Прежде чем войти в состав органических молекул, они должны быть восстановлены до сульфида (S^{2-}). Многие микроорганизмы и высшие растения способны использовать в качестве источника серы сульфат-ион; этот ион восстанавливается до сульфид-иона в последовательности реакций (схема 12), аналогичных тем, которые обеспечивают усвоение нитрат-иона (см. схему 8). У некоторых анаэробных бактерий сульфат может служить конечным окислителем; в этом случае перенос электронов также обеспечивает ступенчатое восстановление до сульфида.

$$SO_4^{2-} \longrightarrow SO_3^{2-} \longrightarrow S^{2-} \qquad (12)$$

При высвобождении серы из органических молекул, например при разложении органического вещества, она может быть снова окислена почвенными микроорганизмами до сульфат-иона.

Основной путь ассимиляции серы до органических соединений пролегает через синтез аминокислот — цистеина (11), гомоцистеина и метионина. Акцептором сульфид-иона является *O*-ацетилсерин (12); растения и микроорганизмы связывают сульфид путем реакции с *O*-ацетилсерином, в результате которой образуется цистеин (схема 13).



28.2.5. ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ И БИОСИНТЕЗ

Углеводы пентозофосфатного цикла — триозофосфаты, например соединение (6), и 3-фосфоглицериновая кислота (5) — являются не только важными промежуточными соединениями в фотосинтетическом связывании диоксида углерода, но и ключевыми соединениями в промежуточном метаболизме углеводов во всех организмах. Метаболизм глюкозы и других углеводов осуществляется по хорошо известному гликолитическому пути; они участвуют также в цикле трикарбоновых кислот; таким путем происходит превращение большей части углеводов в большинстве организмов. Альтернативным путем окисления углеводов, в количественном отношении, правда, менее важном, чем гликолиз и цикл трикарбоновых кислот, является пентозофосфатный путь. Его важность для организмов определяется тем обстоятельством, что он служит источником NADPH и пентозофосфатов. Ключевой стадией в этом процессе является окисление *D*-глюкозо-6-фосфата через промежуточно образующийся *D*-глюконолактон-6-фосфат до *D*-рибулозо-5-фосфата; при этом образуется также ADPH. Пентозофосфат затем превращается в фосфаты других сахаров, например *D*-фруктозо-6-фосфат и *D*-глицеральдегид-3-фосфат, которые затем включаются в метаболизм по гликолитическому пути, а также в *D*-эритрозо-4-фосфат, который наряду с фосфоенолпируватом является исходным соединением в биосинтезе ароматических аминокислот через шикимовую кислоту.

Эти метаболические пути служат, с одной стороны, способом расщепления соединений углерода до более простых соединений с выделением энергии, а с другой — источником промежуточных веществ, используемых в процессах биосинтеза. Например, в цикле трикарбоновых кислот происходит окисление любых источников углерода, будь то углеводы, белки или липиды, до диоксида углерода; но многие промежуточные соединения в цикле окисления одновременно являются предшественниками первичных и вторичных

компонентов клетки. Так, например, оксалоацетат и α-кетоглутарат соответственно обеспечивают синтез аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также других аминокислот, которые в свою очередь синтезируются из них. Аналогично, сукцинилкофермент А представляет собой промежуточное соединение в синтезе кольцевых систем порфиринов и корринов. Точно таким же образом 3-фосфоглицериновая кислота, пировиноградная кислота и фосфоенолпируват являются исходными соединениями для синтеза аминокислот и других соединений. Однако первое место среди всех промежуточных соединений промежуточного метаболизма следует по праву отдать ацетилкоферменту А, который является как полупродуктом, так и исходным соединением во многих биосинтетических процессах.

Подробнее детали различных биосинтетических процессов, ведущих ко многим первичным метаболитам типа аминокислот, пуринов и пиримидинов, описаны в пособиях по биохимии. Целью последующего обсуждения является прежде всего систематизация собранной в течение последней четверти столетия информации о путях биосинтеза некоторых более сложных природных молекул, таких, как стероиды, гем, хлорофилл и витамин B_{12}, биологические функции которых частично или полностью известны. Другой целью является описание путей биосинтеза, которые природа избрала для создания колоссального изобилия вторичных метаболитов типа поликетидов, алкалоидов, фенолов, хинонов и различных микробных антибиотиков. Химики-органики приложили немало усилий для расшифровки запутанных деталей многих из этих процессов, не только выяснив отдельные стадии биосинтеза, но и определив роль ферментов в тончайших стереохимических аспектах биосинтетических реакций. В последующих главах эти и другие пути биосинтеза будут рассмотрены более детально.

ЛИТЕРАТУРА

1. *M. Calvin and J. A. Bassham*, 'The Photosynthesis of Carbon Compounds', Benjamin, New York, 1962.
2. *D. A Walker*, Endeavour, 1966, 25, 21.
3. *J. R. Quayle, R. C. Fuller, A. A. Benson, and M. Calvin*, J. Amer. Chem. Soc., 1954, 76, 3610; *A. Weissbach, G. L. Horecker, and J. Hurwitz*, J. Biol. Chem., 1956, 218, 795; *J. Mayaudon, A. A. Benson, and M. Calvin*, Biochim. Biophys. Acta, 1957, 23, 342.
4. *J. E. Carnaham, L. E. Mortenson, H. F. Mower, and J. E. Castle*, Biochim. Biophys. Acta, 1960, 38, 188.
5. *J. R. Postgate*, 'The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation', Plenum, London, 1971.
6. *D Kleimer*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1975, 14, 80; *H. C. Winter and R. H. Burris*, Ann. Rev. Biochem., 1975, 45, 409.
7. *M. J. Dilworth*, Biochim Biophys. Acta, 1966, 127, 285.
8. *K. R. Schubert and H. J. Evans*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1976, 73, 1207.
9. *J. Chatt, A. J. Pearman, and R. L. Richards*, Nature, 1975, 253, 39 .
10. *E. E. van Tamelen and C. R. Brulet*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, 97, 911.
11. *G. N. Schrauzer*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1975, 14, 514.
12. *E. L. Moorehead, P. R. Robinson, T. M. Vickrey, and G. N. Schrauzer*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, 98, 6555; 1975, 97, 7069.

ЧАСТЬ 29

АЦЕТАТНЫЕ ПУТИ БИОСИНТЕЗА

29.1. БИОСИНТЕЗ ПОЛИКЕТИДОВ

ДЖ. Д. БЮЛОК (University of Manchester)

29.1.1. ВВЕДЕНИЕ

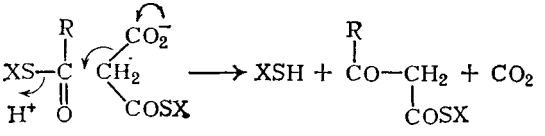
Поликетиды представляют собой класс природных соединений, по своему разнообразию превосходящий даже класс изопреноидов. Подобно изопреноидам, поликетиды выделены в отдельную группу на основе сравнительного структурного анализа природных соединений [1]. Однако в отличие от изопреноидов изучение поликетидов было начато в то время, когда уже появились методы, позволяющие довольно быстро осуществить экспериментальную проверку той или иной биосинтетической гипотезы. История этого вопроса хорошо освещена Берчем [2], школа которого внесла особенно большой вклад в изучение поликетидов. Биосинтез поликетидов рассматривается в большинстве общих обзоров по биосинтезу природных соединений [3—7], а последние достижения в этой области регулярно обобщаются как для всего этого класса соединений [8], так и для отдельных групп поликетидов [9].

29.1.1.1. Что такое поликетиды?

В широком смысле слова к поликетидам относятся соединения, построенные целиком или частично, формально или буквально, из поли-β-кетометиленовых цепей —$[CHRCO]_n$—, где n может достигать значения 19—20 (в макролидных антибиотиках), но чаще всего колеблется в пределах 4—8, а R часто, но не обязательно, является атомом водорода. Эти субъединицы поликетидной цепи часто называют так, как если бы они были производными соответствующих простых алифатических кислот [ацетат (—CH_2CO—), пропионат (—CHMeCO—), бутират (—CHEtCO—) и т. п.] или малоновых кислот (малонат, метилмалонат и т. д.), что точнее отражает природу реальных промежуточных продуктов биосинтеза (см. ниже). Поликетиды нередко характеризуют также как «соединения, образуемые из ацетата», или, что совсем неудачно, как «ацетогенины»; оба эти определения некорректны и к тому

же неэквивалентны. Основной процесс сборки поликетидов осуществляется посредством реакции ацилирования; в этом поликетиды существенно отличаются от изопреноидов, хотя главным предшественником последних также является ацетил-КоА. Поликетидный скелет образуется из кетометиленовой цепи чаще всего посредством ее циклизации по типу альдольной конденсации или конденсации Клайзена, путем перегруппировок и расщепления кольцевой системы, а также с помощью ряда дополнительных процессов, в ходе которых могут отщепляться или присоединяться атомы углерода, вводиться новые функциональные группы.

Многие природные поликетиды, бесспорно, могут быть названы «полностью ацетатными производными». Действительно, их поли-β-кетометиленовая цепь строится (см. разд. 29.1.2) из «стартового звена» одной молекулы ацетил-КоА и нескольких (обычно от 3 до 7) молекул малонил-КоА, также образующегося из ацетил-КоА (см. разд. 29.1.1.3), которые присоединяются к цепи посредством ступенчатой конденсации с одновременным декарбоксилированием (схема 1).



(1)

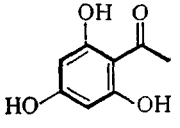
В общем случае, однако, стартовое ацильное звено может вводиться любым из многочисленных ацил-КоА, являющихся производными жирных кислот вплоть до C_{18}, бензойной, коричной, никотиновой и других кислот. Диапазон «малонильных» звеньев менее разнообразен, однако в некоторых классах природных соединений метилмалонильные («пропионатные») звенья встречаются достаточно часто; известны и «бутиратные» звенья, предшественником которых является, возможно, этилмалонил-КоА.

Если все собранные в цепь кетометиленовые звенья полностью восстановлены (восстановление обычно происходит в процессе сборки цепи), то образующийся поликетид представляет собой, естественно, жирную кислоту. Существует множество природных соединений промежуточных типов, в которых ряд звеньев частично восстановлен или же полностью восстановлено только ограниченное число звеньев, поэтому выделение жирных кислот из класса поликетидов нецелесообразно. Хотя проблема биосинтеза жирных кислот вполне заслуживает отдельного детального анализа (см. разд. 25.1.5), ее нельзя не затронуть и в этой главе.

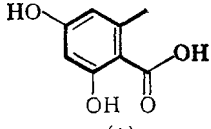
На основной биосинтетический процесс помимо восстановления могут накладываться вторичные трансформации кетометиленовой системы; сюда относятся реакции алкилирования, особенно *C*-метилирования и *C*-пренилирования, другие реакции замещения (электрофильные). Образовавшиеся таким путем соединения могут

подвергаться разнообразным циклизациям, а также претерпевать более или менее существенные последующие трансформации. Таким образом, биосинтез поликетидов приводит к колоссальному множеству природных соединений самых разнообразных структур. Это видно даже на примере совсем небольших поликетидов (**1**) — (**13**), являющихся тетракетидами, т. е. соединениями, построенными из четырех ацильных звеньев. Некоторые из приведенных здесь примеров подробнее рассмотрены в последующих разделах.

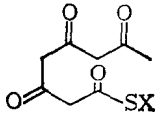
Как производное ацетофенона (**1**), так и орселлиновая кислота (**2**) образуются из одной молекулы ацетил-КоА и трех молекул малонил-КоА (поликетидная цепь выделена жирной линией). Как показано в формулах (**1а**) и (**2а**), их образование обусловлено различными механизмами циклизации 3,5,7-трикетооктаноил-КоА (или его биосинтетического эквивалента). Согласно принятой терминологии, первый механизм циклизации, происходящий с участием концевой ацильной группы, называют «клайзеновским», а второй — «альдольным». Среди различных природных гомологов орселлиновой кислоты соединение (**3**) образуется при замене стартового ацетил-КоА на пропионил-КоА, а (**4**) — в результате *C*-метилирования, предшествующего циклизации. Поскольку такое *C*-метилирование осуществляется путем электрофильной атаки (*S*-аденозилметионином, см. разд. 29.1.2.2), оно захватывает те же атомы углерода образовавшейся из ацетата цепи, которые несли бы метильные группы, если бы в цепь включалось звено метилмалонил-КоА («пропионатное»). Следовательно, методами структурного анализа в принципе невозможно различить эти два пути биосинтеза; задача может быть решена только экспериментально, например, посредством изучения включения альтернативных предшественников. Другим наглядным примером является флаванон (**5**) — исходное соединение для весьма многочисленного класса фенолов растительного происхождения; он образуется в результате конденсации *n*-кумарил-КоА с тремя молекулами малонил-КоА и последующей «клайзеновской» циклизации.



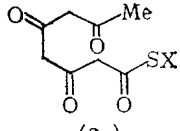
(1)



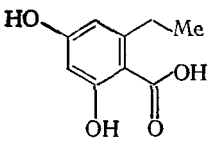
(2)



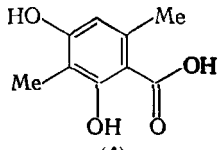
(1a)



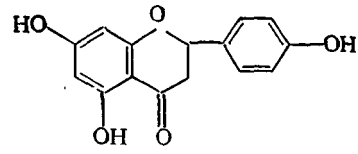
(2a)



(3)

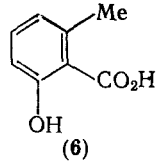


(4)

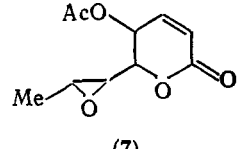


(5)

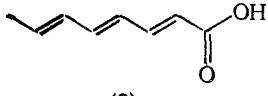
Широко распространенный продукт метаболизма грибов 6-метилсалициловая кислота (6) образуется тем же путем, что и соединение (2), однако добавляется стадия восстановления, осуществляющаяся в определенном месте цепи до ее циклизации. В асперлине (7) то же самое промежуточное соединение подвергается более глубокому восстановлению до октатриеновой кислоты (8), циклизация которой, естественно, происходит другим путем. Понятно, что полное восстановление приводит к октановой кислоте (9), а из гомологичного соединения, построенного из трех остатков метилмалонил-КоА, образуется 2,4,6-триметилоктановая кислота (10). В радицинине (11) только часть молекулы (показанная жирной линией) получается в процессе сборки тетракетида, а остальная часть возникает в результате присоединения ацетоацетильного остатка. Стипитатовая кислота (12), являющаяся производным трополона, образуется из гомолога орселлиновой кислоты (4), а енол-лактон патулин (13) является метаболитом 6-метилсалициловой кислоты. Два последних примера показывают, как далеко заходят трансформации скелета в поликетидах.



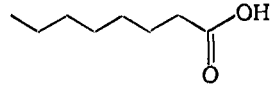
(6)



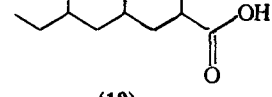
(7)



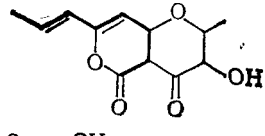
(8)



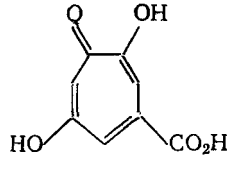
(9)



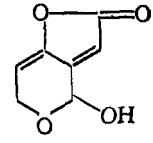
(10)



(11)



(12)



(13)

Поликетиды широко распространены в природе. Обычные жирные кислоты являются практически универсальными необходимыми компонентами любой клетки и обладают способностью накапливаться в ней. В то же время специфические жирные кислоты и такие стоящие особняком поликетиды, как полиацетилены (см. разд. 25.1.2.6), будучи «вторичными метаболитами», аккумулируются более селективно некоторыми семействами растений и микроорганизмов. К вторичным метаболитам относятся и почти все другие поликетиды; из огромного разнообразия структур каждая обычно имеет сравнительно ограниченную область распространения. Поликетиды встречаются весьма редко у позвоночных, но иногда обнаруживаются у насекомых, особенно в виде различных феромонов, и в виде ряда пигментов — производных полициклических ароматических поликетидов.

Флавоноиды и родственные циннамоилтетракетиды распространены во всех высших растениях, лишайниках и даже некоторых грибах. Между прочим, таксономическое деление высших растений в большей степени основывается на отдельных деталях суммарной картины биогенеза флавоноидов, чем на путях биосинтеза более важных групп природных соединений; однако некоторые типы поликетидов из растений характеризуются очень узкой сферой распространения. Стартовые звенья в растительных поликетидах необычно разнообразны; возможно, это обусловлено тем, что в растениях наряду с «ацетильным» звеном широко распространены «циннамоильные» звенья. Большое число самых различных классических ацетатных поликетидов содержится в грибах, особенно в аксомицетах и родственных несовершенных грибах [4]. В нитевидных актиномицетовых бактериях также содержится множество длинноцепочечных поликетидов, в частности поликетидов с частично восстановленными цепями, построенными из звеньев пропионил- и метилмалонил-КоА, как в различных макролидных антибиотиках (см. разд. 29.1.4.2). В других, «истинных» бактериях поликетиды распространены в значительно меньшей степени.

В общем случае относительная важность поликетидов для различных типов организмов отчасти отражает относительную важность соответствующих видов ацил-КоА в их общем метаболизме. Например, распространенность различных ароматических поликетидов в высших растениях является следствием важности биосинтеза ароматических кислот как звена, соединяющего процессы фотосинтеза и лигнификации; наличие в грибах ацетатных поликетидов отражает важность ацетил-КоА как регулятора их метаболической реакции на изменения окружающей среды; преобладание «пропионатных» поликетидов в актиномицетах, вероятно, связано с аналогичными специфическими процессами в их еще мало изученном промежуточном метаболизме. Синтез поликетидов часто отражает степень использования организмом вторичного метаболизма как одного из механизмов регуляции его отношений со средой. В то же время под влиянием естественного отбора эти вторич-

ные продукты метаболизма приобрели определенное значение как факторы адаптации вида в биологическом мире. В общей физиологии организмов и в сложных процессах взаимодействия между растениями и насекомыми важную роль играют не только уже упоминавшиеся поликетиды насекомых, но и все изобилие растительных флавоноидов и других фенольных соединений. Отдельные поликетиды микробного происхождения важны как антибиотики, токсины и т. д.; эволюционная «полезность» таких свойств, конечно, сомнительна. В то же время надежно установлено использование поликетидов в качестве структурных или светопоглощающих компонентов репродуцирующих структур, образующихся в микроорганизмах из растительных клеток.

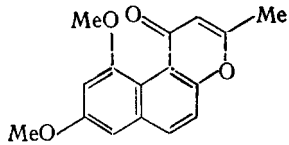
29.1.1.2. История исследования поликетидов

Предположение об образовании жирных кислот из ацетатных цепей было основано на том, что их цепи состоят преимущественно из четного числа атомов углерода, а также на результатах ранних работ по их метаболическому расщеплению путем β-окисления. С химической точки зрения этот процесс заключается в окислении кислот до β-кетоацильных производных, от которых «ацетат» отщепляется по реакции, обратной конденсации Клайзена; при этом получается более короткая цепь, и затем весь процесс может быть повторен. С точки зрения химика эти реакции потенциально обратимы и в обращенном виде в принципе могут быть процессом биосинтеза. В действительности биосинтез редко осуществляется путем, в точности обратным пути катаболизма. Тем не менее заключение о возможности синтеза жиров из ацетата было полезным предположением, принципиальная справедливость которого была доказана в одних из самых первых экспериментов с мечеными соединениями-предшественниками [10]; различие между путями синтеза и деградации выяснилось значительно позже.

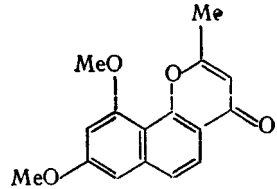
Впервые существование поликетидов как обширного класса природных соединений было постулировано Колли в 1907 г. на основе изучения реакций, в которых *in vitro* из поли-β-кетоацильных производных образовывались ароматические соединения, в частности орселлиновая кислота (**2**); им же предложено название «поликетиды». Однако в то время были известны структуры слишком малого числа природных соединений, и провести обоснованное сравнительное изучение не представлялось возможным; поэтому гипотеза Колли практически не разрабатывалась до тех пор, пока она не была независимо сформулирована Берчем в 1952—1953 гг. [1, 2]. В это время стало возможным сравнение структур большого числа самых разнообразных природных фенольных соединений; таким путем было показано, что характерные для них углеродные скелеты могут быть схематически изображены в виде определенным образом изогнутых линейных цепей, построенных из C_2-звеньев таким образом, что в них окислены чередующиеся атомы углерода. После этого в свете уже известных данных

о биосинтезе жирных кислот была сформулирована «ацетатная гипотеза», гласящая, что такого рода структуры образуются из линейных цепей «ацетатных» звеньев, подобных тем, которые используются для построения жирных кислот, но отличающихся от последних тем, что в их молекулах еще сохраняются атомы кислорода первоначальных продуктов конденсации по Клайзену; эти атомы кислорода обеспечивают возможность циклизаций, в результате которых образуются фенольные соединения, содержащие чередующиеся окисленные и неокисленные атомы углерода.

Первым испытанием ацетатной гипотезы была проверка сделанных на ее основе предсказаний. Например, предложенное ранее для элеутеринола строение (14) было исправлено на структуру (15), поскольку только последняя может быть построена, как того требует гипотеза, из одной неразветвленной цепи с попеременно окисленными атомами углерода. Вскоре были проведены первые эксперименты по изучению включения меченых предшественников (см. разд. 29.1.5.2) [11], и ацетатная гипотеза получила значительно более широкое признание; более того, она стала играть существенную роль в выяснении путей биосинтеза природных соединений.



(14)



(15)

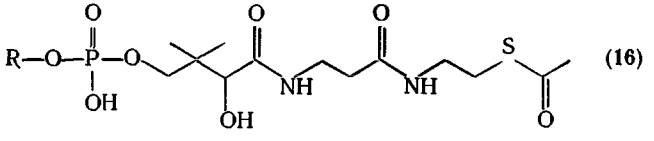
В последующие годы изучение биосинтеза с помощью меченых соединений, проводившееся большей частью (но не исключительно) на микроорганизмах, позволило собрать основную массу данных по биосинтезу поликетидов. Почти все приведенные в данном обзоре примеры изучены экспериментально; в настоящее время применение соответствующих меченых соединений и современной техники эксперимента (см. разд. 29.1.5) дает возможность изучать процесс биосинтеза все более детально. Дополнительные сведения дает исследование сопутствующих и обычно структурно близких метаболитов (кометаболитов) и, в известной степени, кинетики их взаимопревращений. В то же время биохимический подход с применением соответствующих методов экспериментальной энзимологии только начал давать ощутимые результаты на очень ограниченном числе объектов (за исключением специфического случая жирных кислот).

29.1.1.3. Поликетидные звенья

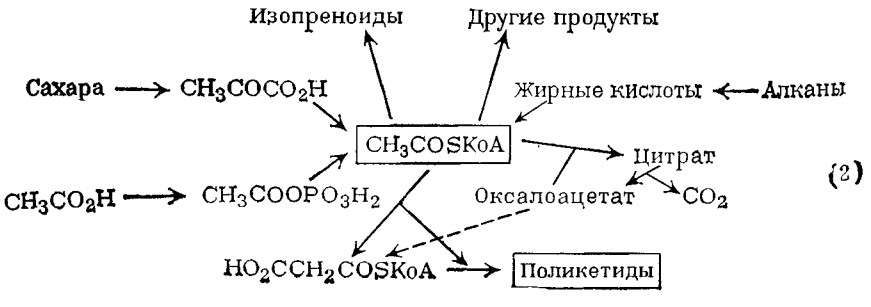
Успех большинства экспериментов с мечеными соединениями зависит от эффективности включения этих соединений в эндогенный метаболически активный предшественник (и часто предполагает

такую эффективность); поэтому сведения о биохимической природе и происхождении предшественников, использующихся в биосинтезе поликетидов, важны как в качестве исходной информации, так и для объяснения полученных экспериментальных данных.

Ключевым промежуточным метаболитом в большинстве организмов (см. разд. 28.2.4) является ацетил-КоА (16; R = 3′-фосфоаденозилфосфатил) (см. разд. 24.3). Некоторые из наиболее важных путей образования ацетил-КоА и способы его дальнейших превращений показаны на схеме (2). Ацетил-КоА образуется в процессе метаболизма сахаров путем окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты; он является также конечным продуктом β-окисления углеводородов или жирных кислот при их использовании в качестве источников энергии и углерода. В экспериментах с мечеными соединениями на интактных организмах ацетил-КоА обычно легко образуется из внешнего ацетата путем ATP-зависимой «активации». В аэробном метаболизме большая часть ацетил-КоА далее конденсируется с оксалоацетатом, образуя лимонную кислоту и таким образом включаясь в окислительный цикл трикарбоновых кислот (и в «обходный» глиоксилатный цикл). Специфика механизма отдельных стадий цикла трикарбоновых кислот такова, что метка из [2-^{14}C]ацетата обычно в значительной степени переходит на C-1 ацетатного звена, и его превращение в CO_2 соответственно замедляется. В случае (1-^{14}C)-ацетата в нормальном цикле метка или сохраняется при C-1 ацетатного звена, или теряется в виде CO_2, поэтому он является более специфичным, но в целом менее «эффективным» предшественником. Влияние этих метаболических процессов уменьшается при увеличении количества добавляемой «метки» (при таких обстоятельствах этот термин, в сущности, уже неприменим); такая ситуация часто возникает при работе с тяжелыми изотопами (см. разд. 29.1.5).



(16)



(2)

Будучи тиоэфиром, ацетил-КоА значительно более реакционноспособен, чем ацетат-ион, в особенности как электрофильный ацилирующий агент; поэтому он является исходной точкой ряда путей биосинтеза, ведущих не только к различным поликетидам, но и к терпеноидам (см. разд. 28.2.4). В реальных реакциях построения поликетидной цепи участвует не кофермент А, а его «макромолекулярный эквивалент» — ацилпереносящий белок (АПБ) [ацетил-АПБ (16; R = белок, связанный с коферментом через остаток серина)]; в некоторых энзимологических исследованиях кофермент А может быть с успехом заменен на более простой тиол, например, цистеинамин (β-аминоэтантиол) или его *N*-ацетильное производное.

Обычно считают, что малонил-КоА, другой предшественник «ацетатных» поликетидов, образуется путем биотинзависимого карбоксилирования ацетил-КоА в присутствии АТР (см. схему 2). Обратная реакция декарбоксилирования осуществляется очень легко *in vivo*, поэтому в общем случае количество имеющегося малонил-КоА может быть фактором, лимитирующим скорость синтеза поликетидов. Это действительно наблюдается в большинстве природных систем, в которых происходит синтез жирных кислот и в которых регуляторные эффекты с участием карбоксилазы (например, ее активация лимонной кислотой) имеют решающее значение. В процессе образования поликетидов свободная карбоксильная группа малонил-КоА теряется; по этой причине интерпретация результатов простых экспериментов с мечеными соединениями не дает прямого ответа на вопрос о действительном источнике малонил-КоА. Не вызывает сомнения, что в последний легко переходит метка из ацетил-КоА и что прямое карбоксилирование широко распространено. В то же время известно, что в растениях свободная малоновая кислота образуется путем декарбоксилирования щавелевоуксусной кислоты; похожий путь, вероятно, доминирует при образовании малонильных звеньев малонилглюкана одного из штаммов *Penicillium* [12]. При биосинтезе тетрациклинов в *Streptomyces aureofaciens* скорость процесса определяется скорее активностью ферментов, производящих малонил-КоА из оксалоацетата, чем непосредственным карбоксилированием ацетил-КоА [13]. Следовательно, представление о том, что малонил-КоА всегда образуется только путем карбоксилирования, не подтверждается; этот аспект биосинтеза поликетидов нуждается в дальнейшем изучении. Для экспериментов с мечеными соединениями часто удобнее использовать не малоновую кислоту, а ее диэтиловый эфир, поскольку эфир, будучи менее полярным, легче проникает в различные клетки; образовавшаяся после гидролиза диэтилмалоната малоновая кислота, как и уксусная кислота, активируется при участии АТР. При изучении поликетидов, построенных из ацетатно-малонатных субъединиц, следует помнить, что фонд промежуточных соединений, лежащих на пути взаимопревращений ацетил-КоА и малонил-КоА, не так уж мал, чтобы во всех случаях считать эти две молекулы метаболически эквивалентными.

Так, при добавлении небольшого количества меченого ацетата метка часто преимущественно накапливается в стартовом звене ацетил-КоА. В других экспериментах меченый малонат в результате декарбоксилирования в значительном количестве вводит метку в стартовое звено, а в особо неблагоприятных случаях метка может распределиться равномерно по всем звеньям. В лаборатории автора данного обзора было показано, например, что добавление [1-^{14}C]ацетата к культуре *Penicillium urticae* приводит к преимущественному (превышение на 5 %) включению метки в стартовое звено 6-метилсалициловой кислоты (**6**), образующейся из ацетил-КоА; в то же время в сравнимых условиях из [2-^{14}C]малоната в стартовое звено перешло приблизительно 25 % активности, найденной в каждом из звеньев, которые образуются из малонил-КоА.

Происхождение пропионил-КоА и метилмалонил-КоА, участвующих в синтезе других поликетидов, изучено в меньшей степени, поскольку они играют важную роль главным образом в бактериях актиномицетах, изучению обмена веществ у которых посвящено очень мало работ. В некоторых случаях, в частности, в анаэробных бактериях, пропионовая кислота может образовываться из сахаров по пируватному или лактатному пути, однако в общем случае более важен другой процесс — B_{12}-зависимая изомеризация сукцинил-КоА, являющегося промежуточным соединением в цикле трикарбоновых кислот. В результате этого процесса образуется метилмалонил-КоА, декарбоксилирование которого приводит к пропионил-КоА. Таким образом, если рассматривать порядок их образования, то здесь ситуация прямо противоположна той, которая имеет место в случае ацетил- и малонил-КоА, хотя метилмалонил-КоА может быть синтезирован и путем карбоксилирования пропионил-КоА. Тем не менее пропионовая кислота является эффективным средством введения метки в звенья, образовавшиеся как из пропионил-, так и из метилмалонил-КоА.

При биосинтезе растительных поликетидов с различными стартовыми замещенными циннамоил-КоА исходная коричная кислота образуется из фенилаланина путем элиминирования аммиака под действием лиазы. Окисление бензольного кольца обычно происходит после этой стадии. Таким образом, свободные кислоты *in vivo* являются нормальными предшественниками; обязательной стадией процесса является их «активация» до соответствующих ацил-КоА, которая во многих важных случаях может определять скорость всего процесса биосинтеза. В синтезе поликетидов иногда участвуют и другие типы ацил-КоА, обычно также образующиеся из свободных кислот; природа их очень разнообразна, поэтому в данном обзоре рассмотреть их невозможно.

29.1.2. ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОСИНТЕЗА ПОЛИКЕТИДОВ

Наши знания о биосинтезе большинства природных поликетидов получены главным образом путем изучения включения меченых предшественников в экспериментах на интактных клетках.

Именно так были получены результаты, позволившие сформулировать некоторые общие принципы биосинтеза поликетидов, которые можно проиллюстрировать на примере уже упоминавшихся тетракетидов (1)—(13).

а) Биосинтез поликетидов подразделяется на процесс основной сборки, в которой соединяются ацильные и малонильные звенья и образуется устойчивая небольшая молекула [например, орселлиновая кислота (2) из одного остатка ацетил-КоА и трех остатков малонил-КоА], и процессы последующей модификации [например, (4)→(12) или (6)→(13)].

(б) Радиоактивная метка из исходных ацил-КоА или малонил-КоА обычно легко включается в собранный из них скелет «конечного» (т. е. изучаемого) соединения. Однако «свободные» меченые соединения, соответствующие промежуточным этапам сборки углеродного скелета, не способны к такому включению. Например, ацетоацетил-КоА и бутирил-КоА не включаются в соединения (2) и (9), соответственно. Напротив, продукты процесса модификации доступны для метки; например, метка из поликетида (6) переходит в соединение (13).

(в) В конечном продукте сборки удельная радиоактивность последовательно вошедших в него малонатных звеньев обычно одинакова, т. е. степень разбавления введенной метки для всех малонатных звеньев одна и та же. Это означает, что фонд образующихся в процессе сборки промежуточных продуктов в организме невелик. Точнее говоря, величина этого фонда определяется концентрацией нужных ферментов в системе, а не концентрацией соответствующих им субстратов.

(г) Процесс сборки основного скелета «запрограммирован» в организме таким образом, что на него накладываются и другие превращения, обусловливающие вариации биосинтетического пути. Так, различные реакционные конформации одного и того же тетракетида, отражающие присущие системам сборки особенности, приводят к образованию либо соединения (1), либо (2). Более того, «отсутствующая» OH-группа в (6) и «дополнительная» CH_3-группа в (4) образуются в результате реакций, протекающих в ходе процесса сборки, а не путем трансформации образовавшегося (2).

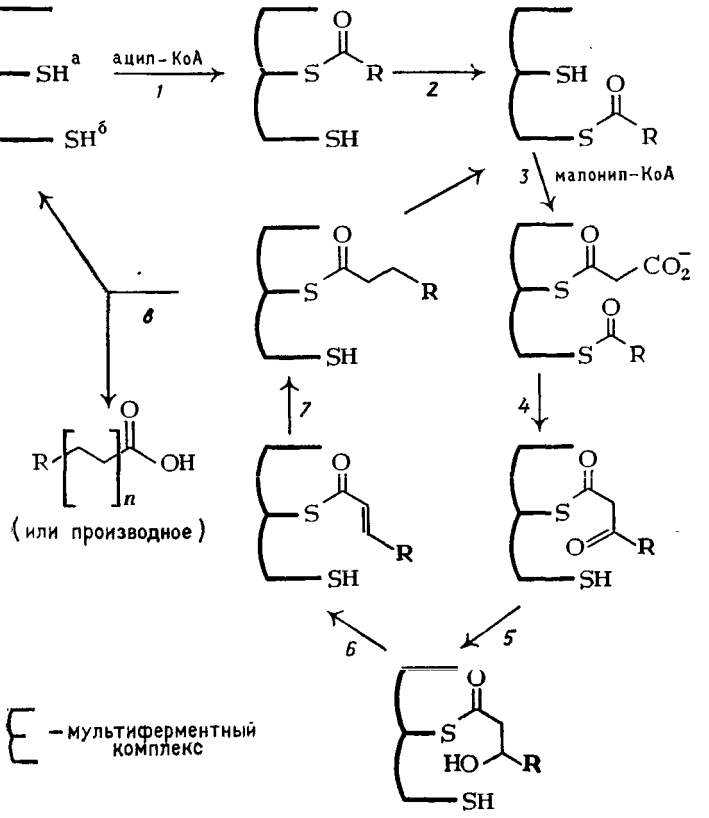
Из таких обобщений можно сделать вывод, что сборка ацильных и малонильных звеньев осуществляется в ферментной системе, действующей по принципу «все или ничего», которая захватывает исходные производные кофермента А и не освобождает их до тех пор, пока не образуется стабильный поликетид. Все промежуточные соединения, по-видимому, связаны с ферментами в течение всего процесса; в нем должно в определенном порядке участвовать большое число ферментов, включая катализаторы сборки и других реакций, осуществляющихся параллельно [см. выше, пункт (г)], а также макромолекулярные носители промежуточных соединений. Таковы общие принципы, относящиеся к биосинтезу любых природных поликетидов. Изучение механизмов биосинтеза

с помощью очищенных и достаточно хорошо охарактеризованных ферментов или ферментных систем проводилось лишь для жирных кислот и очень ограниченного числа других поликетидов; в этой области следует особо отметить работы Линена и сотр. Результаты биохимических исследований блестяще подтверждают химические данные, а в отдельных случаях позволяют получить даже более детальную картину. Однако химические методы исследования позволяют более глубоко изучить механизм биосинтеза, чем энзимологические. Например, сравнение большого числа структур макролидных поликетидов из актиномицетов (см. разд. 29.1.4.3) показывает, что их биосинтез осуществляется в системе, способной собирать в определенном порядке цепь из различных ацильных предшественников и создавать частично собранные фрагменты, которые тем или иным образом соответствуют «блочным матрицам» основных структурных частей конечной молекулы. Имеющиеся энзимологические данные для систем с такими свойствами относятся к биосинтезу только олигопептидов, а не поликетидов. Без сомнения, будут получены соответствующие данные непосредственно для некоторых поликетидных систем, однако в настоящее время приходится полагаться на химические методы.

29.1.2.1. Синтетаза жирных кислот

Наиболее подробно изученной поликетидсинтетазой является мультиферментный комплекс синтетазы жирных кислот (см. разд. 25.1.5). Основа комплекса — ацилпереносящий белок (АПБ), представляющий собой макромолекулярный эквивалент кофермента А (**16**). Характерный для синтетазы жирных кислот каталитический цикл [14] показан на схеме (3). Следует подчеркнуть, что ее мультиферментный комплекс (Е) содержит два различных тиольных центра: один из них ($SH^а$) принадлежит ацилпереносящему белку, а второй ($SH^б$) — ферменту, осуществляющему ацилирование малонил-АПБ.

Согласно схеме (3), первой стадией является ацилирование АПБ посредством ацил-КоА, катализируемое специфической трансацилазой. Именно специфичность стадии *1*, а также доступность различных видов ацил-КоА определяют, какой будет «стартовая» группа. В стадии *2* ацильная группа, введенная на стадии *1* или образовавшаяся после этого, переносится к тиольному центру конденсирующего фермента. Таким образом АПБ освобождается для ацилирования малонил-КоА, катализируемого второй трансацилазой (стадия *3*). Два тиольных центра расположены таким образом, что затем может происходить ацилирование малонил-АПБ (стадия *4*), приводящее к β-кетоацил-АПБ, который восстанавливается через промежуточно образующиеся β-гидрокси- и α,β-ненасыщенный ацил-АПБ до ацил-АПБ (стадии *5*—*7*). Далее ацил-АПБ может либо претерпевать перенос к конденсирующему ферменту, повторяя стадию *2* с последующим повторением цикла ацилиро-



(3)

вания и т. д., либо может быть отщеплен от ферментной системы третьей трансацилазой (стадия *8*). В зависимости от типа системы последняя стадия приводит к свободной жирной кислоте или к одному из специфических видов ацилированного акцептора, в том числе и к ацил-КоА.

Для осуществления такой последовательности реакций нет необходимости в образовании физически связанного в один структурный агрегат комплекса ферментов. Должная степень организации может достигаться за счет специфичности самих ферментов; так, в типичных бактериях ферменты, ответственные за синтез жирных кислот, и сам ацилпереносящий белок обычно находятся в растворе. Возможно, такое же положение существует и в высших растениях. Однако в грибах и в клетках животных ферменты связаны в единый многоферментный комплекс, «синтетазу жирных кислот», структура которого благоприятствует последовательному протеканию макромолекулярных реакций, с довольно большой степенью точности соответствующих тем, которые приведены на схеме (3). При этом исключаются процессы диффузии и замещения

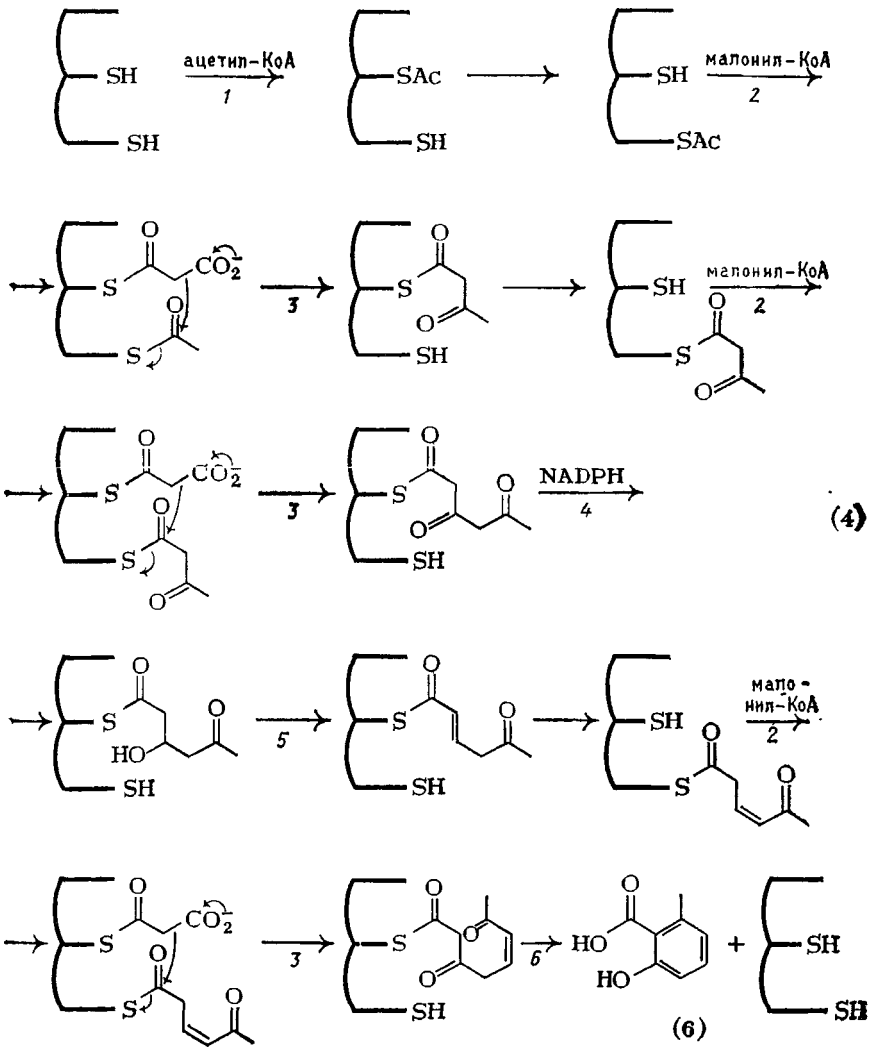
макромолекул и обеспечивается более благоприятная кинетика процесса. Комплекс, выделенный из дрожжей, имеет молекулярную массу, равную $2{,}3 \cdot 10^6$, и содержит три набора ферментов (всего 21 фермент), а также три молекулы АПБ. Образование таких мультиферментных комплексов резко увеличивает вероятность того, что синтетаза будет функционировать по принципу «все или ничего». Например, до того как закончится сборка углеродной цепи высшей жирной кислоты на предельно возможную длину (после которой перенос RCO-групп с SH^a-центра к $SH^б$-центру уже невозможен), в цикл не может быть введена новая молекула стартового ацил-КоА. Эти комплексы представляют особый интерес, так как они могут служить наилучшей моделью общих путей биосинтеза поликетидов.

При биосинтезе обычных жирных кислот для осуществления всей последовательности реакций совершенно необходимы стадии восстановления, и в отсутствие соответствующего гидридного донора NADPH реакция останавливается, обычно на стадиях ацетоацетил- и 3,5-дикетогексаноил-АПБ [15]. Как правило, система способна к образованию только малонил-АПБ (см. схему 3; стадия *3*). Однако стадии *1* и *8* могут быть менее специфичными; они-то и определяют образование всего набора жирных кислот. Например, в бактериях обычный набор жирных кислот *изо-* и *антеизо*-строения с четным и нечетным числом атомов углерода определяется конкуренцией между соответствующими стартовыми ацил-КоА на стадии *1*. В то время как в *Escherichia coli* акцепторная трансацилаза весьма специфична по отношению к ацетил-КоА, у других бактерий аналогичный фермент может присоединять различные ацил-КоА (от C_4 до C_6 с разветвленной или неразветвленной цепью) [16], а у третьих — циклические кислоты от циклобутилуксусной до циклогептанкарбоновой [17]. В то же время вариации в длине цепи, образующейся в результате деятельности синтетазы в тех же самых бактериях, определяются специфичностью трансацилаз на стадии *8* и не зависят от размера стартового звена или числа добавленных к нему малонильных звеньев.

29.1.2.2. Поликетидсинтетазы

Что касается биосинтеза поликетидов вообще и ароматических поликетидов, в частности, то более или менее детально изучен только биосинтез 6-метилсалициловой кислоты (**6**) [18, 19]. В *Penicillium patulum* и родственных низших грибах соединение (**6**) синтезируется мультиферментным комплексом, напоминающим комплекс синтетазы жирных кислот; его изучение дает возможность полнее понять процесс образования поликетидов. Этот комплекс содержит тиольные группы двух типов (аналогичные тиольным центрам АПБ и конденсирующего фермента в случае синтетазы жирных кислот) и также функционирует по принципу «все или ничего». По различным оценкам молекулярная масса комплекса

равна $3{,}7 \cdot 10^5$ или $\sim 1{,}3 \cdot 10^6$; возможно, эти значения относятся соответственно к мономеру и тримеру. Механизм действия синтетазы, изученный Линеном и другими исследователями [19], изображен на схеме (4) в форме, позволяющей сопоставить его с механизмом биосинтеза жирных кислот.



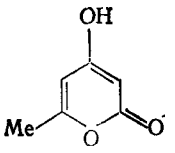
Наиболее очевидное различие между ними заключается в отсутствии почти всех стадий восстановления в ходе биосинтеза полике-

тидов, что для ароматических поликетидов представляет собой достаточно общее явление. Именно этим обусловлена характерная картина чередующихся окисленных и неокисленных атомов углерода в ароматическом кольце. Менее заметное, но не менее важное отличие заключается в различной химической природе ацилирующих частиц (ацетил, ацетоацетил и 5-кетогексен-3-оил), использующихся в трех последовательных стадиях ацилирования (стадия *2* на схеме 4); при синтезе жирных кислот последовательное ацилирование осуществляется гомологичным рядом насыщенных ацильных производных.

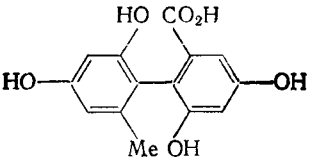
В случае более сложных поликетидов (см., например, разд. 29.1.4.3) участвующие в сборке основной цепи различные малонатные звенья также могут чередоваться в специфической последовательности. Следовательно, необходимым свойством поликетидсинтетаз является их способность осуществлять ступенчатое ацилирование определенной последовательности малонильных или гомологичных звеньев рядом химически дифференцированных остатков, природа которых в свою очередь определяется включением или исключением тех или иных стадий между отдельными стадиями последовательного ацилирования. К этому следует добавить необходимость предохранения растущей поликетидной цепи от преждевременной циклизации и осуществления специфической циклизации после окончания построения цепи.

Так, 6-метилсалицилатсинтетаза обеспечивает одну стадию восстановления, выполняемую специфично на стадии C_6-трикетида. Если необходимый для этого NADPH не поступает, то связанная с ферментом 3,5-дикетогексаноильная группа может отщепиться только в виде лактона (**17**), состоящего из трех ацетатных единиц. В сходных условиях аналогично ведет себя и синтетаза жирных кислот.

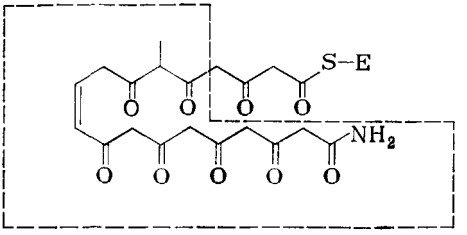
Интересно сравнить биосинтез соединения (**6**) и альтернариола [лактона кислоты (**18**)]. Биосинтез альтернариола осуществляется комплексной синтетазой, которая изучалась и в бесклеточной системе [20]. В этом случае стадия ацилирования должна включать последовательное ацилирование малонильных групп ацильными звеньями от C_2 до C_{12}. Здесь нет стадий восстановления и очевидна необходимость предотвращения «преждевременной» циклизации. Подобным же образом при синтезе соединения (**20**)— предшественника тетрациклина (см. разд. 29.1.3.6) по меньшей мере первые семь звеньев вероятного промежуточного соединения (**19**) (выделенные в формуле рамкой) должны быть собраны в единую структуру (**19**) (или в ее енолизированную форму) прежде, чем произойдет хотя бы одна циклизация. На этом же примере можно видеть, как влияет одна стадия восстановления — дегидрирования на весь процесс биосинтеза: *цис*-конфигурация двойной связи в (**19**) «поворачивает» растущую молекулу и таким образом помогает закрепить определенное пространственное расположение цепи, необходимое для специфической циклизации.



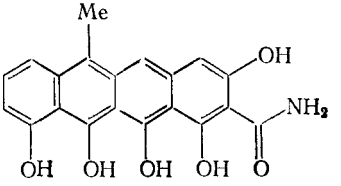
(17)



(18)

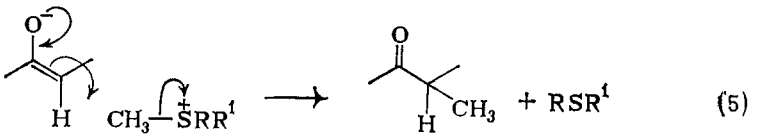


(19)



(20)

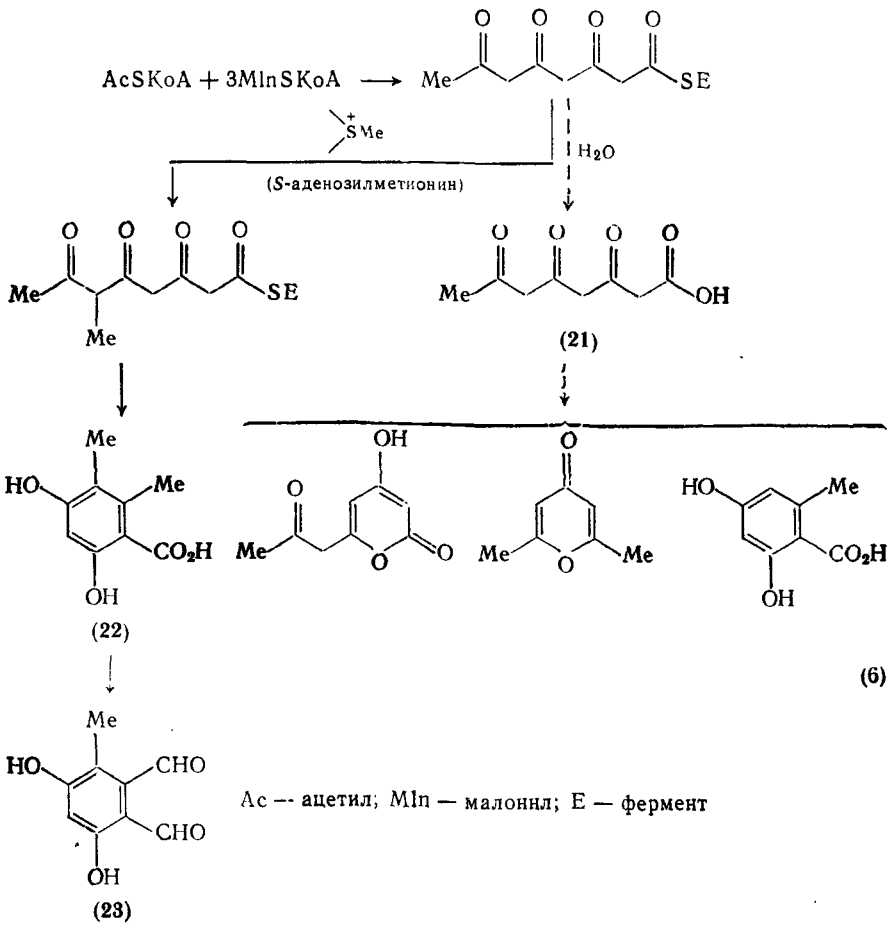
Другим типом реакций, использующихся в процессе сборки поликетидов, является *C*-метилирование, при котором *S*-аденозилметионин служит донором метильных групп, а в состав мультиферментного комплекса входит специфическая трансметилаза. Реакция всегда осуществляется путем электрофильной атаки на енолизирующиеся «метиленовые» атомы углерода [хорошим примером является соединение (19); все три атома водорода метильной группы при этом сохраняются (схема 5) [21].



(5)

Стадия синтеза поликетидов, на которой осуществляются такие реакции, представляет большой интерес. Непосредственное указание на *C*-метилирование частично построенного и связанного с ферментом поликетида получено [22] в ходе изучения *Aspergillus flavipes*, который в нормальных условиях продуцирует 5-метилорселлиновую кислоту (22) и продукт ее дальнейшего метаболизма флавипин (23). В ходе этих работ были выделены бесклеточные ферментные препараты, способные внедрять метку из [$^{14}CH_3$]-*S*-аденозилметионина в (23) без добавления какого-либо поликетидного акцептора. Очевидно, при этом присутствовал субстрат мети-

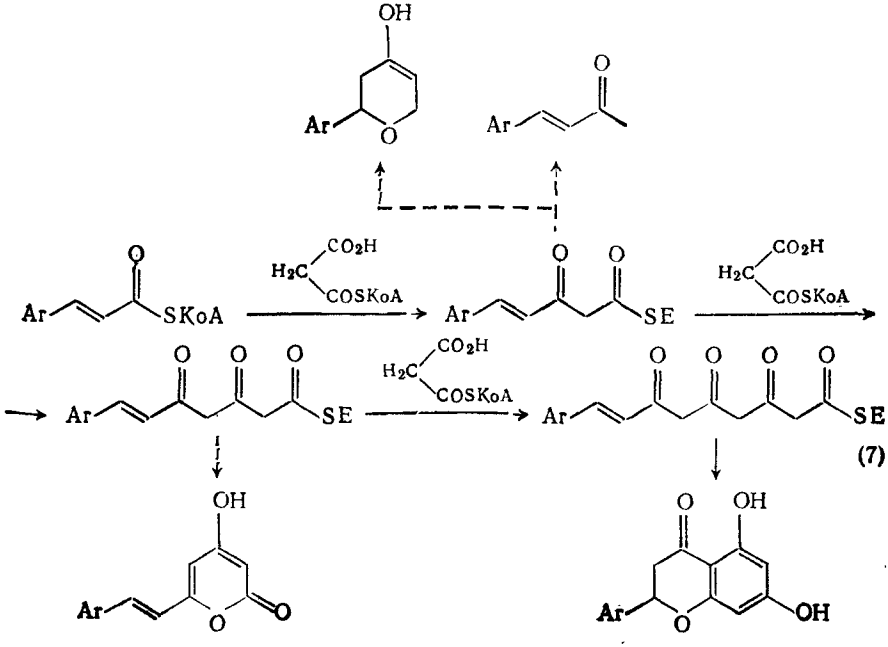
лирования, идентифицированный в виде связанной с белком «тетрауксусной кислоты» (21), различные известные продукты трансформации которой *in vitro* (например, «тетраацетатный» лактон, 2,6-диметилпирон-4, орселлиновая кислота, орцинол) удалось получить при гидролизе этого комплекса. Выясненный таким образом общий путь биосинтеза приведен на схеме (6) (сплошными стрелками на схеме показан нормальный путь биосинтеза в *Aspergillus flavipes*, а пунктирными — процесс образования продуктов гидролитического отщепления поликетидов в отсутствие *C*-метилирования). Другие эксперименты на грибах, продуцирующих изомерную 3-метилорселлиновую кислоту (4), дали сходные, но менее определенные результаты; осталось невыясненным, происходит ли метилирование на стадии трикетида, или на стадии тетракетида [23, 24]. Твердо установлено, однако, что субстратом метилирования в общем случае является связанный с ферментом комплекс,



а не готовый поликетид. Оказалось также, что окончательная циклизация осуществляется по завершении реакции метилирования, но иногда возможен и обратный порядок (ср. пример в ряду тетрациклинов, см. разд. 29.1.3.6). Когда по этой или какой-либо другой причине конечная стадия блокируется, полностью собранная (как в схеме 4) или частично диссоциировавшая (например, до трикетида) поликетидная цепь может быть конечным продуктом реакции и в таком виде может отделиться от синтетазы.

К настоящему времени изучена энзимология другой важной поликетидсинтетазы, участвующей в синтезе флаванонов (флаванонсинтетазы) [25]. Ферментный комплекс, впервые выделенный из культур клеток петрушки Гризебахом и сотр., использует в качестве «стартового» звена *n*-кумарил-КоА и затем последовательно присоединяет три звена малонил-КоА; было показано, что он синтезирует непосредственно 2(*R*)-флаванон (нарингенин), а не халкон, с которым флаванон может затем находиться в равновесии. Вероятно, механизм биосинтеза флаванона аналогичен уже описанным механизмам и происходит с участием трансацилаз и тиольных центров «переносчика» и «акцептора», а заключительной стадией является специфическая циклизация.

В этой системе [схема 7; сплошными стрелками показан нормальный путь биосинтеза (Ar = *n*-гидроксифенил), пунктирными — образование «неправильных» флавоноидов (Ar = 3,4-дигидроксифенил или 4-гидрокси-3-метоксифенил)] «акцепторная трансацилаза», вводящая в систему стартовый ацил-КоА, вероятно, способна



(7)

присоединять (по крайней мере, *in vitro*) множество способных к циклизации субстратов; высокая специфичность фермента по отношению к *n*-кумарил-КоА обеспечивается другими ферментами этого комплекса. Так, при использовании других циннамоил-КоА система продуцирует различные «неправильные» флавоноиды, синтез которых завершается, как это показано на схеме, на стадиях ди- и трикетидов. Интересно, что некоторые из этих «неправильных» флавоноидов, в частности трикетиды стирилпироны, в свою очередь были выделены из растений, но по структурному разнообразию они значительно уступают флавоноидам и обнаруживаются только у узкого круга семейств растений.

29.1.2.3. Основные типы структурных вариаций в биосинтезе поликетидов

Выше отмечалось (см. разд. 29.1.2.1), что в случае синтетаз жирных кислот структура продукта реакции определяется специфичностью трансацилаз, вводящих в систему предшественники и выводящих из нее продукты реакции. В более общей картине синтеза поликетидов возможностей для вариаций значительно больше. Об этом свидетельствуют как непосредственные энзимологические исследования (см. разд. 29.1.2.2), так и гораздо более многочисленные косвенные данные, относящиеся к менее изученным системам (см. последующие разделы). В то же время специфичность каждого отдельного процесса биосинтеза поликетидов значительно выше, чем в случае синтеза жирных кислот; не известно ни одного примера, кроме жирных кислот, когда синтезировался бы весь набор гомологичных соединений. Очевидно, более сложная «архитектура» продуктов реакции позволяет осуществлять с большей специфичностью конечную стадию процесса, в которой поликетидный скелет стабилизируется (например, путем циклизации) и отщепляется от комплекса. В случае 6-метилсалицилат—синтетазы (см. разд. 29.1.2.2) замена стартового звена ацетил-КоА на пропионил-КоА приводит к образованию соответствующего 6-этильного производного, но общая скорость процесса снижается более чем в семь раз [26]. Выше уже отмечалась невозможность осуществления заключительной стадии циклизации в случаях, когда вследствие выпадения стадии *C*-метилирования (схема 6) или использования «чужого» стартового звена (схема 7) не образуется соответствующее промежуточное соединение.

Однако, как показывают приведенные выше примеры тетракетидов (**1**)—(**10**), диапазон структурных вариаций в молекулах поликетидов, связанный с узкой специфичностью действия различных синтетаз, может быть очень широк. В общем случае возможны следующие вариации.

(а) Использование различных ацил-КоА в качестве стартовых звеньев, как, например, в случае ацетофенона (**1**) и нарингенина (**5**). Таким путем могут образовываться самые разнообразные структуры.

(б) Использование различных гомологов малонил-КоА. Такие случаи очень редки в ряду собственно ароматических поликетидов, но довольно обычны у частично восстановленных поликетидов (см. разд. 29.1.4.2). Более того, в последнем случае различные звенья очень специфично встраиваются в цепь. Вероятно, это обусловлено особенностями конфигурации того участка молекулы конденсирующего фермента, где происходит «матричная» сборка цепи. Пространственное окружение соответствующего активного центра таково, что последующее малонатное звено «выбирается» уже частично собранной цепью, а не акцепторной трансацилазой.

(в) Наложение одной или нескольких стадий частичного или полного восстановления. Например, на схеме (4) показана одна такая стадия. В более общем случае возможны любые степени восстановления [—CH(OH)CHR—, —CH=CR— или —CH_2CHR—] в любом числе кетометиленовых звеньев в цепи. В ароматических поликетидах, когда цепь складывается тем или иным специфическим образом [см., например, (19)→(20)], довольно обычен процесс восстановления и дегидратации. В случае частично восстановленных поликетидов степень восстановления отдельных звеньев в цепи, возможно, определяется механизмом, указанным в пункте (б).

(г) Уже упоминавшееся наложение процессов *C*-метилирования (ср. схему 6). Эти процессы отличаются высокой специфичностью, как и, вероятно, некоторые реакции *C*-пренилирования.

(д) Альтернативные циклизации, простейшим примером которых является альтернативное образование ацетофенона (1) и орселлиновой кислоты (2). Способ циклизации определяется конфигурацией собранной цепи, которую в свою очередь определяет ферментный комплекс. Только в очень простых случаях, например при образовании орселлиновой кислоты из «тетрауксусной» (3,5,7-трикетооктановой) кислоты, возможна прямая аналогия между ферментативными циклизациями и спонтанными трансформациями ненапряженных поликетометиленовых цепей *in vitro*.

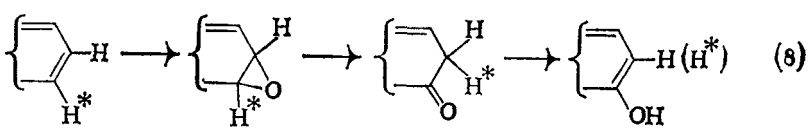
Примеры всех этих типов биосинтетических вариаций приведены в последующих разделах.

29.1.2.4. Превращения поликетидов

Разнообразие продуктов деятельности поликетидсинтетаз, функционирующих по принципу «все или ничего», значительно расширяется за счет их дальнейших превращений. Эти превращения включают реакцию образования простых производных, например *O*-метилирование фенолов, декарбоксилирование [27], например декарбоксилирование 6-метилсалициловой кислоты до *м*-крезола (см. разд. 29.1.3.1), и другие реакции, а также введение групп со сложным углеродным скелетом (в частности, реакция пренилирования) и весьма глубокие превращения, связанные с разрывом циклических систем. Как образование производных, так и декарбокси-

лирование обычно осуществляются довольно специфичными ферментами, действующими на свободный поликетид. *С*-Метилирование, как уже отмечалось выше, обычно осуществляется до отщепления поликетида от ферментного комплекса, а процесс *С*-пренилирования более сложен. Присоединение простых изопентенильных остатков может происходить как в связанном с ферментом состоянии, так и после отщепления поликетида (соответствующие примеры будут приведены ниже; см. разд. 29.1.3.1 и схему 14); в то же время полипренильные группы (геранильная, фарнезильная и т. п.), по-видимому, способны присоединяться только к свободным поликетидам. Эти два процесса невозможно различить *a priori*, поскольку оба они заключаются в электрофильной атаке пренилфосфата на реакционноспособный атом углерода, которым может быть метиленовое звено поликетометиленовой цепи или ароматическое CH-звено в *орто-* и *пара*-положениях по отношению к гидроксильным группам.

Процесс галогенирования протекает путем электрофильной атаки положительно заряженного («окисленного») иона галогена, но детально механизм галогенирования не известен. В наиболее важных типах окисления в качестве окислительных агентов используются молекулярный кислород и «оксигеназные» ферменты. Гидроксилирование ароматических колец этими ферментами обычно сопровождается эффектом «NIH-сдвига» *, при котором замещаемый водород частично обменивается с водородом при соседнем атоме углерода; считается, что промежуточными соединениями в этом процессе являются ареноксиды (схема 8) (см. также разд. 30.3.5).



(8)

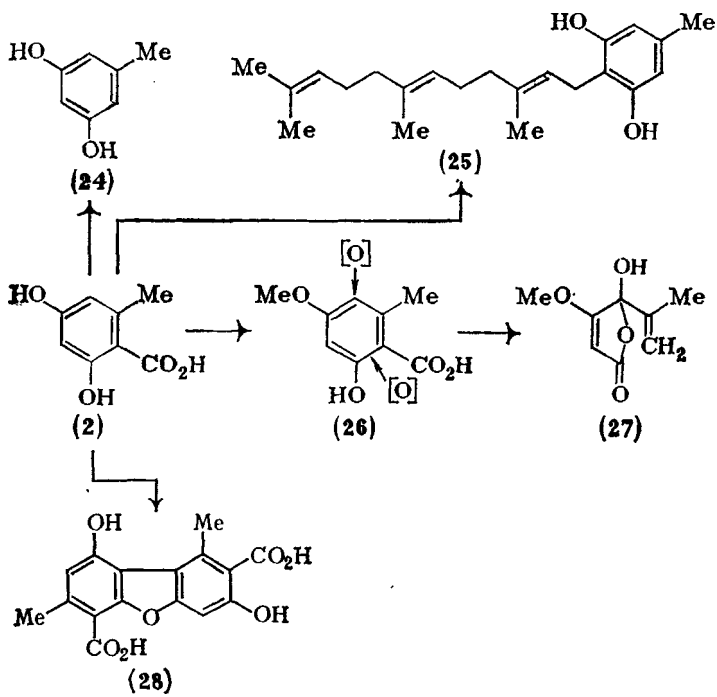
Конечные продукты реакции могут образовываться и путем других превращений ареноксидов. Алкены также могут быть окислены до эпоксидов, а карбонильные группы — до сложноэфирных. Последняя реакция является эффективным способом расщепления фенольных и хиноновых колец. Алифатические атомы углерода гидроксилируются с сохранением их оптической конфигурации.

К другим процессам окисления относятся разнообразные восстановительно-окислительные реакции: превращения типа спирт-карбонильное соединение или гидрохинон — хинон обычно обратимы, а превращение альдегида в кислоту, как правило, необратимо. Одноэлектронные реакции окисления и отщепления атома водорода от фенолов приводят к свободным радикалам, реакции

* «NIH — сдвиг» — перегруппировка, открытая американскими химиками из Национального Института Здравоохранения (National Institute of Health). — *Прим. перев.*

конденсации которых (часто внутримолекулярные) имеют очень большое значение.

В качестве примеров, иллюстрирующих многообразие таких превращений, приведено образование соединений (24)—(28); все они являются грибными метаболитами простого тетракетида орселлиновой кислоты (2). Орцинол (24) представляет собой продукт декарбоксилирования, осуществляющегося при действии специфической декарбоксилазы [27]. Грифолин (25) является одним из фарнезилзамещенных метаболитов (2) [28] [другой пример такого рода — микофеноловая кислота (45), см. разд. 29.1.3.1; электрофильное алкилирование ароматических колец пренилпирофосфатами происходит в самых разнообразных природных соединениях и не ограничено областью поликетидов]. Продуцируемое лишайниками соединение (28), очевидно, образуется при окислительной 3,5-димеризации соединения (2). Пеницилловая кислота (27) возникает при действии оксигеназы на метиловый эфир (26); известно, что ферментативная атака происходит именно в указанных на схеме положениях [29]. В последующих разделах будут приведены другие примеры превращений поликетидов.



Распространенность процессов глубокой трансформации среди природных поликетидов настолько велика, что истинные «исходные» продукты, образующиеся при действии многих поликетидсин-

тетаз, обнаруживаются только в качестве минорных компонентов в более или менее сложных смесях продуктов их превращения. Сложность смеси еще более увеличивается за счет того, что трансформирующие ферменты часто не обладают абсолютной специфичностью по отношению к своим субстратам. Тенденция поликетидов к «исчезновению» носит настолько общий характер, что вызывающие ее процессы, возможно, выполняют определенную функцию в организме, подавляя, например, эффект обратной связи в отношении синтетаз (за счет снижения концентрации непосредственных продуктов деятельности поликетидсинтетазы) и, возможно, распространяя вторичный метаболизм на большее число соединений в каждом конкретном организме. По не вполне понятным причинам как внутривидовое, так и межвидовое метаболическое разнообразие, по-видимому, является одной из целей эволюции, довольно экономично достигаемой разветвленной системой трансформаций. Достаточно надежно установлено, что химическое различие, например, между различными видами лишайников [30] в большей степени обусловлено системой этих разнообразных трансформаций, чем схемой основного поликетидного синтеза, поставляющего для них субстраты.

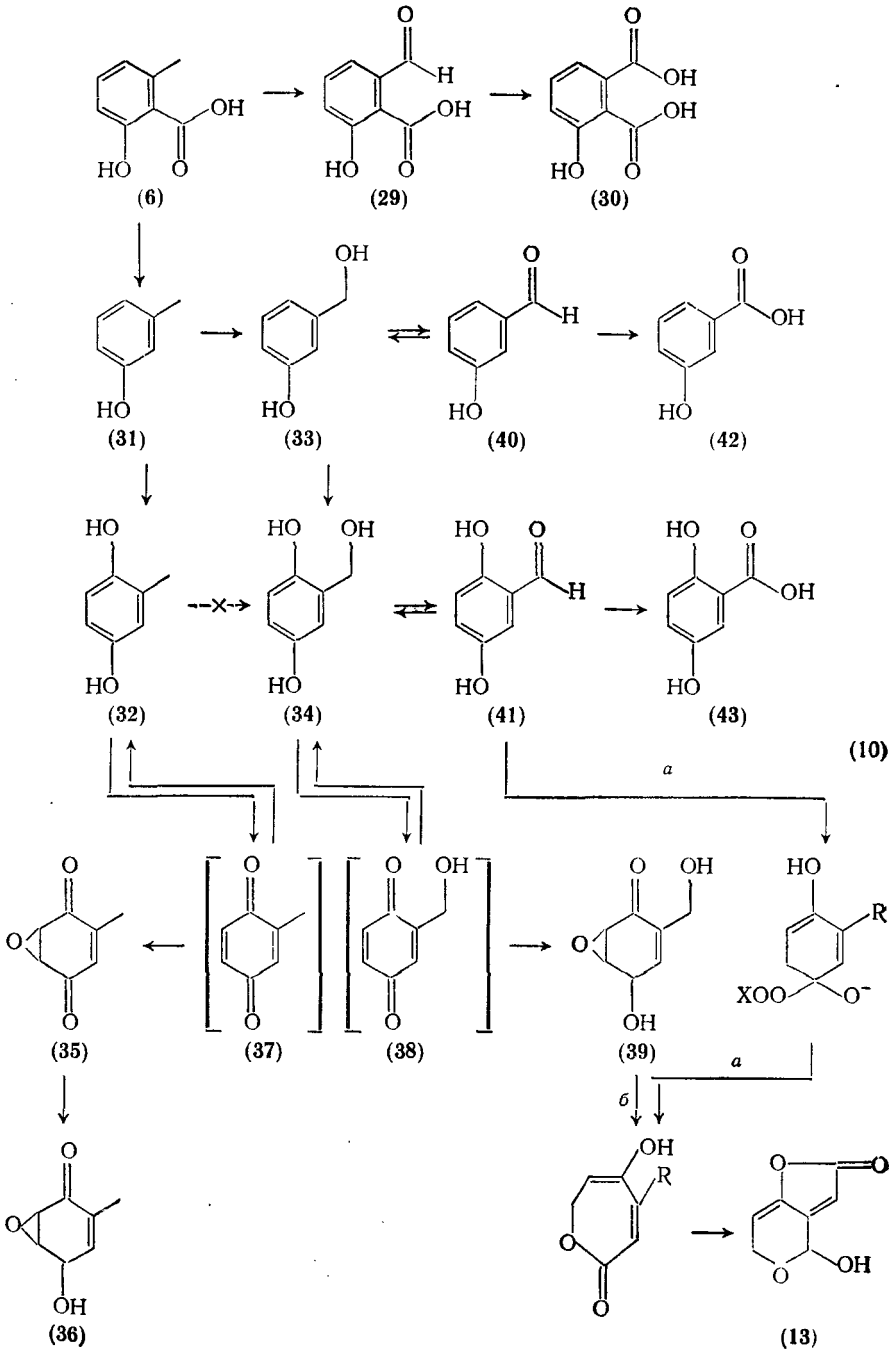
29.1.3. АРОМАТИЧЕСКИЕ ПОЛИКЕТИДЫ

Разнообразие природных поликетидов настолько велико, что для иллюстрации изложенных выше основных принципов целесообразно привести ряд примеров, а не пытаться дать исчерпывающий обзор [4—8]. Насколько это возможно, примеры в этом и последующих разделах выбирались только при наличии достаточного количества экспериментальных данных, большей частью полученных путем включения изотопов (см. разд. 29.1.5). В первую очередь будут рассмотрены поликетиды ароматической природы.

29.1.3.1. Ароматические тетракетиды

Ряд микрогрибов продуцирует 6-метилсалициловую кислоту (**6**), биосинтез которой уже был описан в разд. 29.1.2.2. В свою очередь 6-метилсалициловая кислота является исходным веществом для синтеза большой группы продуктов дальнейшего метаболизма, которые изучены достаточно широко [4, 8, 11, 31—35]. Некоторые из превращений соединения (**6**) приведены на схеме (10).

Не все из приведенных на этой схеме путей происходят в одном и том же организме, но каждый путь частично или полностью реализуется в зависимости от вида организма и условий культивирования. Например, стандартный штамм *Penicillium urticae* можно культивировать так, что он в качестве основного вещества будет продуцировать или (**6**), или (**31**), или (**34**), или (**43**), или (**13**) (см. схему 10) [31, 32]. Это объясняется тем, что генетически этот штамм способен выполнять весь ряд трансформаций, но в реальных


(6)
(29)
(30)
(31)
(33)
(40)
(42)
(32)
(34)
(41)
(43)
(10)
a
(35)
(37)
(38)
(39)
a
б
(36)
(13)

условиях образование необходимых ферментов определяется окружающей средой. Состав питательной среды в культуре влияет как на синтез 6-метилсалициловой кислоты (**6**), так и на ее дальнейший метаболизм, причем сказываются и такие факторы, как доступность микроэлементов (металлов) и преобладающий окислительно-восстановительный потенциал среды. Если учесть, что по меньшей мере некоторые из ферментов, осуществляющих трансформации, способны действовать не на один, а на несколько имеющихся субстратов, то становится понятным, насколько трудна задача детального изучения систем такого рода. В данном конкретном примере в значительной степени была выяснена [33] относительная важность различных принципиально возможных путей через «метаболическую решетку» [3, 31].

Многие из участвующих в превращениях ферментов были выделены и изучены, для других аналогичных соединений общая картина биосинтеза еще далеко не ясна.

Из различных изображенных на схеме (10) путей, путь от соединения (**6**) через промежуточный альдегид (**29**) к 3-гидроксифталевой кислоте (**30**) в большинстве организмов, продуцирующих (**6**), играет менее важную роль, чем декарбоксилирование до *м*-крезола (**31**). Две различные O_2-зависимые гидроксилазы [34] превращают крезол (**31**) или в 2-метилгидрохинон (**32**), или в *м*-гидроксибензиловый спирт (**33**). Второй из этих ферментов способен далее превращать (**33**) в гентизиловый спирт (**34**), первый же фермент более специфичен и не осуществляет аналогичное превращение (**32**) в (**34**). Если преимущественным продуктом процесса является 2-метилгидрохинон (**32**), то он находится в восстановительно-окислительном равновесии с соответствующим хиноном (**37**) и поэтому может быть далее метаболизирован до эпоксидов (**35**) и (**36**). Аналогичным путем из соединения (**34**) образуются соединения (**38**) или (**39**), соответственно.

Другой набор соединений образуется при дегидрировании спирта (**33**) до *м*-гидроксибензальдегида (**40**). Соответствующая дегидрогеназа довольно специфична [33], поэтому не ясно, получается ли альдегид (**41**) путем гидроксилирования (**40**) или путем дегидрирования (**34**). Равновесие между (**33**) и (**40**) благоприятствует первому пути, но соединение (**40**) может быть необратимо окислено до *м*-гидроксибензойной кислоты (**42**); аналогично, кислота (**43**) представляет собой конечный продукт окисления альдегида (**41**).

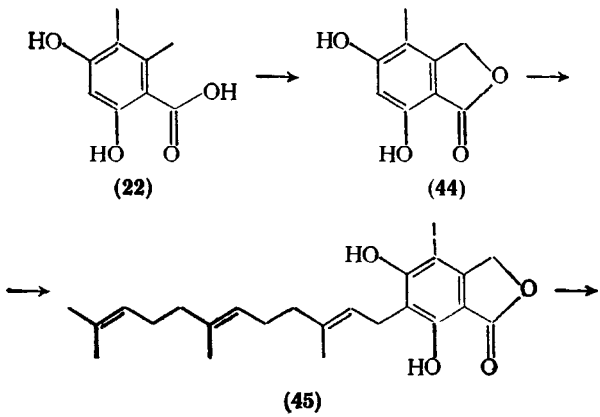
Конечным продуктом метаболизма 6-метилсалицилата является патулин (**13**)— антибиотик и микотоксин из *P. patulum* и других микроорганизмов. Было высказано предположение, что расщепление кольца, ведущее к (**13**), протекает в альдегиде (**41**) путем окисления по механизму, аналогичному реакции Байера — Виллигера (путь «*а*» в схеме 10). Однако существует и другая возможность (путь *б*) образования (**13**) из эпоксида (**39**) (или эквивалентного ему альдегида). Реакция происходит с участием специ-

фичной оксигеназы [35]. Результаты последних работ показывают, что в действительности это превращение осуществляется по пути «*б*» [36].

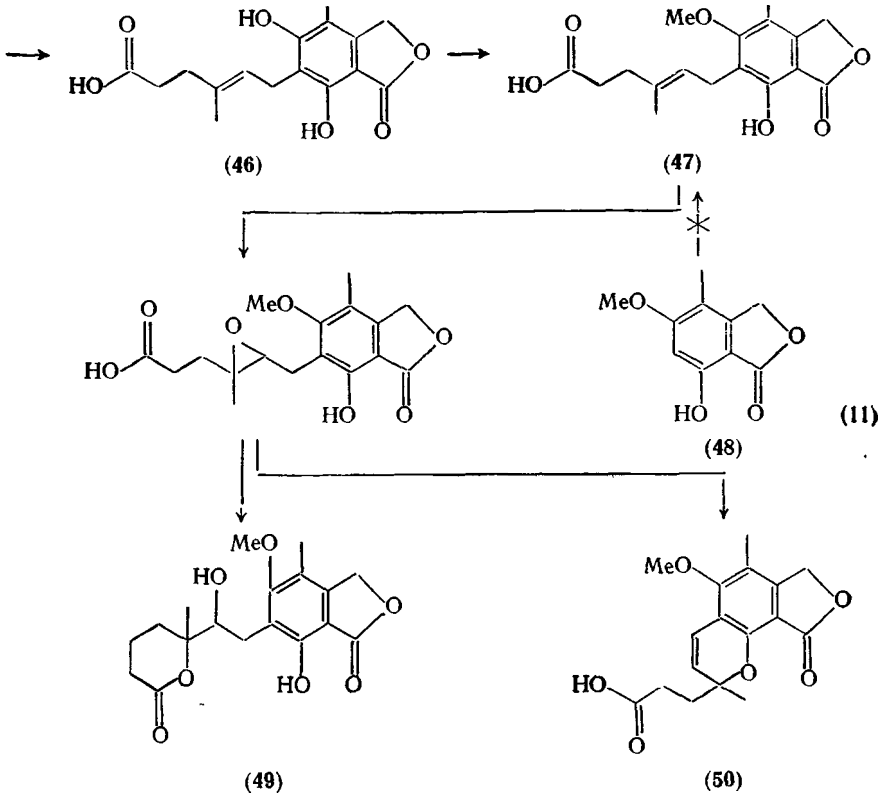
Микофеноловая кислота (**47**) представляет собой другой хорошо известный тетракетид [37], биосинтез которого в *Penicillium brevicompactum* был изучен довольно тщательно [37—41]. Микофеноловая кислота является продуктом превращения 5-метилорселлиновой кислоты (**22**). В соответствии с общим принципом осуществления *C*-метилирования в процессе сборки поликетида, а не после нее (см. разд. 29.1.2.2 и схему 6), меченая орселлиновая кислота не является предшественником соединения (**22**), хотя ацетат и метионин включаются в него весьма эффективно.

При окислении кислоты (**22**) и последующем действии оксигеназы образуется фталид (**44**), точно так же, как из фенола (**31**) образуется гидрохинон (**33**) (см. схему 10). Фталид (**44**) является субстратом для *C*-алкилирования другого типа, в котором донором алкильных групп, как и в биосинтезе терпенов, служит, по-видимому, аллильное соединение фарнезилпирофосфат. В нормальном биосинтезе образующееся таким образом фарнезильное производное (**45**) представляет собой минорный компонент смеси, но при добавлении фталида (**44**) содержание (**45**) резко увеличивается. Отсюда следует, что в обычных условиях скорость всей реакции лимитируется образованием фталида (**44**). Фталид (**45**) в свою очередь путем окислительного расщепления превращается в соединение (**46**) и затем, посредством *O*-метилирования, — в микофеноловую кислоту (**47**). В этой последовательности превращений обращает на себя внимание четкое разделение во времени трех стадий алкилирования. Продуктами дальнейшего метаболизма микофеноловой кислоты являются соединения (**49**) и (**50**) (схема 11).

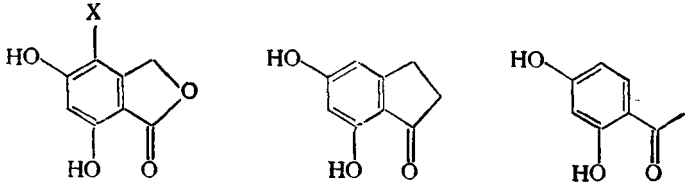
Стадия пренилирования, осуществляющаяся, по-видимому, путем электрофильной атаки фарнезилпирофосфата на фенольный субстрат (**44**), весьма специфична; действительно, ни гераниол



(**22**) (**44**) (**45**)

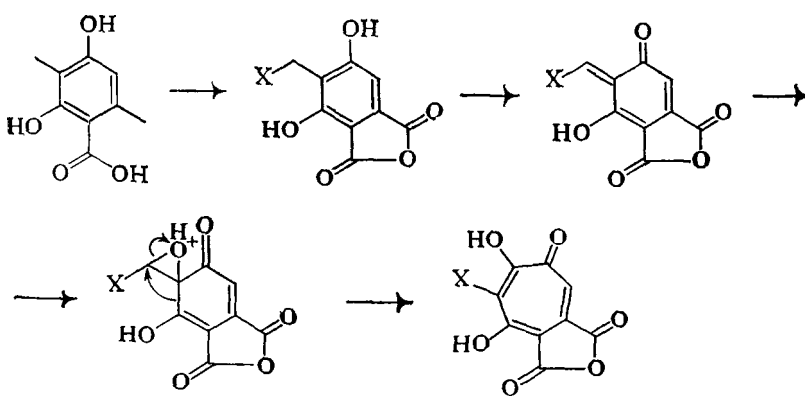


(или его пирофосфат), с одной стороны, ни (**48**), *О*-метильное производное (**44**), с другой, не включаются в кислоту (**47**). В то же время аналоги (**44**), сохраняющие резорциновую структуру, например хлор- и бромпроизводные (**51**), инданон (**52**) и даже резацетофенон (**53**), превращаются в соответствующие аналоги соединения (**47**). Это достаточно показательный пример возможности образования новых необычных соединений путем использования ограниченной специфичности некоторых ферментных систем и введения соответствующих аналогов предшественников.



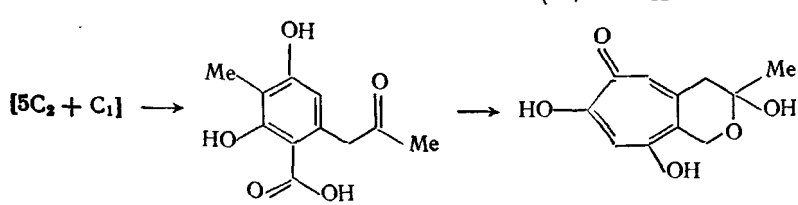
(**51**) X = Cl, Br (**52**) (**53**)

Продуцируемые низшими грибами трополоны стипитатоновая кислота (54) и пуберулоновая кислота (55) представляют собой метаболиты изомерной *C*-метилированной орселлиновой кислоты (4). Они интересны с точки зрения способа участия введенного углеродного атома в стадии расширения цикла. Эти соединения хорошо изучены, в том числе определены положения атомов кислорода, введенных на стадии действия оксигеназы [42]. Полученные данные свидетельствуют о том, что превращение вероятнее всего осуществляется путем перегруппировки эпоксидированного в боковой цепи *o*-хинометида (схема 12). Детали механизма отдельных реакций, однако, не выяснены; неизвестно, например, происходит ли окисление до ангидрида после расширения цикла или до него, как это показано на схеме. Не ясно также, когда разделяются пути, ведущие к соединениям (54) и (55). Интересно отметить, что локализация радиоактивной метки в этих трополонах из различных предшественников (ацетата, малоната, метионина) оказалась особенно затруднительной из-за недостаточной специфичности химических методов деградации. Напротив, применение методик с использованием ^{13}C позволило довольно быстро установить, что общий механизм биосинтеза трополонов (54) и (55) аналогичен механизму биосинтеза сепедонина (56) (схема 13) с той разницей, что в последнем случае исходным соединением является *C*-метилированный пентакетид (см. схему 12 и разд. 29.1.3.3).



(12)

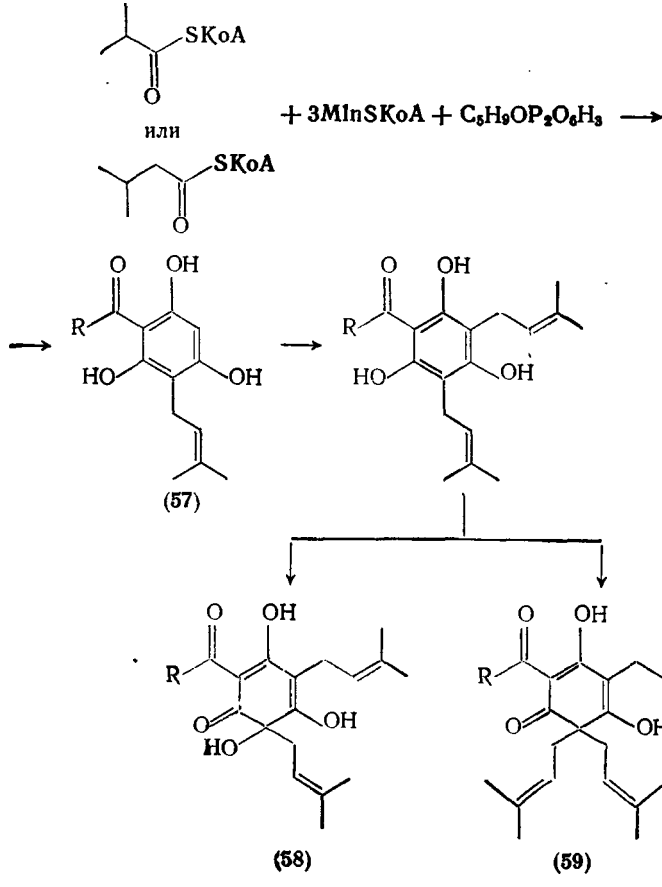
(54) X = H
(55) X = OH



(13)

(ср. схему 12) (56)

Не все тетракетиды являются продуктами метаболизма грибов. Гумулоны и лупулоны из хмеля играют важную роль в технологии брожения; их биосинтез в некоторых отношениях отличается от биосинтеза грибных поликетидов. Как показало изучение включения различных меченых потенциальных предшественников и изучение строения ряда аналогичных природных соединений, он осуществляется путем, приведенным на схеме (14) [44]. Исходными тетракетидами являются пренилированные в положении 3 ацилфлороглюцины (57), образующиеся из трех «ацетатных» звеньев (вероятно, малонил-КоА) и стартового звена ацил-КоА с разветвленной углеродной цепью (им может быть изобутирил- или изовалерил-КоА). Стартовые ацильные звенья синтезируются из α-кетокислот, соответствующих валину и изолейцину. Собранная цепь циклизуется по «клайзеновскому» типу, но только после ее пренилирования, вероятно, подобного *C*-метилированию (но отличного от других случаев пренилирования поликетидов). Эта реакция про-



(14)

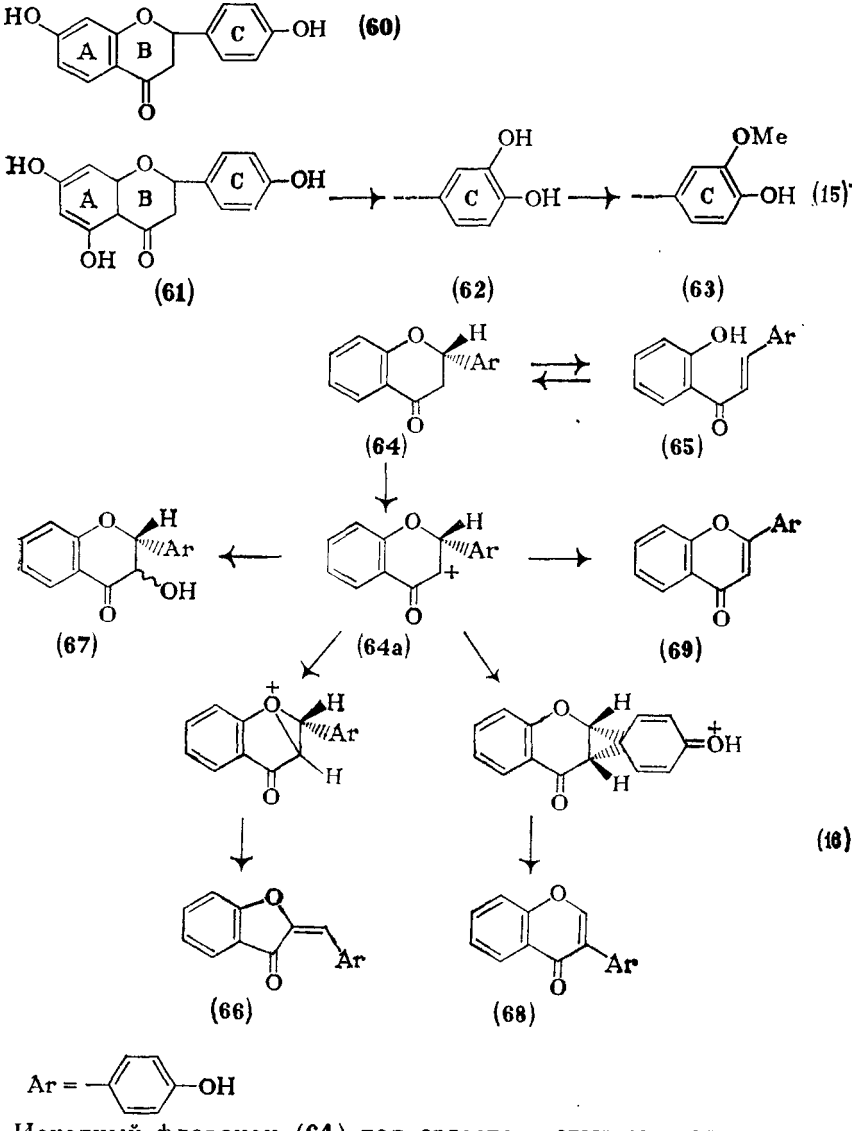
исходит в связанном с ферментом комплексе, так как соответствующие ацилфлороглюцины сами по себе не являются эффективными субстратами. Однако последующие реакции пренилирования и (или) окисления, с помощью которого происходит дезароматизация кольца, осуществляются с участием свободных промежуточных соединений и приводят к гумулонам (**58**) и лупулонам (**59**) (схема 14). В этой последовательности превращений необычны использование C_4- и C_5-ацильных стартовых звеньев и осуществление первой реакции пренилирования до ароматизации поликетидной цепи.

29.1.3.2. Флавоноиды

Роль флавоноидов в жизни растений весьма многогранна; по этой причине их обычно выделяют в отдельный класс тетракетидов [45—47]. Приводящая к флаванонам основная биосинтетическая реакция, которая осуществляется многоферментным синтетазным комплексом, была описана выше (см. разд. 29.1.2.2 и схему 7). Следует отметить, что первоначальное окисление кольца С определяется специфичностью стартовой трансацилазы, но аналогичное превращение кольца А [в соединениях типа (**60**) и (**61**)] определяется наличием дополнительных стадий восстановления, приводящих, например, к (**60**), или отсутствием некоторых из них [ср. (**61**)] в собранном тетракетидном скелете. Однако дополнительные реакции (окисление, *С*-метилирование и др.) возможны и после завершения сборки флавоноидной системы, приводя, например, к превращению соединения (**61**) в (**62**) и (**63**). Одновременное существование флавоноидов с различной степенью окисления предполагает или наличие нескольких комплексов синтетаз различной структуры, или действие модифицирующих ферментов после образования флаванонов. По данным последних исследований [47], представляется наиболее вероятным, что первая причина объясняет дифференциацию в кольце А, а вторая — в кольце С. Это предположение справедливо по крайней мере для наиболее общего случая [например, (**60**)—(**63**)]. Другими словами, использование в качестве стартового звена *п*-кумарил-КоА приводит к флавоноидам типа (**61**), которые далее превращаются в соединения (**62**) и (**63**). В то же время другие данные свидетельствуют о том, что не исключается и существование синтетаз с другой трансацилазной специфичностью, способных взаимодействовать с другими субстратами из числа различных природных производных циннамоил-КоА.

Иные группы природных флавоноидов [45] образуются из флаванонов путем ряда превращений, затрагивающих кольцо В [46, 47], и последующего дифференцированного оксигенирования колец А и С (см. выше), а также путем образования производных, особенно посредством *О*-метилирования и *О*- и *С*-гликозилирования. Реакции образования производных слишком сложны, чтобы их можно было здесь рассматривать. Происхождение основных классов

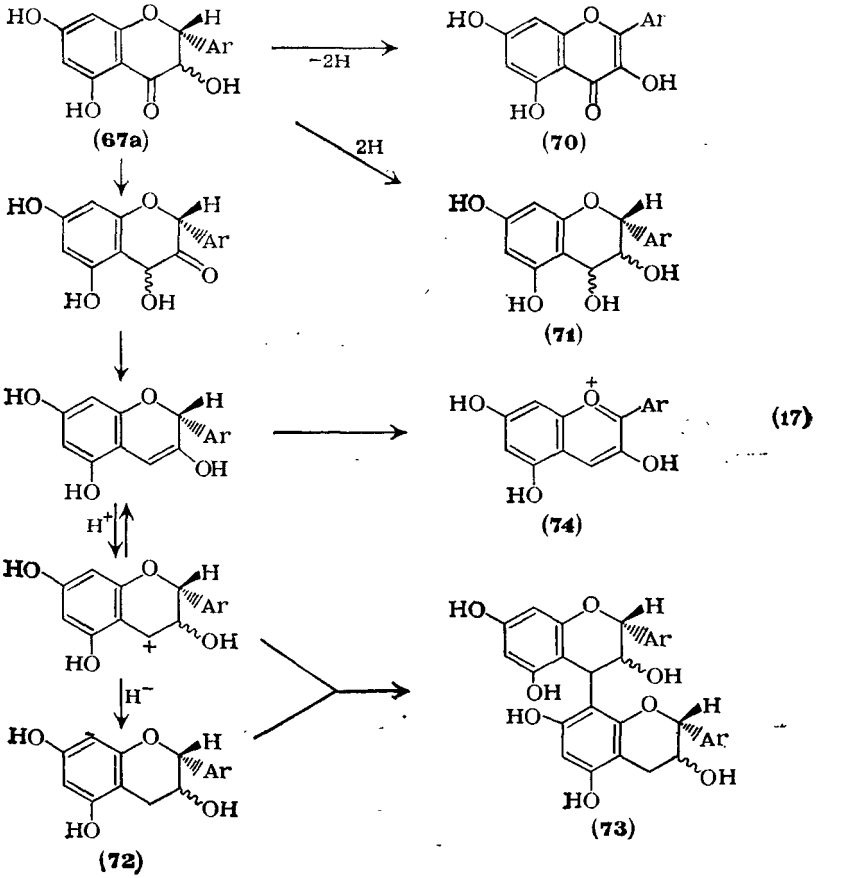
флавоноидов суммировано в схеме (16); реакции, в которых модифицируются другие участки молекул. на схеме не показаны.



Исходный флаванон (64) подвергается четырем различным типам окисления; механизм всех этих реакций не ясен [46—48]. Формально можно изобразить все четыре реакции как конформационнозависимые превращения одного и того же карбениевого иона (64а) (см. схему 16), однако это чрезмерное упрощение. Так, ауроны (66) альтернативно могут образовываться из халконов

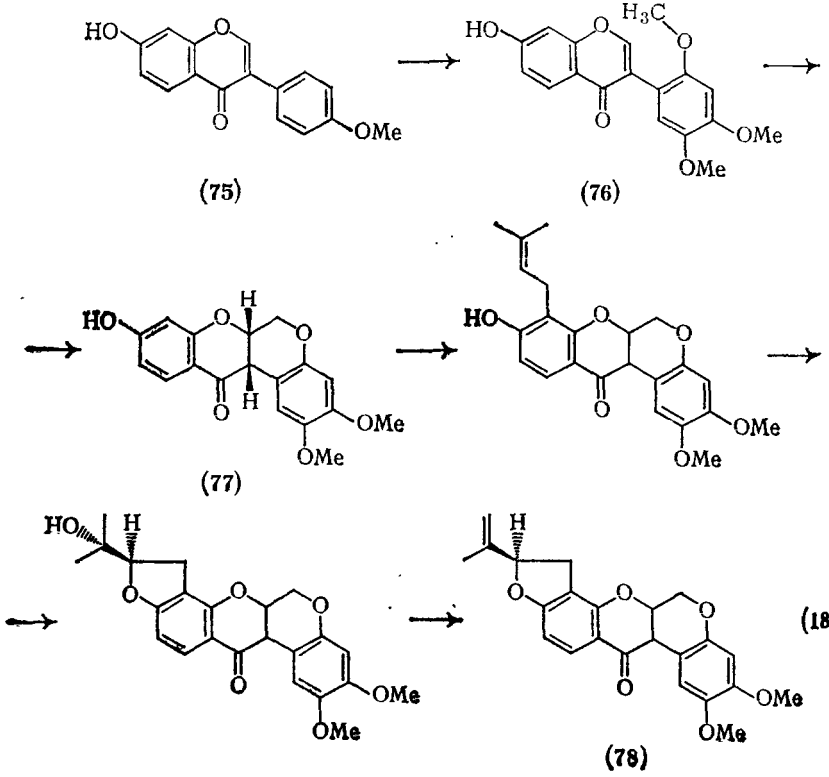
с открытой цепью (65); халконы и флаваноны легко превращаются друг в друга. Дигидрофлавонолы (67) могут также образовываться путем непосредственного оксигенирования флаванонов. Для объяснения миграции арильной группы, сопровождающей превращение флаванонов (64) в изофлавоны (68), предполагается промежуточное образование спиродиенонов; эти интермедиаты с равной легкостью могли бы превращаться и во флавоны (69) без дополнительной перегруппировки. Предполагают, что в синтезе изофлавонов расщепление спиродиенонов возможно не только путем протонирования, но и посредством электрофильного *О*-метилирования кольца С. Этот путь должен приводить непосредственно к известному ряду 4′-метоксиизофлавонов [49].

Особенно важным источником еще одной группы флавоноидов является, по-видимому, дальнейшая трансформация дигидрофлавонолов (67) [47, 48]. Некоторые из возможных путей биосинтеза такого рода приведены в схеме (17). Непосредственное дегидрирование соединений типа (67а) приводит к флавонолам (70), а прямое



восстановление — к флавандиолам (71). Практически важным вариантом восстановительного пути является образование катехинов (флаванолов-3) (72) и через промежуточные флавен-3-олы-3. Карбениевый ион, который, как предполагают, принимает участие в последней стадии этого процесса, в реакциях электрофильного замещения с участием (72) может, очевидно, приводить к олигомерным «проантоцианидинам»; одним из простых примеров последних является соединение (73) [50, 51]. Следует отметить, что в этом превращении сохраняется первоначальная конфигурация (*R*) при С-2, но в других центрах асимметрии кольца В конфигурация не закреплена. Так, соединение (72) может быть катехином (3*R*) или эпикатехином (3*S*). В то же время в ходе образования проантоцианидинов заместитель при С-4 всегда занимает *транс*-положение по отношению к С-3. Истинные антоцианидины (74) также образуются из дигидрофлавонолов, причем промежуточными соединениями, вероятно, являются флавен-3-олы-3.

Одной из интересных разновидностей изофлавонов являются довольно хорошо изученные инсектициды — ротеноиды [49], сфера распространения которых значительно уже сферы распространения основных типов флавоноидов. Основные пути биосинтеза ротеноидов, выясненные путем изучения включения меченых предшествен-

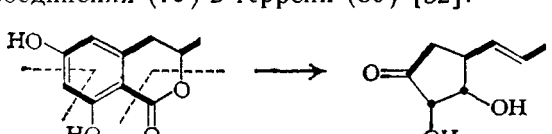


ников, приведены на схеме (18). Как отмечалось выше, 4′-метоксиизофлавон (75) образуется, очевидно, посредством согласованных процессов окисления, метилирования и перегруппировки предшественника — флаванона. Дальнейшие реакции гидроксилирования и *О*-метилирования приводят к соединению (76), а путем прямого окисления *О*-метилового эфира (76) и последующей стереоспецифической циклизации в молекуле (77) образуется второе пирановое кольцо. Далее, как показано на схеме, последовательно осуществляются пренилирование, эпоксидирование, циклизация и, наконец, дегидратация до ротенона (78). Другие ротеноиды образуются или из самого ротенона, или из перечисленных выше его предшественников посредством тех или иных превращений.

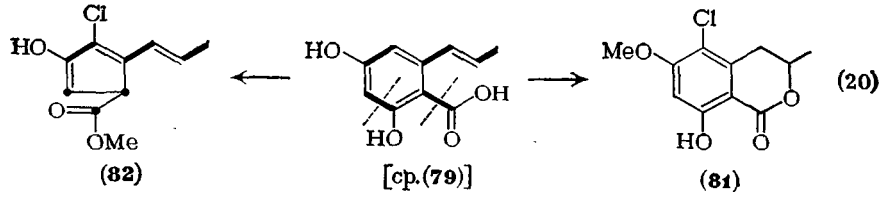
29.1.3.3. Реакции расщепления и конденсации простых поликетидов

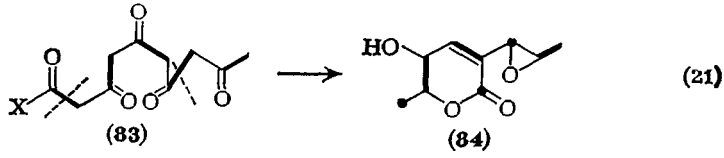
На примере патулина (13) (см. схему 10), пенициллиновой кислоты (27) и тропалонов (54)—(56) (см. схему 12) видно, как радикально перестраивается относительно простой поликетид в результате окислительного расщепления колец и связанных с этим скелетных перегруппировок. Во всех трех случаях наличие перегруппировок доказано экспериментальио путем идентификации исходных соединений на стадиях, предшествующих перегруппировкам, и путем непосредственного выявления соответствующих превращений. На других примерах наличие аналогичных процессов было доказано путем изучения картины распределения метки из меченого предшественника в конечном продукте реакции. Особенно хорошие результаты дает применение в качестве предшественника [$^{13}C_2$]ацетата; изучение спектра ЯМР продукта реакции позволяет локализовать в молекуле последнего «интактные» и «расщепленные» C_2-звенья (см. разд. 29.1.5.4) и таким образом получить информацию о промежуточных стадиях процесса биосинтеза.

Так, в некоторых штаммах *Aspergillus terreus* изокумарин (79), типичный пентакетидный аналог орселлиновой кислоты, сопровождает производное циклопентанона терреин (80). Применение [$^{13}C_2$]ацетата показало, что терреин (80) образуется из соединения (79) путем декарбоксилирования и сужения цикла (схема 19; жирными линиями выделены «интактные» ацетатные звенья). Показано, что каждый из несущих гидроксильную группу атомов углерода в (80) является остатком отдельного двууглеродного звена. Предложенный механизм был подтвержден включением меченного ^{14}C соединения (79) в терреин (80) [52].



(79) (80) (19)

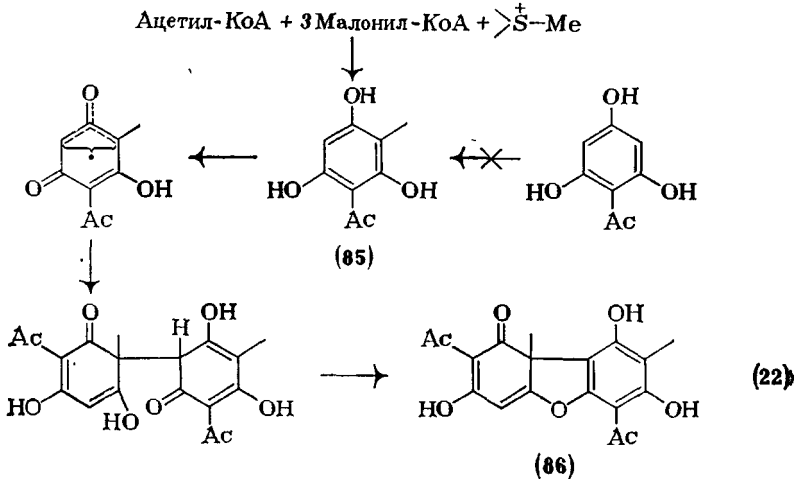




Аналогичные работы по исследованию другой пары поликетидных кометаболитов, (81) и (82), позволили предложить иной механизм расщепления и сужения цикла (схема 20) [53]. Вероятно, общим предшественником этих двух соединений является показанная на схеме свободная кислота, соответствующая лактону (79); детали механизмов других стадий процесса, в том числе *О*-метилирования и электрофильного галогенирования, неизвестны. Подобным же образом были приведены свидетельства в пользу существования перегруппировки третьего типа от пентакетида (83) до пирона (84); промежуточные соединения в этом случае не идентифицированы [54]. В этой перегруппировке (схема 21) степень окисления продукта реакции отвечает скорее эпоксидированному полиену, чем ароматическому поликетиду [ср. аналогичный регулярный поликетид (7)], но достаточно надежно установлены только общие принципы синтеза углеродного скелета этого соединения. В любом случае, однако, данные по включению ($^{13}C_2$)ацетата показывают, какой «конец» углеродного скелета остается интактным и какой теряет атом углерода. Ниже будут рассмотрены некоторые другие важные примеры расщепления кольца и перегруппировок более сложных поликетидов (см. разд. 29.1.3.3 и 29.1.3.5).

Известно, что окислительная конденсация фенолов является важным путем биосинтеза сложных природных соединений различных биосинтетических групп, например алкалоидов (см. разд. 30.1). Относительно простым и важным в историческом плане примером [55] окислительной конденсации поликетидов является метаболит лишайников усниновая кислота (86). Здесь исходный фенол, 2,4,6-тригидрокси-3-метилацетофенон (85), представляет собой *С*-метилированный тетракетид [ср. с 3-пренильным аналогом (57)]. Он претерпевает окислительную конденсацию (схема 22). Как и в других приведенных ранее примерах, уже образовавшееся производное ацетофенона не является субстратом на стадии *С*-метилирования; последнее должно осуществляться во время сборки поликетида [56]. Стадия конденсации, полностью аналогичная реакциям, которые могут быть проведены *in vitro* со множеством одноэлектрон-

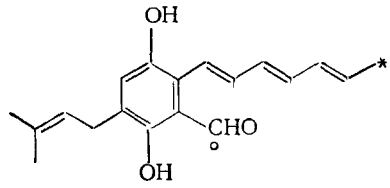
ных окислительных агентов, должна, тем не менее, проходить под контролем фермента, так как продукт реакции оптически активен. Подобно другим аналогичным случаям, изображение процесса конденсации как реакции конденсации двух свободных радикалов носит чисто формальный характер; в действительности с тем же успехом здесь возможно радикальное замещение в исходном феноле с последующим одноэлектронным переносом. В других главах будут приведены иные примеры реакций конденсации; все высказанные выше замечания применимы и к ним. Показано, что в биосинтезе проантоцианидина (см. разд. 29.1.3.2 и схему 17) окислительная конденсация идет по ионному механизму; эта альтернативная возможность раньше привлекала внимание исследователей в значительно меньшей степени, чем одноэлектронный процесс.



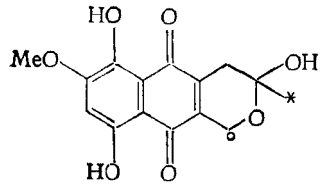
(22)

29.1.3.4. Более сложные процессы циклизации

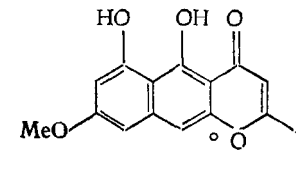
В случае больших поликетидных цепей следует ожидать, во-первых, большего разнообразия в способах циклизации, которая может захватывать как всю цепь, так и ее отдельные части, и, во-вторых, большего числа последующих реакций модификации. Так оно и есть на самом деле. Например, соединения (87)—(93) являются обычными гептакетидными продуктами метаболизма грибов [в формулах (87)—(92) «метильный» и «карбоксильный» концы поликетидов отмечены соответственно звездочкой и кружком].



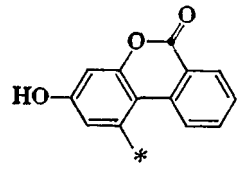
(87)



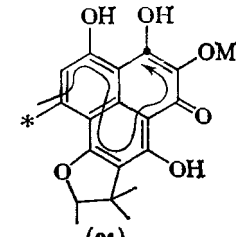
(88)



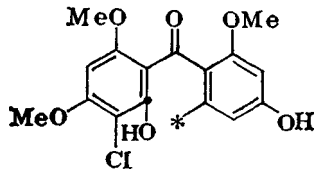
(89)



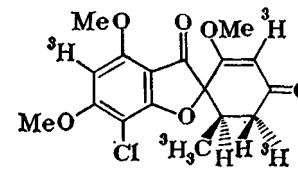
(90)



(91)



(92)



(93)

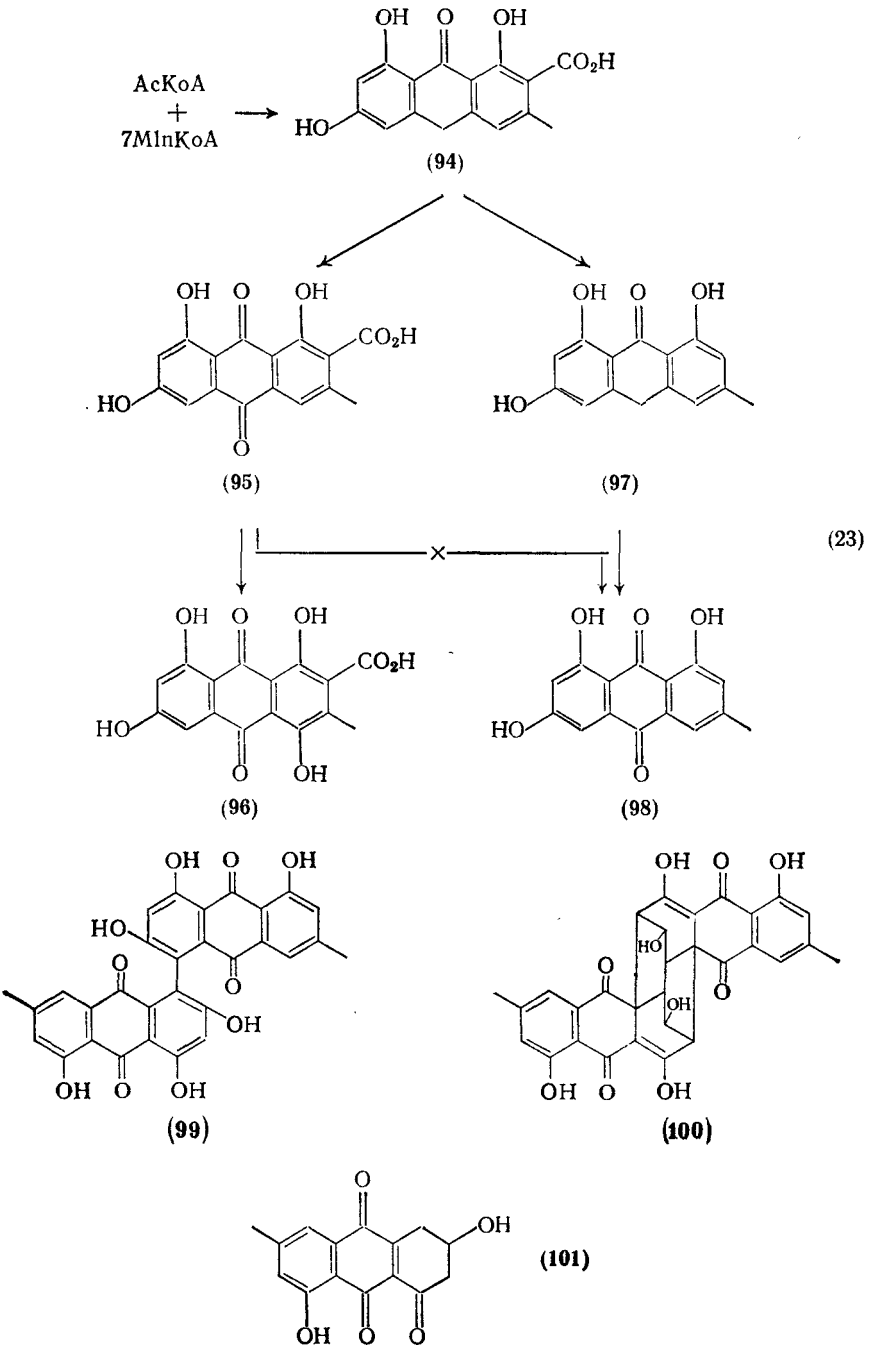
Ауроглауцин (87), содержащий пренильный остаток, является примером того, как одна часть поликетидной цепи может ароматизироваться, а другая восстанавливаться. Три кетометиленовых звена восстановлены до полиена; в одном из кометаболитов, флавоглауцине, эта боковая цепь полностью насыщена, однако данные о биосинтетической связи между этими двумя соединениями отсутствуют. Восстановленная концевая карбоксильная группа в соединении (87) представляет собой сравнительно редкое явление.

Продуцируемые родственными штаммами *Fusarium* фузарубин (88) и руброфузарин (89) также служат типичными примерами родственных метаболитов. Нафталиновые системы в (88) и (89) являются продуктами циклизаций «альдольного» и «клайзеновского» типов, соответственно.

Совершенно иной, довольно редкий тип циклизации характерен для альтернарнола (90) и некоторых других родственных дифенильных производных. Гептакетидный скелет в дезоксигеркеиноне (91) и других грибных феналенонах может возникать различными путями; приведенный на схеме путь биосинтеза доказан (во всяком случае, для данного соединения) с помощью [$^{13}C_2$]меченных соединений [57]. Присоединенный «другим концом» пренильный остаток в (91), вероятно, образуется путем перегруппировки Фриса обычного 3,3-диметилаллильного эфира у соседнего атома кислорода.

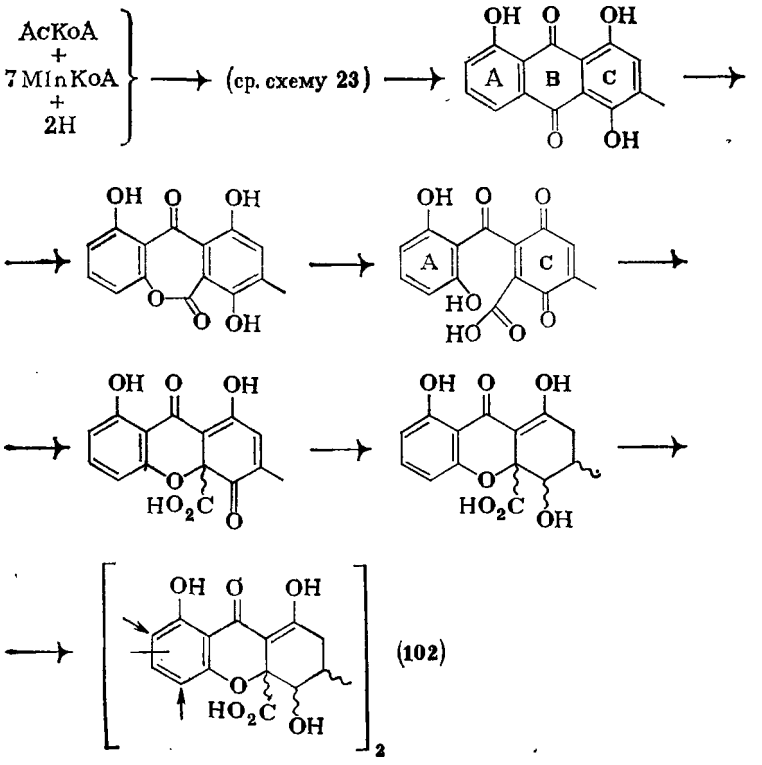
На развитие биосинтетических исследований большое влияние оказало изучение важного противогрибкового антибиотика гризеофульвина (**93**). Доказательство его гептакетидной природы (предсказанное на основе тщательного анализа его строения) посредством включения [^{14}C]ацетата было одним из первых экспериментальных подтверждений «ацетатной гипотезы» [58], а предположение об удивительном превращении производного бензофенона типа (**92**) (одного из ряда в высшей степени минорных кометаболитов) в оптически активный спиродиенон оказало большое влияние на точку зрения исследователей относительно роли контролируемых ферментами одноэлектронных процессов конденсации в биосинтезе природных соединений [59]. Введение атома хлора, очевидно, осуществляется путем электрофильной атаки на соответствующее исходное соединение с помощью обычного в таких случаях (но мало изученного) механизма; порядок введения трех *О*-метильных групп и место этих реакций в общей последовательности превращений также не установлены [60]. Высказывалось мнение, что гризеофульвин является не «настоящим» поликетидом, а продуктом некоторых более сложных реакций расщепления и рециклизации; эта точка зрения, однако, была окончательно опровергнута, когда удалось показать, что тритий из [2-^{3}H,2-^{14}C]ацетата включается в положения, указанные в формуле (**93**); в частности, три меченых атома сохраняются в *С*-метильной группе (**61**). Таким путем, кроме того, была установлена стереоспецифичность реакции восстановления диенона, являющейся, вероятно, последней стадией в биосинтезе (**93**) и осуществляющейся путем *транс*-присоединения двух атомов водорода в аксиальные положения.

Октакетиды с антроновой кольцевой системой, например соединение (**94**), особенно часто встречаются среди продуктов жизнедеятельности грибов; стадия превращения антронов в более обычные антрахиноны (конечно, если такое превращение вообще имеет место) является критической стадией в биосинтезе последних. Было показано [62], что продуцируемая грибами *Dermocybe* антрахинонкарбоновая кислота эндокрин (**95**) избирательно включается только в определенные кометаболиты, например в продукт гидроксилирования (**96**); так, она не способна декарбоксилироваться до эмодина (**98**), который, следовательно, должен образовываться независимо из (**94**) (схема 23). Наиболее вероятным промежуточным соединением в биосинтезе эмодина является соответствующий антрон (**97**). Последний в некоторых штаммах *Penicillium* служит также исходным соединением для особенно сложной группы производных антрахинона, в том числе димеров: от простых бис(антрахинонов) типа скирина (**99**) до мостиковых димеров типа ругулозина (**100**). В таких системах продуцируются также частично восстановленные антрахиноны, например соединение (**101**). Поскольку почти все микроорганизмы этого рода продуцируют множество соединений, тонкие биосинтетические связи между ними большей частью не выяснены, несмотря на довольно широкие исследования [63].



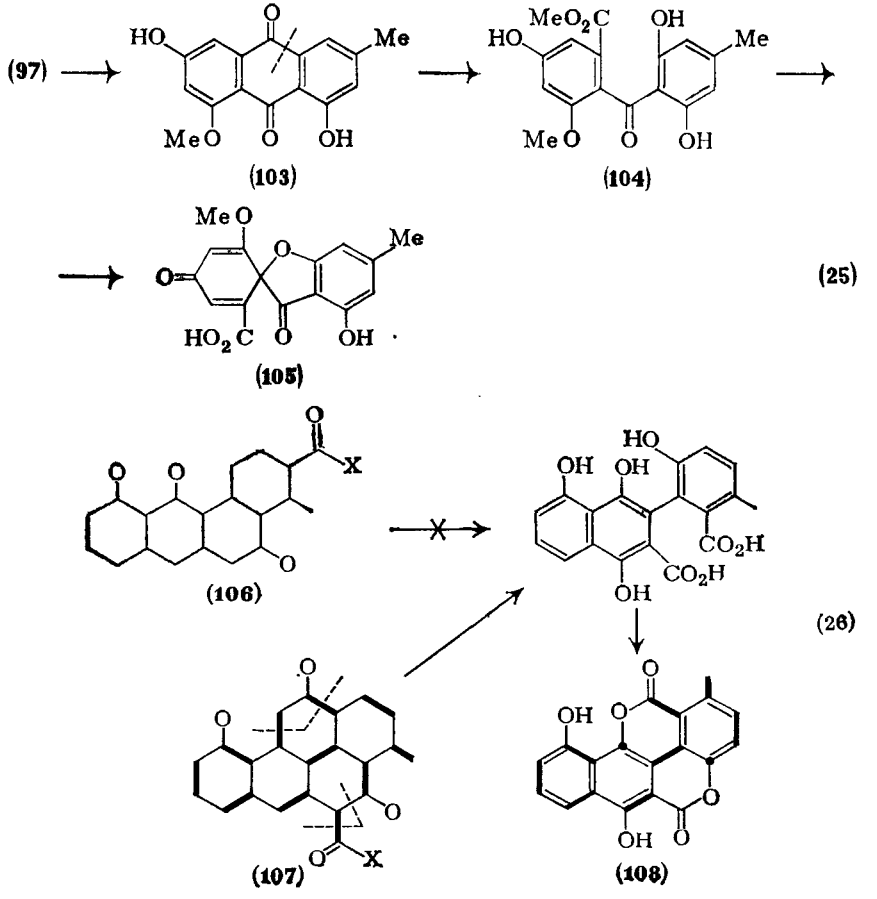
(23)

Важным процессом является дальнейшая трансформация антрахинонов путем окислительного расщепления до бензофенонов и затем до ксантонов. Этот процесс иногда был причиной неправильной интерпретации биосинтетических данных. Дело в том, что некоторые кажущиеся биогенетически близкими бензофеноны образуются непосредственно путем поликетидной сборки [например, предшественник гризеофульвина (**92**)], а другие, по-видимому, могут синтезироваться в результате ацилирования одного поликетида другим (хотя не описано ни одного достоверного случая такого превращения). Особенно наглядным примером расщепления антрахинонов служит биосинтез ряда пигментов спорыньи (эргохромов), типичными представителями которых являются секалоновые кислоты (**102**) [64]. Их биосинтез, вероятно, начинается с окисления кольца В антрахинона по типу реакции Байера — Виллигера (схема 24). Последующее образование гетероциклического кольца осуществляется, скорее всего, посредством 1,4-присоединения фенольного кольца А к хиноновому кольцу С. Согласно этой схеме, происходящее затем восстановление промежуточного соединения приводит к различным природным эпимерам (**102**). На схеме окислительная конденсация до димерных пигмен-



тов изображена как заключительная стадия биосинтеза, хотя возможно, что димеризация идет на одной из более ранних стадий, даже до стадии расщепления кольца B.

Аналогичное окислительное расщепление протекает при образовании сулохрина (**104**) из квестина (**103**), *O*-метилового эфира эмодина (**97**). Вызвавший много споров механизм этого процесса в конце концов был доказан в опытах как *in vivo*, так и в бесклеточных системах из соответствующих грибов [65, 66]. В этом случае последующая окислительная конденсация бензофенона приводит к чрезвычайно похожему на гризеофульвин спиродиенону (**105**). Другие интересные случаи процессов расщепления кольца приведены в разд. 29.1.3.5. Одним из примеров удивительных последствий реакций расщепления является образование антибиотика шартрезина из актиномицетов. Его агликон (**108**), очевидно, представляет собой продукт расщепления поликетида; простой анализ его строения позволяет высказать вполне правдоподобное



(25)

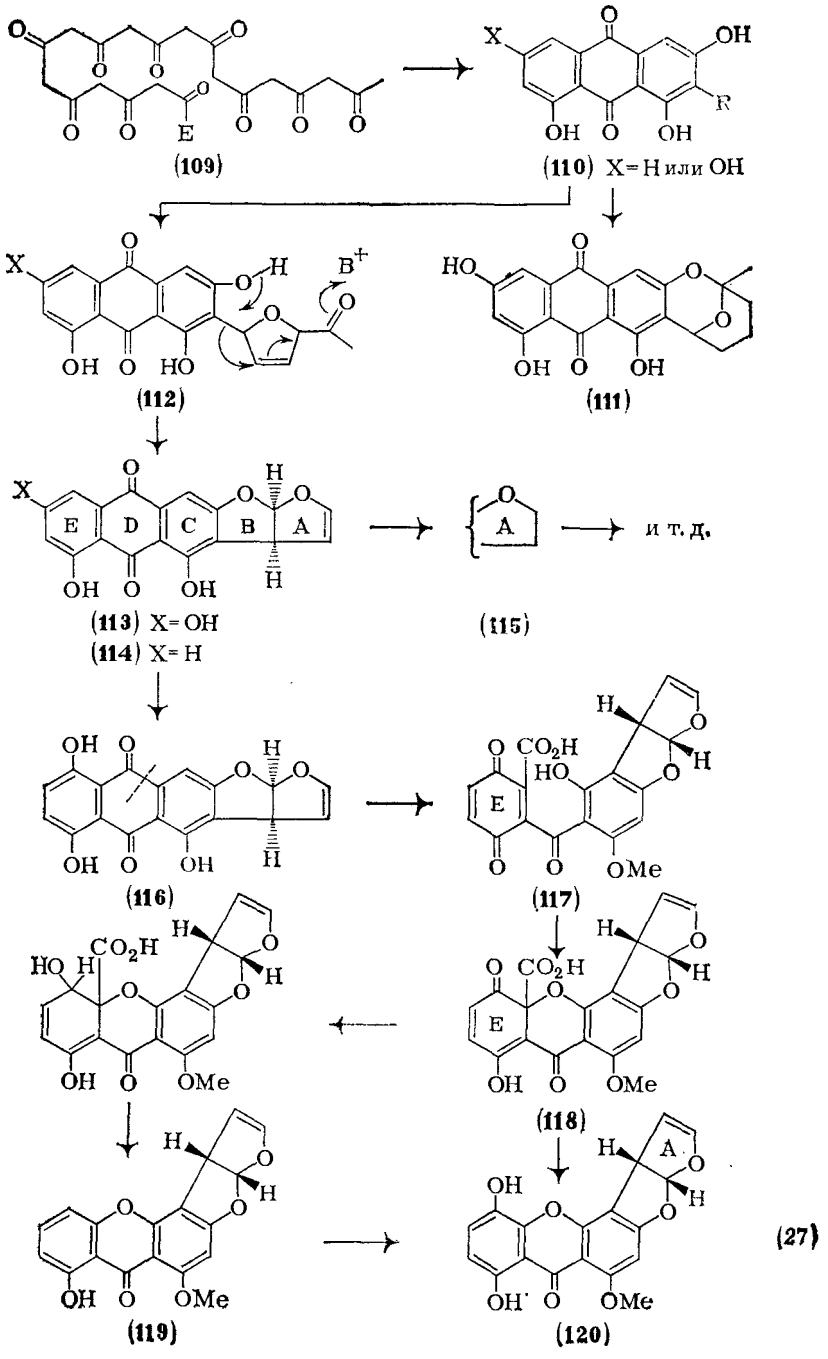
(26)

предположение об его образовании посредством расщепления декакетида (**106**). Однако применение [$^{13}C_2$]ацетата выявило [67] такое распределение интактных и расщепленных C_2-звеньев, которое может быть только результатом более сложного процесса расщепления ундекакетида (**107**) (схема 26; жирными линиями выделены «интактные» ацетатные звенья). Тем самым была получена еще одна иллюстрация возможностей этого метода в выяснении тонких деталей биосинтеза, которые, по крайней мере в этом случае, едва ли можно было предугадать заранее.

29.1.3.5. Афлатоксины и их предшественники

Выяснение биосинтеза афлатоксинов в *Aspergillus flavus* и родственных грибах, без сомнения, представляет собой важную (ввиду практической значимости этих токсинов) и трудную проблему; трудность обусловлена структурными особенностями афлатоксинов как высоко модифицированных производных соответствующих предшественников, а также их канцерогенностью. Путь биосинтеза афлатоксинов, учитывающий только наиболее надежно установленные данные, приведен на схемах (27) и (28). Источниками информации (в момент написания настоящего обзора) служили: (а) данные по изучению большого числа кометаболитов, обнаруженных в различных штаммах *Aspergillus flavus* и *Aspergillus versicolor*, а также результаты изучения их способности к взаимопревращениям [68, 69]; (б) общая картина распределения метки, в частности из [$^{13}C_2$]ацетата, тщательно исследованная на примере некоторых кометаболитов [70]; (в) гипотезы Томаса [71] и Холкера [72] о вероятных механизмах трансформаций, подкрепленные примерами метаболизма других грибов (ср. со схемой 24).

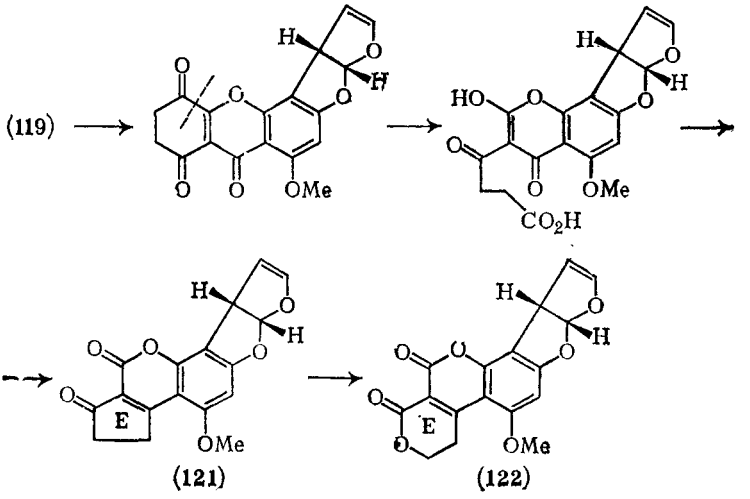
Исходным соединением является антрахинон (**110**) с шестиуглеродной боковой цепью. Он образуется из декакетида, молекула которого перед циклизацией должна складываться так, как это показано в формуле (**109**) [70]. Типичным представителем декакетидов, соответствующих данному типу циклизации, является averufin (**111**). Одно из неидентифицированных соединений этого ряда, имеющее, вероятно, строение (**112**), может претерпевать стереоспецифическую перегруппировку, при которой боковая цепь смещается от α- к β-углеродному атому и одновременно элиминируется C_2-звено. На схеме показан вероятный механизм превращения, ведущего от (**112**) к верзиколорину A (**113**) или его дезоксипроизводному (**114**) [71]. Известен ряд дигидропроизводных типа (**115**), что свидетельствует о возможности восстановления фуранового кольца A на этом этапе. Меченый averufin (**111**) является эффективным предшественником соединения (**113**) в одном из мутантов *Aspergillus* [69]. Дальнейшие превращения, в результате которых последовательно образуются стеригматоцистины (**120**) и афлатоксины (**122**), наиболее вероятно протекают через


(109)
(110) X=H или OH
(112)
(111)
(113) X=OH
(114) X=H
(115)
и т. д.
(116)
(117)
(118)
(119)
(120)

(27)

промежуточные дезоксисоединения типа (114). Это должно было бы означать, что дезоксигенирование осуществляется на стадии поликетида, например (109), так что пути через (113) и (114) должны проходить параллельно на протяжении всего процесса. Однако в этом процессе существует и альтернативный путь дезоксигенирования на стадии антрахинона; в частности, меченый верзиколорин А является эффективным предшественником афлатоксинов [69].

Последующей реакции расщепления, скорее всего, предшествует введение *пара*-гидроксильной группы в кольцо Е, как показано в (116) [72]. Таким образом, после расщепления кольца возникает возможность циклизации с образованием ксантонов путем 1,4-присоединения к хиноновой группировке, (117)→(118) (как и при образовании эргохромов, см. схему 24). Распределение [$^{13}C_2$]ацетата показывает, что ориентация кольца Е не изменяется по сравнению с предполагаемым промежуточным соединением (118) [70]; следовательно, в циклизации до ксантона не может участвовать гидроксильная группа, уже имеющаяся в кольце Е. На этой стадии в образовании ксантона потенциально могут участвовать два атома кислорода кольца С; выбору между ними, по-видимому, способствует стереохимия активного центра фермента или *О*-метилирование, связанное, скорее всего, с фрагментацией промежуточного продукта расщепления по Байеру — Виллигеру. С этого момента (см. схему 27) *О*-метильные производные являются истинными промежуточными соединениями. Непосредственным продуктом циклизации в этом случае будет соединение (118), которое может, очевидно, ароматизироваться путем восстановления и последующего элиминирования — декарбоксилирования, образуя стеригматоцистин (119), или посредством прямого декарбоксилирования енола, давая 5-гидроксистеригматоцистин



(28)

(120). Меченый стеригматоцистин является очень эффективным предшественником афлатоксинов [69].

Из продуктов жизнедеятельности грибов, в сущности, было выделено только 5-*О*-метильное производное (120), но единственным известным до настоящего времени экспериментально доказанным селективным предшественником соответствующих типов афлатоксинов является дигидропроизводное (в кольце А) соединения (120) [68]. В любом случае создание кольца Е афлатоксинов (см. схему 28) вероятнее всего происходит путем второго окислительного расщепления (120) с последующей «клайзеновской» конденсацией. Этот путь ведет к афлатоксинам группы В (121), из которых посредством третьего окисления по Байеру — Виллигеру образуются афлатоксины G-ряда (122).

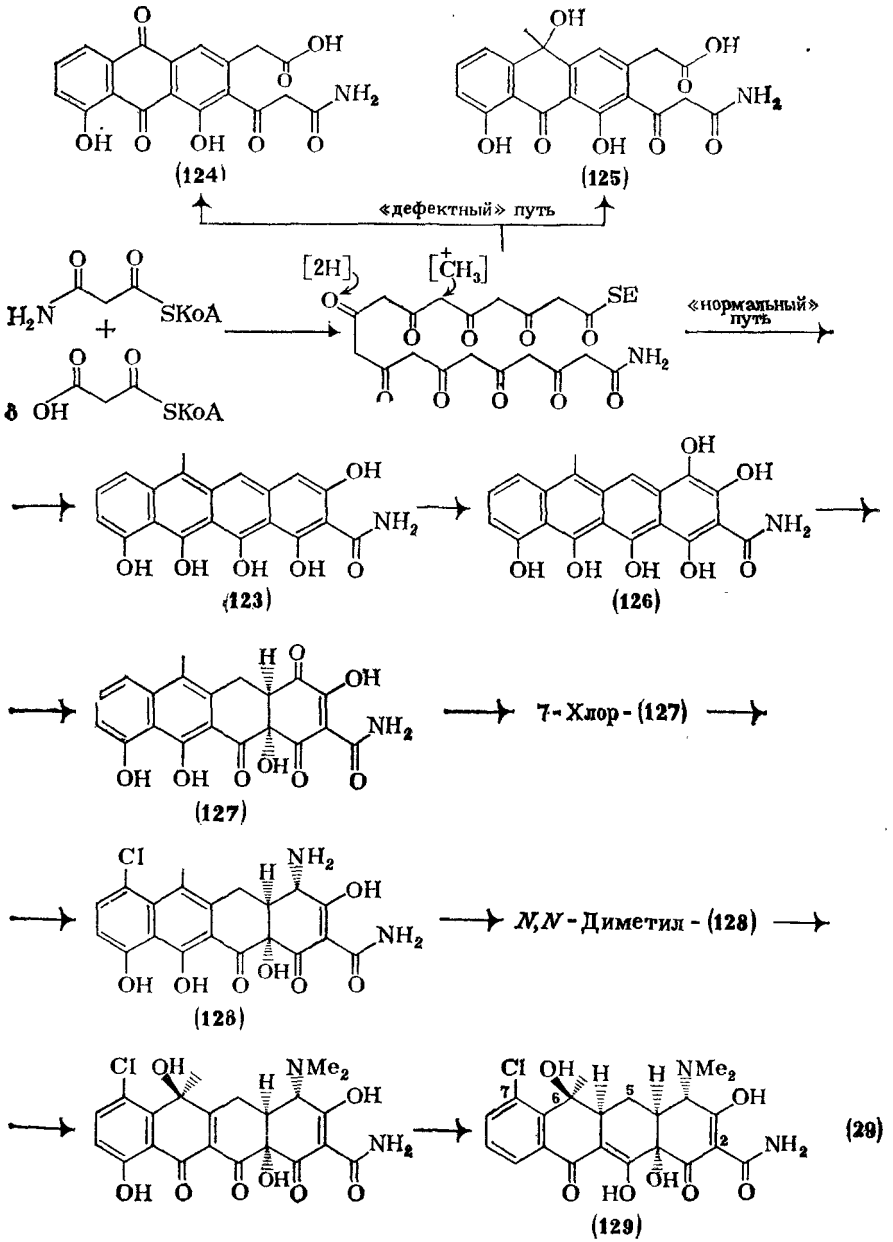
29.1.3.6. Тетрациклины

Биосинтез тетрациклиновых антибиотиков из бактерий стрептомицетов является другим важным примером последовательных превращений поликетидных предшественников; особый интерес представляет осуществление параллельных трансформаций различных субстратов. Эти превращения изучены достаточно детально [73, 74]; установлено, что «центральный» путь, ведущий к 7-хлортетрациклину, реализуется так, как это показано на схеме (29).

В исходном предшественнике — нонакетиде стартовым звеном является малонильный остаток (см. разд. 29.1.1.3); в процессе сборки нонакетид дезоксигенируется и *С*-метилируется, образуя 6-метилпрететрамид (123). Известны мутанты с «дефектным» процессом сборки и циклизации; некоторые из них накапливают трициклические нонакетиды, например (124) и (125). Эти нонакетиды аналогичны продуктам «неполного» поликетидного синтеза, описанным в случае более простых систем.

Исследования по идентификации и возможности превращения в тетрациклины «непродуцирующими» штаммами продуктов метаболизма других дифференцированно блокированных мутантов показали, что следующей стадией процесса является гидроксилирование 6-метилпрететрамида (123) до соединения (126); соответствующий последнему хинон, по-видимому, стереоспецифично присоединяет воду и образует известный субстрат (127) для следующей стадии электрофильного хлорирования. Аминогруппа вводится, очевидно, путем восстановительного (стереоспецифичного) аминирования. Последующие процессы *N*-метилирования соединения (128), а затем стереоспецифичные стадии гидроксилирования и восстановления приводят к хлортетрациклину (129). Таким образом, специфическая стереохимия конечного продукта процесса определяется рядом последовательных превращений.

Существует несколько видов упоминавшихся выше параллельных путей биосинтеза. Некоторые из них являются основными для различных штаммов продуцирующих стрептомицетов. Изменение


(124)
(125)
«дефектный» путь
[2H]
[+CH3]
SE
«нормальный» путь
SKoA
SKoA
(123)
(126)
7-Хлор-(127)
(127)
(128)
N,N-Диметил-(128)
(129)
(29)

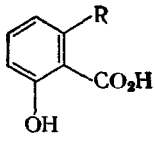
специфичности в отношении стартовой ацильной группы, например замена малонильного остатка на ацетоацетильный, приводит к совершенно независимому ряду 2-ацетильных аналогов, а изменение специфичности в процессе сборки комплекса, позволяющее опустить стадию *C*-метилирования, является причиной образования группы 6-деметилированных тетрациклинов. Аналогично, может быть опущена стадия хлорирования, а введение еще одной гидроксильной группы при C-5 может являться необязательной дополнительной стадией. Таким образом, в случае биосинтеза тетрациклина высокая степень реакционной специфичности ферментов сочетается с их относительно низкой субстратной специфичностью; в этом отношении тетрациклинсинтезирующая система является хорошо изученным примером довольно общего явления в биосинтезе природных соединений.

29.1.4. ЧАСТИЧНО ВОССТАНОВЛЕННЫЕ ПОЛИКЕТИДЫ

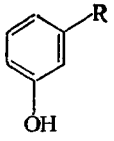
29.1.4.1. Типы частичного восстановления

Как уже отмечалось выше и как было показано на ряде примеров, общие механизмы биосинтеза поликетидов часто включают случаи, промежуточные между полным восстановлением почти всех ацильных звеньев (например, в жирных кислотах) и незначительным восстановлением (или его полным отсутствием), в результате которого образуются ароматические поликетиды с чередующимися окисленными и неокисленными атомами углерода. Так, например, в случае декакетидов ряда афлатоксинов (110)—(122) только семь ацильных звеньев включены в процесс ароматизации, а в ауроглауцине (87) только четыре из семи звеньев не подверглись восстановлению. В любом из этих случаев биосинтез мог бы протекать в два этапа путем образования производного жирной кислоты C_6 — C_8, используемого затем в качестве стартового звена биосинтеза ароматического поликетида. Однако имеющиеся экспериментальные данные не подтверждают это предположение.

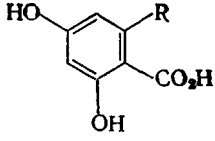
Некоторые высшие растения, например гинкго и кэшью, продуцируют алкилфенолы с длинными боковыми цепями и соответствующие кислоты типов (130)—(133), где R — неразветвленные алкильные цепи от C_{13} до C_{19} с нечетным числом атомов углерода и с одной — тремя двойными связями. Наиболее вероятным путем их биосинтеза является поликетидный путь с использованием жирных C_{14} — C_{20}-кислот в качестве стартовых звеньев [75]; в самом деле, меченый малонат селективно включается в ароматическую часть молекулы (130). Такой двустадийный биосинтез во многих отношениях напоминает механизм, установленный для превращения обычных жирных C_{16} — C_{18}-кислот в гомологичные C_{22} — C_{24}-соединения в системах животного происхождения (ср. разд. 25.2).



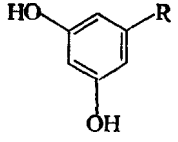
(130)



(131)



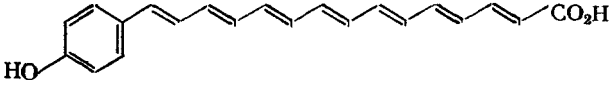
(132)



(133)

В общем случае, однако, биосинтез природных поликетидов осуществляется путем «нормальной» последовательности сборки, когда за стадией ацилирования следует стадия восстановления (одна стадия на одно ацильное звено), в результате чего образуются 1,3-полиолы или сопряженные полиены, которые обычно занимают значительные участки молекул (схема 30).

$$-[CHR-CO]_n- \longrightarrow -[CHR-CHOH]_n- \longrightarrow -[CR=CH]_n- \qquad (30)$$



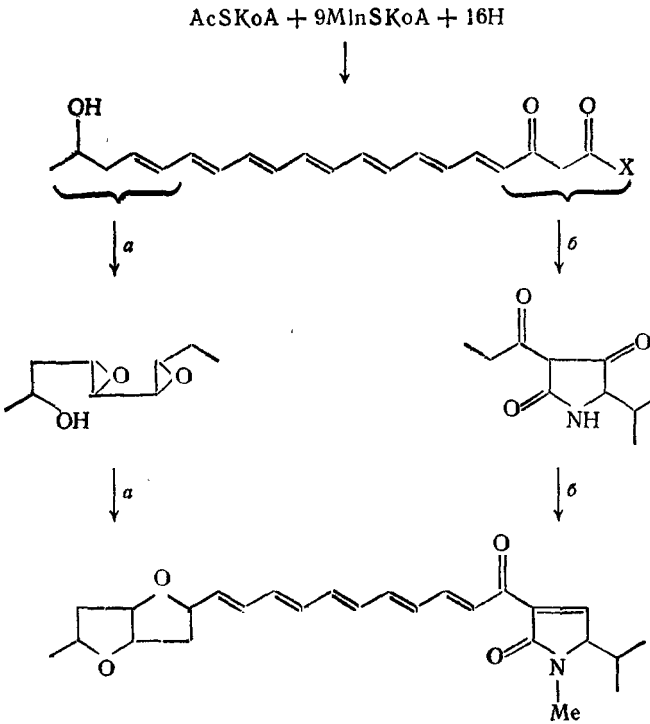
(134)

Так, например, грибной пигмент кортизалин (**134**) почти наверное образуется посредством конденсации *n*-кумарил-КоА с шестью молекулами малонил-КоА, сопровождающейся восстановлением и дегидратацией на каждой стадии. Как и в случае других поликетидов, при этом возможны те или иные отклонения от основного процесса восстановления, поэтому общая картина биосинтеза достаточно сложна. Это тем более справедливо, если принять во внимание, что не слишком четко определяемый класс «частично восстановленных поликетидов» включает несколько больших групп природных соединений, в частности из актиномицетов, в процессе сборки которых селективно используются также различные аналоги малонил-КоА. К сожалению, детали механизма биосинтеза таких соединений практически не известны, поэтому используемое в настоящем обзоре разделение различных примеров на группы в той или иной мере произвольно.

29.1.4.2. Некоторые продукты жизнедеятельности грибов

Примером разнообразия реакций восстановления поликетидов является биосинтез эритроскирина (**135**), построенного из остатков декакетида и *N*-метилированного валина [77]. Гипотетический путь его биосинтеза показан на схеме (31); следует подчеркнуть, однако, что порядок осуществления отдельных стадий на самом деле неизвестен. Исходный декакетид изображен в виде β-кетоацильного производного, соответствующего восстановлению восьми кетогрупп до спиртовых групп, семь из которых дегидратированы. Это позволяет объяснить образование фуранофурановой системы из бис(эпоксида) на одном конце цепи (путь *а*) и лактама на β-кетоацильном конце (путь *б*). Реакции последнего типа обнаружены при биосинтезе нескольких классов природных соединений,

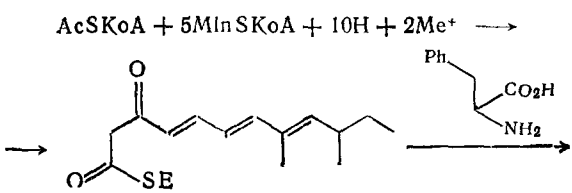
в том числе соответствующих кислородсодержащих аналогов — еноллактонов и тетроновых кислот [4].

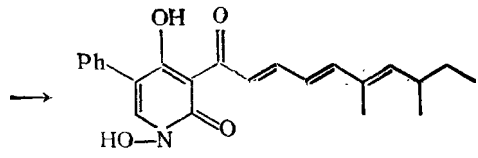


(31)

(135)

Бассианин **(136)** также является примером частично восстановленных поликетидов. Строение и биосинтез этого соединения были выяснены одновременно, в основном методами ЯМР ^{13}C и ЯМР ^{15}N [78]. Исходным соединением в биосинтезе бассианина является дважды *C*-метилированный гексакетид с одним полностью восстановленным и тремя частично восстановленными звеньями; этот гексакетид конденсируется с фенилаланином (схема 32); остаток фенилаланина при этом подвергается перегруппировке. Такая перегруппировка типична и для других продуктов метаболизма растений и грибов, образующихся из фенилаланина.

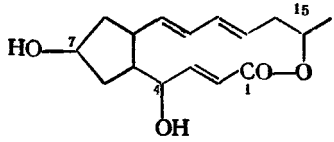




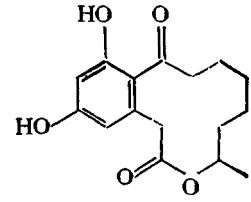
(32)

(136)

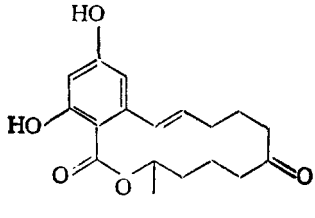
В других типах грибных поликетидов общая степень восстановления приближается к таковой у жирных кислот; именно неполнота восстановления и приводит в конечном счете к разнообразию структур этих соединений. Ранее ошибочно считалось, что антибиотик брефельдин А (**137**) образуется из пальмитиновой кислоты. Позднее выяснилось, что он является специфически построенным октакетидом. Оба лактонных атома кислорода (при С-1 и С-15) возникают из атомов кислорода ацетил-КоА [80]; атомы кислорода при С-4 и С-7 вводятся в отдельных реакциях двумя молекулами кислорода. Пока еще неясно, каким образом связываются атомы С-5 и С-9 (бывшие карбонильные группы) при образовании пятичленного цикла. Отмечалось, что в подавляющем большинстве ароматических поликетидов «метильный» и «карбоксильный» концы конечного продукта пространственно сближены, что может быть причиной образования макроциклических лактонов в тех случаях, когда поликетидная цепь восстановлена и ароматизация ограничена или вообще отсутствует. Отсюда следует, что и в первом, и во втором случаях рост поликетидной цепи напоминает равномерное удлинение петли, находящейся между двумя более или менее фиксированными центрами. Петля может быть отщеплена посредством реакции между концевыми группами в этих центрах, когда соответствующая «матричная» область, занятая петлей, «заполнена». Другими примерами грибных макроциклических лактонов являются окта- и нонакетиды курвуларин (**138**) [81], зеараленон (**139**) [82] и монорден (**140**). На первый взгляд степень восстановления отдельных звеньев в этих трех соединениях настолько различна, что наличие в них трех или четырех необходимых для ароматизации соседних кетометиленовых групп кажется делом случая. Однако предшественники соединений (**138**) и (**140**) могли бы циклизоваться и по иным направлениям; то, что этого не происходит, свидетельствует о существовании совершенно определенного механизма циклизации.



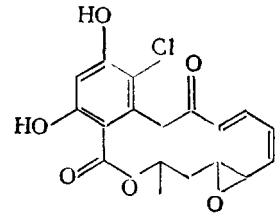
(137)



(138)

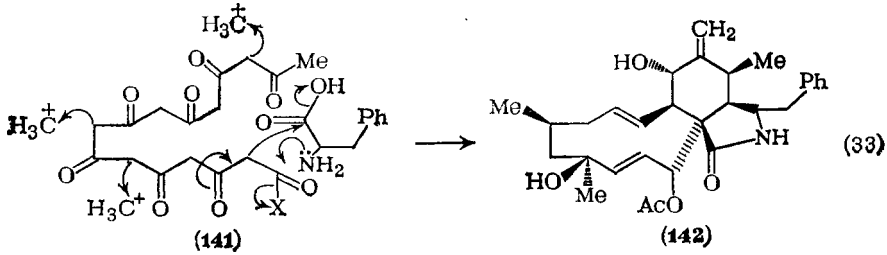


(139)

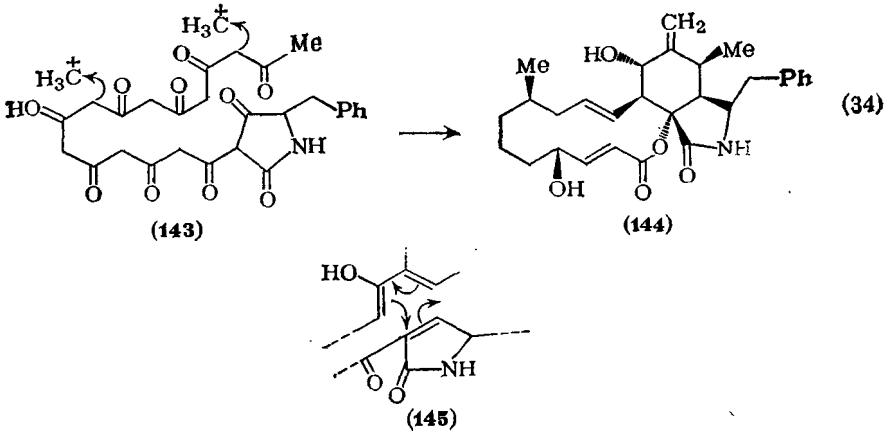


(140)

Особенно сложная картина наблюдается при биосинтезе цитохалазина и родственных метаболитов, при котором окта- и нонакетидные цепи циклизуются в процессе взаимодействия с фенилаланином. Подробные исследования с применением ^{14}C и ^{13}C показали, что в общих чертах биосинтез протекает согласно схемам (33) и (34) [83]. Следует отметить, что хотя поликетидные цепи в цитохалазине D (**142**) и фомине (**144**) различны по длине, их дальнейшие превращения — изменение уровня окисления, *C*-метилирование, циклизация — совершенно идентичны на любом из концов молекулы, так что в результате «лишнее» C_2-звено в соединении (**144**) располагается, очевидно, в середине цепи. Такой метод сравнения структур, другие примеры которого приведены ниже, помогает выявить неизвестные высокоспецифичные механизмы биосинтеза. Фенилаланин присоединяется, по-видимому, к промежуточному β-кетоацильному соединению [см. формулы (**141**) и (**143**)]; реакция аналогична реакции образования соединений (**135**) и (**136**) из той же самой аминокислоты. Предполагали [84], что циклогексановое кольцо, образование которого не может быть объяснено механизмами обычных реакций в поликетидной цепи, возникает с помощью электроциклического процесса, возможно так, как показано в формуле (**145**); эта гипотеза хорошо согласуется с принципом минимальных энергетических затрат и, кроме того, объясняет стереохимию конечных продуктов реакции. Наконец, в случае фомина (**144**) лактонный атом кислорода, весьма вероятно, внедряется в карбоциклический аналог (**142**) посредством реакции типа Байера — Виллигера; это превращение протекает, как и ожидалось, с сохранением конфигурации.



(141) (142) (33)



(143) (144) (34)

(145)

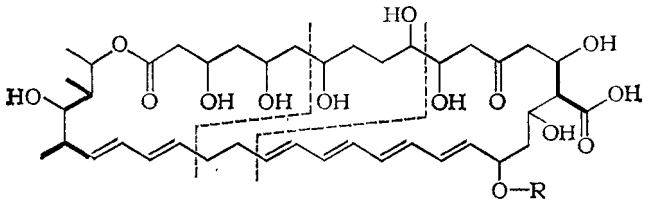
29.1.4.3. Макролиды и родственные антибиотики из стрептомицетов

Наиболее полно гибкость поликетидного биосинтеза используется, вероятно, бактериями стрептомицетами, которые продуцируют огромное число различных соединений; все эти соединения были открыты в ходе поиска новых антибиотиков. На примере этих соединений видно все разнообразие типов сборки различных ацильных предшественников, различие в уровнях восстановления после каждой стадии сборки, специфические типы складывания молекул продуктов сборки, дальнейших контролируемых трансформаций; заметна явная тенденция к преимущественному образованию макроциклических соединений по механизмам, описанным в предыдущем разделе.

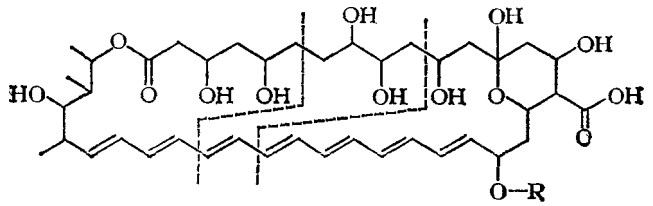
Выше уже приводились примеры «ацетатных» и преимущественно ароматизированных поликетидных антибиотиков из стрептомицетов [например, (108) и (129)]; еще более велико разнообразие структур соединений, для которых типичной является промежуточная степень восстановления кетогрупп (частично до полиолов, а частично — до полиенов) (см. разд. 29.1.4.1).

Во многих случаях составляющие поликетид ацильные звенья были идентифицированы путем изучения включения меченых предшественников; тем не менее о механизме, с помощью которого достигается структурная специфичность в процессе сборки этих предшественников, практически ничего не известно. Например, агликон нистатина (146) построен из 16 «ацетатных» звеньев (предположительно, 15 из них от малонил-КоА) и трех «пропионатных» или метилмалонильных звеньев [жирные линии в формуле (146)] [85], расположенных в последовательности: (ацетат)→ →(пропионат)$_2$→(ацетат)$_8$→пропионат→(ацетат)$_7$. Степень восстановления преимущественно, но не исключительно, отвечает

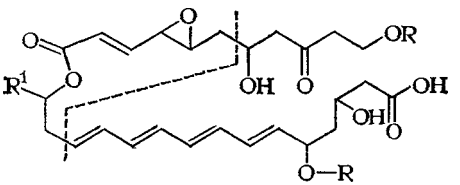
образованию полиолов и полиенов, причем имеющиеся полиеновые и полиольные фрагменты расположены в разных участках молекулы. Гептаен амфотерицин В (**147**), очевидно, очень близок по строению к соединению (**146**), но мы не имеем ни малейшего представления о том, какие механизмы ответственны за тот факт, что различие между (**146**) и (**147**) сконцентрировано в центральных областях полиенового и полиольного фрагментов. Здесь нет простого совпадения; об этом свидетельствует тот факт, что в структурах двух других полиеновых макролидов, пимарицина (**148**) и люцензомицина (**148а**) с совершенно другой последовательностью предшественников: (ацетат или *н*-валерат)→(ацетат)$_6$→(пропионат)→(ацетат)$_5$, — большая часть конечной структуры точно такая же, как и общий элемент структуры соединений (**146**) и (**147**).



(**146**) R = остаток микозамина



(**147**) R = остаток микозамина



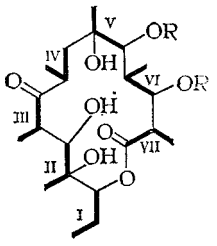
(**148**) R^1=Me; (**148а**) R^1=*н*-Bu
R = остаток микозамина

Аналогичные повторяющиеся элементы структуры могут быть обнаружены при сравнении строения отдельных соединений в самых различных группах полиеновых и других макролидных антибиотиков [86]; такие примеры будут приведены ниже, однако в отсутствие прямых экспериментальных данных об основах их

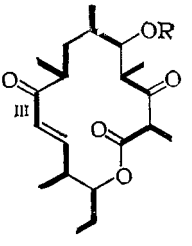
биосинтеза интерпретация результатов структурного анализа может быть дана только в самом общем виде. В значительно более хорошо изученном [87] биосинтезе олигопептидных антибиотиков в бактериях основной механизм сборки очень похож на механизм синтеза поликетидов: (а) сборка олигопептида осуществляется мультиферментным комплексом, содержащим как акцепторные центры, так и белок-переносчик; (б) конденсация субъединиц осуществляется с участием высокореакционноспособных тиоэфиров. Олигопептидсинтетазы характеризуются довольно высокой, но не абсолютной специфичностью по отношению к субстратным аминокислотам; последние соединяются в специфические последовательности, определяемые, как принято считать, пространственным расположением акцепторных центров в комплексе. С помощью механизма такого типа с тем же успехом можно объяснить специфичность последовательности звеньев-предшественников в более сложных поликетидах. Поликетидсинтетазы должны, однако, иметь в своем распоряжении дополнительные механизмы, обеспечивающие специфические локальные трансформации в определенных точках конечного продукта. Логично предположить, что специфичность этих стадий зависит от расположения соответствующих каталитических центров и(или) центров, доступных для определенных реагентов, в объеме, определяющем окончательную конфигурацию конечного продукта сборки, т. е. в области матрицы. Описанная выше общность элементов структур, возможно, свидетельствует о том, что такие матричные области определяются несколькими макромолекулами, так что одна часть матрицы может быть общей для нескольких различных систем, в то время как другие системы могут отличаться только относительно небольшими изменениями в одной части одного из компонентов матрицы.

Другим примером структурных взаимосвязей, на которых базируются приведенные выше рассуждения, являются различные макролидные антибиотики, родственные эритромицину (**149**). Агликон соединения (**149**) построен из одного остатка пропионил-КоА и шести остатков метилмалонил-КоА; таким образом, он имеет полностью «пропионатную» природу [88]. Составляющие молекулу звенья выделены в приведенных ниже формулах жирными линиями и пронумерованы цифрами I—VII, начиная от стартового звена. Агликон нарбомицина (**150**) почти идентичен (**149**) за исключением того, что звено III здесь является «ацетатным» остатком. Однако в тиломицине (**151**) изменения более существенны. Звено III заменено двумя звеньями: «пропионатным» IIIа и «ацетатным» IIIб; звено V стало теперь «бутиратным» C_4-звеном, а звено VII — «ацетатным». Тем не менее общая схема молекулы в заметной степени сохранена. Метимицин (**152**) очень похож на нарбомицин (**150**), хотя звено VI в нем отсутствует. Аналогично, платеномицин (**153**), очевидно, очень близок (**151**), хотя у него совершенно иная последовательность предшественников: (ацетат)$_4$→(пропионат)→(бутират)→(X)→(ацетат), где X —

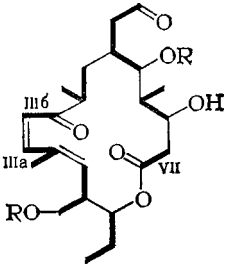
неидентифицированный предшественник «метоксиацетатного» звена [89]. Как и в случае полиеновых макролидов, этот список может быть значительно расширен в рамках известных структур [86]; тесное сходство между ними охватывает и такие элементы структуры, как стереохимию хиральных центров макролида и строение входящих в гликозид остатков сахаров; эти элементы не отражены в формулах (149)—(153). Степень биологической близости организмов, продуцирующих эти разнообразные соединения, и связанная с этим степень идентичности или близости макромолекул, участвующих в биосинтезе поликетидов, не ясна (имеющиеся сведения противоречивы), но вместе с тем одни только химические данные свидетельствуют о тесном родстве между так называемыми матричными функциями и о частичной независимости последних от функций, определяющих последовательность звеньев в предшественнике.



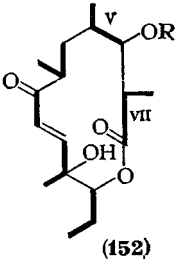
(149)



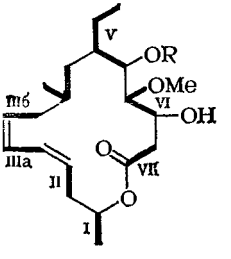
(150)



(151)



(152)



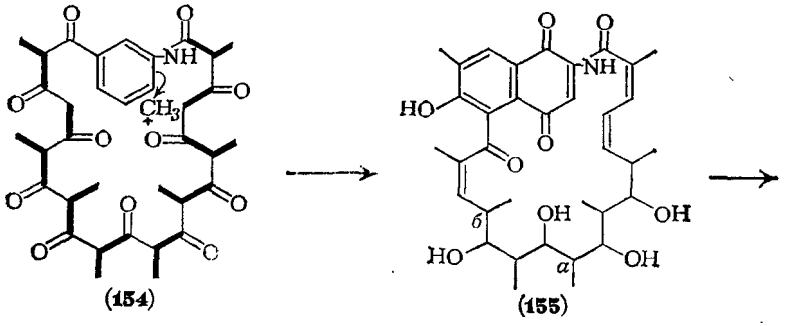
(153)

R=гликозил

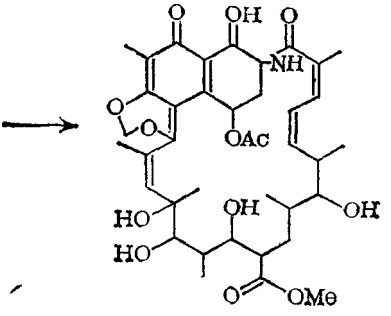
«Анса»-группа антибиотиков из актиномицетов, названная так из-за присущей им макроциклической структуры с ароматическими мостиками, в некоторых отношениях аналогична другим макролидам. Общий механизм сборки этих соединений изучен мало; значительно лучше выяснены взаимосвязи между отдельными представителями этой группы.

С помощью меченых соединений была выяснена природа стартовых ацильных звеньев этих антибиотиков; ими оказались образовавшиеся из углеводов производные со скелетом *м*-аминобензойной кислоты [90], как, например, в соединении (154). В стреп-

товарицинах стартовые звенья *C*-метилированы (схема 35). Широко изучалось также включение других меченных ^{13}C предшественников; таким путем было установлено, что конечный продукт сборки состоит из восьми «пропионатных» и двух «ацетатных» звеньев [см. формулу (154)], причем построение цепи завершается ацилированием аминогруппы стартового звена [91]. Из идентифицированных до настоящего времени макроциклических предшественников стрептоварицинов наиболее ранним является протострептоварицин I (155). Из него образуется набор последующих метаболитов. Конечным продуктом является стрептоварицин C (156), но, поскольку переход от (155) к (156) осуществляется

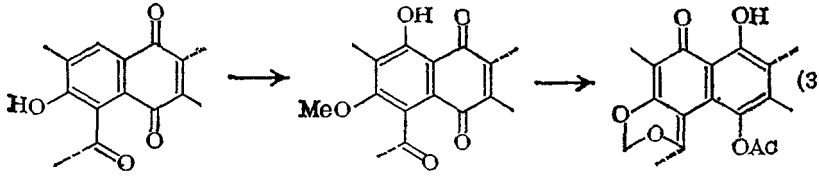


(154) (155)

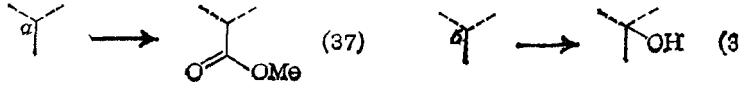


(156)

(35)



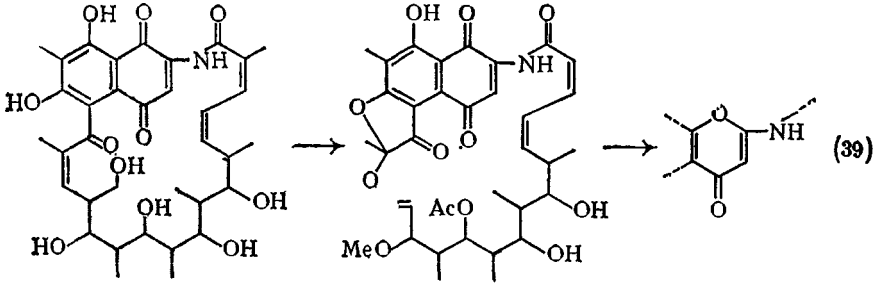
(36)

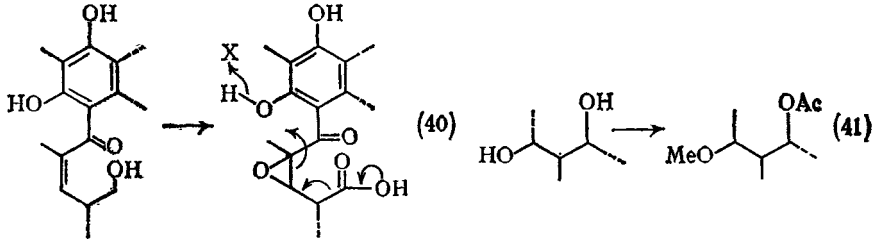


(37) (38)

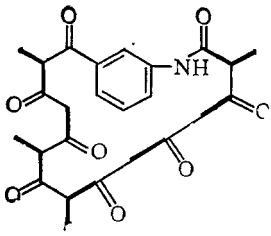
несколькими параллельными путями (схемы 36—38), образуется также ряд различных «промежуточных» соединений [92].

В очень близкой группе рифамицинов, изучавшейся аналогичными методами, стартовое звено, образованное из углевода, лишено *C*-метильной группы; в других отношениях продукт сборки (**157**) идентичен соединению (**154**) [93]. Однако дальнейшие превращения (**157**) протекают другими путями (схемы 39—41). Уже в самом раннем из идентифицированных макроциклических предшественников, рифамицине W (**157**), метильная группа при C-14 подверглась гидроксилированию. Как было показано с помощью меченых соединений [94], рифамицин W является предшественником рифамицина S (**158**); механизм этого превращения включает стадию внедрения кислорода, которая, возможно, протекает путем раскрытия кольца промежуточного эпоксида и последующего отщепления окисленной метильной группы в виде CO_2 (схема 40). Протекают также незначительные трансформации в различных участках цепи (схема 41). В ходе дальнейших превращений, связанных, очевидно, с окислительным сужением цикла, из соединения (**158**) образуется пироновый аналог (**159**).

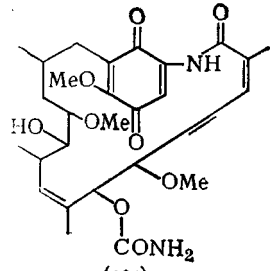




Примером третьего типа анса-антибиотиков является гельдамицин (**161**). Показано [95], что в его биосинтезе исходным соединением служит (**160**) — гомолог (**154**), содержащий меньшее число звеньев (на 3 звена).



(160)



(161)

29.1.5. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСИНТЕЗА ПОЛИКЕТИДОВ

Источником наших знаний о биосинтезе являются экспериментальные исследования; это относится как к уже известным, так и к невыясненным вопросам биосинтеза. Классический прием изучения химических реакций в биологических системах заключается в применении методов энзимологии, которые в данном обзоре не рассматриваются. Таким путем получено, однако, очень мало данных о биосинтезе поликетидов; мы надеемся, что в предыдущем изложении эти сведения были отражены достаточно полно. Их значимость определяется тем обстоятельством, что они образуют соединительное звено между данными более распространенных методов изучения биосинтеза, с одной стороны, и основными фактами и представлениями современной биохимии — с другой. Детальные энзимологические характеристики каждой стадии биосинтеза, хотя они и получены для ограниченного круга объектов, позволяют сделать достаточно обоснованные выводы относительно значительно большего числа менее изученных систем на языке, одинаково приемлемом как для «биохимиков», так и для специалистов по химии природных соединений.

29.1.5.1. Биологические аспекты применения меченых соединений

Наши сведения о биосинтезе поликетидов получены в основном путем использования меченых соединений. Такой подход легко воспринимается химиками-органиками и разрабатывается очень интенсивно. Однако в отличие от других методов современной органической химии он в большей мере имеет характер пассивного наблюдения. В биосинтетическом эксперименте контролируемые изменения можно варьировать только в пределах, обусловленных природой исследуемой биологической системы, которая обычно представляет собой более или менее интактный организм колоссальной сложности на молекулярном и более высоких уровнях. В отдельных случаях, например при изучении «направленного биосинтеза», биологическую систему намеренно «настраи-

вают» на аномальное функционирование, но чаще необходимо проводить эксперименты на системах с минимальными отклонениями от их «нормальных» функций. Именно на этом критерии базируются все допущения экспериментов с мечеными соединениями; этот же критерий, в частности, позволяет судить об успехе или неудаче работ. В настоящем разделе приведены некоторые практические соображения по поводу таких допущений.

В типичном эксперименте с мечеными соединениями в биологическую систему вводится некое постороннее (экзогенное) вещество. При этом предполагается, что его молекулы будут вступать в те же самые реакции, что и некоторое продуцируемое системой (эндогенное) вещество, участвующее в биосинтезе исследуемого соединения. Для этого эндогенный и экзогенный субстраты должны стать биологически идентичными, причем это требование относится как к природе, так и к количеству меченого соединения. Например, к культуре плесени добавляют следовые количества ацетата натрия; ацетат-ион (или уксусная кислота) должен быть усвоен клетками без заметного нарушения связанных с энергетическими затратами механизмов транспорта через клеточные мембраны и далее превращен внутри клетки в ацетил-кофермент А без значительных изменений концентраций веществ, требующихся для осуществления этих реакций (ATP, кофермент А), или продуктов превращений (ADP, ацетилкофермент А). Наконец, получившийся таким образом ацетилкофермент А должен полностью перемешаться с ацетилкоферментом А, образовавшимся в клетке несколькими совершенно другими путями, с тем чтобы степень его участия в биосинтезе поликетидов была пропорциональна его доле в общем фонде ацетил-КоА. Кроме того, должен быть метод, позволяющий отличить меченый компонент от эндогенного продукта биосинтеза, например, путем измерения уровня радиоактивности, если экзогенный ацетат частично содержал ^{14}C или ^{3}H. В конечном счете одни из перечисленных выше требований несовместимы с другими; результаты эксперимента можно интерпретировать только при допущении, что свойства возмущенной системы идентичны свойствам ее невозмущенного состояния. При этом еще предполагается, что наблюдатель способен фиксировать изменение свойств биологической системы точнее, чем сама эта система.

Иногда для получения информативных данных достаточно даже простого различия в строении молекул субстрата. Например, во многих (но не во всех) организмах вклад стартового ацетил-КоА в синтез жирных кислот может быть прослежен с помощью пропионовой или даже изомасляной кислоты путем идентификации примеси жирных *н*-C_{2n+1}- или *изо*-C_{2n}-кислот в образующейся смеси жирных кислот. Однако этим методом нельзя обнаружить вклад ацетил-КоА в построение оставшейся части скелета жирных кислот, поскольку фермент, превращающий ацетил-КоА в малонил-КоА, более специфичен, т. е. более тонко ощущает разницу между субстратами. Последняя ситуация более ти-

пична, поэтому экспериментатор должен иметь в своем распоряжении очень тонкие методы различения субстратов. Это и послужило причиной разработки ряда методик с использованием меченых соединений, которые вкратце рассматриваются в последующих разделах. Здесь же мы рассмотрим прежде всего биологические критерии; с этой точки зрения ошибки эксперимента могут быть обусловлены тремя факторами.

Прежде всего об общих принципах эксперимента. Меченый предшественник должен более или менее свободно входить в систему и становиться метаболически эквивалентным эндогенному субстрату, в который требуется ввести метку. Эти требования в общем соблюдаются, например, для ацетат-иона, в меньшей степени — для малонат-иона и часто совершенно не соблюдаются для введенного мевалонат-иона. Конечно, во время эксперимента организм должен продуцировать требуемое соединение из эндогенного субстрата (а не, например, из некоторого накапливаемого позднее промежуточного вещества). Эксперимент должен также обеспечивать возможность отличать проверяемый «прямой» путь включения от любых других неожиданных и часто в высшей степени косвенных путей. Например, структуры многих поликетидов таковы, что меченый поликетид в результате простых реакций расщепления может стать источником специфически меченного ацетил-КоА, который затем может включаться в совершенно иное соединение. Еще один пример: такие совершенно различные по структуре аминокислоты, как глицин, серин и триптофан, могут являться эффективными предшественниками *С*-метильных групп; количественное сравнение с меченым метионином показывает, что последний представляет собой гораздо лучший предшественник, но результаты с другими аминокислотами могут быть правильно интерпретированы только при наличии определенных данных о промежуточном метаболизме. Соблюдение соответствующих биологических принципов может также оказаться выгодным при выборе наиболее экономичной или наиболее чувствительной методики. Как будет показано ниже, различные применяющиеся в настоящее время изотопы следует вводить в различных количествах; этот факт следует учитывать, например, при проведении предварительных опытов с целью оптимизации условий включения предшественника. Кинетика включения предшественника может быть чрезвычайно сложной. Эта тема достаточно хорошо освещена в обзорах [1, 96, 97]; описано и применение математического анализа кинетических данных, который имеет, по-видимому, ограниченное применение, но тем не менее важен как инструмент фундаментального исследования [98, 99].

Второй биологический фактор, который следует принимать во внимание при разработке и планировании эксперимента, связан с возмущениями нормального состояния системы под влиянием добавленного меченого соединения. Как будет показано ниже, метод меченых атомов обладает одновременно очень высокой чувстви-

тельностью и высокой специфичностью по отношению к субстрату, так что абсолютное количество используемого меченого предшественника может быть, соответственно, очень небольшим. Для большинства предшественников оно будет небольшим и по отношению к количеству соответствующего эндогенного субстрата, образующегося в процессе обмена веществ, поэтому может быть удовлетворено по крайней мере одно требование — о минимальных нарушениях количественных соотношений. Однако и в этом случае могут быть исключения, например, когда количество эндогенного субстрата, продуцируемого в самой системе, мало, или же когда недостаточно высоко содержание радиоактивного элемента в экзогенном меченом соединении. К сожалению, эти два обстоятельства часто совпадают. Например, при исследовании какого-либо сложного предшественника или предполагаемого промежуточного соединения его эндогенная концентрация может быть и в самом деле очень низкой (в частности, если он является продуктом реакции, определяющей скорость процесса), и при его синтезе исследователь может сделать попытку увеличить его выход путем внесения слишком большого количества немеченого носителя. При использовании тяжелых изотопов системы детектирования менее чувствительны (см. разд. 29.1.5.2) и вероятность такой ситуации повышается, в частности, потому, что здесь наибольшее внимание уделяется обеспечению минимального разведения добавленной метки (а не ее максимального включения). Это достигается только при максимально возможном отношении количеств меченого соединения и эндогенного субстрата.

Нарушения, вызванные внесением избыточных количеств экзогенных субстратов, могут быть очень глубокими, так как нормальная биологическая система очень строго регулируется сложными механизмами обратной связи. В основном эти нарушения связаны с возможностью включения меченого соединения в циклы метаболизма, не реализующиеся в обычных условиях. Это происходит либо потому, что уже имеющийся фермент действует на этот субстрат только при достаточно высокой концентрации последнего, либо вследствие образования в системе нового фермента, вызванного введением такого субстрата. Точно так же избыток меченого соединения может ингибировать синтез и(или) промотировать конкурентные пути выведения эндогенного субстрата с помощью обычных регуляторных механизмов. Эффекты такого рода заслуживают особого изучения. В случае хорошо известных биологических систем их можно учитывать и даже выгодно использовать, но в общем случае они являются скорее источником серьезных ошибок. Их можно свести к минимуму посредством тщательного планирования эксперимента, в частности добавляя предшественник (и выделяя продукт превращения) в самые оптимальные моменты, а при необходимости вводя предшественник не в один прием, а постепенно в течение всего эксперимента.

Трудности третьего типа возникают тогда, когда меченое соединение биологически не идентично немеченому, т. е. когда имеет место так называемый «изотопный эффект». К счастью, биологический изотопный эффект имеет ту же самую основу и подчиняется тем же правилам, что и эффекты химических систем; поэтому его учет не представляет больших сложностей для химика. В частности, изотопные эффекты обычно проявляются только у изотопов водорода. Следует иметь в виду, что радиоактивные изотопы обычно занимают только небольшую часть «меченых положений». Так, в образце [1-^{14}C,2-^{3}H]ацетата большая часть молекул не содержит ни одного изотопа, практически нет молекул, имеющих оба изотопа, и совершенно отсутствуют соединения, содержащие более одного атома трития. Так, если образец превращается химическим или биологическим путем в $CHCl_2COR$, не следует ожидать, что 2/3 всего количества трития будет потеряно; наиболее вероятный результат будет зависеть от тонких деталей механизмов превращений. Ситуация складывается совершенно иначе, если все возможные положения действительно заняты атомами изотопа, как это обычно бывает в случае тяжелых изотопов, например [2-$^{2}H_3$]ацетата. Так, для определения числа атомов водорода, переносимых вместе с атомом углерода в процессе С-метилирования, обычно используют [Me-$^{2}H_3$]метионин (при этом основным методом анализа служит масс-спектрометрия). Стереоспецифическое введение метки, например частичное включение ^{3}H в прохиральную CH_2-группу, широко применяется для изучения стереохимии процессов биосинтеза. В любом случае, однако, следует помнить, что скорость реакций меченых соединений может отличаться от скорости реакций немеченых аналогов, и интерпретировать результаты с необходимой осторожностью; в общем случае предпочтительным является эксперимент, дающий ответ типа да — нет, а не тот, который можно интерпретировать только на основе неопределенных в количественном отношении изотопных эффектов.

Интерпретация результатов, полученных в опытах с мечеными соединениями, позволяет предположить конкретный путь биосинтеза. Почти всегда такое изучение биосинтеза неполно, и его итогом является некая «общая» схема, в которой отсутствуют детали механизма и даже последовательность осуществления отдельных стадий. В биологическом процессе может быть либо одна, либо несколько параллельных последовательностей превращений; оценить степень вероятности того или иного варианта чисто логическим путем трудно. Почти во всех случаях приходится ссылаться на множество данных по изучению близких объектов и на небольшое число тщательно исследованных примеров. Поскольку биологические системы построены в соответствии с некими общими принципами, понимание биохимической основы которых становится все более глубоким, такое использование аналогий с точки зрения биохимика вполне обоснованно.

29.1.5.2. Использование радиоактивных изотопов

До недавнего времени источником всех данных по биосинтезу поликетидов было применение меченых соединений [97], содержащих ^{3}H (иногда) или ^{14}C (большей частью). Конечно, параллельно развивались исследования в других областях применения радиоактивных изотопов в биохимии; этой теме посвящено несколько монографий [100—103]. Оба изотопа являются источниками мягкого β-излучения; периоды их полураспада достаточно велики, что позволяет осуществить их транспортировку и исключает необходимость введения поправок на распад в ходе эксперимента (^{3}H обладает меньшим периодом полураспада; срок годности меченых соединений ограничивает не их распад, а индуцированное радиацией химическое разложение препаратов). Современное оборудование позволяет определять оба изотопа легко, с высокой степенью точности (часто взвешивание образца менее точно, чем подсчет уровня радиоактивности) и чувствительности; достаточно часто надежно определяются продукты реакции с активностью в несколько стотысячных долей от исходной. Один и тот же образец может быть использован для одновременного и независимого определения ^{3}H и ^{14}C, что делает метод двойного маркирования особенно удобным. Менее точные методы определения радиоактивности используют при различных способах хроматографического разделения смесей.

Результаты измерений могут выражаться несколькими способами. В большинстве методик определяется общее число распадов (в единицу времени) в образце, которое умножается на коэффициент, характеризующий «эффективность» счетчика; таким путем получают *общую радиоактивность*, выраженную в числе распадов в минуту. Деление последней величины на массу образца дает *удельную радиоактивность*; в некоторых случаях, например, при изучении процессов расщепления, мольная удельная активность может быть разделена на число меченых положений в молекуле. Результаты эксперимента по введению метки выражаются далее либо как *включение* (общая активность в продукте реакции как часть общей введенной активности), либо как *разбавление* (отношение удельной активности предшественника к удельной активности продукта реакции), либо как *удельное включение* (величина, обратная разбавлению). Когда по условиям эксперимента реальный выход продукта превращения низок, предпочтительнее определение удельной активности. Любому из способов выражения результатов свойственен — часто в скрытом виде — ряд трудностей, связанных с количествами эндогенных предшественников и промежуточных соединений («метаболического пула»), а также с соотношением между скоростью изучаемого процесса и скоростями общих процессов метаболизма [96—98]. Включение меченого ацетата в типичный поликетид в микроорганизмах обычно составляет 1—10 %; в растениях эта величина на один — два по-

рядка ниже. Степень разведения изменяется в очень широких пределах: от 100 до 10 000 раз. При работе с более сложными субстратами более важно измерение разбавления, оно обычно весьма низко (в 1—100 раз). Следует подчеркнуть, что очень низкие значения изотопного разбавления свидетельствуют о заметных отклонениях от стандартных условий эксперимента с радиоактивным «метчиком», рассматриваемых в разд. 29.1.5.1.

Изотопные эффекты при использовании ^{14}C незначительны, а реакции, приводящие к потере метки, очень редки. Выпускается широкий набор меченных ^{14}C соединений, пригодных для непосредственного применения или в качестве исходных веществ для синтеза. Однако синтез меченых соединений с достаточно высокой для использования в работах по биосинтезу удельной активностью часто требует особого искусства [104, 105]; трудности связаны с необходимостью сведéния к минимуму потерь при работе с небольшими количествами веществ и с обеспечением минимального разбавления. Для получения сложных меченых метаболитов и их последующего включения часто применяют биосинтетическое включение ^{14}C из простого предшественника. Эта методика, однако, неизбежно приводит к двукратному разведению меченого соединения, и, соответственно, потери должны быть очень велики. Кроме того, всегда существует опасность, что меченные таким образом природные поликетиды будут легко подвергаться биологическому расщеплению с образованием значительных количеств специфически меченного ацетата. Методы обнаружения радиоактивности настолько чувствительны, что такого рода непрямое включение может быть ошибочно принято за непосредственное включение; необходим внутренний контроль, например, путем одновременного определения включения в какое-либо неродственное соединение типа жирной кислоты. По указанным причинам результаты таких исследований не должны содержать никаких неоднозначных данных, только тогда они будут в принципе приемлемы.

Несколько по-иному складывается положение при работе с ^{3}H. Как уже отмечалось выше, в этом случае изотопные эффекты могут быть очень значительными. Кроме того, многие атомы водорода в органических молекулах с большей или меньшей скоростью обмениваются с атомами водорода воды. Вероятность химического обмена как способа введения метки или ее потери обычно очевидна. Если введенный (иногда в довольно жестких условиях) меченый атом стабилен в последующих превращениях, эта реакция, очевидно, может использоваться как важный способ получения соединений, меченных ^{3}H. Кроме того, существует несколько довольно обычных катализируемых ферментами процессов, осуществления которых трудно ожидать в мягких условиях химических реакций, но которые *in vivo* приводят к обмену атомов водорода. Выбор меченных ^{3}H соединений гораздо более узок, чем в случае ^{14}C, но некоторые из них, в том числе $^{3}H_2O$ и $^{3}H_2$, до-

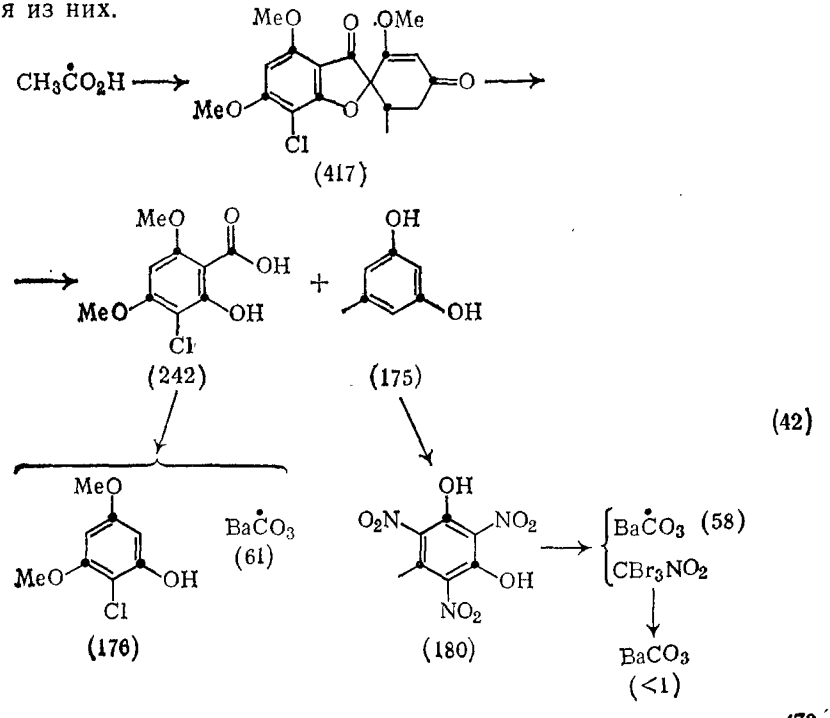
ступны и обладают очень высокой удельной активностью. В общем случае это удобно, но на практике может приводить к ошибочным интерпретациям из-за того, что непрямое включение ^3H легко обнаруживается. Другая трудность заключается в том, что из-за высокой удельной активности ^3H радиолиз меченого вещества может происходить очень быстро, что заставляет сомневаться не только в чистоте, но и в химической природе вводимого меченого предшественника.

Наилучшие результаты дает применение ^3H в виде двойной метки, обычно вместе с ^{14}C (поскольку в этих случаях может быть применена одна система детектирования). Этот метод можно использовать для выяснения тонких деталей механизмов биосинтеза, в особенности его стереохимических аспектов (так как возможен синтез стереоспецифически меченных ^3H субстратов) [106, 107], а также для проверки «интактного» включения сложных промежуточных соединений; если включение метки из последних происходит косвенным путем, то это обычно приводит к существенному изменению первоначального отношения $^3H/^{14}C$. Метод имеет свои недостатки, но он позволяет устранить многие из отмечавшихся выше неопределенностей. При очень высоких удельных активностях соединений, содержащих ^3H (~ 1 мКи), атомы ^3H можно обнаружить и определить их положение в молекуле методом ЯМР; этот метод использовали при изучении процессов биосинтеза [108], однако применение его ограниченно.

В некоторых случаях достаточно самого факта более или менее эффективного включения предшественника, меченного ^{14}C или ^3H, в конечный продукт превращения. В более общем случае, однако, желательно или даже необходимо определить распределение метки в молекуле продукта реакции. Например, классическим доказательством поликетидной гипотезы явилось выяснение того факта, что метка из [1-^{14}C]- или [2-^{14}C]ацетата располагается в чередующихся атомах углерода [2, 11]. Именно относительная трудность установления распределения метки в наибольшей степени ограничивает сферу применения радиоизотопного метода. Определение положения меченых атомов в молекуле предполагает расщепление последней с помощью химических реакций, характеризующихся гарантированной специфичностью и высоким выходом, до все более и более мелких фрагментов — в идеале до одноуглеродных молекул типа CO_2 или метиламина [109]. Большое значение при этом имеет чистота реагентов и продуктов деградации. Реакции, конечно, могут проводиться только последовательно, и даже самому искусному экспериментатору при самой скрупулезной работе часто необходимо значительно большее количество вещества, чем может быть получено в биосинтетическом эксперименте.

В качестве типичного примера приведена последовательность превращений, осуществленная Берчем и сотр. в ходе одной из первых работ по изучению биосинтеза гризеофульвина из мече-

ного [1-^{14}C]ацетата [110] [схема 42; меченые атомы углерода обозначены жирными точками, а в скобках приведены соответствующие значения мольной удельной активности (в произвольных единицах)]. В данном случае процесс расщепления не был доведен до специфических одноуглеродных соединений, но и в таком виде он дал информацию, достаточную для доказательства чередования метки через атом углерода и — в первом приближении — однородность такого ее распределения в углеродном скелете молекулы. Необходимость в упрощении операций химической деградации изучаемого вещества или даже необходимость прервать последовательность реакций деградации на полпути (из-за того, что исчерпались запасы вещества) очевидна; тем не менее упрощения могут быть источником ошибок. Используемым при деградации химическим реакциям часто бывают свойственны неожиданные характеристики, являющиеся источником всякого рода трудностей. В качестве примера приведем реакцию окисления по Куну — Роту, являющуюся удобным способом выделения определенных атомов углерода в виде уксусной кислоты. Однако в случае соединений с несколькими *C*-метильными группами уксусная кислота, выход которой обычно ниже теоретического, часто «представляет» одну *C*-метильную группу в большей степени, чем другие, а образующийся одновременно CO_2 может никак не отражать природу оставшихся углеродных атомов, хотя в принципе образуется из них.



(42)

В последние годы эта проблема приобрела еще большую актуальность; новые природные соединения часто выделяют в столь малых количествах (и к тому же в недостаточно очищенном от примесей состоянии), что их характеристика может быть осуществлена только спектроскопическими методами. В результате часто отсутствует необходимая первичная химическая информация о структуре исследуемого соединения, даже если меченое соединение удается выделить в количествах, достаточных для его последующей деградации. В таких случаях самыми надежными являются наиболее простые методы расщепления. Несмотря на эти трудности, следует отметить, что метод включения меченых соединений с последующим химическим расщеплением для определения положения метки в молекуле был и остается наиболее важным методом изучения биосинтеза природных соединений вообще и поликетидов в частности. Только совсем недавно появились более современные методы, которые, как будет показано ниже, также имеют недостатки.

29.1.5.3. Масс-спектрометрия

Радиоактивным изотопам ^{14}C и ^{3}H соответствуют тяжелые изотопы ^{13}C и ^{2}H. Можно использовать также тяжелые изотопы ^{15}N и ^{18}O; для этих элементов не существует радиоактивных изотопов с приемлемым периодом полураспада и типом излучения.

В принципе, все тяжелые изотопы можно определить методом масс-спектрометрии. Наличие в масс-спектрах пиков, соответствующих как молекулярным ионам, так и фрагментам, массовые числа которых на соответствующее число единиц массы выше нормальных значений, указывает на наличие изотопных ядер и их число в молекуле, а интенсивности этих пиков (в сравнении с обычными спектрами) позволяют определить их относительное содержание; точность определения зависит от характеристик прибора. Для масс-спектрометрии требуется очень небольшое количество исследуемого вещества. Если спектр поддается интерпретации, то можно определить и положение тяжелых атомов в молекуле или, по крайней мере, в определенных ее участках, что в ряде случаев может быть достаточным для решения конкретной задачи. В случае ^{18}O масс-спектрометрия является единственно возможным методом исследования. Масс-спектрометрию в ряде случаев успешно применяли для выяснения путей биосинтеза или решения отдельных специфических задач, чаще всего для изучения механизмов окисления (путем определения числа и положения атомов кислорода, введенных в процессе инкубации в атмосфере $^{18}O_2$, а также, например, и для проверки поликетидного происхождения атомов кислорода (с помощью [$^{18}O_2$]уксусной кислоты в качестве источника метки). Удобно и иногда дает хорошие результаты введение ^{18}O (из $C^{18}O_2$) в карбоксильные группы. Единственным доступным изотопом азота является ^{15}N,

который можно детектировать как масс-спектрометрически, так и с помощью ЯМР (см. разд. 29.1.5.4).

Общий недостаток метода применения тяжелых изотопов и их масс-спектрометрического определения заключается в его невысокой чувствительности, обусловленной, главным образом, относительно большим содержанием (около 1 %) природного ^{13}C. По этой причине в масс-спектре любого органического соединения с десятью атомами углерода уже содержится «изотопный пик», имеющий на одну единицу массы больше, чем молекулярный ион; интенсивность этого пика составляет 11 % от интенсивности $[M]^+$. В этих условиях присутствие 2 % меченого соединения с одним атомом ^2H или ^{13}C, увеличивающее интенсивность пика иона $[M+1]^+$ до 13 %, заметить практически невозможно. Положение облегчается при введении нескольких меченых атомов: в том же самом спектре «природная интенсивность» пика иона $[M+2]^+$ составит только 1 % от интенсивности пика $[M]^+$, так что добавление 2 % метки $^2H_2$ или $^{13}C_2$ можно обнаружить без труда. Однако и в этом случае точность определения невелика. Если такая точность удовлетворяет требованиям эксперимента, то масс-спектрометрия может служить очень удобным методом исследования. Таким образом, этот метод имеет хотя и ограниченные, но очень полезные сферы применения. Например, чувствительности метода масс-спектрометрии достаточно, чтобы вполне надежно определить число введенных в соединение меченых атомов, если полностью меченный в одном или нескольких положениях предшественник удается включить с разбавлением метки не более, чем в 50 раз. Масс-спектрометрия особенно удобна при работе с соединениями, меченными ^2H, когда полное дейтерирование предшественника обычно не представляет трудностей и когда желательно избежать проявления изотопных эффектов; наглядным примером является широкое использование [Me-$^2H_3$]метионина для изучения процессов *C*-метилирования.

29.1.5.4. Спектроскопия ЯМР

Метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (метод ЯМР) в принципе применим для обнаружения, выяснения положения в молекуле и количественного определения ^2H (и ^3H), ^{13}C и ^{15}N, а также комбиннрованных меток типа $^{13}C-{}^{13}C$, $^{13}C-{}^{15}N$ и т. п. Метод не требует никакой химической обработки меченого соединения и даже его выделения в особо чистом состоянии; интерпретация основывается на результатах исследования немеченого соединения в тех же условиях тем же методом. Метод находит все более широкое применение, что связано с растущей доступностью соответствующих приборов, особенно для определения ^{13}C. Метод ЯМР может не только заменить радиоизотопный метод, но и обеспечить информацией, не доступной при использовании других методов. Поэтому широкое внедрение метода ЯМР привело

к такому качественному скачку в развитии биосинтетических исследований, который по своему значению уступает только этапу, последовавшему за освоением метода ^{14}C. Тем не менее применение ЯМР не лишено ряда ограничений и трудностей.

Некоторые из первых работ по изучению биосинтеза с применением ^{13}C были выполнены посредством измерения «сателлитных сигналов», обусловленных взаимодействием $^{13}C-{}^{1}H$ (в районе 100 Гц) в спектрах ЯМР ^{1}H. Такие сигналы, однако, наблюдаются только в благоприятных случаях (и совсем отсутствуют у полностью замещенных атомов углерода). Очевидно, более предпочтителен метод ЯМР ^{13}C при условии доступности спектрометров с накопителями спектров типа преобразователей Фурье, способных регистрировать спектры ^{13}C на уровне содержания ^{13}C в естественном элементе (1,108 %). Такой методический подход является сейчас основным; ему посвящен ряд обзоров [111, 112]. Необходимым предварительным условием для биосинтетических исследований является интерпретация спектра при природной концентрации ^{13}C [113—115]. Это кажущееся очевидным требование ни в коей мере не является тривиальным или несущественным, а его важность особенно хорошо подчеркнута в работе Стейна с сотр. по изучению биосинтеза афлатоксинов [70]. Химики восприняли необходимость интерпретации спектров с энтузиазмом, поскольку тем самым исключалась гораздо более трудоемкая работа по определению положения меток путем химической деградации.

В простейших экспериментах с применением ^{13}C, при которых получаемые результаты эквивалентны результатам работ с радиоактивным ^{14}C, важнейшим фактором является заметное природное содержание ^{13}C. Именно этот фактор стимулировал развитие инструментальной техники ЯМР ^{13}C и сделал реальной интерпретацию спектров. С другой стороны, этот фактор ограничивает чувствительность ЯМР как метода детектирования включенной метки. Если предшественник в каком-то определенном положении мечен на 100 %, то, конечно, соответствующие сигналы в его спектре будут интенсивнее сигналов при природной концентрации, составляющей около 1 %. Для надежного обнаружения введенной метки ее максимально допустимое разбавление должно быть не выше 100-кратного, а для сколько-нибудь точного количественного определения оно должно быть значительно ниже. Более того, в идеальном варианте необходимо количественное сравнение включенной в несколько различных положений метки; здесь уже появляются проблемы, связанные с использованием преобразования Фурье в методе ЯМР. Так, на интенсивность сигналов в спектре ЯМР ^{13}C заметно влияют релаксационные эффекты, различные для разных атомов углерода; эти эффекты трудно воспроизводимы даже в различных спектрах одного и того же соединения. Эта трудность может быть преодолена [70] путем применения парамагнитных «релаксационных реагентов», например трис(ацетилацетоната)хрома(III) [116, 117], специальных приемов подавле-

ния спин-спинового взаимодействия [118] и увеличения числа точек отсчета для преобразований Фурье [119]. Кроме того, для калибровки одного спектра по другому можно использовать сигналы полностью немеченых групп (вводимых, если необходимо, химическим путем, например ацетилированием). Если не приняты никакие меры такого рода, то данные по количественному определению степени включения ^{13}C методом ЯМР будут крайне ненадежными. Существуют также проблемы, связанные с низкой чувствительностью этого метода. Для синтеза простого поликетида в микроорганизмах необходимый уровень чувствительности обычно обеспечивается применением предшественников типа [^{13}C]ацетата, содержащего 95 % ^{13}C. Исключение составляют те (сравнительно редкие) случаи, когда выход исследуемого метаболита низок по сравнению с выходом продуктов других метаболических превращений его предшественников. В таких случаях обычно стремятся ввести в систему большие количества предшественника, что может привести к заметному нарушению нормального течения биохимических процессов (см. разд. 29.1.5.1). В других системах, например, в высших растениях, необходимость низкой степени разбавления, в сущности, ограничивает применение ^{13}C кругом более сложных предшественников, для которых обычно характерна меньшая степень обусловленного метаболизмом разбавления; здесь сохраняют силу отмеченные выше меры повышения надежности результатов.

Все сказанное относится и к прямому определению ^{15}N с помощью метода ЯМР. Для спектров ЯМР ^{15}N обычно характерно меньшее число сигналов, а природная концентрация ^{15}N ниже концентрации ^{13}C. Никаких новых проблем здесь не возникает при условии наличия соответствующих приборов. В принципе тем же самым способом можно определять и ^{2}H в соответствующем диапазоне частот при условии селективного или шумового подавления спин-спинового взаимодействия ядер ^{1}H. Однако и ^{15}N и ^{2}H с большей чувствительностью и с большей информативностью определяются в сочетании с ^{13}C.

В то время как применение в изучении биосинтеза меченных одним атомом соединений представляет собой просто удобную (но не с безграничными возможностями) альтернативу использованию ^{14}C, введение субстратов, дважды меченных ^{13}C, в частности (но ни в коей мере не исключительно) [$^{13}C_2$]ацетата, является источником качественно новой информации, получить которую двумя первыми путями в принципе невозможно. Одним из первых и особенно показательных примеров применения методов однократного и двукратного маркирования метки ^{13}C (а также $^{13}C — ^{15}N$) было выяснение строения и путей биосинтеза метаболитов тенеллина и бассианина (**136**) (см. разд. 29.1.4.2) [78]. Основой метода ЯМР $^{13}C_2$ является изучение взаимодействия $^{13}C — ^{13}C$. В пределах природных концентраций изотопа такие взаимодействия не заметны, поскольку природная концентрация пар атомов ^{13}C составляет 1 %

от 1 %, т. е. всего 0,01 %. Поэтому, если в продукт реакции из предшественника включаются два атома ^{13}C, их наличие легко обнаруживается в спектре по появлению дублетных сигналов, расположенных на одинаковых расстояниях по обе стороны от синглета природного ^{13}C в спектре ЯМР ^{13}C с развязкой от протонов. При наличии соответствующего оборудования этот метод значительно более чувствителен, чем метод однократного ^{13}C-маркирования (так что становится вполне реальным его применение для изучения биосинтеза в высших растениях). Кроме того, он дает уникальную информацию о судьбе отдельных пар атомов в ходе биосинтеза и тем самым о процессах расщепления и о перегруппировках. Некоторые примеры такого рода были приведены в предыдущих разделах (см. разд. 29.1.3.3 и 29.1.3.4). Путем применения соответствующих предшественников могут быть также получены сведения о «спаривании» изотопов, возникающем в ходе биосинтеза при образовании связей между первоначально не связанными атомами. Представляется очень перспективным расширение метода путем изучения пар $^{13}C - {}^{15}N$ и $^{13}C - {}^{2}H$, хотя в этом случае может потребоваться дальнейшее усовершенствование спектрометров.

Основным недостатком метода $^{13}C_2$ является необходимость обеспечения соответствующей степени разбавления в меченом соединении. Если разбавление слишком велико, интенсивности «сателлитных» сигналов будут слишком малы по сравнению с интенсивностью сигналов, обусловленных «естественным» содержанием изотопа. Это либо потребует длительного времени для многократной записи спектров, либо приведет к тому, что сигналы не удастся отличить от фонового шума и сигналов, обусловленных примесями, особенно в тех областях спектра, где имеется много других сигналов. Если эффект разбавления не слишком велик и общее содержание ^{13}C довольно высоко, становится заметным дальнейшее расщепление сигналов, обусловленное взаимодействием близких ^{13}C-атомов, но не связанных ковалентной связью. Это возможно или при низком значении общего разбавления, или более скрытым путем, когда значительная часть продукта реакции образуется из добавленного предшественника сравнительно быстро и, следовательно, при низком разбавлении, а другая часть синтезируется из эндогенного предшественника при значительно более высоком разбавлении. Другие, часто употребляющиеся в предварительных опытах методы (например, включение ^{14}C) дают сведения только об общей степени разбавления, и не исключают возможной ошибки. Такого рода сложности при использовании спектроскопии ЯМР ^{13}C могут быть преодолены несколькими путями, в том числе сочетанием селективного подавления ССВ $^{13}C—{}^{13}C$ с шумовым подавлением ССВ от протонов [120]. Однако, где только это возможно, предпочтительнее обеспечить необходимую степень разбавления, во-первых, используя в должной мере разбавленный предшественник и, во-вторых, добавляя его последовательно небольшими порциями.

До настоящего времени подавляющее число работ с применением $^{13}C_2$-метода было выполнено с простейшим предшественником [$^{13}C_2$] ацетатом.

В некоторых интересных работах использовались более сложные предшественники, синтезированные лабораторным путем. Осуществление такого синтеза представляет не намного меньше трудностей, чем работа с радиоактивными изотопами, уже хотя бы из-за того, что исходные вещества, как правило, берутся в гораздо больших количествах. Успехи метода, несомненно, приведут к значительному расширению круга применяемых предшественников. Одним из следствий требования о необходимости для успеха эксперимента соблюдения определенной степени разбавления будет, несомненно, расширение наших знаний о кинетических аспектах биосинтеза и повышение интереса к этой проблеме со стороны исследователей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *A. J. Birch and F. W. Donovan*, Austral. J. Chem., 1953, 6, 360.
2. *A. J. Birch*, Science, 1967, 156, 202.
3. *J. D. Bu'Lock*, 'Biosynthesis of Natural Products', McGraw-Hill, London, 1965.
4. *W. B. Turner*, 'Fungal Metabolites', Academic Press, London, 1971.
5. *N. M. Packter*, 'Biosynthesis of Acetate-Derived Compounds', Wiley, London, 1973.
6. *M. Luckner*, 'Secondary Metabolism in Plants and Animals', Chapman and Hall, London, 1972.
7. *J. Mann*, 'Secondary Metabolism', Oxford University Press, 1977.
8. См., например: *J. B. Harborne, T. Money, J. Simpson*, in 'Specialist Periodical Reports: Biosynthesis', ed. T. A Geissman and J. D. Bu'Lock, The Chemical Society, London, 1972, и следующие выпуски.
9. См., например: Fortschr. Chem. org. Naturstoffe.
10. *D. Rittenberg and K. Bloch*, J Biol. Chem., 1944, 154, 311.
11. *A. J. Birch, R. A. Massy-Westropp, and C. J. Moye*, Chem. and Ind. (London), 1955, 683; Austral. J. Chem., 1955, 8, 529
12. *S. Gatenbeck and A. K. Mahlen*, Acta Chem. Scand., 1968, 22, 1696.
13. *V. Behal and Z. Vanek*, Folia Microbiol., 1970, 15, 354.
14. *F. Lynen*, Biochem. J., 1967, 102, 381.
15. *M. Yalpani, K. Willecke, and F. Lynen*, European J. Biochem., 1969, 8, 495.
16. *P. H. W. Butterworth and K. Bloch*, European J. Biochem., 1970, 12, 496.
17. *M. de Rosa, A. Gambacorta, and J. D. Bu'Lock*, Phytochemistry, 1974, 13, 905.
18. *R. J. Light and L. P. Hager*, Arch. Biochem. Biophys., 1968, 125, 326.
19. *P. Dimroth, H. Walter, and F. Lynen*, European J. Biochem., 1970, 13, 98.
20. *S Sjoland and S Gatenbeck*, Acta Chem. Scand., 1966, 20, 1053.
21. *R. Jaureguiberry, M. Lenfant, B. C. Das, and E. Lederer*, Tetrahedron, 1966, suppl. 8, part 1, 27.
22. *S. Gatenbeck, P. O. Eriksson, and Y. Hansson*, Acta Chem. Scand., 1969, **23**, 699.
23. *S. W. Tanenbaum, S. Nakajima, and G. Marx*, Biotechnol. Bioeng., 1969, **11**, 1135.
24. *R Bentley and P. M. Zwitkowits*, J. Amer. Chem. Soc., 1967, 89, 676, 681.
25. *G. Hrazdina, F. Kreuzaler, K. Hahlbrock, and H. Grisebach*, Arch. Biochem. Biophys., 1976, 175, 392.
26. *P. Dimroth, E. Ringelmann, and F. Lynen*, European J. Biochem., 1976, 68, 591.
27. *R. Bentley*, in 'Biogenesis of Antibiotic Substrances', ed. Z. Vanek and Z. Hostalek, Academic Press, New York, 1965, p. 241.

28. *K. T. Suzuki and S. Nozoe*, Bioorg. Chem., 1974, 3, 72.
29. *K. Mosbach*, Acta Chem. Scand., 1960, 14, 457.
30. *C. F. Culbertson*, 'Chemical and Botanical Guide to Lichen Products', University of North Carolina Press, Chapel Hill, 1969.
31. *J. D. Bu'Lock, D. Hamilton, M. A. Hulme, A. J. Powell, H. M. Smalley, D. Shepherd, and G. N. Smith*, Canad. J. Microbiol., 1965, 11, 765.
32. *J. D. Bu'Lock, D. Shepherd, and D. J. Winstanley*, Canad. J. Microbiol., 1969, 15, 279.
33. *P. J. Forrester and G. M. Gaucher*, Biochemistry, 1972, 11, 1102.
34. *G. Murphy and F. Lynen*, European J. Biochem., 1975, 58, 467.
35. *A. I. Scott and L. Beadling*, Bioorg. Chem., 1974, 3, 281.
36. *G. M. Gaucher*, доклад на конференции, 1977.
37. *A. J. Birch, R. J. English, R. A. Massy-Westropp, and H. Smith*, J. Chem. Soc., 1958, 369.
38. *I. M. Campbell, C. H. Calzadilla, and N. J. McCorkindale*, Tetrahedron Letters, 1966, 5107.
39. *L. Canonica, W. Kroszczynski, B. M. Ranzi, B. Rindone, E. Santaniello, and C Scolastico*, J. C. S. Perkin I, 1972, 2639.
40. *L. Canonica, B. Rindone, C. Scolastico, F. Aragozzini, and R. Craveri*, J. C. S. Chem. Comm., 1973, 222.
41. *F. Aragozzini, P. Toppino, R. Craveri, M. G. Beretta, B. Rindone, and C. Scolastico*, Bioorg. Chem., 1975, 127.
42. *A. I. Scott and K. J. Wiesner*, J. C. S. Chem. Comm., 1972, 1075.
43. *J. Wright, D. G. Smith, A. G. McInnes, L. C. Vining, and D. W. S. Westlake*, Canad. J. Biochem., 1969, 47, 945; Chem. Comm., 1971, 325.
44. *F. Drawert and J. Beier*, Phytochemistry, 1976, 15, 1695.
45. *J. B. Harborne*, 'Comparative Biochemistry of the Flavonoids', Academic Press, London, 1967.
46. *H. Grisebach and K. Hahlbrock*, in 'Recent Advances in Phytochemistry', ed. V. Runeckles and E. Conn, Academic Press, New York, 1976, vol. 8.
47. *J. B. Harborne, in* 'Specialist Periodical Reports: Biosynthesis', ed. J. D. Bu'Lock, The Chemical Society, London, 1977, vol. 5.
48. *A. J. Birch*, Ann. Rev. Plant Physiol., 1968, 19, 321.
49. *L. Crombie, P. M. Dewick and D. A. Whiting*, Chem. Comm., 1970, 1469; 1971, 1182, 1183.
50. *E. Haslam*, J. C. S. Chem. Comm., 1974, 594.
51. *E. Haslam, C. T. Opie, and L. J. Porter*, Phytochemistry, 1977, 16, 99.
52. *R. A. Hill, R. H. Carter, and J. Staunton*, J. C S. Chem. Comm., 1975, 380.
53. *J. S. E. Holker and K. Young*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 525
54. *T. J. Simpson and J. S. E. Holker*, Tetrahedron Letters, 1975, 4693.
55. *D. H. R. Barton, A. M. Deflorin, and O. E. Edwards*, J. Chem. Soc., 1956, 530.
56. *H. Taguchi, U. Sankawa, and S. Shibata*, Tetrahedron Letters, 1966, 5211.
57. *T. J. Simpson*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 258.
58. *A. J. Birch, R. A. Massy-Westropp, R. W. Rickards, and H. Smith*, J. Chem. Soc., 1958, 360.
59. *D. H. R. Barton and I. Cohen*, 'Festschrift A. Stoll', Birkhauser, Basel, 1956, p. 117.
60. *A. Rhodes, G. A. Somerfield, and M. P. McGonagle*, Biochem. J., 1963, 88, 349.
61. *Y. Sato, T. Machida, and T. Oda*, Tetrahedron Letters, 1975, 4571.
62. *W. Steglich, R. Arnold, W. Lösel, and W. Reininger*, J. C. S Chem. Comm., 1972, 102.
63. *N. Takeda, S. Seo, Y. Ogihara, U. Sankawa, I. Iitaka, I. Kitagawa, and S. Shibata*, Tetrahedron, 1973, 29, 3703.
64. *B. Franck and H. Flasch*, Prog. Chem. Org. Nat. Prod., 1973, 30, 151.
65. *A. Mahmoodian and C. E. Stickings*, Biochem. J., 1964, 92, 369.
66. *S. Gatenbeck and L. Malmstrom*, Acta Chem. Scand., 1969, 23, 3493.
67. *P. Canham, L. C. Vining, A. G. McInnes, J. A. Walker, and J. L. C. Wright*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 319.

68. *G. C. Elsworthy, J. S E. Holker, J. M. McKeown, J. B. Robinson, and L. J. Mulheirn*, Chem. Comm., 1970, 1069; *J. C. Roberts*, Prog. Chem. Org. Nat. Prod., 1974, **31**, 119.
69. *R. Singh and D. P. H. Hsieh*, Arch. Biochem. Biophys., 1977, 178, 285.
70. *P. S. Steyn, R. Vleggaar, P. L. Wessels, and D. B. Scott*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 193; *C. F. Gorst-Allman, K. G. R. Pachler, P. S. Steyn, P. L. Wessels, and D B. Scott*, ibid., 1976, 916; J. C. S. Perkin I, 1976, 1182.
71. *R. Thomas*, in 'Biogenesis of Antibiotic Substances', ed. Z. Vanek and Z. Hostalek, Academic Press, New York, 1965, p. 155.
72. *J. S. C. Holker*, частное сообщение.
73. *J. R. D. McCormick*, in 'Antibiotics, Vol. II, Biosynthesis', ed. D. Gottlieb and P. D. Shaw, Springer, New York, 1967, p. 113.
74. *J. R. D. McCormick, E. R. Jensen, N. H. Arnold, H. S. Corey, U. H. Joachim, S. Johnson, P. A. Miller, and N. O. Sjolander*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, 90, 7127.
75. *A. J. Birch*, Prog. Chem Org. Nat. Prod., 1975, 14, 186.
76. *J. L. Gellerman, W. H. Anderson, and H. Schlenk*, Biochim. Biophys. Acta, 1976, 431, 16.
77. *S. Shibata, U. Sankawa, K. Yamasaki and H. Taguchi*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1966, 14, 474.
78. *A. G. McInnes, D G. Smith, J. A. Walter, L. C. Vining and J. L. C. Wright*, J. C. S. Chem. Comm., 1974. 281, 283; Tetrahedron Letters, 1975, 4103.
79. *B. E. Cross and P. Hendley*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 124; *G. N. Smith*, неопубликованные данные.
80. *C. T. Mabuni, L. Garlaschelli R. A. Ellison, and C. R. Hutchinson*, неопубликованные данные.
81. *A. J. Birch, O. C. Musgrave, R. W. Rickards, and H. Smith*, J. Chem. Soc. 1959, 3146.
82. *J. A. Steele, J. R. Lieberman, and C. J. Mirocha*, Canad. J. Microbiol., 1974, 20, 531.
83. *W. Graf, J. L. Robert, J. C. Vederas, C. Tamm, P. H. Solomon, I. Miura, and K. Nakanishi*, Helv. Chim. Acta, 1974, 57, 1801.
84. *W. B. Turner*, неопубликованные данные.
85. *A. J. Birch, C. W. Holzapfel, R. W. Rickards, C. Djerassi, M. Suzuki, J. Westley, J. D. Dutcher, and R. Thomas*, Tetrahedron Letters, 1964, 1485.
86. *W. Keller-Schierlein*, Forschr. Chem. org. Naturstoffe, 1973, 30, 313.
87. *L. C. Vining and J. L C. Wright*, in 'Specialist Periodical Reports: Biosynthesis', ed. J. D. Bu'Lock, The Chemical Society, London, 1977, vol. 5, p. 240.
88. *H. Grisebach, H. Archenbach and W. Hofheinz*, Z. Naturforsch., 1960, 15b, 560: 1962, 17b, 64.
89. *S. Omura, A. Nakagawa, H. Takeshima, K. Atsumi, J. Miyazawa, F. Pirion, and G. Lukacs*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, 97, 6600: Tetrahedron Letters, 1975, 4503.
90. *R. J. White and E. Martinelli*. FEBS Letters, 1974, 49, 233.
91. *B. Milavetz, K. Kakinuma, K. L. Rinehart, I. P. Rolls, and W. J. Haak*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, 95, 5793.
92. *P. V. Desmukh, K. Kakinuma, J. J. Ameel, K. L. Rinehart, P. F. Wiley, and L. H. Li*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, 98, 870.
93. *E. Martinelli, R. J. White, G. G. Gallo, and P. J. Beynon*, Tetrahedron Letters, 1974, 1367.
94. *R. J. White, E. Martinelli, and G. Lancini*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 3260.
95. *R. D. Johnson, A. Haber, and K. L. Rinehart*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, 96, 3316.
96. *T. Swain*, in 'Biosynthetic Pathways in Higher Plants', ed. J. B. Pridham and T. Swain, Academic Press, London, 1965, p. 9.
97. *S. A. Brown*, in 'Specialist Periodical Reports: Biosynthesis', ed. T. A. Geissman, The Chemical Society, London, 1971, vol. 1, p. 1.
98. *I. M. Campbell*, Phytochemistry, 1975, 14. 683.
99. *I. M. Campbell*, Phytochemistry, 1976, 15, 1367.

100. *G. D. Chase and J. L. Rabinowitz*, 'Principles of Radioisotope Methodology' Burgess, Minneapolis, 1967.
101. *M. D. Kamen*, 'Isotopic Tracers in Biology', Academic Press, New York, 1957.
102. *J. R. Catch*, 'Carbon-14 Compounds', Butterworth, London, 1961.
103. *E. A. Evans*, 'Tritium and its Compounds', Van Nostrand, London, 1966.
104. *M. Bubner and L. Schmidt*, 'Die Synthese Kohlenstoff-14-markierter organischer Verbindungen', Thieme, Leipzig, 1966.
105. *A. Murray and D. L. Williams*, 'Organic Syntheses with Isotopes', Interscience, New York, 1958.
106. *J. W. Cornforth*, Quart. Rev., 1969, 23, 125.
107. *J. W. Cornforth*, Chem. Soc. Rev., 1973, 2, 1.
108. *J. M. A. Al-Rawi, J. A. Elvidge, D. K. Jaiswal, J. R. Jones, and R. Thomas*, J. C. S. Chem. Comm., 1974, 220.
109. *H. Simon and H. G. Floss*, 'Bestimmung der Isotopenverteilung in markierten Verbindungen', Springer, Berlin, 1967.
110. *A. J. Birch, R. A. Massy-Westropp, R. W. Rickards and H. Smith*, Proc. Chem. Soc., 1957, 98.
111. *T. J. Simpson*, Chem. Soc. Rev., 1975, 4, 497.
112. *M. Tanabe*, in 'Specialist Periodical Reports: Biosynthesis', ed. T. A. Geissman and J. D. Bu'Lock, The Chemical Society, London, 1973, vol. 2, p. 241; 1975, vol. 3, p. 247; 1976, vol. 4, p. 204.
113. *G C. Levy and G. L. Nelson*, 'Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists', Wiley, New York, 1972 [*Леви Г., Нельсон Г.* Руководство по ядерному магнитному резонансу углерода-13. Пер. с англ. М.: Мир, 1975].
114. *J. B. Stothers*, 'Carbon-13 N. M. R. Spectroscopy', Academic Press, New York, 1972.
115. *L. F. Johnson and W. C. Jankowski*, 'Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy', Wiley, New York, 1972.
116. *R. Freeman, K. G. R. Pachler, and G. N. La Mar*, J. Chem. Phys., 1971, 55, 4586.
117. *M. Tanabe, K. Suzuki, and W. C. Jankowski*, Tetrahedron Letters, 1973, 4723.
118. *L. Cattel, J. F. Grove, and D. Shaw*, J. C. S. Perkin I, 1973, 2626.
119. *H. M. Pickett and H. L. Strass*, Analyt Chem., 1972, 44, 265.
120. *A. G. McInnes, D. G. Smith, J. A. Walter, L. C. Vining, and J. L. C. Wright*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 66.

29.2. БИОСИНТЕЗ ТЕРПЕНОИДОВ

ДЖ. Р. ХЭНСОН (University of Sussex)

29.2.1. ВВЕДЕНИЕ

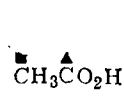
Терпеноиды и стероиды широко распространены в природе. Благодаря тому, что для соединений этого класса характерно, с одной стороны, исключительное разнообразие в построении углеродного скелета, а с другой — устойчивое повторение в этих скелетах одного и того же пятиуглеродного «изопренового» звена, биосинтез терпеноидов уже почти сто лет привлекает внимание химиков, занимающихся изучением природных соединений.

Структурное сходство многих монотерпеноидов и образование изопрена при их термическом разложении, отмеченное Тильденом еще в 1884 г., позволило предположить, что пятиуглеродный фрагмент является общей структурной единицей всех монотерпеноидов.

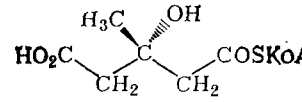
Это структурное единство позволило Ружичке сформулировать в 1921 г. известное «изопреновое правило», согласно которому углеродный скелет терпеноидов состоит из изопреновых фрагментов, связанных в определенном порядке [1,2]. Это правило было использовано при установлении строения сесквитерпеноидов и дитерпеноидов в последующие десятилетия. Со временем накопилось немалое число примеров формального нарушения правила Ружички. Это привело к новой его формулировке как «биогенетического изопренового правила», учитывающего возможность различных «дозволенных» перегруппировок в ходе биосинтеза. Согласно «биогенетическому изопреновому правилу», терпеноидами являются соединения, изначально образованные комбинацией изопреновых фрагментов, в результате которой возникают гераниол, фарнезол, геранилгераниол, сквален и другие алифатические соединения того же типа [3]. Прочие терпеноиды могут быть получены из этих алифатических предшественников путем обычных реакций циклизации, а в некоторых случаях путем циклизации с перегруппировкой.

Было высказано много предположений о возможности образования «активного изопренового фрагмента» из таких соединений, как лейцин и сенециевая (β,β-диметилакриловая) кислота. Многие ранние исследования в основном были посвящены изучению стероидов вследствие их важного биологического значения. Первые исследования биосинтеза начались вскоре после установления структуры этих соединений. В 1937 г. Зондерхоф [4] одним из первых применил метод меченых атомов для решения биосинтетических проблем. При выращивании дрожжевых клеток на среде, содержащей тридейтероуксусную кислоту, он обнаружил, что образующиеся в них стерины содержат большое количество дейтерия. Исследования, начатые в 1946 г. Блохом [5], Корнфортом и Попчаком [6], с использованием уксусной кислоты (1), меченной ^{14}C по метильной или по карбоксильной группе [1], привели к установлению пути ее превращения в стероиды. Этими экспериментами было показано, что атомы углерода метильной и карбоксильной групп чередуются в углеродном скелете холестерина (7) [7], а боковые метильные группы образуются из метильной группы уксусной кислоты.

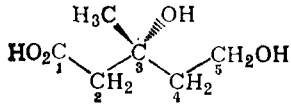
В 1951 г. так называемый активный ацетат был выделен в виде сложного эфира уксусной кислоты со специфическим тиолом коферментом А (ацетил-КоА) [7]. За этим последовало выявление важной роли шестиуглеродной структурной единицы — 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА (2; ГМГ-КоА) в биосинтезе изопреноидов [8]. Потеря ацетатного карбоксила в виде диоксида углерода, наблюдающаяся при биосинтезе стеринов, согласуется с образованием из трех ацетатных единиц шестиуглеродного фрагмента, который является предшественником основного пятиуглеродного изопренового фрагмента. Другие важные интермедиаты были идентифицированы в опытах, непосредственно не связанных с проблемой биосинтеза стеринов. В 1965 г. было обнаружено, что



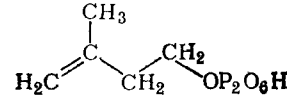
(1)



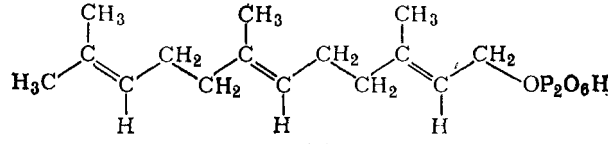
(2)



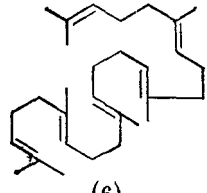
(3)



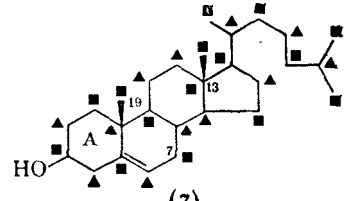
(4)



(5)



(6)



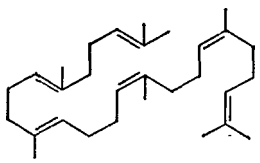
(7)

3,5-дигидрокси-3-метилвалериановая (мевалоновая) кислота (3) может заменять ацетат в качестве необходимого фактора роста мутантного штамма *Lactobacillus acidophilus*. Бесклеточная система из печени способна включать меченую мевалоновую кислоту в молекулу холестерина (7) [10]. Вскоре было доказано, что мевалоновая кислота — универсальный биогенетический предшественник всех терпеноидов [11].

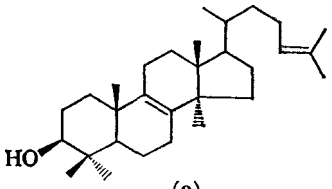
В 1926 г. Чэннон [12] высказал предположение, что сквален (6) может быть промежуточным звеном в биосинтезе стеринов, а в 1934 г. Робинсон предположил [13], что при превращении в холестерин молекула сквалена складывается строго определенным образом (8). Блох в 1952 г. установил, что углеродные атомы боковой цепи холестерина (7) образуются из ацетата согласно «изопреновому правилу», а несколько позднее Корнфорт и Попчак установили происхождение углеродных атомов в кольце А и ангулярного атома С-19. Однако в 1953 г. Блох показал [14], что углеродные атомы С-13 и С-7 образуются не из карбоксильной группы уксусной кислоты, как должно было бы быть, если бы в процессе биосинтеза реализовалась конформация (8), а из ее метильной группы. Этот факт в сочетании с появившимися тогда же данными о структуре ланостерина (9) позволил Вудварду и Блоху пред-

ложить иную предреакционную конформацию сквалена, а именно (6).

Вскоре появилось экспериментальное подтверждение роли сквалена и ланостерина в биосинтезе стеринов. Так, введение в пищу крысам меченого ацетата приводило к образованию меченого сквалена, а затем меченого холестерина.



(8)



(9)

Бесклеточные экстракты дрожжей и печени способны синтезировать сквален из мевалоновой кислоты. Этот процесс требует присутствия кофакторов, ATP, ионов Mg^{2+} и NADPH. В отсутствие NADPH накапливается фарнезилпирофосфат (5). В свою очередь, последний может быть превращен в сквален (6). В присутствии ингибитора (иодацетамид, $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л) обнаружен еще один интермедиат — изопентенилпирофосфат (4). Именно это пятиуглеродное соединение и играет роль «активного изопрена». Так к 1960 г. были установлены основные этапы биосинтеза холестерина: от ацетата к мевалонату, затем к изопентенилпирофосфату и далее к фарнезилпирофосфату, скваленту и ланостерину.

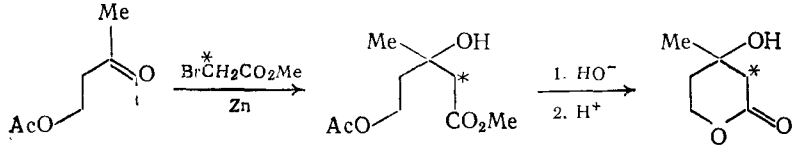
В соответствии с этим изучение биосинтеза терпеноидов целесообразно разделить на четыре этапа: (1) образование изопентенилпирофосфата (ИПП); (2) олигомеризация изопентенилпирофосфата в геранил-, фарнезил- и другие полипренилпирофосфаты, сквален и каучук; (3) стадии циклизации в биосинтезе стероидов и терпеноидов; (4) образование индивидуальных терпеноидов в результате гидроксилирования, перегруппировок и других реакций. При изучении этих этапов важную роль играют мевалоновые кислоты, меченные изотопами в определенных центрах. Поэтому полезно рассмотреть пути их получения прежде чем начать рассматривать сами биосинтетические исследования.

29.2.2. ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МЕВАЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ [15, 16]

Природная мевалоновая кислота оптически активна и представляет собой 3(*R*)-изомер (3), который участвует в биосинтезе терпеноидов. Фермент фосфомевалонаткиназа («мевалонаткиназа») фосфорилирует только этот энантиомер. Важное значение мевалоновой кислоты как необратимо образующегося предшественника в биосинтезе терпеноидов привело к разработке методов синтеза большого числа меченных в разные положения мевалонатов.

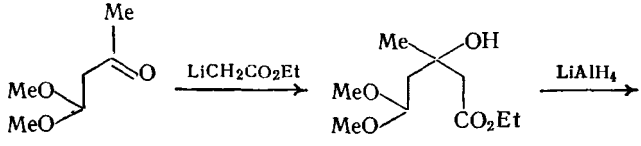
Применение таких мевалонатов обеспечивает включение метки в определенные места конечных терпеноидов.

В самых первых опытах использовался лактон [2-^{14}C]мевалоновой кислоты (**10**), полученный (схема 1) по реакции Реформатского между метилбромацетатом и 1-ацетоксибутаноном-3 или 1,1-диметоксибутаноном-3. В других случаях в качестве четырехуглеродного компонента использовали 1-хлорбутанон-3. В последнее время для приготовления мевалоната, меченного ^{13}C, использовали катализируемую основаниями конденсацию меченого этилацетата или *O,C*-дианиона уксусной кислоты (в виде дилитиевой соли) с 1-замещенным бутаноном-3 [16]. Восстановлением эфира (**11**) до спирта и окислительным гидролизом диметоксиацеталя (**12**) (схема 2) можно получить продукт, меченный при С-4 и С-5. Четырехуглеродный компонент, 1-ацетоксибутанон-3, меченный ^{13}C в положениях 2 и 4, может быть получен (схема 3) из [2-^{13}C]ацетилхлорида. Известен также альтернативный синтез из ацетилхлорида и моноэтилового эфира малоновой кислоты.

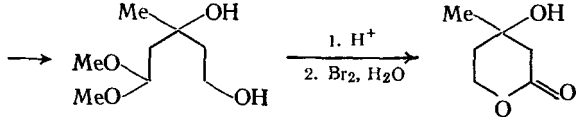


(1)

(10)

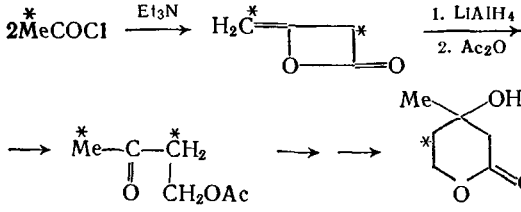


(11)



(2)

(12)



(3)

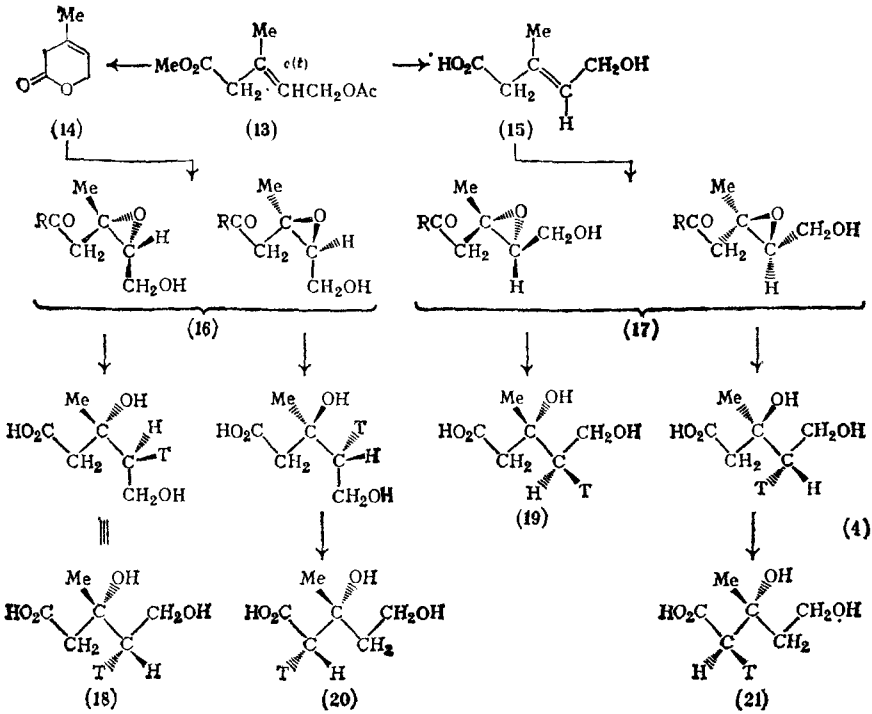
Некоторые из этих методов пригодны для синтеза нестереоспецифично меченных тритием мевалонатов. Так, из метил[2-$^{3}H_2$]бромацетата методом Реформатского получают [2-$^{3}H_2$]мевалонат.

[5-$^3H_2$]Мевалонат можно получить восстановлением эфира 3-гидрокси-3-метил-5,5-диметоксипентановой-1 кислоты [^{3}H]борогидридом лития с последующим окислительным гидролизом или восстановлением альдегидной группы мевалдиновой кислоты [см. формулу (28)] [^{3}H]борогидридом натрия.

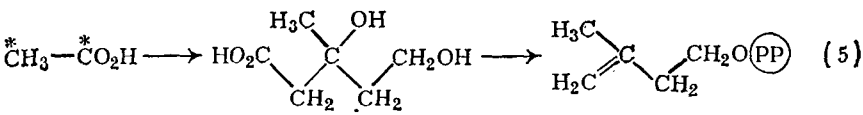
Стереоспецифически меченные мевалонаты можно получать некоторыми оригинальными методами [17] (схема 4). Исходным материалом для синтеза 4(*R*)- и 4(*S*)-[^{3}H]мевалоновой кислоты служит эфир (13), который при мягком гидролизе дает разделимую смесь лактона (14) (из *цис*-изомера) и *транс*-гидроксикислоты (15). Каждый изомер в отдельности эпоксидируется, эпоксиды (16) и (17) восстанавливаются [^{2}H]- или [^{3}H]борогидридом лития до меченых мевалоновых кислот (18) и (19). Раскрытие эпоксида таким методом приводит к *транс*-расположению гидроксильной группы относительно входящего нуклеофильного гидрид-иона. Так как только 3(*R*)-изомер, например (18), служит субстратом мевалонаткиназы, то это определяет хиральность атома С-4 в мевалонате, используемом в биосинтезе. Взаимопревращением спиртовой или карбоксильной группы хиральный центр перемещается от С-4 к С-2, что приводит к меченым 2(*S*)- и 2(*R*)-мевалоновым кислотам (20) и (21), соответственно. Для синтеза стереоспецифически меченного при С-5 мевалоната используют соответствующие ферменты. Мевалдинатредуктаза из печени свиньи или крысы является ферментом типа «А», переносящим метку (^{2}H или ^{3}H) с «А»-стороны восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH), т. е. от его 4(*R*)-положения, с образованием 5(*R*)-меченого мевалоната из мевалдиновой кислоты (28). Интересно, что мевалдинатредуктаза восстанавливает оба эпимера мевалдиновой кислоты и в каждом случае метка имеет 5(*R*)-конфигурацию. 5(*S*)-Меченый мевалонат в ряде случаев получают ферментативным восстановлением 3-метил[1-^{3}H]бутен-3-аля с последующим превращением в мевалонат. Мевалоновую кислоту, в которой метильные группы хирально мечены дейтерием и тритием, получают из хирального ацетата [18].

Описано получение [5-^{18}O]мевалонолактона, в который изотопная метка вводится в результате кислотного гидролиза диметилацеталя метилмевалдината $H_2{}^{18}O$ и последующего восстановления продукта гидролиза борогидридом натрия [19].

Очень ценную информацию дают опыты с использованием соединений с двойной меткой (т. е. соединений, содержащих ^{3}H и ^{14}C в известном соотношении). По соотношению удельной радиоактивности ^{3}H и ^{14}C в образующихся метаболитах и по изменениям этого соотношения в продуктах тщательным образом выбранных и проведенных реакций деградации можно определить, например, стереохимию таких стадий биосинтеза, как гидроксилирование или перегруппировки. При использовании очищенных ферментных систем степень включения метки часто столь высока, что содержание дейтерия можно измерять с помощью масс-спектрометрии.



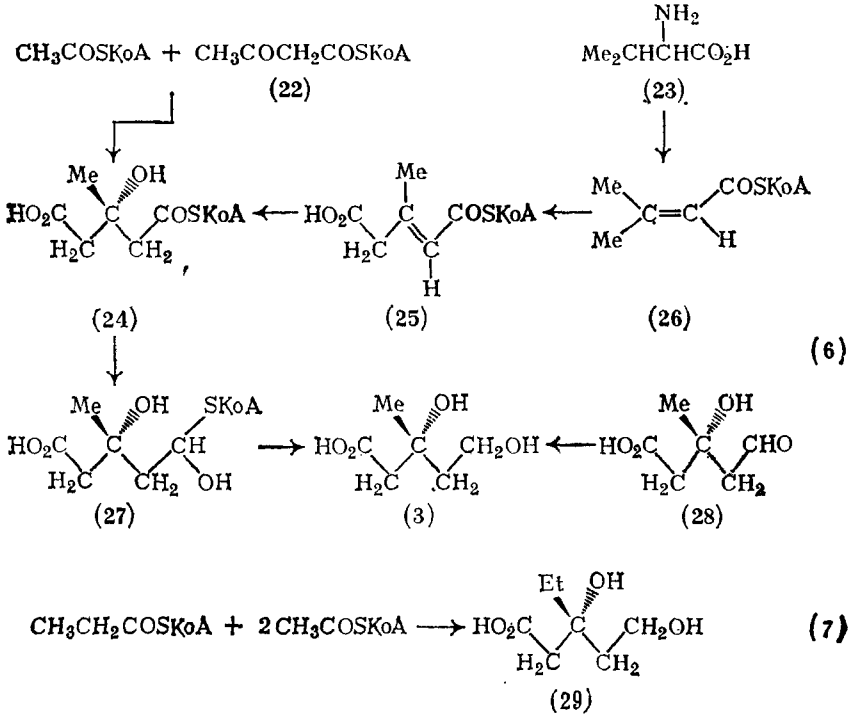
В последние годы широкое применение при изучении биосинтеза терпеноидов находит спектроскопия ЯМР ^{13}C [20]. Особенно ценны следующие сведения: увеличение интенсивности специфических сигналов и константы спин-спинового взаимодействия $^{13}C - {}^{13}C$. Применение этого метода в опытах по введению [$^{13}C_2$]уксусной кислоты в различные биосинтетические системы основано на том, что углеродные атомы изопренового фрагмента могут взаимодействовать друг с другом (схема 5).



29.2.3. ОБРАЗОВАНИЕ ИЗОПЕНТЕНИЛПИРОФОСФАТА [21—23]

3(*S*)-3-Гидрокси-3-метилглутарил-КоА (**24**; ГМГ-КоА) образуется при «альдольной» конденсации ацетоацетил-КоА (**22**) с ацетил-КоА (схема 6). Существует еще один, второстепенный путь образования этого соединения из лейцина (**23**), включающий карбоксилирование 3-метилкротонил-КоА (**26**) и гидратацию эфира (**25**). Хотя образование (**24**) является обратимой стадией, его восстановление в мевалонат (**3**), по существу, необратимо и представляет

собой одну из ключевых (и контрольных) стадий в биосинтезе стеринов. Мевалдиновая кислота (28), хотя и восстанавливается в мевалонат специфической редуктазой, вероятно, не является нормальным интермедиатом в биосинтезе мевалоната. Истинным же интермедиатом служит полутиоацеталь (27), образующийся из кофермента А и мевалдиновой кислоты [24]. Обе стадии восстановления, приводящие к превращению (24) в мевалоновую кислоту (3) и катализируемые ГМГ-КоА-редуктазой, связаны с участием 4-*pro*-(*R*)-водородного атома NADP. Представляет интерес стереохимия этого восстановления. Полутиоацеталь (27) как аддукт 3(*R*)-мевалдиновой кислоты и кофермента А служит хорошим субстратом для ГМГ-КоА-редуктазы печени крысы, и его восстановление приводит к 5-*pro*-(*S*)-меченному соединению. В то же время, восстановление 3(*R*)-мевалдиновой кислоты мевалдинатредуктазой из печени крысы приводит к 5-*pro*-(*R*)-меченному соединению.

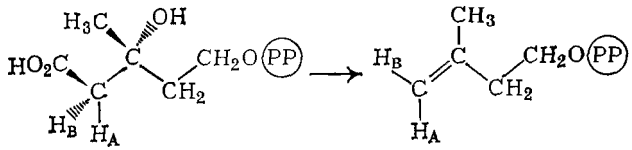


Распределение меток в меченом сквалене и меченом холестерине, полученных в ходе биосинтеза из [2-^{14}C]мевалоновой кислоты, свидетельствует о ее прямом включении [25]. Кроме того, меченая мевалоновая кислота обнаруживается в том случае, когда немеченый материал добавляется к ферментной системе из печени во время биосинтеза сквалена из [^{14}C]ацетата [26]. Использование

3(*R*)-энантиоморфа сопровождается потерей карбоксильной группы. Конфигурация при С-3 биологически активной формы мевалоновой кислоты установлена непосредственной корреляцией ее антипода с хинной кислотой и ее синтезом из (*S*)-линалоола [27].

3-Гомомевалоновая кислота (**29**) участвует в биосинтезе ювенильных гормонов насекомых [28]. Она образуется из пропионилкофермента А и двух молекул ацетилкофермента А (схема 7).

Для превращения мевалоната в изопентенилпирофосфат необходимы АТР и Mg^{2+}. Образование монофосфорилированного производного мевалоновой кислоты, которое является эффективным предшественником сквалена, катализируется мевалонаткиназой. Было показано, что препараты мевалонаткиназы из нескольких растений ингибируются геранил- и другими полипренилпирофосфатами. Следовательно, активность этой ферментной системы может быть еще одним важным фактором, влияющим на ход биосинтеза изопреноидов. Позднее было показано, что монофосфат мевалоновой кислоты подвергается вторичному АТР-зависимому фосфорилированию с образованием 5-пирофосфата. За этим следуют одновременно дегидратация и декарбоксилирование, протекающие по согласованному механизму. Для их осуществления требуется третья молекула АТР.



(30) (31) (8)

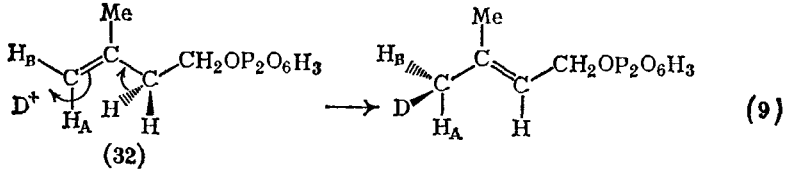
Стереохимия реакций декарбоксилирования и дегидратации (схема 8) изучена с использованием [2(*S*)-2-^{2}H]- и [2(*R*)-2-^{2}H]-меченных мевалонатов. Стереохимия дейтериевых меток при двойной связи в полученных изопентенилпирофосфатах отражает стереохимию реакции и показывает, что процесс происходит как *транс*-элиминирование.

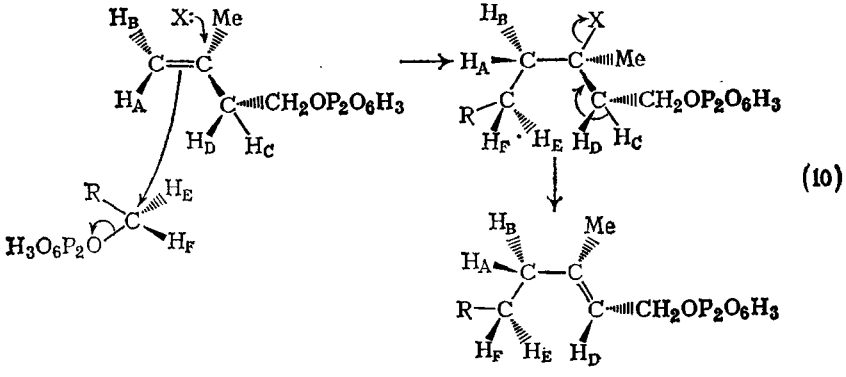
29.2.4. ОБРАЗОВАНИЕ ФАРНЕЗИЛПИРОФОСФАТА [29]

Хотя изопентенилпирофосфат (ИПП) является тем фрагментом, который обеспечивает удлинение цепи в биосинтезе изопреноидов, инициатором («стартером») олигомеризации служит его изомер — диметилаллилпирофосфат (ДМАПФ). Изомеризация, так же как и стадия удлинения цепи, включает элиминирование протона от атома С-4 в исходном мевалонате (которому соответствует атом С-2 в изопентенилпирофосфате). Изучение включения [4(*R*)-4-^{3}H]- и [4(*S*)-4-^{3}H]мевалоновой кислоты в различные изопреноиды показало, что в случае *транс*-конфигурации изопреноидной двойной связи остается 4-*pro*-(*R*)-протон, а в случае *цис*-конфигурации этой связи (например, в каучуке) — 4-*pro*-(*S*)-протон. Однако в неболь-

ших изопреноидных молекулах ряд *цис*-двойных связей образуется с сохранением 4-*pro*-(*R*)-протона. Изомеризация таких олефинов будет рассмотрена позднее.

Исследования, использующие появление хиральности в [2-^{3}H]ацетате, показали [30], что присоединение атома водорода к двойной связи изопентенилпирофосфата происходит с 3-*re*,4-*re*-стороны, так что стереохимия изомеризации соединения (32) [2-*pro*-(*R*)-элиминирование, 3-*re*,4-*re*-присоединение] определяется согласованным механизмом (схема 9). Это одна из немногих обратимых реакций в биосинтезе терпеноидов, и она может привести к потере стереохимической тождественности атомов водорода при атомах углерода, возникающих из атомов С-2 мевалоната.

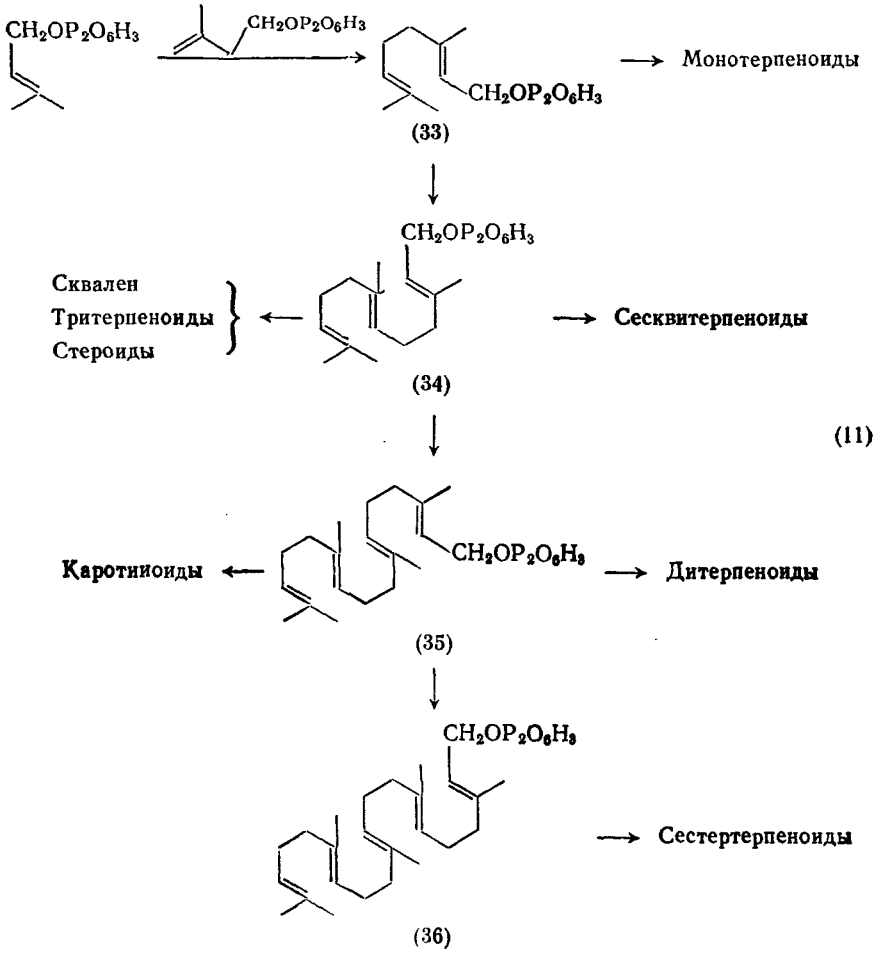




Стадии алкилирования олефинов, которые приводят к полимергомологичным полипренилпирофосфатам, катализируются пренилтрансферазой [31]. Движущей силой этих реакций является высокая реакционная способность аллильных пирофосфатов. Стереохимия этих стадий также изучалась с использованием хирально меченных при С-2 и С-5 мевалонатов. Чтобы согласовать результаты этих экспериментов, было высказано предположение, что процесс протекает в две отдельные стадии (схема 10). Первая включает *транс*-присоединение аллильного фрагмента и электронодонорной группы X по двойной связи, которое сопровождается обращением конфигурации при атоме углерода, связанного с пирофосфатной группой. Вторая стадия включает элиминирование группы X и атома водорода от углеродного атома, возникшего из С-4 мевалоната.

Фарнезилпирофосфат (34) и позднее геранилпирофосфат (33) были идентифицированы как предшественники сквалена. Затем

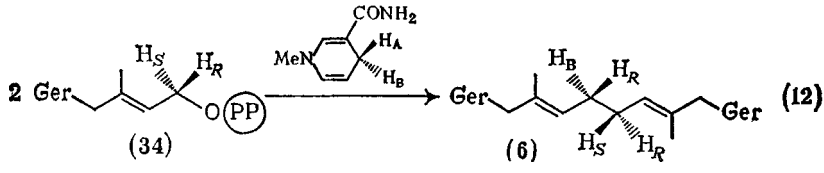
было установлено, что эти полипренилпирофосфаты вместе с геранилгеранилпирофосфатом (35) и фарнезилгеранилпирофосфатом (36) являются родоначальниками моно-, сескви-, ди- и сестертерпеноидов и каротиноидов (схема 11).

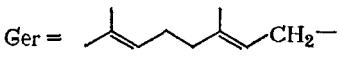


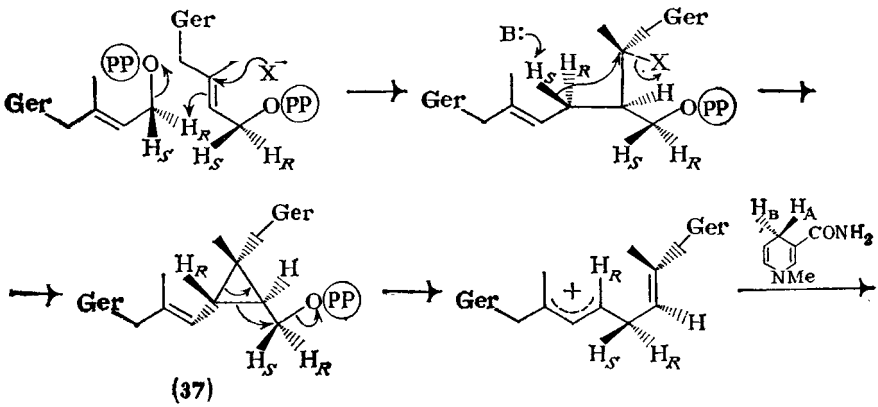
29.2.5. ОБРАЗОВАНИЕ СКВАЛЕНА [22, 29, 32]

Механизму конденсации двух молекул фарнезилпирофосфата (34) по типу «голова к голове» с образованием сквалена (6) посвящено большое число работ. Сквален, полученный в ходе биосинтеза из [5-$^2H_2$]мевалоната в ферментной системе из печени крысы, содержит одиннадцать из двенадцати максимально возможных атомов дейтерия. «Потерянная» метка, которая должна

была бы находиться при двух центральных углеродных атомах сквалена, заменялась стереоспецифически 4-*pro*-(*S*)-водородным атомом с «В»-стороны молекулы NADPH. При озонолизе сквалена, полученного биосинтетически из [5-$^2H_2$]мевалоната, образуется тридейтероянтарная кислота с (*S*)-конфигурацией. Это позволило предсказать, что тритий, включенный в сквален из [^{3}H]NADP может в конце концов появиться в C-11α- и C-12β-положениях стероидных ядер. При использовании 1(*R*)-[1,5,9-$^2H_3$]фарнезилпирофосфата, полученного из [5(*R*)-5-^{2}H]мевалоната, было показано, что не происходит потери этой метки при биосинтезе сквалена и что каждый из центральных углеродных атомов сохраняет «свою» метку. Таким образом, при образовании сквалена теряется 1-*pro*-(*S*)-водородный атом фарнезилпирофосфата. Кроме того, дидейтероянтарная кислота, полученная озонолизом сквалена, была оптически неактивным *мезо*-(*RS*)-изомером. Таким образом, соединение двух молекул фарнезилпирофосфата (**34**) приводит к скваленту (**6**) с сохранением конфигурации при C-1 в одной молекуле и с обращением конфигурации при C-1 в другой.



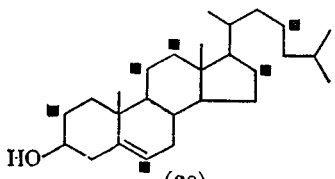




Значительным шагом вперед в изучении этой стадии послужило выделение прескваленпирофосфата (37) [33]. Он был получен при исключении NADPH из системы, приводящей обычно к сквалену. Окончательное доказательство структуры прескваленпирофосфата и его участия в биосинтезе привело к уточнению пути образования сквалена. До сих пор нет единого мнения относительно механизма образования сквалена; не ясно, проходит ли оно с участием группы X или нет. Возможный механизм этого типа приведен на схеме (13).

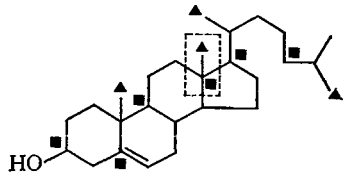
29.2.6. БИОСИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРИНА [22, 34, 35]

Биогенетическая взаимосвязь сквалена и холестерина предполагалась еще до 1926 г., однако достоверно участие сквалена в образовании углеродного скелета холестерина было установлено лишь в 1953 г. после того, как было выяснено распределение радиоактивной метки в холестерине, образующемся из меченого ацетата. Распределение меток в холестерине, полученном в опытах с ацетатом и мевалонатом, показано соответственно формулами (7), (38) и (39). Положения атомов ^{13}C в холестерине, полученном из [5-^{13}C]- и [3′,4-$^{13}C_2$]мевалонатов, недавно установлено методом ЯМР ^{13}C [36]. В результате стереоспецифической циклизации сквалена в молекуле появляется концевая *транс*-метильная группа, которая метится, если используется [2-^{14}C]мевалоновая кислота; из этой группы возникает 4α-метильная группа ланостерина.



(38)

■ = метка из [5-^{13}C]МВК



(39)

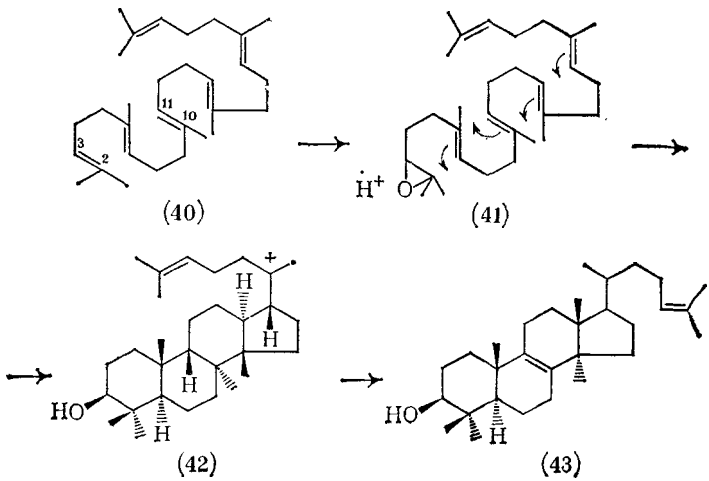
▲ = метка из [3′-^{13}C]МВК

■ = метка из [4-^{13}C]МВК

Первоначально предполагалось, что биологическая циклизация сквалена с образованием ланостерина (43) инициируется атакой формального катиона OH^+. Чен и Блох [37] установили, что циклизация сквалена является аэробным процессом; ланостерин, образующийся в присутствии ^2H_2O или $H_2{}^{18}O$, не содержит дейтерия или ^{18}O, но в присутствии $^{18}O_2$ получается меченый продукт. Таким образом, в процессе не участвует свободный, частично циклизованный интермедиат, для дальнейшей циклизации которого требуется повторное протонирование. В 1966 г. Кори и Ван Тамелен [38] обнаружили еще один промежуточный продукт в биосинтезе стеринов — 2,3-эпоксисквален (41). Было показано, что это соединение играет принципиальную роль в образовании многих тритерпенов. Установлено, что радиоактивная метка из сквалена легко

попадает в 2,3-эпоксид. Этот эпоксид, абсолютная стереохимия которого надежно установлена, обнаружен во многих растениях. 2,3-Иминосквален действует как конкретный ингибитор циклизации, в результате чего в системе накапливается 2,3-эпоксид. Если же субстратом в ферментной системе является 10,11-дигидросквален, то он окисляется до 2,3-эпоксида, но дальше не метаболизирует. Отсюда следует, что превращение сквалена в тетрациклический стерин в такой системе осуществляют два ферментных комплекса — эпоксидаза и циклаза.

Образование ланостерина и его дальнейшее превращение в холестерин явились предметом тщательного изучения. Было высказано предположение (см. схему 14), что циклизация приводит к образованию протоланостеринового карбениевого иона (**42**), который может стабилизоваться на поверхности фермента. Затем следует ряд миграций атомов водорода и метильных групп, которые завершаются потерей водородного атома при С-9 и образованием ланостерина (**43**). Сквален, содержащий шесть атомов ^3H, вошедших в него из шести молекул меченого мевалоната с 4-*pro*-(*R*)-конфигурацией, образует ланостерин, содержащий только пять таких меток вследствие потери водородного атома от С-9 [39]. Деградацией холестерина, полученного из соответствующего мевалоната, показано, что протоны при С-17α и С-20β образуются из атомов водорода, находившихся при С-13 и С-17 протоланостерина. Кроме того, Бартон показал [40], что в ланостерине, полученном из 2,3-эпокси[11,14-$^3H_2$]сквалена, 94 % тритиевой метки остается при С-17. Атом ^3H, находившийся при С-11 в молекуле эпоксисквалена, оказывается в положении С-9 в молекуле протоланостерина и теряется при образовании ланостерина. С помощью [3,4-$^{13}C_2$]мевалоната Корнфорт [41] установил, что перегруппировка метильных групп от С-8 к С-14 и от С-14 к С-13 включает две 1,2-миграции, а не одну 1,3-миграцию (т. е. от С-8 к С-13).



(40) (41) (42) (43)

(14)

Миграция внутри единичного изопренового звена [^{13}C]метильной группы от атома С-14 к атому С-13, который сам мечен ^{13}C из С-4 положения мевалоната, приводит к соединениям, из которых при деградации методом Куна — Рота получается [$^{13}C_2$]уксусная кислота. При использовании хирально меченной метильной группы мевалоновой кислоты удалось показать, что в ходе этой перегруппировки метильная группа при С-18 сохраняет свою конфигурацию [18].

Превращение ланостерина в холестерин (44) включает потерю трех метильных групп, восстановление двойной связи в боковой цепи и миграцию $\Delta^{8,9}$-двойной связи в $\Delta^{5,6}$-положение. Во время превращения ланостерина в холестерин метильные группы при С-4 элиминируются в виде диоксида углерода [42], а метильные группы при С-14 — в виде муравьиной кислоты [43]. 4,4-Диметилхолестадиен-8,24-ол-3β, обнаруженный в различных системах у млекопитающих, легко превращается в холестерин; таким образом, первой элиминируется метильная группа при С-14. В опытах с [3(*R*),2(*S*)-2-^{3}H]мевалонатом показано, что потеря водородного атома от С-15α связана с потерей С-14α-метильной группы. Образовавшийся 8,14-диен восстанавливается затем по *транс*-схеме, так что присоединяющиеся водородные атомы занимают положения 14α и 15β [44]. Удаление обеих метильных групп от С-4 является ступенчатым процессом, в котором 4α-метильная группа удаляется первой. В ходе этого процесса теряется водородная метка у атома С-3, а метильные группы в конце концов элиминируются в виде диоксида углерода. Используя в качестве субстрата 4,4-диметил-5α-холестен-7-ол-3β, Гейлор показал [45], что окислительное деметилирование может быть разделено на несколько отдельных стадий. Первая стадия, для которой требуется NADPH и кислород, состоит в гидроксилировании метильной группы. Вторая стадия протекает в анаэробных условиях, для дегидрирования используется окисленный пиридиннуклеотид; эта стадия включает превращение спирта в альдегид. Потеря 3α-водородного атома приводит к 3-кетопроизводному, от которого через β-дикарбонильное соединение легко отщепляется функциональная группа при С-4. Однако 3-кето-4-метилстероиды не являются субстратами для гидроксилазы и 3β-гидрокси-4-метилстерины образуются до того, как происходит дальнейшее гидроксилирование и удаление второй метильной группы при С-4.

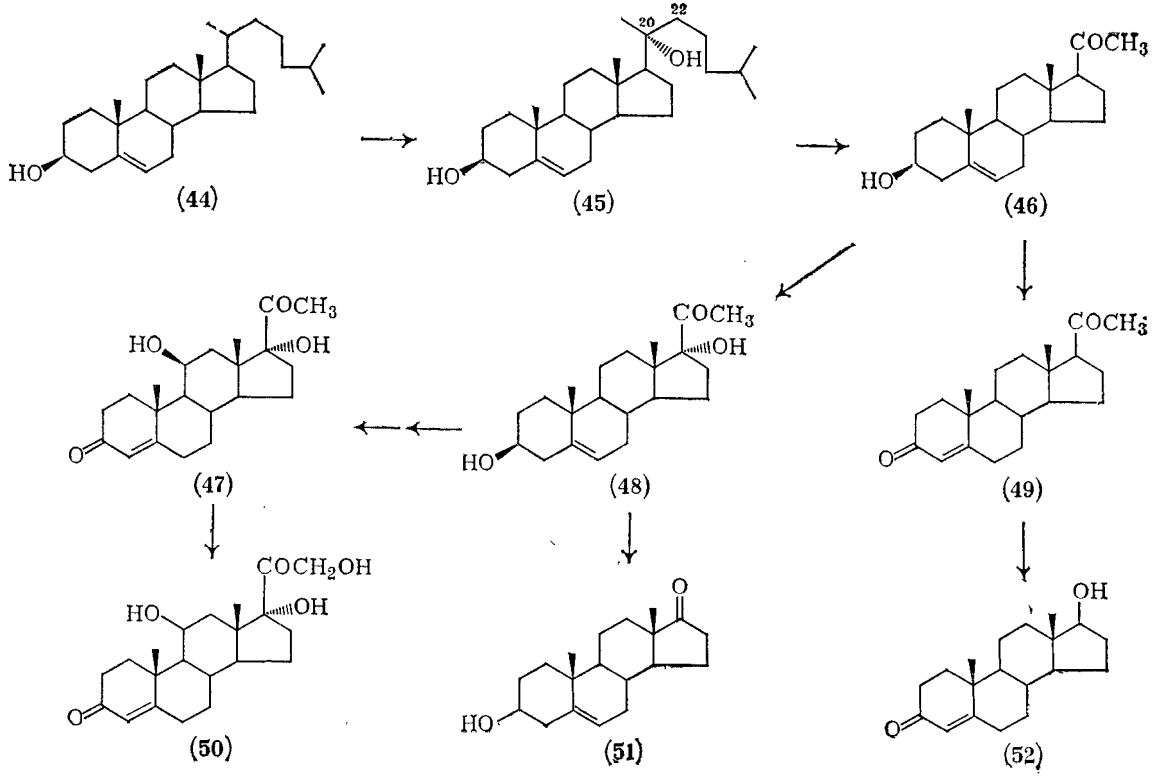
Заключительная стадия биосинтеза холестерина включает насыщение двойной связи в боковой цепи и миграцию двойной связи в ядре. Восстановление Δ^{24}-двойной связи в стерине, например в десмостерине, включает присоединение H^+ к С-24 и гидрид-иона из NADPH к С-25. Этот процесс заключается в *цис*-присоединении водорода с *re*-стороны двойной связи. Изомеризация двойной связи ядра состоит в миграции ее в положение 7, последующем дегидрировании, приводящем к образованию 7-дегидрохолестерина и, наконец, в восстановлении последнего до холестерина. Исполь-

зуя мевалонат, стереоспецифически меченный тритием по С-2, удалось показать, что образование Δ^7-двойной связи включает стереоспецифическое удаление 7β-водородного атома [44]. Однако при биосинтезе эргостерина теряется 7α-водородный атом [45]. С помощью мевалонатов, специфически меченных тритием при С-5, было показано, что при образовании стероидных 5,7-диенов теряется атом водорода из положения 6α. Эта реакция является скорее реакцией дегидрирования, чем гидроксилирования и дегидрирования. Восстановление 5,7-диена включает *транс*-присоединение водорода по Δ^7-двойной связи. Когда в качестве кофермента используют [4-^3H]NADP, то образующийся холестерин содержит тритиевую метку в 7α-положении. В присутствии ^3H_2O метка входит в 8β-положение [47].

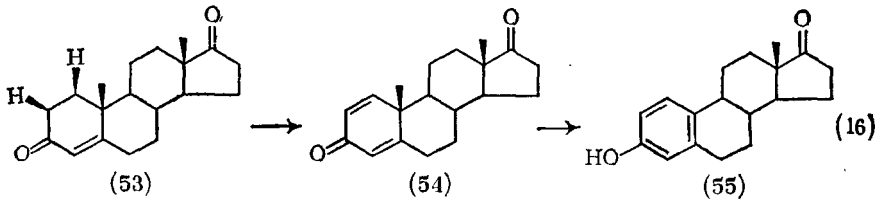
29.2.7. СВЯЗЬ ХОЛЕСТЕРИНА С ДРУГИМИ СТЕРОИДАМИ [48, 49]

Вследствие важной биологической роли стероидных гормонов млекопитающих их образованию посвящено огромное число работ. В данном разделе невозможно рассмотреть все известные пути биосинтеза этих соединений. Ограничимся лишь кратким разбором тех путей, которые составляют часть трехмерной карты метаболизма стероидов. Начальные этапы включают деградацию боковой цепи холестерина (**44**) путем введения к С-20α гидроксильной группы, приводящего к диолу (**45**), с последующим окислением при С-22 и расщеплением связи С-20—С-22, в результате которого образуется прегненолон (**46**) и изогексановая кислота [50]. Прегненолон далее превращается в кортикостероиды, окисляясь сначала до прогестерона (**49**), а затем, окисляясь по атомам С-17, С-21 и С-11, образует, например, кортизол (**50**) [51]. Отмечалось, что в некоторых системах прегненолон гидроксилируется по С-17 с образованием соединения (**48**) прежде, чем происходит окисление кольца А в α,β-ненасыщенный кетон. 17α-Гидроксипрегненолон (**48**) может также превращаться в C_{19}-стероид, дегидроизоандростерон (**51**), в то время как прогестерон (**49**) превращается под действием 17β-десмолазы в тестостерон (**52**).

Так же подробно исследовано превращение тестостерона (**52**) и андростен-4-диона-3,17 (**53**) в эстрон (**55**) [48]. Дегидрирование, приводящее к андростадиендиону (**54**), связано с потерей 1β- и 2β-протонов [52]. Гидроксилирование по С-19 может происходить как до, так и после дегидрирования, за которым следует окисление и элиминирование атома С-19 в виде муравьиной кислоты. С-19-Спирт был специфически мечен тритием. Основная часть радиоактивной метки из [19(*R*)-^{3}H]андростен-5-триола-3β,17β,19 обнаружена в муравьиной кислоте, тогда как тритий из 19(*S*)-изомера найден в воде [53].


HO
(44)
20
22
OH
HO
(45)
COCH3
HO
(46)
COCH3
HO
OH
O
(47)
COCH3
OH
HO
(48)
COCH3
OH
O
(49)
COCH2OH
HO
OH
O
(50)
O
HO
(51)
OH
O
(52)

(15)

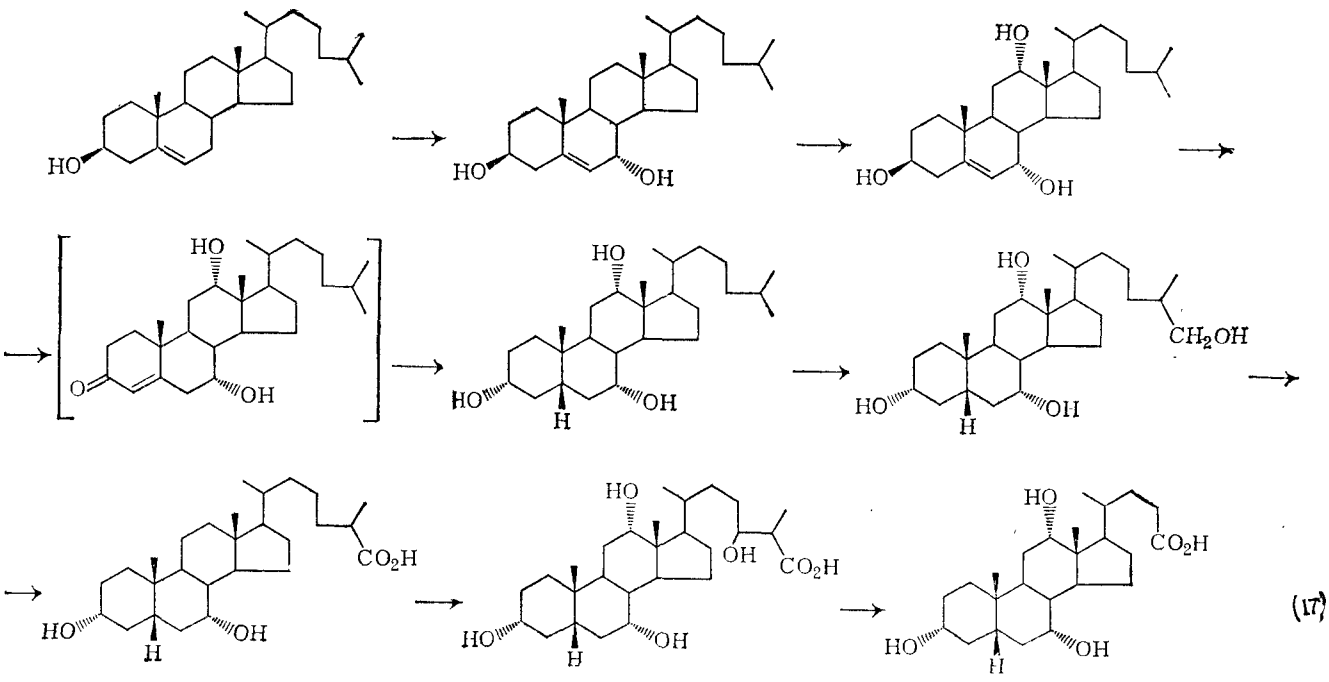


(53) (54) (55) (16)

К другому ряду метаболитов холестерина относятся желчные кислоты типа холевой кислоты (56). Первоначальные исследования показали, что трансформации скелета предшествует деградация боковой цепи (см. схему 17) [48]. Так, гидроксилирование при С-7 и С-12, изменение конфигурации атома С-3 (с промежуточным образованием 3-кетопроизводного) и насыщение Δ^5-двойной связи путем *цис*-присоединения водорода к β-стороне молекулы характерно для C_{27}-стероидов. Деградация боковой цепи может начинаться с гидроксилирования по С-26. Затем происходит окисление атома С-24, и трехуглеродный фрагмент С-25—С-27 элиминируется в виде пропионил-КоА. Для образования конъюгатов желчных кислот с глицином и таурином необходимо присутствие производных холил-КоА. Важную роль в превращениях желчных кислот играют кишечные микроорганизмы. Например, при скармливании кролику меченой холевой кислоты из нее с помощью кишечных бактерий образуется меченая дезоксихолевая кислота.

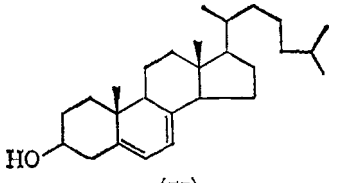
7-Дегидрохолестерин (57) может быть предшественником витамина D_3 (58) [54]. Биологически активными метаболитами витамина D_3, которые стимулируют транспорт кальция в кишечнике, являются 25-гидрокси- и 1α,25-дигидроксипроизводные витамина D_3 (59) и (60), соответственно. 1α,25-Дигидроксивитамин D_3 образуется в почках и обладает гормональными свойствами. Его биологическая функция связана с регулированием синтеза белкового паратироидного гормона. Другим метаболитом витамина D_3 является его 1α,24(*R*),25-тригидроксипроизводное.

Насекомым требуется пища, содержащая стерины, которые необходимы для образования гормонов линьки ряда экдизона [55]. В этом случае скелетной трансформации также предшествует модификация боковой цепи. Холестерин превращается в 7-дегидрохолестерин путем потери 7β- и 8β-водородных атомов и последующего окисления с образованием характерной системы 14α-гидрокси-7-ен-6-она. Как было показано в опытах с применением меченых субстратов, в процессе биосинтеза экдистерона (62) 3β,14α-дигидрокси-5β-холестен-7-он-6 (61) гидроксилируется сначала по С-25 и затем по С-22 и С-21. В организмах травоядных насекомых происходит деалкилирование боковой цепи фитостеринов с образованием экдизона. Весьма примечательно, что соединения экдизонового ряда образуются в заметных количествах и в некоторых растениях; биосинтез таких фитоэкдизонов также изучен.

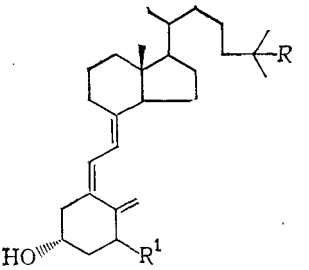


(56)

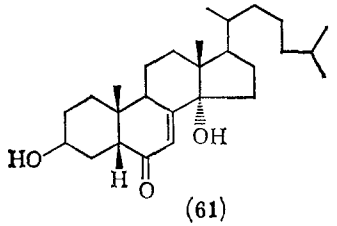
(17)



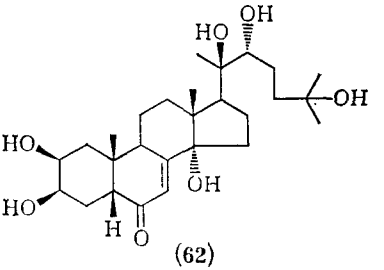
(57)



(58) $R = R^1 = H$
(59) $R = OH$, $R^1 = H$
(60) $R = R^1 = OH$



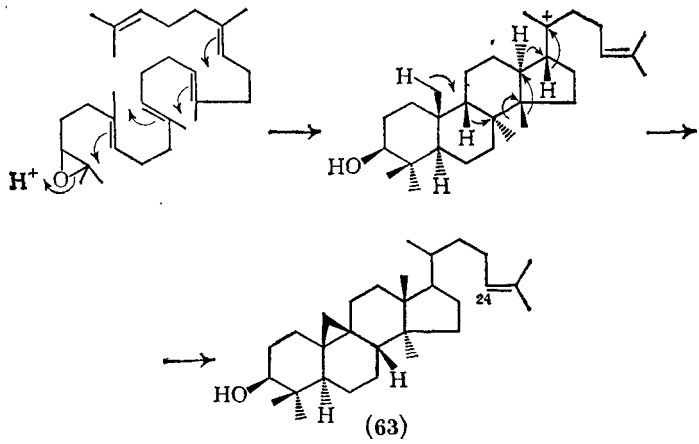
(61)



(62)

29.2.8. БИОСИНТЕЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ СТЕРИНОВ [56, 57]

Биосинтез растительных стеринов несколько отличается от биосинтеза стероидов животного происхождения. В отличие от ланостерина, который редко встречается в высших растениях, родственные ему циклопропилтритерпены — циклоартенол (**63**) и 24-метиленциклоартанол широко распространены. Если вводить [2-^{14}C]мевалонат в листья кукурузы или гороха, то метка обнаруживается в циклоартеноле и 24-метиленциклоартаноле, а не в ланостерине. При биосинтезе циклоартенола и 24-метиленциклоартанола из [4(*R*)-4-^{3}H,2-^{14}C]мевалоната, в их молекулы входят шесть меченых атомов вместо пяти, как следовало бы ожидать, если бы в их биосинтезе участвовал ланостерин. Отмечено образование 2,3-эпоксисквалена в культуре ткани табака и показано, что в этой системе радиоактивная метка из 2,3-эпокси[^{14}C]сквалена попадает в молекулы циклоартенола и 24-метиленциклоартанола. Из растений можно получить ряд систем, способных превращать эти тритерпены в фитостерины, например в β-ситостерин. Таким образом, в растениях первоначальным продуктом циклизации 2,3-эпоксисквалена и предшественником фитостеринов является циклоартенол (**63**).



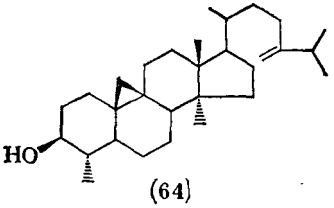
(18)

(63)

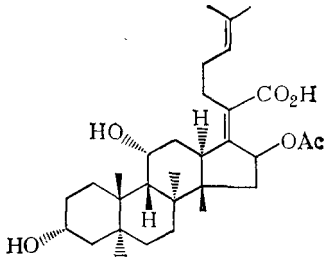
Алкилирование боковой цепи *S*-аденозилметионином с образованием 24-метиленстеринов может происходить как на стадии, предшествующей удалению связанных с циклами метильных групп, так и на гораздо более поздней стадии; последнее наблюдается в случае биосинтеза эргостерина [58]. В молекулах тех стеринов, которые содержат этильную группу в боковой цепи, источником обоих дополнительных углеродных атомов служит метионин. Алкилирование сопровождается миграцией водородного атома от С-24 к С-25.

Ряд стеринов, найденных в высших растениях, содержат Δ^{22}-*транс*-двойную связь. Стереохимия элиминирования водорода от атомов С-22 и С-23 в пориферастерине исследовалась с применением мевалонатов, стереоспецифически меченных при С-2 и С-5. Суммарный процесс включает *цис*-отщепление 22-*pro*-(*R*)- и 23-*pro*-(*R*)-водородных атомов. При биосинтезе эргостерина удаляется 22-*pro*-(*S*)-атом водорода. Вероятно, что при деметилировании скелета одна из метильных групп при С-4 теряется раньше, чем происходит деметилирование при атоме С-14; на такую возможность указывает распространенность циклоэукаленола (64) среди высших растений. Однако многие другие стереохимические особенности биосинтеза стеринов в растениях аналогичны таковым в биосинтезе животных.

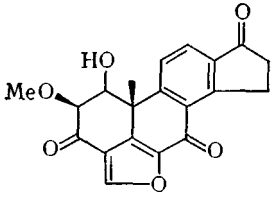
Доказано, что ряд грибных метаболитов имеет стероидное происхождение, например фузидиевая кислота (65) и виридин (66). Первая, по существу, является высокоокисленным стерином; в случае виридина процесс окислительной деградации стеринов заходит значительно дальше. Углеродный скелет фузидиевой кислоты соответствует углеродному скелету протоланостеринового карбениевого иона (42), стабилизированного путем выброса протона от С-17.



(64)



(65)



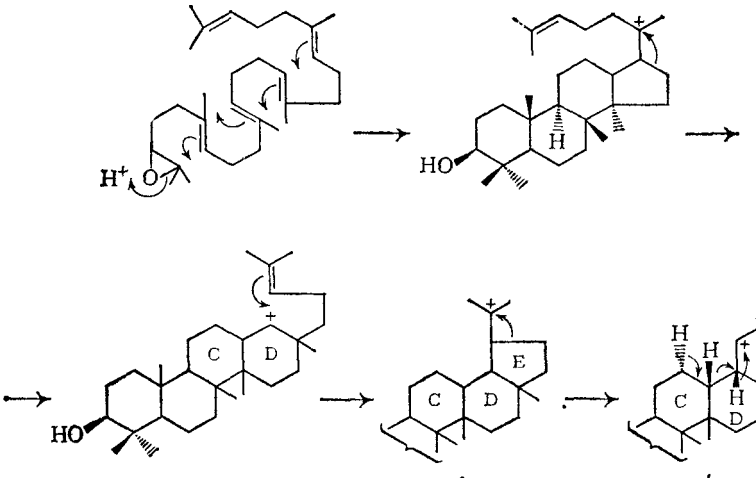
(66)

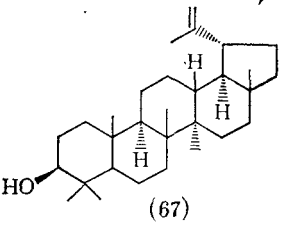
29.2.9. БИОСИНТЕЗ ПЕНТАЦИКЛИЧЕСКИХ ТРИТЕРПЕНОВ [2]

Пентациклические тритерпены могут быть разделены на классы с учетом различных типов циклизации эпоксисквалена, после которой возможны различные перегруппировки, обусловленные возникновением карбениевого центра в кольце *E* [2]. В качестве примера приведено образование лупеола (67) и β-амирина (68) (схема 19).

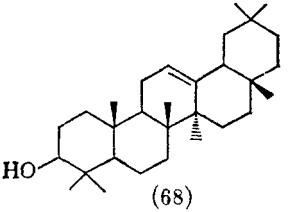
[2-^{14}C]Мевалонат и эпоксисквален включаются в β-амирин (68) и родственные тритерпены в проростках гороха. Деградацией соясапогенола (69) из сои, биосинтезируемого с участием [2-^{14}C]мевалоната, показано, что геминальные метильные группы при С-4 сохраняют свою стереохимию в процессе биосинтеза [59]. Радиоактивная метка из положения С-2 в мевалонате попадает в экваториальную метильную группу при С-4. Культуры тканей *Isodon japonicus* были использованы для исследования биосинтеза скелета олеанена-12 и урсена-12 из [4-^{13}C]мевалоната [60]. Полученные результаты подтвердили предположение, что в ходе биосинтеза протекают перегруппировки, показанные на схеме (19). Шесть тритиевых меток включаются в β-амирин из [4(*R*)-4-^{3}H,2-^{14}C]мевалоновой кислоты, и их положение, особенно в кольце Е, определяется последовательностью 1,2-водородных сдвигов в соответствии с этой схемой.

У некоторых пентациклических тритерпенов, например фернена **(70)**, отсутствует кислородная функция при С-3. Эти соединения образуются при циклизации самого сквалена. Так же синтезируется тетрагиманол (71) простейшими *Tetrahymena pyriformis*. 2(3),22(23)-Диэпоксисквален (72) является предшественником α-оноцерина (73), в котором циклизация происходит с обоих концов молекулы.

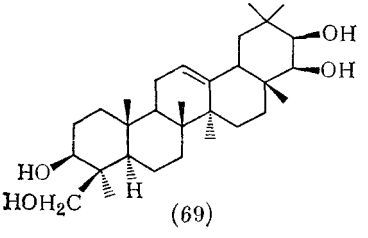




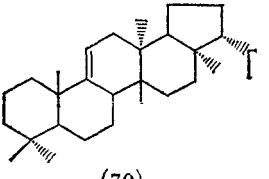
(67)



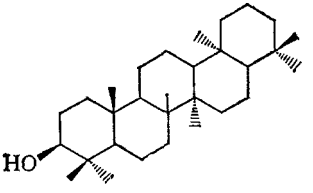
(68)



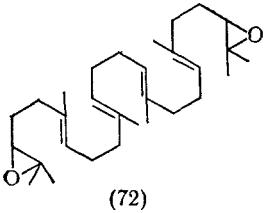
(69)



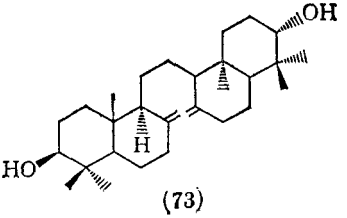
(70)



(71)



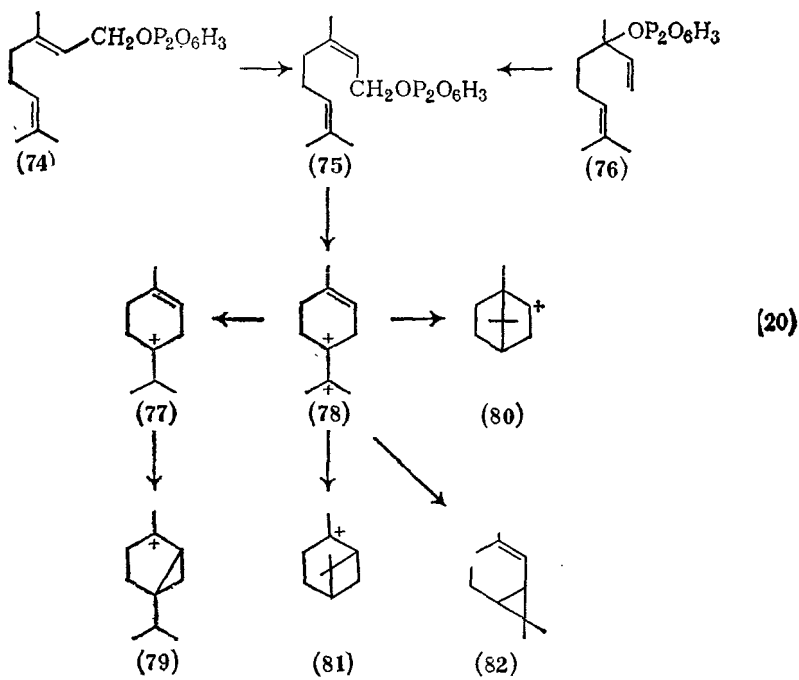
(72)



(73)

29.2.10. БИОСИНТЕЗ МОНОТЕРПЕНОИДОВ [61]

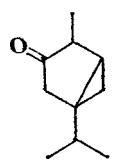
Монотерпеноиды встречаются преимущественно у растений. Сезонные изменения в интенсивности биосинтеза того или иного монотерпеноида, пространственная разобщенность отдельных этапов биосинтеза («компартиментализация») и наличие не только межвидовых, но и внутривидовых хемотаксономических различий делают задачу изучения биосинтеза монотерпеноидов особенно трудной. Универсальная биогенетическая схема, предложенная Ружичкой, основывается на циклизации нерилпирофосфата (**75**) или линалилпирофосфата (**76**) [2, 3]. Геранилпирофосфат (**74**) с *транс*-двойной связью не может циклизоваться непосредственно с образованием шестичленного кольца. В зависимости от места локализации заряда в карбениевом ионе (**78**) могут образовываться α-терпинеол или лимонен. Ион (**78**) может служить субстратом для дальнейшей циклизации с образованием борнанового (**80**), пинанового (**81**) или каранового (**82**) скелетов и затем перегруппировываться, например, в фенханы. Если в α-терпенильном карбениевом ионе (**78**) происходит гидридный сдвиг с образованием иона (**77**), соответствующего терпинен-4-олу, то дальнейшая циклизация может привести к туйановому скелету (**79**) (схема 20).



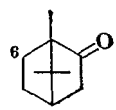
(20)

За редкими исключениями (например, при биосинтезе монотерпенов в лепестках розы), меченый мевалонат включается в мо-

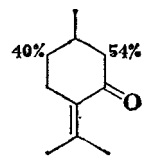
нотерпеноиды растений в очень незначительной степени. Кроме того, включение мевалоната в два пятиуглеродных фрагмента C_{10}-скелета часто не равноценно. Так, туйон (83), биосинтезируемый из [2-^{14}C]мевалоната, может содержать до 99 % метки в карбонильной группе в той части молекулы, которая образуется непосредственно из изопентенилпирофосфата, и очень низкий уровень метки в той части, которая образуется из диметилаллилпирофосфата [62]. В случае камфоры (84) большая часть радиоактивной метки из [2-^{14}C]мевалоновой кислоты находится в положении 6, в то время как у пулегона (85) метка распределяется между двумя положениями. Как и в случае туйона, содержание метки в той части соединений, которые образовались из диметилаллилпирофосфата, весьма невелико.



(83)



(84)

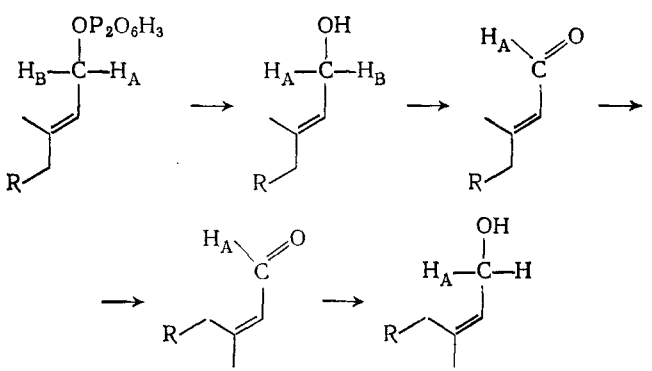


(85)

Неадекватность вхождения метки объясняется неодинаковой степенью доступности метаболических фондов изомерных C_5-пирофосфатов. Деградацией гераниола, синтезированного *Pelargonium glaveolens* из $^{14}CO_2$, показано, что большее количество метки переходит в ту часть молекулы, которая образуется непосредственно из изопентенилпирофосфата. Сначала метка приблизительно одинаково распределяется между обеими частями молекулы, но после экспозиции в течение 12 ч содержание метки в части молекулы, образованной из изопентенилпирофосфата, повышается до 78 %, затем уменьшается, и вновь достигается равновесное распределение. Это позволяет предположить, что выделяемый в начале опыта геранилпирофосфат образуется в результате «утечки» C_5-пирофосфатов из мест биосинтеза высших терпеноидов, тогда как на образовании последующего вещества сказалось как наличие диметилаллилпирофосфатного (ДМАПФ) фонда, так и компартментализация биосинтеза изопреноидов. Было высказано предположение, что имеются два фонда ДМАПФ, один из которых соответствует свободному ДМАПФ и невелик, а другой, гораздо более богатый — ферментативно связанному ДМАПФ [63]. Если биосинтез терпенов протекает быстро и степень оборачиваемости субстрата высока или велико время метаболизма, то между обоими фондами и радиоактивным маркером устанавливается равновесие. В результате образуются симметрично меченные продукты. При коротком же периоде метаболизма или при более низких скоростях синтеза терпенов не происходит существенного изменения ферментативно связанного фонда, который ответственен за синтез терпенов, и поэтому образуются несимметрично меченные соединения. Уже

сообщалось о низком включении таких аминокислот, как лейцин и валин, в гераниол, цитронелол, линалоол. Частичной деградацией установлено, что существенная часть метки присутствует в той части терпеноидов, которая образуется из ДМАПФ. Однако не установлено, какая доля аминокислот вошла в фонд ДМАПФ с сохранением углеродного скелета.

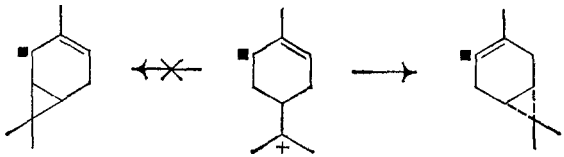
Как было показано, геранилпирофосфат является предшественником ряда циклических монотерпеноидов, например цинеола и иридоидов [64]. Для образования циклогексановых монотерпеноидов и их бициклических аналогов *транс*-конфигурация двойной связи геранилпирофосфата должна смениться на *цис*-конфигурацию, как в нероле. Эта изомеризация и соотношение между гераниолом и неролом, как и аналогичная *цис,транс*-изомеризация их сесквитерненовых аналогов, весьма интересны для понимания путей биосинтеза. Доказано существование двух пренилтрансфераз, одна из которых приводит к гераниолу, а другая — к неролу. Тем не менее превращение гераниола в нерол твердо установлено [65]. При этом сохраняется водородный атом при двойной связи, а теряется водородный атом при С-1. Превращение геранилпирофосфата в свободный спирт в *Menyanthes trifoliata* происходит с обращением конфигурации и, вероятно, с расщеплением аллильной С—О-связи. Свободный гераниол превращается в нерол в результате окислительно-восстановительного процесса со стереоспецифической потерей H_B-атома (схема 21). Восстановление приводит к первоначальной стереохимии при атоме С-1.



(21)

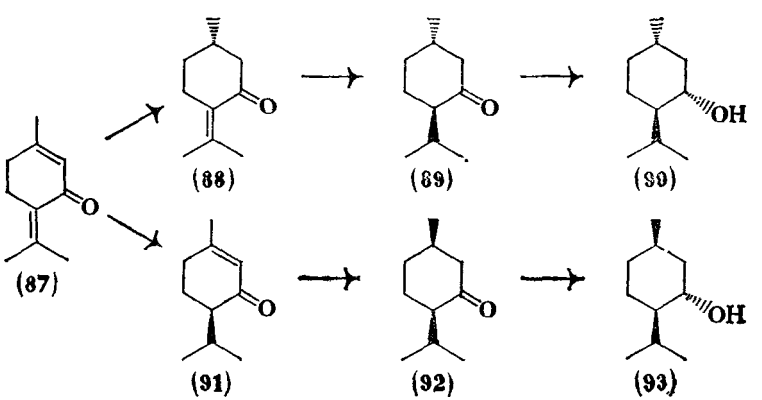
Нерилпирофосфат является предшественником лимонена и α-пинена, а из одного из видов мяты (*Mentha*) получена бесклеточная система, с помощью которой осуществляется циклизация нерилпирофосфата в α-терпинеол. При изучении биосинтеза (+)-карена-3 (86) в одном из видов сосны (*Pinus*) установлено, что атом С-4 монотерпена образуется из атома С-2 мевалоната, а 2-*pro*-(*S*)-водородный атом мевалоната теряется при образований двойной связи [66]. Этот факт привел к пересмотру первоначаль-

ного предположения Ружички об образовании монотерпена (см. схему 22).

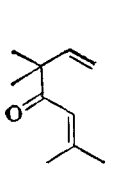


(86) (86) (22)

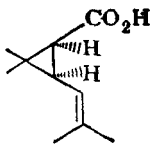
При исследовании биосинтеза монотерпенов у разных видов *Mentha* установлена взаимосвязь пиперитенона (87) с пулегоном (88), ментоном (89) и ментолом (90), с одной стороны, и с пиперитоном (91), изоментоном (92) и изоментолом (93), с другой (схема 23). Ряд монотерпеноидов, таких как артемизиа-кетон (94), хризантемовая кислота (95) и лавандулол (96), обладает «аномальным» изопреноидным скелетом; для объяснения их биосинтеза предложен ряд чисто умозрительных схем [67—69]. Современные биогенетические представления подтверждают, что эти соединения образуются путями, в которые не вовлекаются обычные C_{10}-интермедиаты терпеноидного биосинтеза. [2-^{14}C]мевалоновая кислота и изопентенилпирофосфат включаются в артемизиа-кетон (94) таким образом, что меченый атом предпочтительно оказывается в пятиуглеродном фрагменте, не содержащем карбонильной группы. Очевидно, геранилпирофосфат не является в этом случае интермедиатом. Показано также, что [2-^{14}C]мевалоновая кислота способна включаться в хризантемовую кислоту (95). Опытами с введением метки через определенные промежутки времени в *Chrysanthemum cinerariaefolium* установлено, что хризантемиловый спирт является промежуточным продуктом в биосинтезе хризантемовой кислоты, в то время как лавандулол и артемизиловый спирт, превращения которых могли бы приводить к образованию циклопропанового кольца, не участвуют в ее биосинтезе.



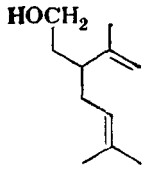
(87) (88) (89) (90) (91) (92) (93) (23)



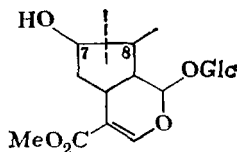
(94)



(95)



(96)

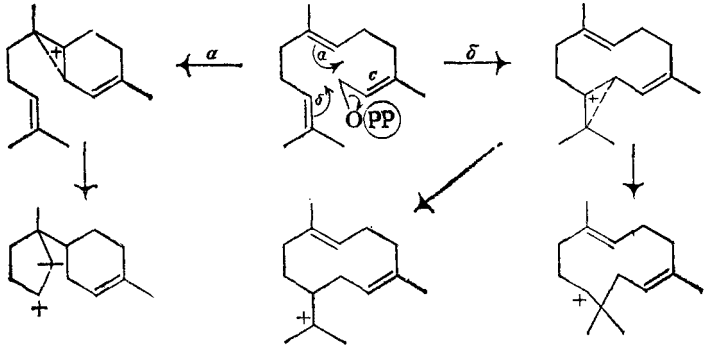


(97)

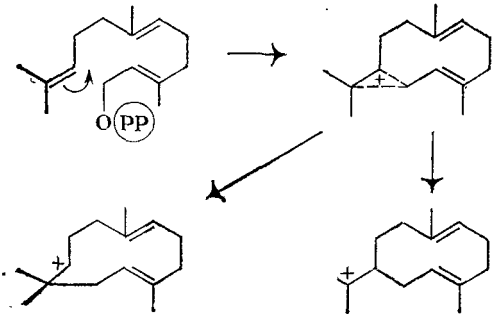
Циклопентановые монотерпеноиды, в основе которых лежит скелет логанина (**97**) и его 7,8-секопроизводных, образуют интересную группу монотерпеноидов, соотношение которых с индольными алкалоидами в процессе биосинтеза интенсивно изучается (см. разд. 30.1).

29.2.11. БИОСИНТЕЗ СЕСКВИТЕРПЕНОИДОВ [70, 71]

Хотя структурное разнообразие сесквитерпеноидов очень велико, их можно сгруппировать исходя из типа скелета, образующегося при первичной циклизации фарнезилпирофосфата. Важнейшие реакции циклизации протекают как атака пирофосфата на центральную или периферическую двойную связь. Для того, чтобы атаковалась центральная двойная связь, двойная связь при С-2 должна иметь *цис*-конфигурацию. Такая геометрия связи необходима также для последующей вторичной циклизации, которая приводит к полициклическим сесквитерпеноидам, содержащим пяти-, шести- или семичленные кольца (схемы 24, 24а).

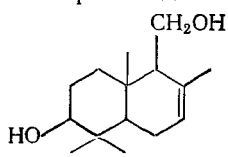


(24)

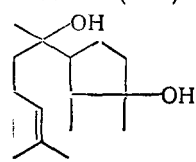


(24а)

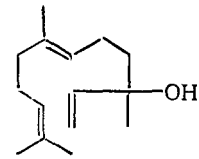
Образование некоторых соединений, например дрименола (98), включает циклизацию, типичную для тритерпеноидов. Некоторые другие соединения, например циклонеродиол (99), могут быть отнесены к производным неролидола (100).



(98)

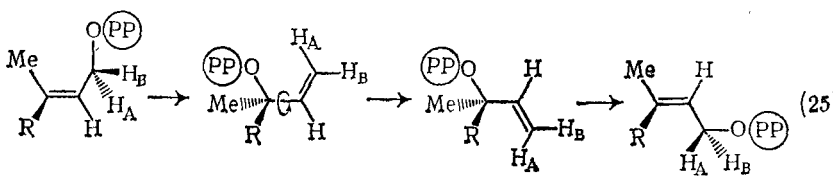


(99)



(100)

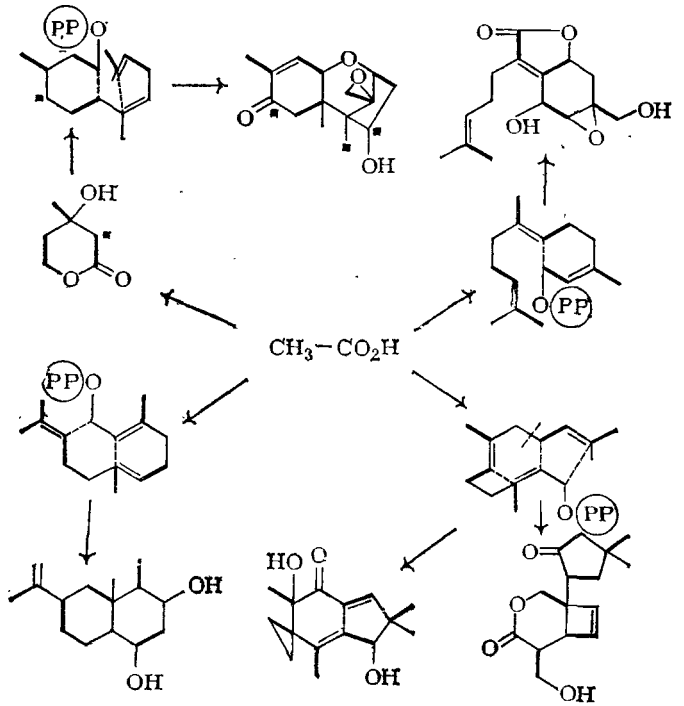
Изомеризация полностью *транс*-фарнезилпирофосфата и соответствующего ему спирта в 2-*цис*-изомер может происходить несколькими путями. Один из путей, который был найден у низших грибов *Gelminthosporium sativum*, включает окислительно-восстановительное взаимодействие с соответствующим альдегидом [72]. При таком окислении теряется 1-*pro*-(*R*)-водородный атом. Второй путь, исследованный в культурах тканей *Andrographis paniculata*, включает стереоспецифическую потерю 1-*pro*-(*S*)-водородного атома в процессе превращения 2-*транс*-фарнезилпирофосфата в его 2-*цис*-изомер [73]. Обратная изомеризация 2-*цис*-изомера в 2-*транс*-изомер связана с потерей 1-*pro*-(*R*)-водородного атома. Изомеризация полностью *транс*-фарнезилпирофосфата в культуре *Trichothecium roseum* и образование триходиена также включают потерю 1-*pro*-(*S*)-водородного атома, который в конечном счете замещается в образующемся триходиене на 4-*pro*-(*S*)-водородный атом NADPH [74]. В другом изученном примере, а именно при биосинтезе лонгифолена, оба водородных атома сохраняются, но с обращением конфигурации при С-1 [65]. Это объясняется супраповерхностной анионотропной перегруппировкой *транс*-пирофосфата (101) в неролидилпирофосфат (102), который затем принимает более выгодную конформацию (102 → 103); обратная анионотропная перегруппировка (103) приводит к *цис*-изомеру (104).



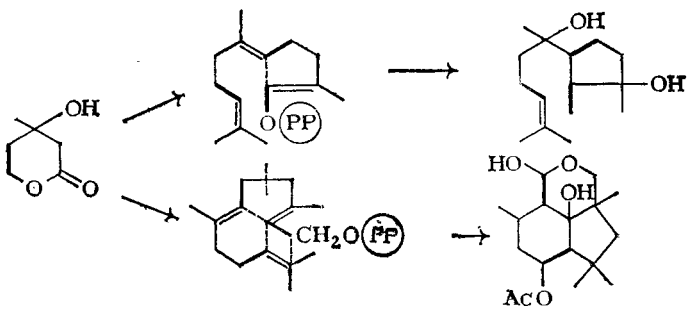
(101) (102) (103) (104) (25)

Недавно метод ЯМР ^{13}C стал широко использоваться для определения реакционной конформации фарнезилпирофосфата при образовании циклических сесквитерпеноидов. Этим методом можно определить как степень обогащения меткой ^{13}C, так и константы спин-спинового взаимодействия [20, 73, 75, 76]. Соответствующие данные, полученные для некоторых сесквитерпеноидов, биосинтез

которых осуществлялся из меченых ацетата и мевалоната, приведены на схемах (26 и 26а; жирными линиями показаны интактные ацетатные звенья). В некоторых случаях подобные исследования проводились с применением ^{14}C.



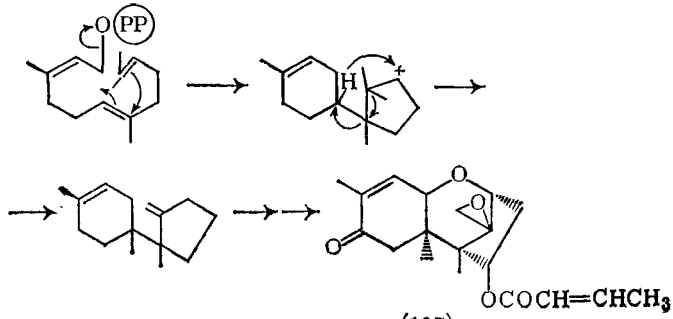
(26)



(26а)

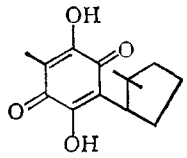
Эти циклизации сопровождаются рядом гидридных сдвигов и другими перегруппировками. В случае трихотецина (105) и геликобазидина (106) наблюдается гидридный сдвиг от центрального изопренового звена к концевому фрагменту, соответствующему

звену-стартеру (схема 27). У трихотеценов этот сдвиг инициирует миграцию метильной группы [77].



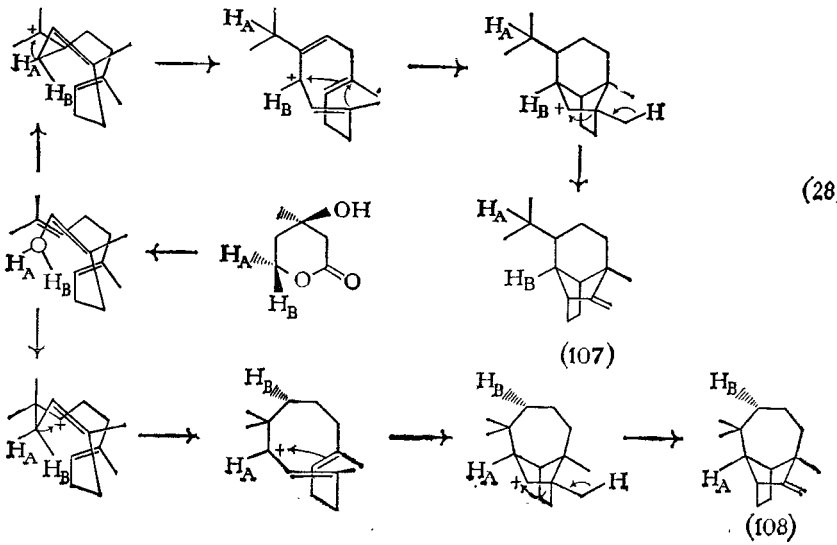
(27)

(105)



(106)

Ряд полициклических сесквитерпеноидов образуется в результате первоначальной атаки атома С-1 пирофосфата на периферийную двойную связь и последующей циклизации. В этих случаях наблюдается ряд 1,3-водородных сдвигов. Они способствуют переносу катионного центра от атомов С-10 или С-11, т. е. от «дальнего» конца фарнезилпирофосфата, к С-1; таким путем инициируются дальнейшая изомеризация и вторичная циклизация 10- или 11-членных циклов. На схеме (28) представлены пути образования



(28)

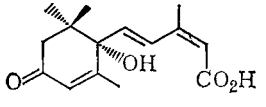
(107)

(108)

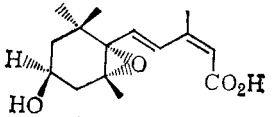
трициклических углеводородов (—)-сативена (**107**) и *энт*-лонгифолена (**108**) через 10- и 11-членные циклические интермедиаты, соответственно [65]. В случае (—)-сативена мигрирует 5-*pro*-(*R*)-водородный атом (H_A) мевалоната, а в случае *энт*-лонгифолена — 5-*pro*-(*S*)-водородный атом. Подобные перегруппировки отмечались и у других сесквитерпеноидов, включая кулморин, авоцеттин и дендробин.

Для нескольких групп сесквитерпеноидов, например для трихотеценов, иллюдинов, кориолинов, а также для кулморина, авоцеттина и сативена установлено положение водородных меток, вводимых с помощью меченых мевалонатов. Показано, что такие трансформации, как гидроксилирование, протекают с соблюдением обычных стереохимических закономерностей. Определен также ряд биосинтетических путей, приводящих, например, к трихотецину через триходиен и триходермин.

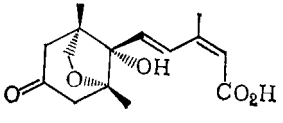
Абсцизовая кислота (**109**) является широко распространенным регулятором роста растений; важное биологическое значение этой кислоты обусловило интенсивное исследование путей ее биосинтеза [78]. Для этого была использована бесклеточная система из плодов авокадо. Хотя абсцизовую кислоту можно рассматривать как продукт деградации каротиноидов, однако при введении [^{14}C]фитоина в эту бесклеточную систему радиоактивная метка включается только в каротиноиды, но не в абсцизовую кислоту. В то же время абсцизовая кислота приобретает три метки из [2-^{14}C]мевалоната. Концевая *цис*-двойная связь метится изотопами водорода из 4-*pro*-(*R*)-мевалоната и, следовательно, образуется на какой-то стадии из *транс*-двойной связи. Опыты с мевалонатом, стереоспецифически меченным при С-2 и С-5, показали, что при образовании двойной связи наблюдается только *транс*-элиминирование от атомов С-4 и С-5 предшественника абсцизовой кислоты с потерей 2-*pro*-(*S*)- и 5-*pro*-(*R*)-водородных атомов мевалоната. Гидроксиэпоксид (+)-2-*цис*-ксантоксиновая кислота (**110**) является предшественником γ-гидрокси-α,β-ненасыщенного кетона — абсцизовой кислоты. 2-*pro*-(*S*)-Водородный атом мевалоната при образовании двойной связи теряется от С-3′-атома, а 4-*pro*-(*R*)-водородный атом мевалоната — от С-1′-атома при введении кислородной функции. Метильные группы метятся, как показано в фор-



(109)



(110)



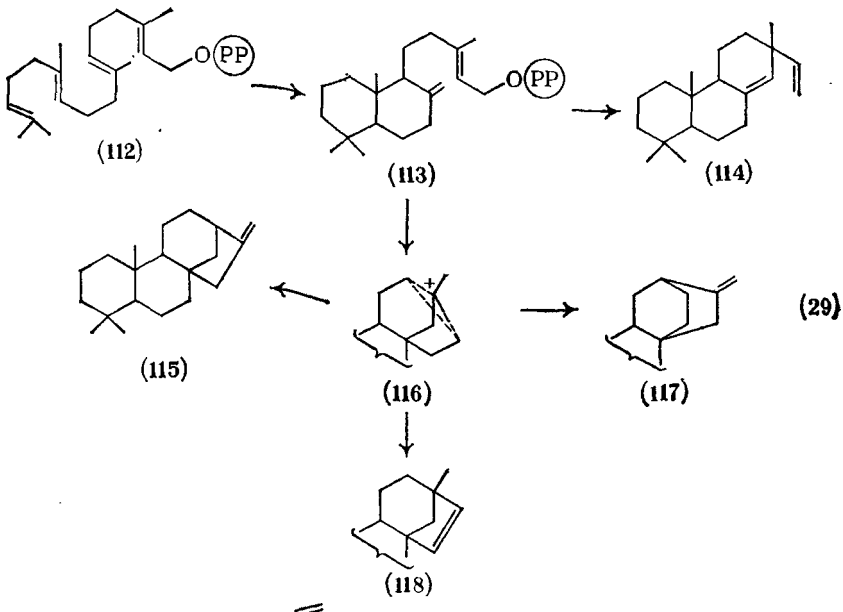
(111)

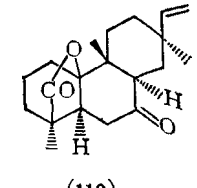
муле (109). Метаболизм абсцизовой кислоты, включая ее превращение в фазеевую кислоту (111), изучался с использованием фасоли *Phaseolus vulgaris*.

29.2.12. БИОСИНТЕЗ ДИТЕРПЕНОИДОВ [79]

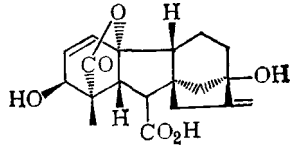
Дитерпеноиды образуются из геранилгеранилпирофосфата, и в зависимости от способа циклизации подразделяются на два основных типа. С одной стороны, имеются соединения, образующиеся в результате инициируемой протоном реакции по двойной связи дальнего (т. е. стартового) изопренового фрагмента и структурно напоминающие высшие терпеноиды. Однако в отличие от биосинтеза большинства тритерпеноидов в случае дитерпеноидов циклизации подвергаются олефины, а не эпоксиды. С другой стороны, известно немалое число таких дитерпеноидов, биосинтез которых, вероятно, инициируется атакой карбениевого иона, генерируемого из терминального пирофосфата, на дальнюю от него двойную связь. Возникающие при этом макроциклические соединения могут подвергаться дальнейшей циклизации. Первый тип циклизации включает ряд дискретных стадий. Первоначально геранилгеранилпирофосфат (112) циклизуется с образованием бициклического пирофосфата — лабдадиенола (113). Здесь сразу же проявляется одна из первых характерных особенностей биосинтеза дитерпеноидов: стереохимия сочленения циклов может быть либо такой, как в стероидах («нормальной»), либо энантиомерна ей. Неизменность абсолютной конфигурации в местах сочленения циклов, которая характерна для тритерпеноидов и стероидов, для дитерпеноидов не наблюдается. Последующая модификация и циклизация пирофосфата (113) могут приводить к три- и тетрациклическим дитерпеноидам, например, (114) и (115). Предполагают [80], что тетрациклические дитерпеноиды могут возникать при циклизации определенным образом ориентированных пимарадиенов (114) через неклассический карбениевый ион (116), который может затем распадаться по различным направлениям, приводящим к соединениям с филокладен-кауреновым (115), атизиновым (117) и бейереновым (стахеновым) (118) скелетами (схема 29).

Ряд дитерпеноидов продуцируется грибами, что облегчает изучение их биосинтеза. Меченые образцы [^{14}C]ацетата и [2-^{14}C]мевалоната использовали при изучении биосинтеза таких дитерпеноидов, как розенонолактон (119), гибберелловая кислота (120) и плевромутилин (121). Для изучения биосинтеза этих соединений, а также виресценозидов (122) был использован метод спектроскопии ЯМР ^{13}C. Этим методом установлено, каким образом происходит включение геранилгеранилпирофосфата в дитерпеноиды.

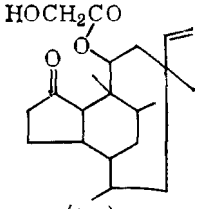




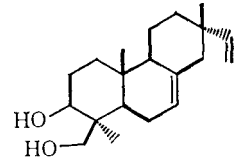
(119)



(120)



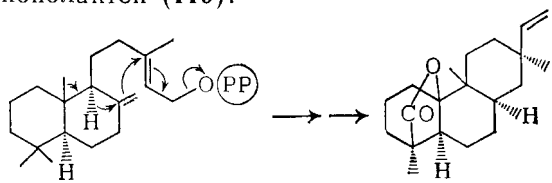
(121)



(122)

Некоторые детали биосинтеза трициклического грибного метаболита (**124**) розенонолактона, продуцируемого *Trichothecium roseum*, подробно изучены. На основании биогенетических предпосылок предположили [81], что перегруппировка скелета может происходить во время циклизации бициклического лабдадиенилпирофосфата (**123**) (схема 30). Это соединение является специфическим предшественником дитерпеноидов ряда розана. Использование многократно меченных мевалонатов дает информацию о стадиях циклизации [82]. Если предполагаемый гидридный сдвиг действительно имеет место, то водородный атом при С-9

должен оказаться при С-8. Этот водородный атом, как и следовало ожидать, берется из С-4-положения мевалоната; действительно, 4-*pro*-(*S*)-водородный атом мевалоната локализован у атома С-8. Кроме того, оба атома водорода при С-1, атом водорода при С-5 и оба атома водорода при С-6 метятся соответствующими мевалонатами. Эти результаты подтверждают постулированный гидридный сдвиг и исключают участие $\Delta^{1(10)}$-, $\Delta^{5(10)}$- и $\Delta^{5,6}$-интермедиатов в биосинтезе. Следовательно, С-10-карбениевый ион может быть стабилизирован взаимодействием с нуклеофилом до лактонизации. В этом биосинтезе происходит последовательное превращение дезоксирозенонолактона (**124**) в 7β-гидроксирозенонолактон и розенонолактон (**119**).



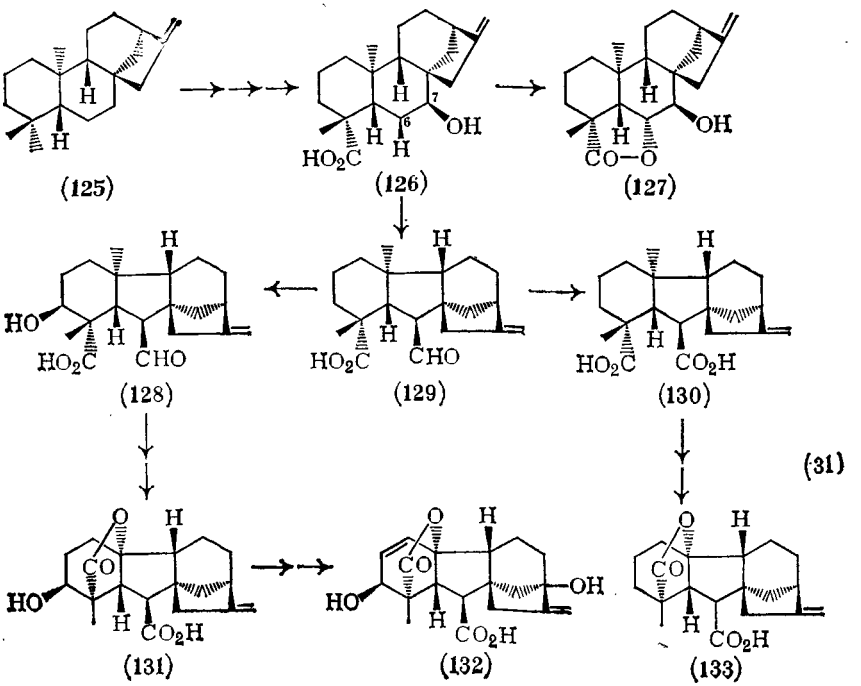
(123) (124) (30)

Плевромутилин (**121**) представляет собой другой пример трициклического дитерпеноида, в котором произошла скелетная перегруппировка [83]. Во время биосинтеза 4-*pro*-(*R*)-водородный атом мевалоната мигрирует от С-9 к С-8. Так как этот водородный атом находится в *цис*-положении по отношению к мигрирующей метильной группе, то было предположено образование интермедиата, связанного с ферментом через атом С-9 (с последующей миграцией водорода и сужением цикла кольца А). Неожиданной особенностью этого биосинтеза является нейтрализация карбениевого иона, возникающего в результате циклизации, за счет гидридного сдвига 5-*pro*-(*S*)-водородного атома мевалоната от С-11 к С-4.

Большое число работ посвящено биосинтезу гиббериллинов, являющихся гормонами роста растений [84—85]. Первое экспериментальное доказательство дитерпеноидной природы гибберелловой кислоты (**120**) получено в результате изучения включения [1-^{14}C]уксусной и [2-^{14}C]мевалоновой кислот [81]. Метильная группа кольца А и углеродный атом карбоксильной группы возникают из атома С-2 мевалоната. Тщательное изучение метаболитов гибберелловой кислоты позволило установить присутствие ряда кауреноидных дитерпеноидов, включая *энт*-каурен (**125**). Этот углеводород является специфическим предшественником гибберелловой кислоты [86]. Биосинтез гиббереллинов можно разделить на ряд этапов: 1) циклизация геранилгеранилпирофосфата, приводящая к *энт*-каурену; 2) гидроксилирование кольца В *энт*-каурена; 3) сужение кольца В; 4) регулирование соотношения между различными типами гиббереллинов, включая превращения C_{20}-гиббереллинов в C_{19}-соединения.

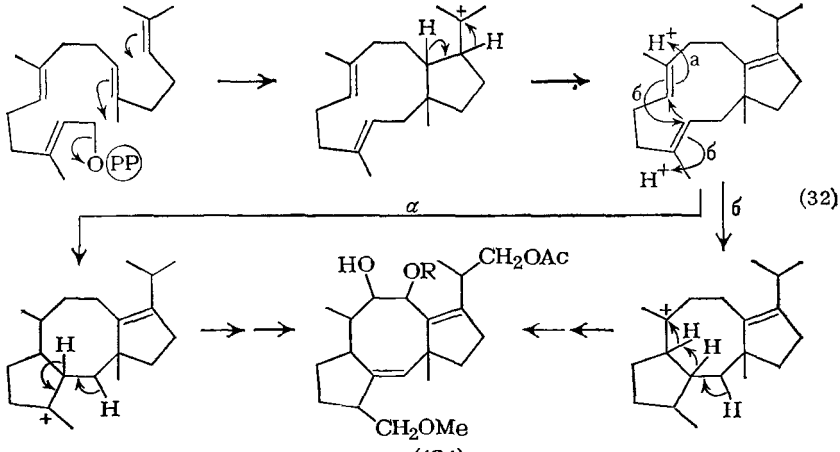
Из растений и низших грибов были получены растворимые

ферментные системы, способные превращать геранилгеранилпирофосфат и *энт*-лабдадиенилпирофосфат (копалилпирофосфат) в *энт*-каурен. Изучение распределения ^3H из меченого мевалоната в *энт*-каурене (**125**) показало, что свободный трициклический пимарадиен не участвует в этой циклизации [87]. *энт*-Каурен является углеводородным предшественником гиббереллинов, кауреолидов, например (**127**), и стевиола. Во всех трех случаях следующий этап биосинтеза включает ступенчатое окисление метильной группы при С-19 через спирт и альдегид до карбоновой кислоты. *энт*-7β-Гидроксикауреновая кислота (**126**) служит субстратом для стадии сужения кольца. Это сужение осуществляется путем удаления экваториального 6β-водородного атома [88]. Соответствующий 6β,7β-диол не является промежуточным продуктом биосинтеза. Гиббановый альдегид (**129**) является точкой разветвления на пути биосинтеза гиббереллинов [89]. Окисление альдегида до дикарбоновой кислоты, гиббереллина A_{12} (**130**), дает начало ряду гиббереллинов (например, A_{15} — A_9) (**133**), не имеющих гидроксильной группы в кольце А. Наоборот, первоначальное гидроксилирование кольца А приводит через альдегид гиббереллина A_{14} (**128**) к ряду гиббереллинов, гидроксилированных в кольце А. Заключительная стадия биосинтеза гиббереллинов состоит в потере С-20-углеродного атома, вероятно, при декарбоксилировании соответствующей кислоты, и в превращении гиббереллина A_4 (**131**)



через Δ^1-олефин, гиббереллин A_7, в гибберелловую кислоту (132). При изучении биосинтеза с использованием стереоспецифически меченных тритием мевалонатов показано, что гидроксилирование кольца А происходит с сохранением конфигурации при С-3 и что образование двойной связи в кольце А происходит в результате *цис*-элиминирования атома водорода с α-стороны молекулы. Изучен метаболизм ряда гиббереллинов, например A_1 и A_2, в высших растениях.

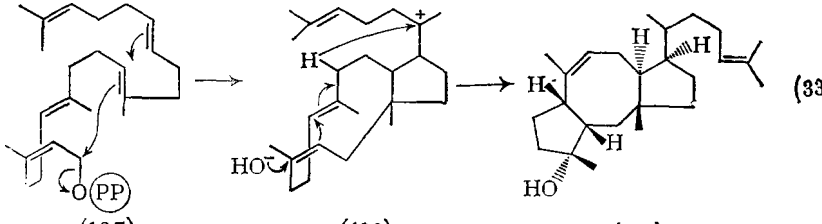
Фузикокцины, например (134), являются метаболитами гриба *Fusiccocum amygdali*. Имея углеродный скелет, подобный сестертерпеноидам, фузикокцины все же являются дитерпеноидами [90]. Меченые фузикокцины, полученные биосинтезом из [1-^{13}C]- и [2-^{13}C]ацетатов и [3-^{13}C]- и [4(*R*)-4-^{3}H]мевалоновых кислот, соответствуют фузикокцинам, полученным из геранилгеранилпирофосфата (схема 32).



(134)

29.2.13. БИОСИНТЕЗ СЕСТЕРТЕРПЕНОИДОВ [91]

Сестертерпеноиды представляют собой относительно небольшой класс C_{25}-терпеноидов. Изучен биосинтез офиоболинов, которые являются фитотоксичными метаболитами некоторых видов *Helminthosporium* и *Cochliobolus*. Геранилфарнезилпирофосфат (135) является предшественником офиоболина F (137). Во время



(135) (136) (137)

биосинтеза 2-*pro*-(*R*)-водородный атом мевалоната мигрирует в результате стереоспецифического 1,5-водородного сдвига [(136)] от С-8 к С-15. Механизм образования сестертерпеноидов с офиобулиновым скелетом представлен на схеме (33).

ЛИТЕРАТУРА

1. *L. Ruzicka and J. Meyer*, Helv. Chim. Acta, 1921, **4**, 505.
2. *L. Ruzicka*, Proc. Chem. Soc., 1959, 341.
3. *L. Ruzicka, A. Eschenmoser, and H. Heusser*, Experientia, 1953, **9**, 357.
4. *R. Sonderhoff and H. Thomas*, Annalen, 1937, **530**, 195.
5. *K. Bloch*, The Harvey Lectures, 1952/3, series 48, p. 68.
6. *J. W. Cornforth, G. D. Hunter, and G. Popjak*, Biochem. J., 1952, **54**, 597.
7. *F. Lynen, L. Wessely, O. Wieland, L. Rueff, and E. Reichert*, Angew. Chem., 1952, **64**, 687.
8. *H. Rudney and J. Fergurson*, J. Amer. Chem. Soc., 1957, **79**, 5580; J. Biol. Chem., 1957, 227, 363; *G. Popjak*, Ann. Rev. Biochem., 1958, **27**, 533.
9. *D. E. Wolf, C H. Hoffman, P. E. Aldrich, H. R. Skeggs, L. D. Wright, and K. Folkers*, J. Amer Chem. Soc., 1956, **78**, 4499; 1957, **79**, 1486.
10. *P. A. Tavormina, M. H. Gibbs, and J. W. Huff*, J. Amer. Chem. Soc., 1956, **78**, 4498.
11. CIBA Foundation Symposium on the 'Biosynthesis of Terpenes and Sterols', ed. G. Wolstenholme and M. O'Connor, Churchill, London, 1959.
12. *H. J. Channon*, Biochem. J., 1926, **20**, 400
13. *R. Robinson*, Chem. and Ind. (London), 1934, **53**, 1062.
14. *R. B. Woodward and K. Bloch*, J. Amer. Chem. Soc., 1953, **75**, 2023.
15. *J. W. Cornforth and R. H. Cornforth*, in 'Biochem. Soc. Symposium 29', Academic Press, London, 1970, p. 5.
16. *J. S. Lawson, W. T. Colwell, J. I. DeGraw, R. H. Peters, R. L. Dehn, and M. Tanabe*, Synthesis, 1975, 729.
17. *J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, C. Donninger, and G. Popjak*, Proc. Roy. Soc. (B), 1965, 163, 492; *C. Donninger and G. Popjak*, ibid., 163, 465.
18. *K. H. Clifford and G. T. Phillips*, European J. Biochem., 1976, **61**, 271.
19. *J. W. Cornforth and R. T.* Gray, Tetrahedron, 1975, **31**, 1509.
20. *T. J. Simpson*, Chem. Soc. Rev., 1975, 4, 497.
21. *F. Lynen and U. Henning*, Angew Chem., 1960, 72, 820.
22. *R. B. Clayton*, Quart. Rev. Chem. Soc., 1965, **19**, 168.
23. *T. W. Goodwin*, Essays Biochem., 1973, **9**, 103.
24. *J. Retey, E. von Stetten, U. Coy, and F. Lynen*, European J. Biochem., 1970, **15**, 72.
25. *J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, G. Popjak, and I. Y. Gore*, Biochem. J., 1958, **69**, 146.
26. *H. J. Knauss, J. W. Porter, and G. Wasson*, J. Biol. Chem., 1959, **234**, 2835.
27. *M. Eberle and D. Arigoni*, Helv. Chim. Acta, 1960, **43**, 1508; *R. H. Cornforth, J. W. Cornforth, and G. Popjak*, Tetrahedron, 1962, **18**, 1351.
28. *R. C. Jennings, K. J. Judy and D. A. Schooley*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, **21**.
29. *G. Popjak and J W. Cornforth*, Biochem. J., 1966, **101**, 553.
30. *K. H. Clifford, J. W. Cornforth, R Mallaby, and G. T. Phillips*, J. C. S. Chem. Comm., 1971, 1599; *J. W. Cornforth*, Chem. Brit., 1970, **6**, 431.
31. *J. W. Cornforth*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1968, 7, 903.
32. *G. Popjak*, in 'Biochem. Soc. Symposium 29', Academic Press, London, 1970, p. 17.
33. *H. C. Rilling*, J. Biol. Chem., 1966, **241**, 3233; *W. W. Epstein and H. C. Rilling*, ibid., 1970, 245, 4597; *H. C. Rilling, L. Kuehl, F. Muscio, and J. P. Carlson*, ibid., 1974, 249, 2746.
34. *L. J. Goad*, in 'Biochem. Soc. Symposium 29', Academic Press, London, 1970, p. 45.

35. *L. J. Mulheirn and P. J. Ramm*, Chem. Soc. Rev., 1972, **1**, 259.
36. *G. Popjak, J. Edmond, F. A. L. Anet, and N. R. Easton*, J. Amer. Chem. Soc. 1977, **99**, 931.
37. *T. T. Tchen and K. Bloch*, J. Amer. Chem. Soc., 1956, **78**, 1516.
38. *E. J. Corey, W. E. Russey, and P. R. Ortiz de Montellano*, J. Amer. Chem. Soc., 1966, **88**, 4750; *E. E. van Tamelen, J. D. Willet, R. B. Clayton and K. E. Lord*, ibid., 1966, **88**, 4752.
39. *J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, C. Donninger, G. Popjak, Y. Shimizu, S. Ichii, E. Forchielli, and E. Caspi*, J. Amer. Chem. Soc., 1965, **87**, 3224.
40. *D. H. R. Barton, G. Mellows, D. A. Widdowson, and J. J. Wright*, J. Chem. Soc. (C), 1971, 1142.
41. *J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, A. Pelter, M. G. Horning, and G. Popjak*, Terahedron, 1959, **5**, 311.
42. *F. Gautschi and K. Bloch*, J. Biol. Chem., 1958, **233**, 1343.
43. *K. Alexander, M. Akhtar, R B. Boar, J. F. McGhie, and D. H. R. Barton*, J. C. S. Chem. Comm., 1972, 383.
44. *G. F. Gibbons, L. J. Goad, and T. W. Goodwin*, J. C. S. Chem. Comm., 1968, 1212, 1458.
45. *W. L. Miller and J. L. Gaylor*, J Biol. Chem., 1970, **245**, 5369.
46. *M. Akhtar and S. Marsh*, Biochem. J., 1967, **102**, 462; *D. C. Wilton and M. Akhtar*, ibid., 1970, **116**, 337.
47. *D. C. Wilton, K. A. Munday, S. J. M. Skinner, and M. Akhtar*, Biochem. J., 1968, **106**, 803.
48. *R. B. Clayton*, Quart. Rev. Chem. Soc., 1965, **19**, 201.
49. *I. D. Frantz and G. J. Schroepfer*, Ann Rev. Biochem., 1967, **36**, 691; *C. J. Sih and H. W. Whitlock*, ibid., 1968, **37**, 661.
50. *S. Burstein and M. Gut*, Adv. Lipid Res., 1971, **9**, 291.
51. *P. Morand and J. Lyall*, Chem. Rev., 1968, **68**, 85.
52. *T. Nambara, T. Anjyo, and H. Hosoda*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1972, **20**, 853.
53 *D Arigoni, R. Battaglia, M. Akhtar, and T. Smith*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 185.
54. *H. F. de Luca and H. K. Schnoes*, Ann. Rev. Biochem., 1976, **45**, 631; *P. E. Georghiou*, Chem. Soc. Rev., 1977, **6**, 83.
55. *H. H. Rees and T. W Goodwin*, Biochem. Soc. Trans., 1974, **2**, 1027.
56. *L. J. Goad and T. W. Goodwin*, Prog. Phytochem., 1972, **3**, 113.
57. *B. A. Knight*, Chem. Brit., 1973, **9**, 106.
58. *E. Lederer*, Quart. Rev. Chem. Soc., 1969, **23**, 453.
59. *D. Arigoni*, Experientia, 1958, **14**, 153.
60. *S. Seo, Y. Tomita, and K. Tori*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 270.
61. *D. V. Banthorpe, B. V. Charlwood, and M. J. O. Francis*, Chem. Rev., 1972, **72**, 115.
62. *D. V. Banthorpe, J. Mann, and K. W. Turnbull*, J. Chem. Soc. (C), 1970, 2689.
63. *K. G. Allen, D. V. Banthorpe, B. V. Charlwood, O. Ekundayo, and J. Mann*, Phytochemistry, 1976, **15**, 101.
64. *B. Achilladelis and J. R. Hanson*, Phytochemistry, 1968, 7, 1317.
65. *D. Arigoni*, Pure Appl. Chem., 1975, **41**, 219.
66. *D. V. Banthorpe and O. Ekundayo*, Phytochemistry, 1976, **15**, 109.
67. *W. Epstein and C. D. Poulter*, Phytochemistry, 1973, **12**, 737.
68. *G. Pattenden, C. R. Popplestone, and R. Storer*, J. C. S Chem. Comm., 1975, 290.
69. *K. G. Allen, D. V. Banthorpe, B. V. Charlwood, and C. M. Voller*, Phytochemistry, 1977, **16**, 79; *D. V. Banthorpe, S. Doonan, and J. A. Gutowski*, ibid., 1977, **16**, 85.
70. *W. Parker, J. S. Roberts, and R. Ramage*, Quart. Rev. Chem. Soc., 1967, **21**, 331.
71. *G. A. Cordell*, Chem. Rev., 1976, **76**, 425.
72. *K. Imai and S. Marumo*, Tetrahedron Letters, 1974, 4401.
73. *K. H. Overton and D. J. Picken*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 105.
74. *R. Evans and J. R. Hanson*, J. C. S. Perkin I, 1976, 326

75. *J. R. Hanson, T. Marten, and M. Siverns*, J. C. S. Perkin I, 1974, 1033.
76. *M. Tanabe and K. T. Suzuki*, Tetrahedron Letters, 1974, 4417; *D. E. Cane and R. H. Levin*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 1282.
77. *B. A. Achilladelis, P. M. Adams, and J. R. Hanson*, Chem. Comm., 1970, 511; J. C. S. Perkin I, 1972, 1425; *S. Nozoe, M. Morisaki, and H. Matsumoto*, Chem. Comm., 1970, 926; *D. Arigoni, D. E. Cane, B. Muller, and C. Tamm*, Helv. Chim. Acta, 1973, **56**, 2946.
78. *B. V. Milborrow*, Phytochemistry, 1975, **14**, 123, 2403.
79. *J. R. Hanson*, Forsch. Chem. org. Naturstoffe, 1971, **29**, 395.
80. *E. Wenkert*, Chem. Ind. (London), 1955, 282.
81. *A. J. Birch, R. W. Rickards, H. Smith, A. Harris, and W. B. Whalley*, Tetrahedron, 1959, **7**, 241.
82. *B. Achilladelis and J. R. Hanson*, J. Chem. Soc. (C), 1969, 2010.
83. *A. J. Birch, C. W. Holzapfel, and R. W. Rickards*, Tetrahedron, 1966, Suppl. 8, 359; *D. Arigoni*, Pure Appl. Chem. 1968, **17**, 331.
84. *B. E. Cross*, Prog. Phytochem., 1968, **1**, 195.
85. *J. MacMillan*, 'Chemistry and Biochemistry of Plant Hormones', ed. V. C. Runeckles, E. Sondheimer, and D. C. Walton, Academic Press, New York, 1974.
86. *B. E. Cross, R. H. B. Galt, and J. R. Hanson*, J. Chem. Soc., 1964, 295.
87. *R. Evans and J. R. Hanson*, J. C. S. Perkin I, 1972, 2382.
88. *J. E. Graebe, P. Hedden, and J. MacMillan*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 161.
89. *J. R. Bearder, J. MacMillan, and B. O. Phinney*, J. C. S. Perkin I, 1975, 721; *J. R. Hanson and R. Evans*, ibid., 1975, 663.
90. *K. D. Barrow, R. B. Jones, P. W. Pemberton, and L. Phillips*, J. C. S. Perkin I, 1975, 1405; *A. Banerji, R. B. Jones, G. Mellows, L. Phillips, and Keng-Yeow Sim*, ibid., 1976, 2221.
91. *G. A. Cordell*, Phytochemistry, 1974, **13**, 2343.

29.3. БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ И ВИТАМИНА А

Г. БРИТТОН (University of Liverpool)

29.3.1. БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ [1—18]

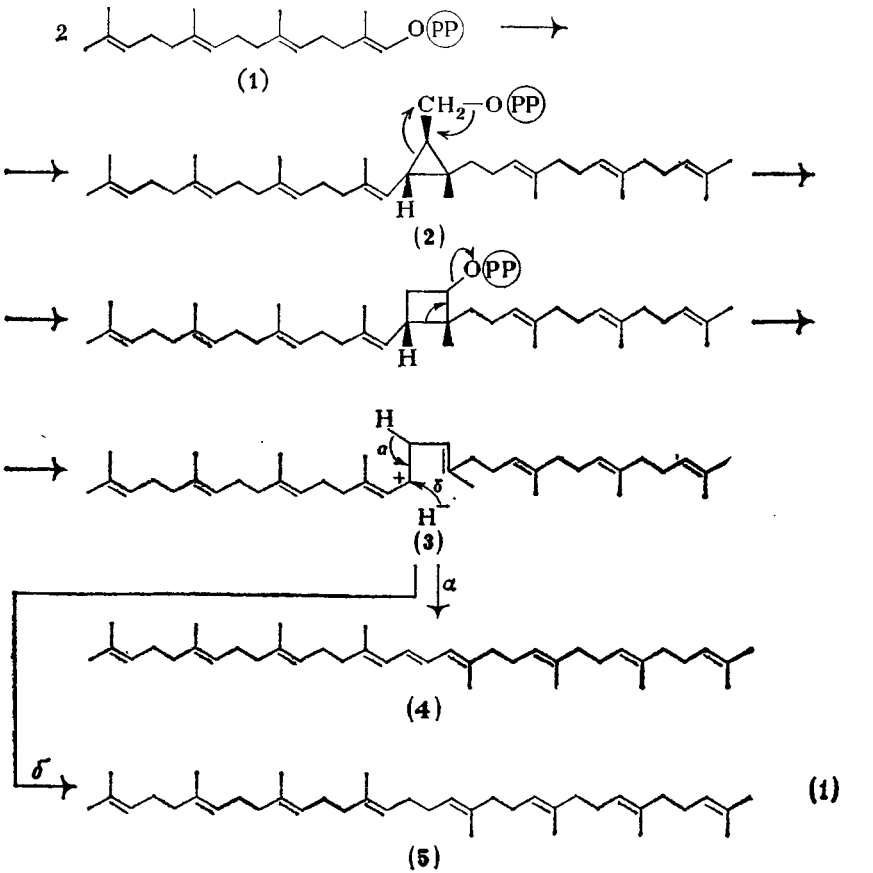
29.3.1.1. Введение

Природные каротиноидные пигменты в большинстве случаев представляют собой тетратерпены, образующиеся из двух C_{20}-звеньев (геранилгеранилпирофосфата). Некоторые бактериальные C_{30}-каротиноиды образуются аналогичным путем из двух C_{15}-звеньев (фарнезилпирофосфата). Небольшое число природных C_{45}- и C_{50}-каротиноидов синтезируется путем присоединения одного или двух C_5-звеньев к C_{40}-предшественнику.

Пути биосинтеза каротиноидов состоят из небольшого числа основных реакций: образования фитоина (первого C_{40}-промежуточного соединения), образования дополнительных кратных связей (десатурация), циклизации и родственных процессов, общих почти для всех каротиноидов. Индивидуальные структуры 400—500 природных каротиноидов образуются в результате разнообразных завершающих модификаций.

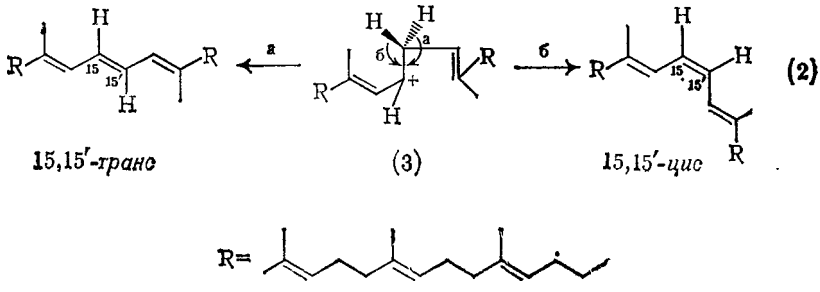
29.3.1.2. Образование фитоина [1, 2]

C_{20}-Предшественник каротиноидов геранилгеранилпирофосфат (**1**) образуется по типичному для терпеноидов пути биосинтеза (см. разд. 29.2.1—29.2.3). Для синтеза первого промежуточного C_{40}-каротиноида, фитоина (7,8,11,12,7′,8′,11′,12′-октагидро-ψ,ψ-каротина) (**4**), используются две молекулы геранилгеранилпирофосфата. Ранее считалось, что предшественником каротиноидов является ликоперсин (7,8,11,12,15,7′,8′,11′,12′,15′-декагидро-ψ,ψ-каротин) (**5**), C_{40}-аналог сквалена. Механизм образования фитоина, однако, имеет много общего с биосинтезом сквалена. В частности, в этом процессе промежуточно образуется префитоинпирофосфат (**2**) — C_{40}-производное циклопропана, аналогичное прескваленпирофосфату и, вероятно, синтезирующееся по аналогичному механизму (см. разд. 29.2.5). Образование фитоина из префитоинпирофосфата



также напоминает превращение прескваленпирофосфата в сквален и отличается от него только конечной стадией. Последний промежуточный «карбениевый ион» (3) стабилизируется посредством элиминирования протона, что приводит к фитоину, тогда как присоединение H^- от NADPH дало бы по аналогии с синтезом сквалена ликоперсин (схема 1).

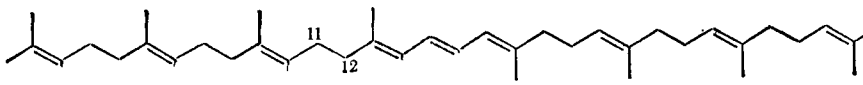
Большинство каротиногенных систем синтезирует 15,15′-*цис*-фитоин. Образование этого изомера протекает путем элиминирования одного 1-*pro*-(*S*)-атома водорода от каждой молекулы геранилгеранилпирофосфата (первоначально, 5-*pro*-(*S*)-атома водорода мевалоната). В некоторых бактериальных системах посредством отщепления 1-*pro*-(*S*)-атома водорода от одной молекулы геранилгеранилпирофосфата и 1-*pro*-(*R*)-атома водорода от другой синтезируется полностью *транс*-фитоин [9]. Вероятный механизм и стереохимия образования полностью *транс*- и 15-*цис*-фитоинов из префитоинпирофосфата приведены на схеме (2). Полагают, что биосинтез C_{30}-каротиноидов протекает через промежуточный дегидросквален, образующийся аналогично из прескваленпирофосфата.



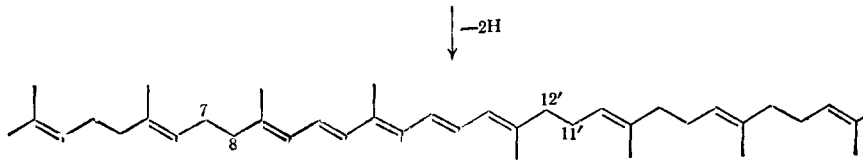
(2)

29.3.1.3. Возрастание степени ненасыщенности [1, 2]

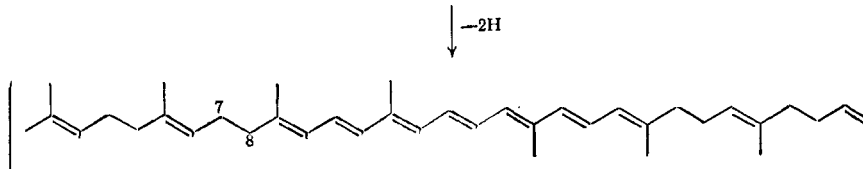
При образовании окрашенных каротиноидов из фитоина прежде всего последовательно осуществляются четыре реакции дегидрирования звеньев $—CH_2CH_2—$; в результате каждой из реакций вводится двойная связь, и хромофор увеличивается на две сопряженные двойные связи (схема 3). Промежуточными соединениями в этом процессе являются последовательно: фитофлуин (7,8,11,12,7′,8′-гексагидро-ψ,ψ-каротин) (6); затем ζ-каротин, представляющий собой оба возможных изомера с сопряженным гептаеновым хромофором, расположенным или симметрично [7,8,7′,8′-тетрагидро-ψ,ψ-каротин; (7)] или несимметрично [7,8,11,12-тетрагидро-ψ,ψ-каротин; (8)], и далее нейроспорин (7,8-дигидро-ψ,ψ-каротин) (9); конечным продуктом последовательного дегидрирования фитоина является ликопин (ψ,ψ-каротин) (10).



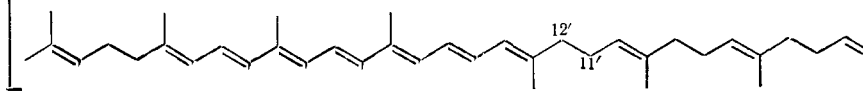
(5)



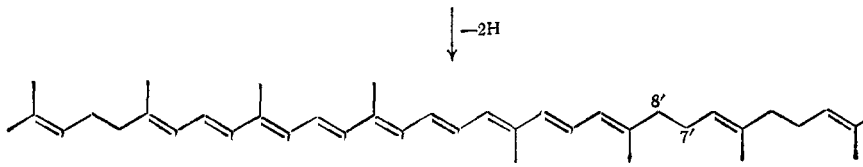
(6)



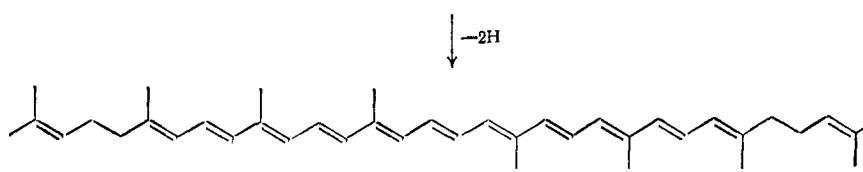
(7)



(8) (3)



(9)

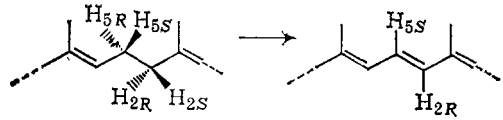


(10)

Ликопин и почти все природные каротиноиды имеют полностью *транс*-конфигурацию, поэтому если в тканях образуется 15-*цис*-фитоин, то какая-то из стадий должна сопровождаться изомеризацией. Есть основания полагать, что изомеризация в различных системах может осуществляться на различных стадиях, например на стадии фитоина, фитофлуина, ζ-каротина.

Механизм реакций дегидрирования до конца не выяснен, однако эксперименты с мевалонатом, меченным стереоспецифически

^3H при С-2 или С-5, показали, что введение каждой двойной связи происходит путем *транс*-элиминирования водорода (схема 4).

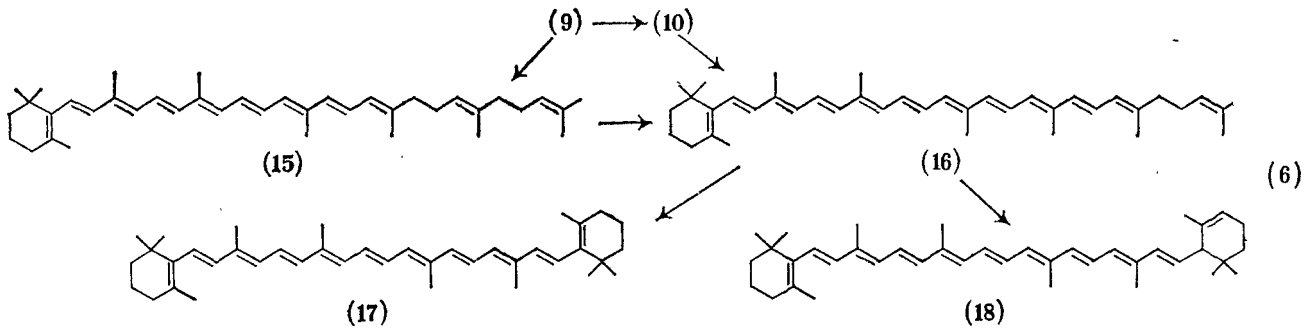


(4)

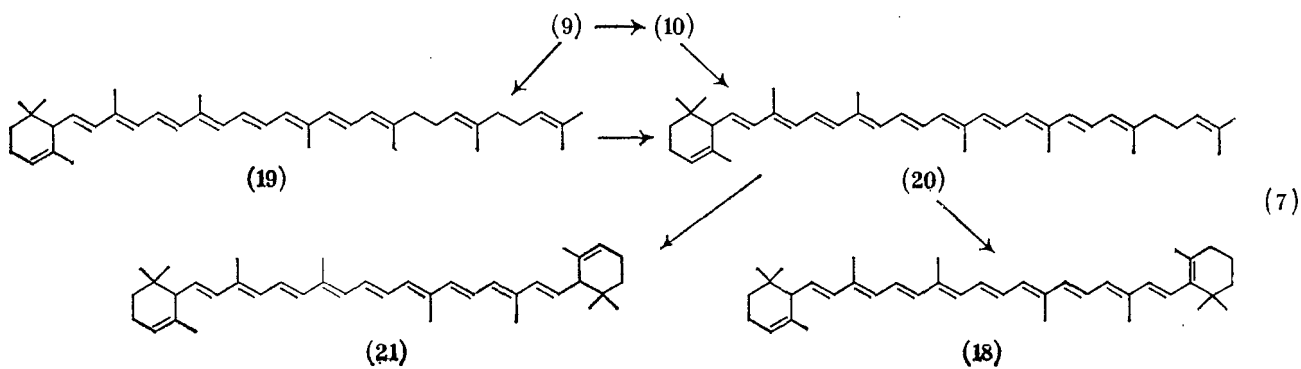
29.3.1.4. Циклизация и другие реакции при двойной связи в положении 1,2 [3]

В большинстве каротиногенных систем ликопин является не конечным продуктом, а промежуточным соединением в биосинтезе важнейших каротиноидов нормального строения. В частности, ликопин может претерпевать различные реакции при двойной связи в положении 1,2, образуя ряд ациклических каротиноидов, характерных для многих фотосинтезирующих бактерий, или более известных моноциклических и бициклических каротиноидов, типичных для растений.

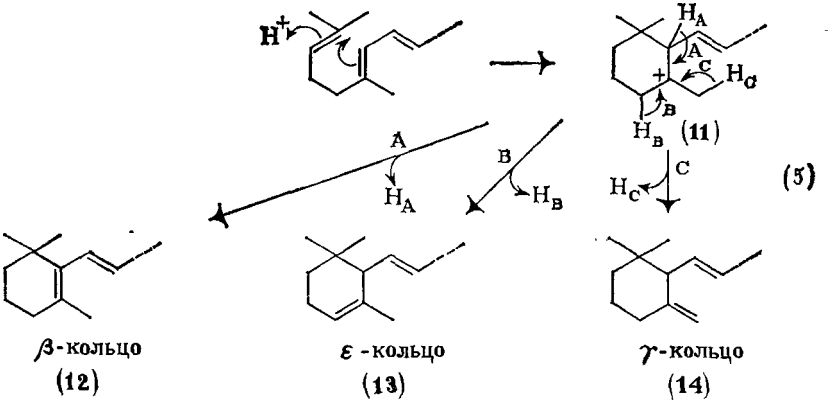
Жесткость сопряженной полиеновой системы промежуточных каротиноидов исключает возможность множественных циклизаций характерных для соединений ди- и тритерпеновой природы. В случае каротиноидов циклизация сводится к образованию шестичленного кольца на одном или на двух концах молекулы ациклического предшественника. Принято полагать, что циклизация промежуточных каротиноидов представляет собой процесс присоединения, инициирующийся атакой протона на атом С-2 концевой двойной связи. В результате циклизации образуется «карбениевый ион» (**11**), который может стабилизироваться путем потери протона или от С-6, или от С-4, или от С-18, что приводит, соответственно к β-кольцу (**12**), ε-кольцу (**13**) или менее типичному γ-кольцу (**14**) (схема 5). Эти кольца не способны к взаимопревращениям. Так, ликопин может превращаться через промежуточно образующийся γ-каротин (β,ψ-каротин) (**16**) в β-каротин (β,β-каротин) (**17**) или α-каротин (β,ε-каротин) (**18**); предложен также альтернативный путь биосинтеза β-каротина из нейроспорина через промежуточный β-зеакаротин (7′,8′-дигидро-β,ψ-каротин) (**15**) (схема 6). Аналогично, если результатом первой циклизации является образование ε-кольца, то из нейроспорина и ликопина образуются α-зеакаротин (7′,8′-дигидро-ε,ψ-каротин) (**19**) и δ-каротин (ε,ψ-каротин) (**20**), соответственно. Соединения (**19**) и (**20**) являются промежуточными соединениями в альтернативном пути биосинтеза α-каротина и ε-каротина (ε,ε-каротин) (**21**) (схема 7). Во всех случаях, однако, циклизация происходит только в той «половине» молекулы каротиноида, которая достигла уровня ненасыщенности, соответствующего ликопину.



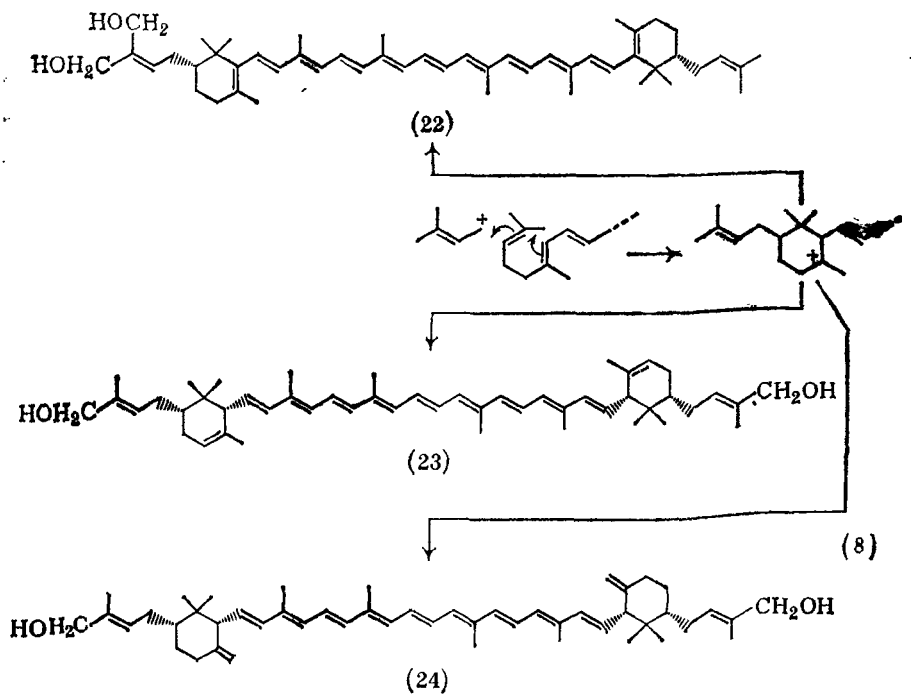
(6)



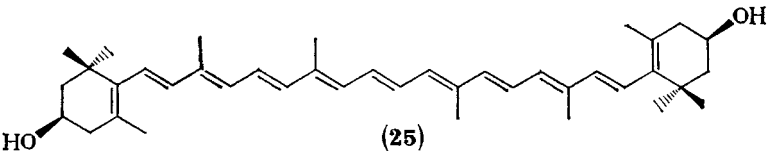
(7)



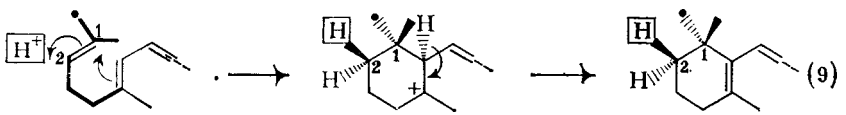
В некоторых нефотосинтезирующих бактериях циклизацию могут инициировать электрофильные C_5-агенты (схема 8); в результате получаются C_{45}- и C_{50}-каротиноиды с C_5-заместителем при С-2 β-, ε- или γ-кольца, например «вещество С. р. 450» [2-(4-гидрокси-3-гидроксиметилбутен-2-ил)-2′-(3-метилбутен-2-ил)-β,β-каротин] (**22**), декапреноксантин [2,2′-бис(4-гидрокси-3-метилбутен-2-ил)-ε,ε-каротин] (**23**) и сарцинаксантин [2,2′-бис(4-гидрокси-3-метилбутен-2-ил)-γ,γ-каротин] (**24**).



Выяснены стереохимические детали поведения метильных заместителей при С-1 в ходе циклизации с образованием β-кольца, а также стереохимия первичной атаки H^+ на двойную связь в положении 1,2. Метка из [2-^{13}C]мевалоната переходит в метильную группу при С-16 ациклического предшественника ликопина, т. е. в метильную группу, которая находится в *транс*-положении по отношению к молекуле в целом. В зеаксантине [3(*R*), 3′(*R*)-β-каротиндиоле-3,3′] (**25**) ^{13}C включается в 1α-метильный заместитель, а циклизация ликопина в бактериальных клетках, суспендированных в тяжелой воде, приводит к введению дейтерия в 2β-положение зеаксантина. Результаты этих исследований, характеризующие характер складывания молекулы, стереохимию атаки протона и циклизации, показаны на схеме (9).

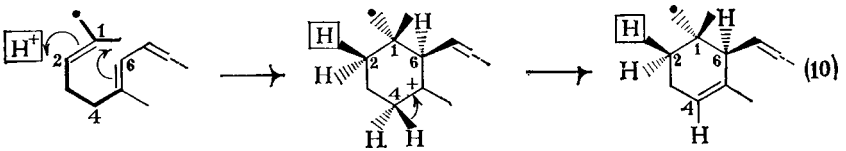


(25)



(9)

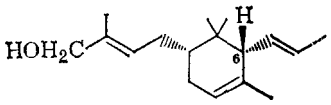
Стереохимия образования ε-кольца затрагивает два других центра хиральности, С-6 и С-4. Для всех изученных до настоящего времени (незамещенных) каротиноидов с ε-кольцом характерна абсолютная (*R*)-конфигурация при С-6 (в одном случае конфигурация не установлена), а образование ε-кольца из промежуточного карбениевого иона сопровождается потерей от С-4 атома водорода [первоначально, 2-*pro*-(*S*)-атома водорода мевалоната]. Стереохимия атаки протона и стереохимическое поведение метильной группы при С-1 в ходе образования ε-кольца не установлены, однако если в этом отношении β-кольцо не отличается от ε-кольца, то образование последнего должно происходить так, как это показано на схеме (10).



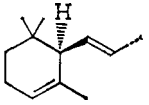
(10)

В C_{50}-каротиноидах C_5-заместитель при С-2 занимает 2α-положение, т. е. положение, противоположное тому, какое занимает атом водорода, вводящийся в процессе образования незамещенного кольца. Кроме того, в C_{50}-каротиноиде декапреноксантине хиральность при С-6 [(**26**)] противоположна хиральности при том

же атоме углерода [(27)] в незамещенных каротиноидах с ε-кольцом, например в α-каротине. Эти экспериментально установленные факты, возможно, свидетельствуют о том, что электрофильная атака C_5-агентами осуществляется с противоположной стороны двойной связи в положении 1,2 и что реакционная конформация полиеновой C_{40}-цепи может отличаться от таковой в случае биосинтеза незамещенных колец.

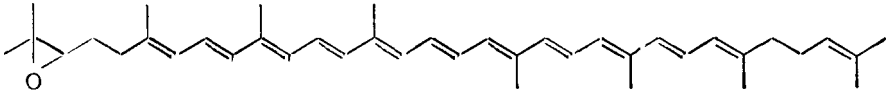


(26)

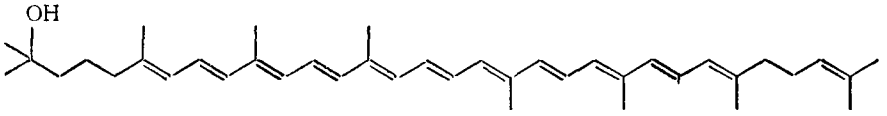


(27)

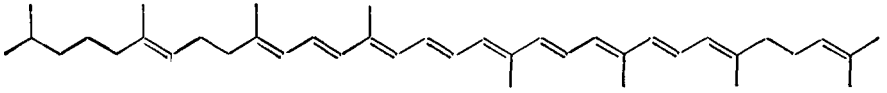
Помимо циклизации, каротиноидная двойная связь в положении 1,2 участвует и в более простых реакциях присоединения. Так, в некоторых высших растениях обнаружены 1,2-эпоксипроизводные ациклических каротинов, например, 1,2-эпоксиликопин (1,2-дигидро-1,2-эпокси-ψ,ψ-каротин) (**28**). Возможно, их биосинтез аналогичен биосинтезу 2,3-эпоксисквалена (см. разд. 29.2.6).



(28)



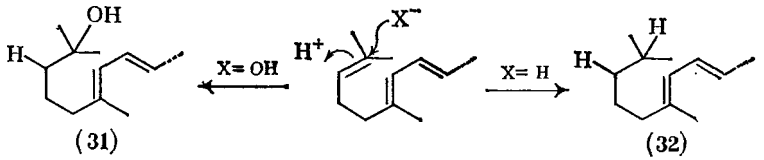
(29)



(30)

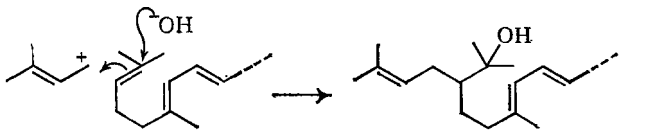
Одной из характерных реакций биосинтеза каротиноидов в фотосинтезирующих бактериях является присоединение воды к двойной связи в положении 1,2, в результате чего образуется концевая 1-гидрокси-1,2-дигидрогруппа [(**31**)]; примером может служить родопин (1,2-дигидро-ψ,ψ-каротинол-1) (**29**). Известен также случай присоединения водорода, приводящего к каротинам с концевой 1,2-дигидрогруппой, например к 1,2-дигидронейроспорину (1,2,7,8-тетрагидро-ψ,ψ-каротину) (**30**). Такие реакции ингибируются теми же самыми веществами (например, никотином), которые ингибируют циклизацию каротиноидов. Возможно, что они также представляют собой реакции присоединения, инициируемые атакой протона на С-2. Образующийся при этом дефицит электрона у С-1 компенсируется присоединением ^-OH или H^- (а не

электронами двойной связи в положении 5,6 как в случае циклизации) (схема 11).

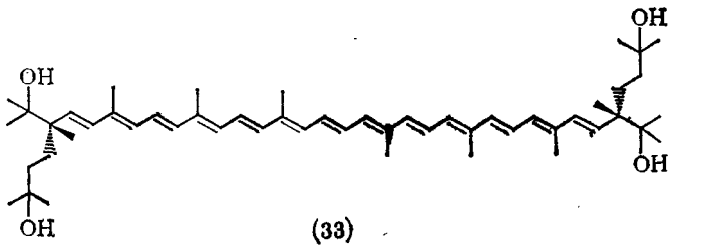


(31) (32) (11)

Реакция, аналогичная гидратации по связи C-1—C-2, как и циклизация, может инициироваться не H^+, а электрофильными C_5-агентами (схема 12). В этих случаях образуются ациклические C_{45}- и C_{50}-каротиноиды, например бактериоруберин (2,2′-бис-(3-гидрокси-3-метилбутил)-3,4,3′,4′-тетрадегидро-1,2,1′,2′-тетрагидро-ψ,ψ-каротиндиол-1,1′) (33). Абсолютные конфигурации при C-2 в бактериоруберине и в циклических C_{50}-каротиноидах идентичны, что, возможно, отражает сходство соответствующих биосинтетических реакций.



(12)



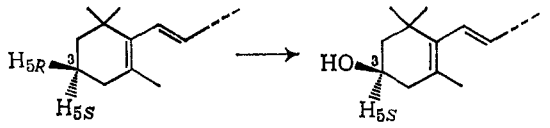
(33)

29.3.1.5. Заключительные модификации [2, 3]

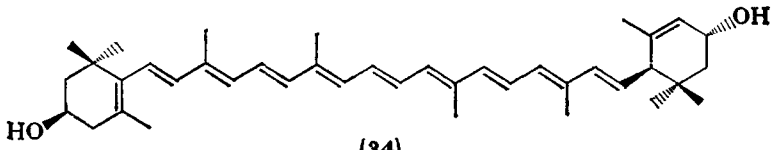
В предыдущих разделах описаны основные реакции, в результате которых образуются основные элементы структуры ациклических и циклических каротиноидов. Строение индивидуальных каротиноидов окончательно формируется в ходе разнообразных заключительных модификаций. Некоторые из этих процессов, особенно введение кислородсодержащих функциональных группировок, встречаются очень часто, другие — уникальны и обнаружены только в случае одного каротиноида в одном или нескольких видах организмов. Циклические каротиноиды подвергаются более широкому кругу модификаций, чем ациклические.

Наиболее общим элементом структуры модифицированных каротиноидов является гидроксильная группа. Гидроксилирование чаще всего осуществляется в положение 3; довольно обычны

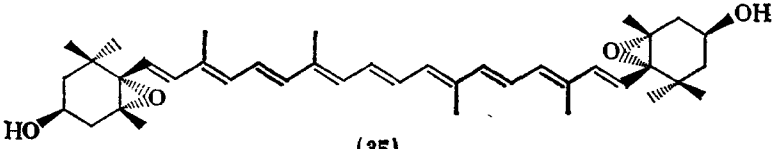
также 2-гидрокси- и 4-гидроксикаротиноиды (последние нередко окисляются далее до 4-кетокаротиноидов), а иногда встречаются и соединения с гидроксигруппой в других положениях (например, при С-19). Изучен только процесс гидроксилирования при С-3. 3(*R*),3′(*R*)-Зеаксантин (25) образуется в растениях и бактериях путем гидроксилирования β-каротина. Источником гидроксильной группы служит молекулярный O_2; реакция управляется многофункциональной оксидазой и протекает путем непосредственной замены на гидроксил атома водорода при С-3 [первоначально, 5-*pro*-(*R*)-атом водорода мевалоната] (схема 13). Аналогичным путем, вероятно из α-каротина, образуется лютеин (β,ε-каротиндиол-3,3′) (34), основной ксантофилл листьев. Однако в лютеине хиральность при С-3′ противоположна хиральности при С-3 (а также при С-3′ в зеаксантине), так что стереохимия гидроксилирования в этих центрах, очевидно, различна.



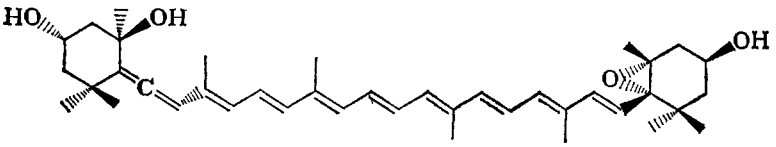
(13)



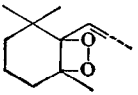
(34)



(35)



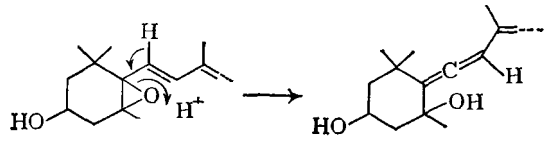
(36)



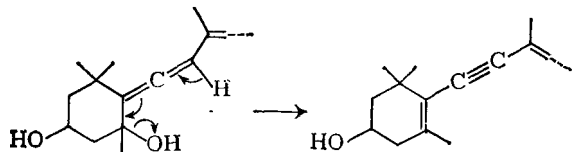
(37)

Ксантофиллы хлоропластов виолаксантин (5,6,5′,6′-диэпокси-5,6,5′,6′-тетрагидро-β,β-каротиндиол-3,3′) (35) и неоксантин (6,7-дидегидро-5,6,5′,6′-тетрагидро-5′,6′-эпокси-β,β-каротинтриол-3,5,3′) (36) имеют 5,6-эпоксидную группу. Описано ферментативное

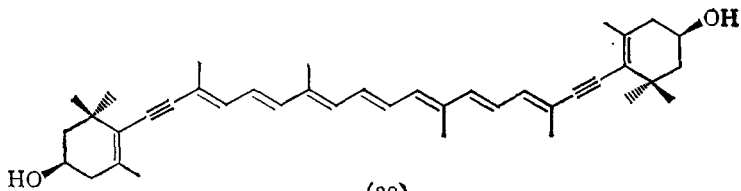
эпоксидирование зеаксантина. Такие эпоксиды [или родственные пероксиды (37)] могут являться также важными промежуточными соединениями при различных модификациях каротиноидов, особенно при модификациях их концевых групп. Для этих реакций был предложен весьма правдоподобный механизм, но экспериментальные доказательства практически отсутствуют. Так, раскрытие оксидного (или пероксидного) кольца с последующим отщеплением протона при С-7 (схема 14) могло бы привести к образованию алленовой концевой группы неоксантина. Перегруппировка алленового остатка (схема 15) может быть причиной образования ацетиленовых 7,8-дидегидрокаротиноидов, например аллоксантина (7,8,7′,8′-тетрадегидро-β,β-каротиндиола-3,3′) (38), часто встречающегося в некоторых классах водорослей.



(14)



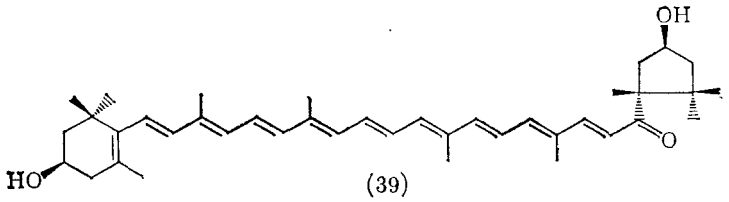
(15)



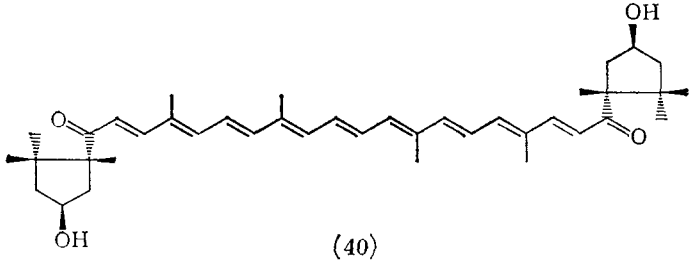
(38)

Считают, что циклопентановые концевые группы капсантина (3,3′-дигидрокси-β,κ-каротинона-6′) (39) и капсорубина (3,3′-дигидрокси-κ,κ-каротиндиона-6,6′) (40) образуются путем раскрытия оксидных (или пероксидных) колец по альтернативному пути, когда атом кислорода остается связанным с С-6 (а не с С-5) и когда за разрывом кольца следует перегруппировка пинакол-пинаколонового типа, приводящая к циклопентановой кольцевой системе (схема 16).

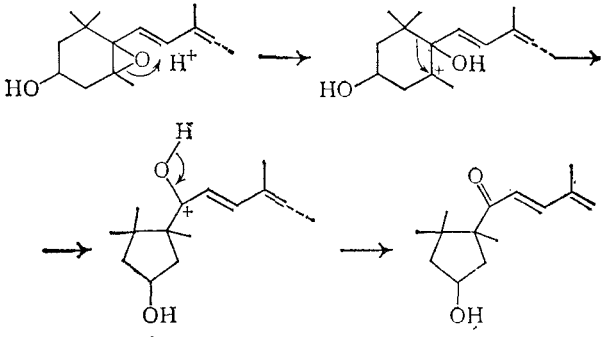
Возможно также, что в этом процессе участвует вся π-электронная система полиеновой цепи, так что дефицит электронов в одном кольце в конце концов нейтрализуется потерей протона из другого кольца. Такой механизм был предложен для образования *ретро*-каротиноида эшольцксантина (4′,5′-дидегидро-4,5′-*ретро*-β,β-каротиндиола-3,3′) (41) (схема 17).



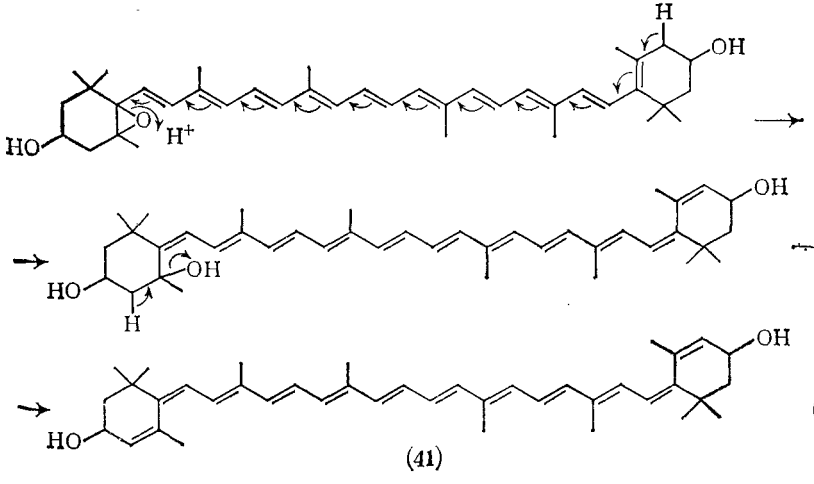
(39)



(40)



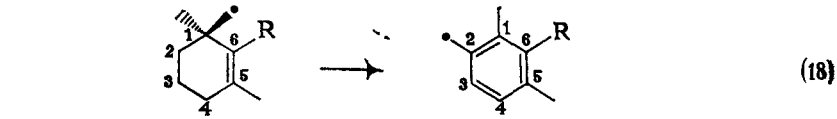
(16)



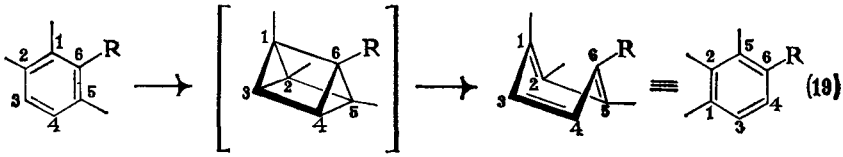
(17)

(41)

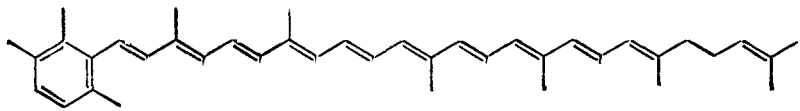
Существование нескольких каротиноидов с арильными концевыми группами представляет особый интерес, так как их образование иллюстрирует новый путь биосинтеза ароматической кольцевой системы из мевалоната (в отличие от обычных шикиматного и ацетатного, точнее поликетидного, путей биосинтеза). Например, в хлоробактине (φ,ψ-каротине) (42) концевая 1,2,5-триметилфенильная группа образуется путем простой миграции одной из метильных групп от C-1 к C-2. Мигрирующая метильная группа образуется из C-3′-метильной группы мевалоната (схема 18) [10]. Концевая 1,2,3-триметилфенильная группа окенона (1′,2′-дигидро-1′-метокси-χ,ψ-каротинона-4′) (43) возникает путем гораздо более сложной перегруппировки. Механизм этой перегруппировки не установлен, однако предполагают, что в этом случае промежуточно образуется структура типа призмы Ладенбурга (схема 19) [11].



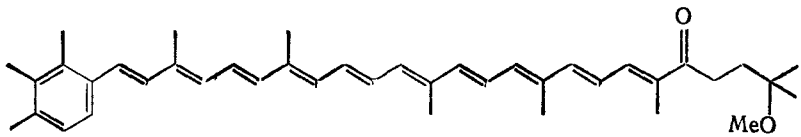
(18)



(19)



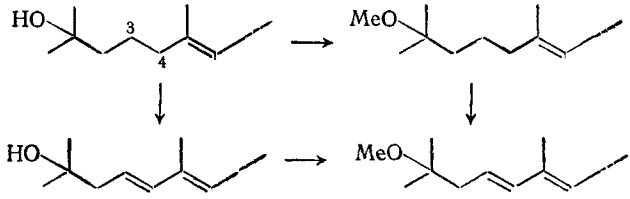
(42)



(43)

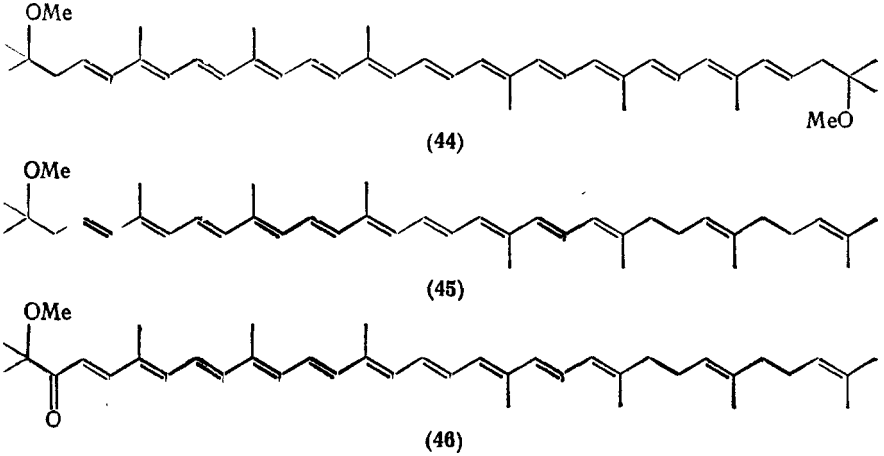
Диапазон дальнейших модификаций в ряду ациклических каротиноидов значительно у́же. В фотосинтезирующих бактериях гидратация двойной связи в положении 1,2 обычно сопровождается *O*-метилированием (посредством *S*-аденозилметионина) образующейся третичной гидроксильной группы и дегидрированием звеньев C-3—C-4 (схема 20), в результате чего образуются такие каротиноиды, как спириллоксантин (3,4,3′,4′-тетрадегидро-1,2,1′,2′-тетрагидро-1,1′-диметокси-ψ,ψ-каротин) (44). Неизвестно, анало-

ичны ли в этом случае стереохимия и механизм дегидрирования звеньев С-3—С-4 таким же процессам в ряду фитоина — ликопина.



(20)

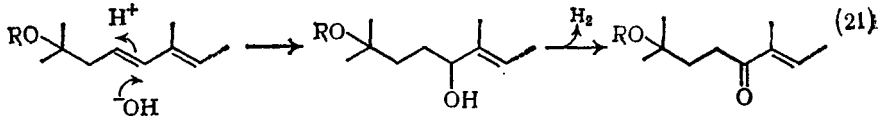
В различные положения ациклических каротиноидов могут вводиться карбонильные группы. Наиболее изучено превращение сфероидина (3,4-дидегидро-1,2,7′,8′-тетрагидро-1-метокси-ψ,ψ-каротина) (45) в сфероидинон (3,4-дидегидро-1,2,7′,8′-тетрагидро-1-метокси-ψ,ψ-каротинон-2) (46); в этом случае кетогруппа вводится в положение 2 при участии молекулярного O_2. В других фотосинтезирующих бактериях окисление до кетогруппы при С-4 или окисление метильной группы при С-20 до альдегидной происходит в анаэробных условиях, вероятно, через гидроксилированное промежуточное соединение (схема 21).



(44)

(45)

(46)



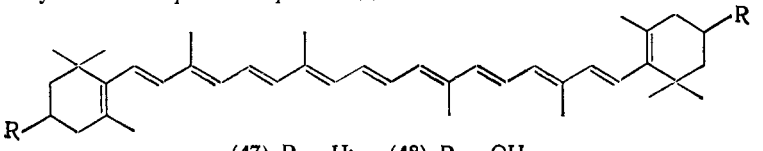
(21)

29.3.1.6. Трансформации каротиноидов в организмах животных [12]

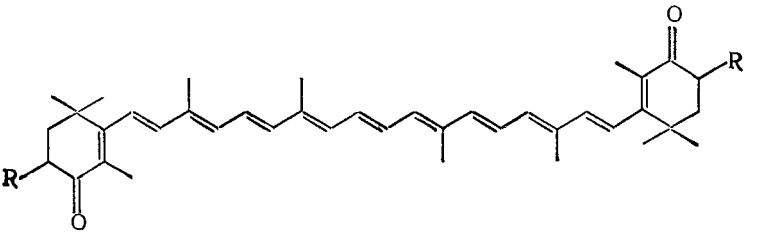
Считается, что животные не могут синтезировать каротиноиды и должны получать их с пищей или из микробных симбионтов. Однако в организмах многих животных (рыб, птиц, насекомых и

других беспозвоночных) возможно модифицирование структуры каротиноидов, в частности, путем введения кетогруппы в положение 4; таким путем, например, β-каротин (47) и зеаксантин (48) превращаются в кантаксантин (β,β-каротиндион-4,4′) (49) и астаксантин (3,3′-дигидрокси-β,β-каротиндион-4,4′) (50), соответственно.

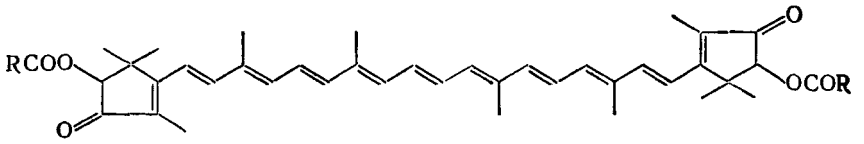
Интересной модификацией является образование норкаротиноида актиноэритрина (диэфира 3,3′-дигидрокси-2,2′-динор-β,β-каротиндиона-4,4′) (51) путем сокращения шестичленного цикла до пятичленного. Предложенный механизм превращения [11] (схема 22) включает перегруппировку бензильного типа на стадии промежуточного трикетопроизводного.



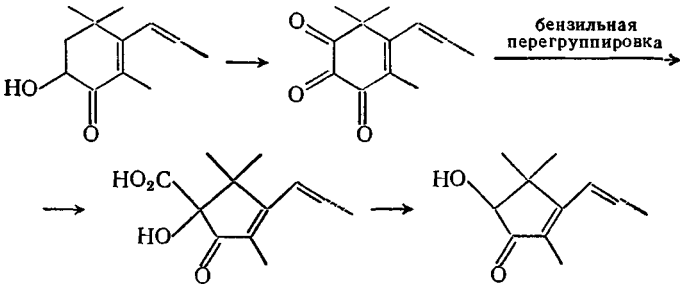
(47) R = H; (48) R = OH



(49) R = H (50) R = OH



(51)



(22)

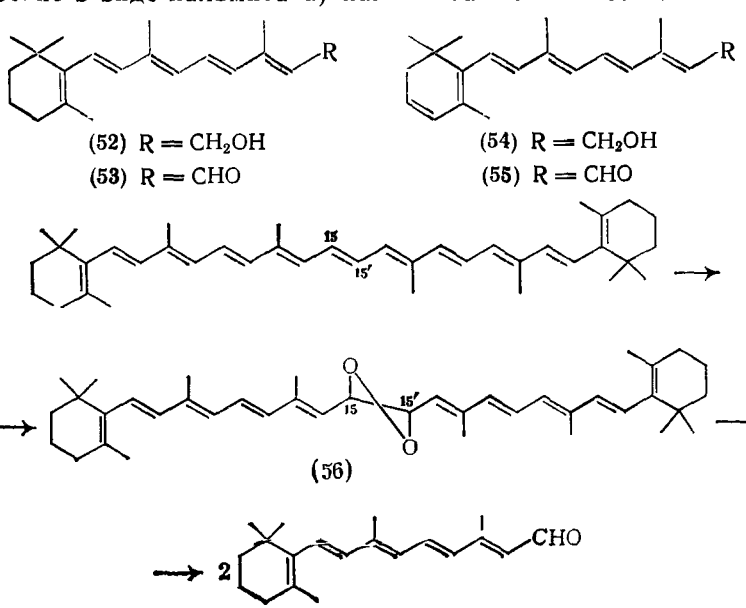
Кетокаротиноидные пигменты, особенно астаксантин, характерны для многих морских беспозвоночных, в организмах которых они обычно связаны в стехиометрическом отношении с белком, образуя водорастворимые комплексы [13, 14]. Связь каротинов

с белком не ковалентна, но своеобразна; она приводит к большому батохромному сдвигу максимума поглощения света. Природа этой связи не выяснена, однако почти наверное она осуществляется с участием кетогруппы каротиноида.

29.3.2. БИОСИНТЕЗ ВИТАМИНА А [19—21]

29.3.2.1. Структуры витаминов А и их образование из β-каротина

В организмах животных, в том числе и человека, наиболее важными продуктами метаболизма каротиноидов являются витамины группы А: ретинол (витамин A_1) (**52**) и его 3,4-дидегидропроизводное — витамин A_2 (**54**), а также соответствующие альдегиды — ретиналь (**53**) и 3,4-дидегидроретиналь (**55**), входящие в состав родопсина и других зрительных пигментов. Ретиналь (ретинальдегид, ретинен) образуется в слизистой оболочке кишечника путем окислительного расщепления β-каротина (схема 23). Этот процесс катализируется ферментом β-каротин-15,15′-диоксигеназой и протекает через промежуточно образующийся пероксид (**56**). Ретиналь и ретинол легко взаимопревращаются в присутствии NADH или NADPH под действием дегидрогеназ, присутствующих в различных тканях, особенно в печени и в сетчатке. Транспорт витамина А в крови осуществляется в виде его комплекса с липопротеином, т. е. ретинолсвязывающим белком, а запасы ретинола в виде соответствующих сложных эфиров (преимущественно в виде пальмитата) накапливаются в печени.

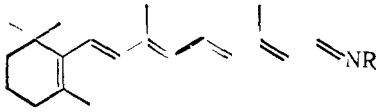


(52) R = CH_2OH
(53) R = CHO
(54) R = CH_2OH
(55) R = CHO
(56)

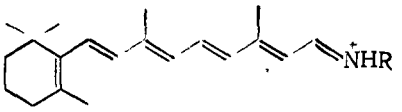
(23)

29.3.2.2. Зрительные пигменты

В процессах зрения участвуют светочувствительные пигменты, расположенные в сетчатке глаза (ретине). Из зрительных пигментов лучше всего изучен родопсин, являющийся у млекопитающих, в том числе и у человека, фоторецептором палочек сетчатки — клеток, ответственных за сумеречное зрение. Родопсин представляет собой комплекс гликопротеина опсина с 11-*цис*-ретиналем. Связь осуществляется посредством образования основания Шиффа (**57**) между альдегидной группой ретиналя и аминогруппой остатка лизина в молекуле опсина. Несмотря на то что сам по себе ретиналь бесцветен [$\lambda_{макс}$ 383 нм (в этаноле)], образование протонированного основания Шиффа (**58**) сопровождается резким батохромным сдвигом, и родопсин поглощает свет в видимой области ($\lambda_{макс}$ 500 нм). Родственные комплексы ретиналя или 3,4-дидегидроретиналя с различными опсинами колбочек выполняют в них функцию рецепторных пигментов цветового зрения. Некоторые из этих зрительных пигментов удалось идентифицировать благодаря различным максимумам поглощения и, следовательно, различной чувствительности к свету в зависимости от длины волны. К ним относятся иодопсин и цианопсин, образующиеся из опсинов колбочек, и, соответственно, ретиналя или 3,4-дидегидроретиналя.



(**57**)

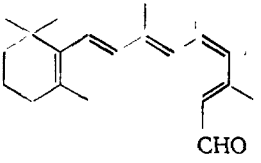


(**58**)

R — остаток молекулы опсина

29.3.2.3. Молекулярная биология зрения

Лучше других изучен цикл ночного зрения, в котором участвует родопсин. В родопсине связанный ретиналь находится в 11-*цис*-12-*s*-*цис*-конформации (**59**). Свет инициирует конфигурационные и конформационные превращения, приведенные на схеме (24).



(**59**)

Родопсин (500 нм) ⟶ Прелюмиродопсин (543 нм) ⟶
⟶ Люмиродопсин (497 нм) ⟶ Метародопсин I (478 нм) ⟶
⟶ Метародопсин II (380 нм) ⟶ Метародопсин III (465 нм) ⟶
⟶ полностью *транс*-Ретиналь + Опсин (**24**)

Первая реакция является чрезвычайно быстрой (6 пс) изомеризацией в прелюмиродопсин, в котором ретиналь имеет 11-*транс*-12-*s*-*цис*-конформацию. Последующие конформационные изменения, происходящие намного медленнее (в диапазоне наносекунд или микросекунд), пока полностью не выяснены. Конечный продукт процесса, метародопсин, неустойчив и легко распадается, образуя полностью *транс*-ретиналь. Комплекс может снова образоваться только после катализируемой ферментами обратной изомеризации ретиналя в 11-*цис*-соединение.

ЛИТЕРАТУРА

1. *B. H. Davies and R. F. Taylor*, Pure Appl. Chem., 1976, 47, 211.
2. *G. Britton*, in 'Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments', ed. T. W. Goodwin, Academic Press, London, 2nd. edn., 1976, vol. 1, p. 262.
3. *G. Britton*, Pure Appl. Chem., 1976, 47, 223.
4. *J. W. Porter*, Pure Appl. Chem., 1969, 20, 449.
5. *T. W. Goodwin*, in 'Carotenoids', ed. O. Isler, Birkhäuser, Basel, 1971, p 577.
6. *G. Britton*, in 'Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry', ed. T. W. Goodwin, Academic Press, London, 1971, p. 255.
7. *B. H. Davies*, Pure Appl. Chem., 1973, 35, 1.
8. *J C. B McDermott, A. Ben Aziz, R. K. Singh, G. Britton, and T. W. Goodwin*, Pure Appl. Chem., 1973, 35, 29
9. *D. E. Gregonis and H. C. Rilling*, Biochemistry, 1974, 13, 1538.
10. *S. E. Moshier and D J Chapman*, Biochem J., 1973, 136, 395.
11. *S. Liaaen-Jensen*, Pure Appl. Chem., 1969, 20, 421.
12. *H. Thommen*, in 'Carotenoids', ed. O. Isler, Birkhäuser. Basel, 1971, p. 637.
13. *D. F. Cheesman, W L. Lee, and P. F. Zagalsky*, Biol. Rev., 1967, 42, 132.
14. *P. F. Zagalsky*, Pure Appl. Chem., 1976, 47, 103.
15. *G. Britton and T. W. Goodwin*, Methods Enzymol., 1971, 18C, 654.
16. *B. H. Davies*, in 'Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments', ed. T. W. Goodwin, Academic Press, London, 2nd. edn, 1976, vol. II, p. 38.
17. 'Carotenoids', ed. O. Isler, Birkhäuser, Basel, 1971.
18. *G. P. Moss and B. C L Weedon*, in 'Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments', ed. T. W. Goodwin, Academic Press, London, 2nd. edn., 1976, vol. I, p. 149.
19. *G. A. J. Pitt*, in 'Carotenoids', ed. O. Isler, Birkhäuser, Basel, 1971, p. 717.
20. *T. G. Ebrey and B. Honig*, Quart. Rev. Biophys., 1975, 8, 129.
21. *R. Hubbard, P. K. Brown, and D. Bownds*, Methods Enzymol., 1971, 18C, 615.

ЧАСТЬ 30

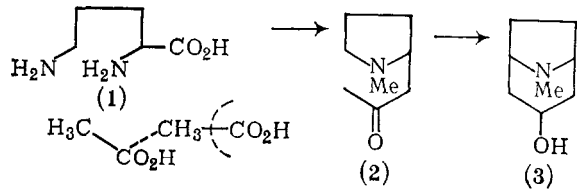
БИОСИНТЕЗ: ОБЩИЙ ОБЗОР

30.1. БИОСИНТЕЗ АЛКАЛОИДОВ

Р. Б. ГЕРБЕРТ (University of Leeds)

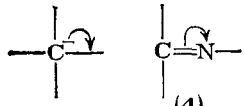
30.1.1. ВВЕДЕНИЕ

Число растительных алкалоидов необычайно велико, разнообразие их структур огромно, и все же, как было установлено уже очень давно, между отдельными алкалоидами можно найти структурные взаимосвязи [1], особенно если они выделены из растений одного вида или семейства. Более того, вероятные взаимосвязи могут быть прослежены вплоть до совсем простых молекул, являющихся промежуточными веществами в первичном метаболизме, что дает возможность высказать предположения о возможных путях биосинтеза алкалоидов. Так, например, тропин **(3)** (встречающийся в природе обычно в виде различных сложных эфиров) и гигрин **(2)** образуются в растениях одного вида и имеют резко выраженное структурное сходство; их вероятное происхождение может быть прослежено до первичных метаболитов — орнитина **(1)** и уксусной кислоты (схема 1). На примере этих алкалоидов может быть рассмотрен также другой важный аспект структурных взаимосвязей — вероятная последовательность образования алкалоидов в растении. Сравнение структур **(2)** и **(3)** позволяет предположить, что гигрин **(2)** является промежуточным веществом в биосинтезе тропина **(3)**.

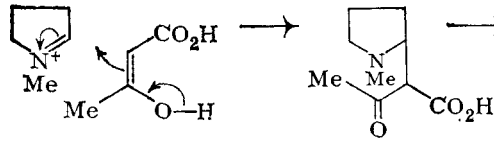


(1)

Одновременно рассматривались возможные механизмы образования алкалоидов из первичных метаболитов. Полагают, что наиболее универсальной реакцией в ходе биосинтеза алкалоидов является конденсация с участием иминов **(4)** или енаминов. Реакция такого типа была предложена, например, для биосинтеза гигрина (схема 2) и подтверждена успешными лабораторными синтезами (см. разд. 30.1.2.1).

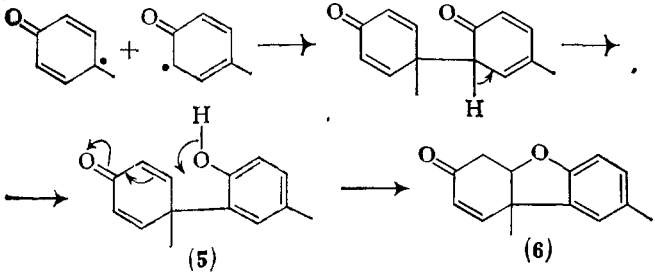


(4)

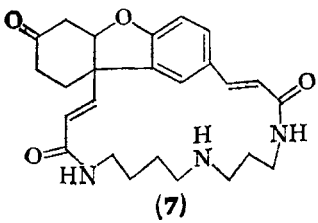


(2) (2)

Другой важной реакцией при биосинтезе самого широкого круга соединений, в особенности алкалоидов с ароматическими кольцами, является, вероятно, окислительная конденсация фенолов [2]. Предполагают, что новые углерод-углеродные и углерод-кислородные связи могут образовываться путем конденсации мезомерных радикалов, возникающих при одноэлектронном окислении фенолов. Примером может служить химическое превращение *n*-крезола в кетон (6); при этом осуществляется взаимодействие между *орто*-положением (по отношению к гидроксильной группе) одной молекулы и *пара*-положением другой; возможны и другие способы конденсации: между двумя *орто*-положениями, двумя *пара*-положениями или конденсация с образованием связи С—О. Ароматичность восстанавливается посредством элиминирования протона от центра конденсации. В случае (6) таким путем может ароматизироваться только одно кольцо; наличие ангулярной метильной группы в другом кольце обеспечивает сохранение диеноновой структуры (5). Диеноны являются реакционноспособными соединениями и могут подвергаться дальнейшим превращениям (схема 3; см. также разд. 30.1.4.4); более важное значение имеют перегруппировки, приводящие к ароматическим сосдинениям.



(5) (6) (3)



(7)

$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$

(8)

Тщательные исследования биосинтеза ароматических алкалоидов убедительно показали правильность предложенных гипотез (см. разд. 30.1.4 и 30.1.5). Во всех изученных случаях новая связь между ароматическими кольцами создавалась только между *орто*- или *пара*-положениями по отношению к фенольной гидроксильной группе; если эти гидроксигруппы, например, алкилированы, реакции такого типа вообще не происходят. В качестве примера рассмотрим биосинтез лунарина (**7**), структура которого близка к структуре соединения (**6**) и отличается, главным образом, отсутствием двойной связи. Резонно предположить, что и образуется лунарин по аналогичному механизму из *п*-гидроксикоричной кислоты. Это предположение подтверждается тем, что фенилаланин (вероятный предшественник *п*-гидроксикоричной кислоты), как и спермидин (**8**), является предшественником этого алкалоида [3].

До сих пор мы говорили только о гипотезах. Этим, в сущности, и ограничивалось развитие исследований по биосинтезу алкалоидов до тех пор, пока не стали доступными эксперименты с радиоактивными изотопами. В настоящее время, когда стала возможна экспериментальная проверка этих гипотез в опытах на растениях с помощью соединений, меченных ^{14}C и ^{3}H, в развитии биосинтетических исследований произошел резкий скачок. (Методы исследований рассмотрены в обзоре [4].) Некоторые гипотезы были отброшены, другие получили экспериментальное подтверждение и были дополнены важными деталями. Успехи в этой области связаны также с применением более тонких методов исследования, в том числе с использованием ферментов. В последнее время внимание исследователей привлекает изучение способности растений продуцировать неприродные аналоги тех алкалоидов, которые они обычно синтезируют [5, 6]. Таким путем, с одной стороны, могут быть синтезированы потенциально ценные соединения, а с другой — можно получить более глубокое представление о ферментативных реакциях, участвующих в биосинтезе алкалоидов.

Поразительно, какое большое число чисто гипотетических путей биосинтеза алкалоидов впоследствии, при экспериментальной проверке оказались правильными. Так же поразительно, что все многообразие продуктов вторичного метаболизма (частью которого является биосинтез алкалоидов) достигается с помощью простых, почти шаблонных реакций, чего нельзя сказать о реакциях образования продуктов первичного метаболизма. Поэтому реакции вторичного метаболизма легко могут быть интерпретированы с помощью обычных представлений органической химии. Именно это обстоятельство способствовало тому, что большинство гипотез о биосинтезе алкалоидов подтвердилось. Оно же, очевидно, является причиной успешного моделирования путей биогенеза алкалоидов при их химическом синтезе.

Другая примечательная особенность биосинтеза алкалоидов состоит в том, что все огромное разнообразие их структур возни-

кает в результате превращений всего нескольких продуктов первичного метаболизма аминокислот; большинство алкалоидов образуется из лизина и родственного ему орнитина, а также из ароматических аминокислот — фенилаланина, тирозина и триптофана. Сочетание продуктов превращения аминокислот с продуктами метаболизма уксусной и мевалоновой кислот приводит к еще большему увеличению числа возможных для алкалоидов структур. Интересно, что в биосинтезе растительных алкалоидов, в отличие от биосинтеза микробных алкалоидов, в качестве промежуточных соединений не используются простые циклические пептиды.

Давно отмечалось родство различных типов алкалоидов, имеющих пергидрофенантреновую систему циклов. Очевидно, в растениях существует общая тенденция к синтезу соединений сходной структуры различными путями; доводы чисто химической логики в таких случаях непригодны для суждения о биогенетическом родстве соединений по их строению. Показательными примерами могут служить совершенно различные пути биосинтеза структурно родственных алкалоидов кониина и *N*-метилпельтьерина (см. разд. 30.1.3.1), анабазина и анатабина, выделенных из одного и того же растения (см. разд. 30.1.3.1 и 30.1.3.2), мезембрина и алкалоидов Amaryllidaceae (см. разд. 30.1.5).

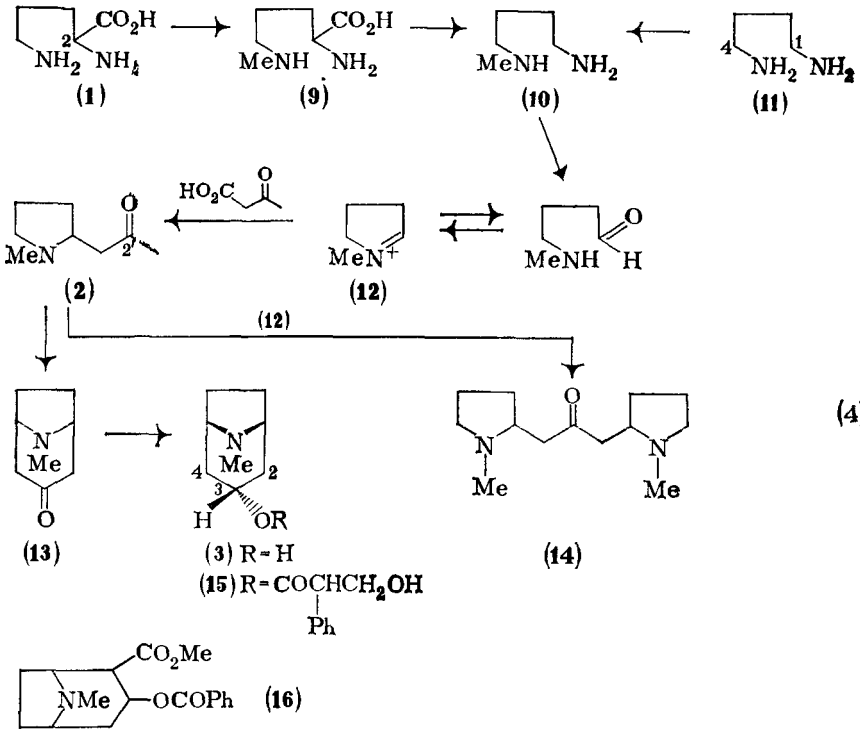
Считают, что *O*- и *N*-метильные группы образуются, как это неоднократно было доказано, из метионина (формирование метилендиоксигруппы рассматривается в разд. 30.1.5.1). В опубликованных ранее обзорах биосинтез метильных групп описан достаточно подробно. Эти обзоры [7—10], из которых наиболее обстоятельным является монография Мотеса и Шютте [8], охватывают период приблизительно до 1967 г.; более поздние исследования описаны в обзорах [11, 12].

30.1.2. БИОСИНТЕЗ ПИРРОЛИДИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ

30.1.2.1. Тропановые и родственные алкалоиды

Классический синтез тропинона (**13**) из янтарного альдегида, метиламина и ацетондикарбоновой кислоты в «физиологических условиях» [13] до наших дней остается образцом эффективности и стратегического мастерства, однако биосинтез такого рода алкалоидов осуществляется другим путем и начинается с α-аминокислоты — орнитина (**1**). Установлено, что в различные тропановые алкалоиды, например в гиосциамин (**15**), включается [2-^{14}C]орнитин [14, 15], а также продукт его декарбоксилирования, путресцин (**11**); метка из [1,4-$^{14}C_2$]путресцина переходит в мостиковые атомы углерода [16]. Путем удачно выбранной последовательности реакций расщепления, позволившей различить мостиковые углеродные атомы гиосциамина, было показано, что метка из С-2 орнитина включается только в один углеродный атом, стоящий во главе

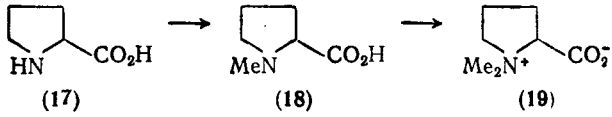
мостика [14]. Отсюда следует, что орнитин включается в гиосциамин (**15**) несимметрично и, следовательно, симметричное основание, путресцин, не может быть промежуточным соединением в этом процессе. На основании результатов, полученных с помощью меченых соединений при изучении биосинтеза тропановых оснований и родственного алкалоида кускогигрина (**14**), в настоящее время полагают, что асимметричное включение орнитина обеспечивается промежуточным образованием δ-*N*-метилорнитина (**9**) и далее *N*-метилпутресцина (**10**) [18, 19]; последний, как показано [17], может синтезироваться также и из другого предшественника — путресцина (**11**) [17]. Этот путь биосинтеза (схема 4) отличается от биогенеза пиперидиновых алкалоидов (см. разд. 30.1.3.1); вопрос о включении лизина будет рассмотрен также в связи с биосинтезом никотина (см. разд. 30.1.2.2).



(4)

Примером тропаноподобного основания с сохранившейся от орнитина карбоксильной группой является кокаин (**16**), продуцируемый вместе с гигрином и эфирами тропина. К сожалению, биосинтез кокаина до конца не ясен, поскольку включение наиболее вероятных предшественников в (**16**) происходит с очень низкой эффективностью. Напротив, бетаин стахидрин (**19**) образуется

непосредственно из пролина (17) через промежуточную гигриновую кислоту (18) (схема 5) [20]; его биосинтез, таким образом, отличается от биосинтеза тропановых алкалоидов.



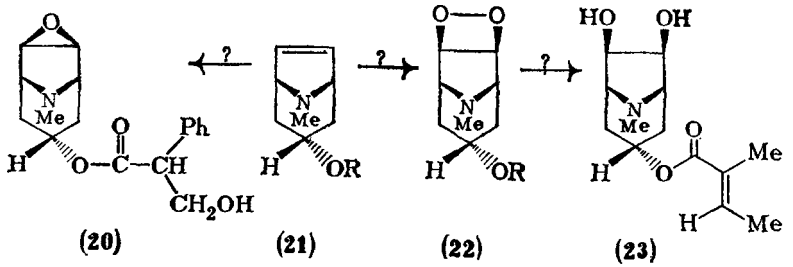
(17) (18) (19) (5)

Вероятным, хотя и не доказанным, промежуточным соединением в биосинтезе тропановых алкалоидов является соль *N*-метил-Δ^1-пирролиния (12). Установлено, что последняя выполняет роль предшественника в синтезе никотина (см. ниже), а *in vitro* реагирует с ацетоуксусной кислотой, образуя гигрин (2) [21] [ср. схему 2, кокаин (16) также может синтезироваться этим путем, но без потери карбоксильной группы]. В соответствии с этой гипотезой (см. схему 4) ацетат (в виде ацетоацетата) является вторым специфическим предшественником гигрина (2), кускогигрина (14) и гиосциамина (15); справедливость гипотезы была подтверждена с помощью меченых соединений, что позволило локализовать места включения меток [19, 22, 23].

Близость структур гигрина (2) и тропановых алкалоидов, например гиосциамина (15) и кускогигрина (14), позволяет предположить, что гигрин может выполнять роль предшественника этих алкалоидов; это подтверждается описанными выше экспериментами с мечеными соединениями. [*N*-метил,2′-$^{14}C_2$] Гигрин эффективно и строго определенным образом включается в кускогигрин (14); при этом исходная удельная радиоактивность *N*-метильной группы уменьшается вдвое относительно удельной радиоактивности С-2′. Следовательно, второе пирролидиновое кольцо кускогигрина образуется не путем деградации гигрина, а посредством конденсации боковой метильной группы гигрина со второй молекулой (12) [22].

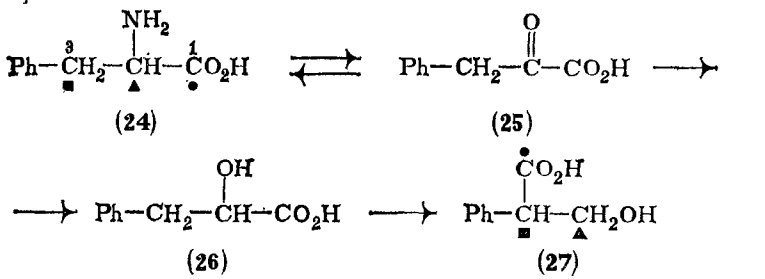
Альтернативное превращение — внутримолекулярная реакция с участием метильной группы боковой цепи гигрина (2) может приводить к тропинону (13), тропину (3) и далее к тропановым алкалоидам. Эта гипотеза подтверждена включением изотопной метки из тропина (3) в гиосциамин (15) [24].

Тропановые алкалоиды более высоких степеней окисления, метелоидин (23) и скополамин (20), также образуются из тропина (3) [24]. Гиосциамин (15) является промежуточным соединением в синтезе алкалоида (20) [25], а его дегидропроизводное (21), вероятно, играет такую же роль в биосинтезе как основания (20), так и алкалоида (23). Скополамин (20) может получаться путем простого эпоксидирования, но стереохимия гидроксигрупп в метелоидине (23) исключает такой вариант и предполагает участие промежуточного диоксетанового производного (22).



(6)

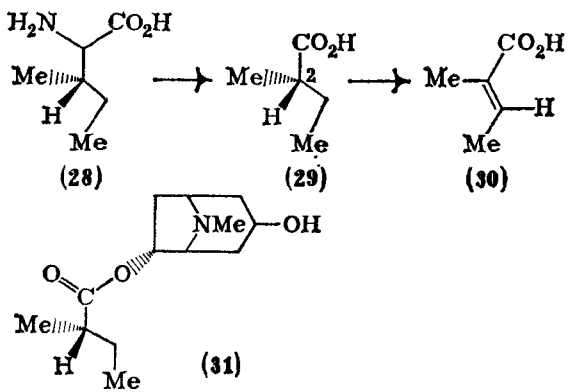
Тропановые алкалоиды обычно встречаются в природных источниках в виде эфиров троповой [как в соединении (15)] или тиглиновой [как в соединении (23)] кислот. Тщательное изучение биосинтеза троповой кислоты (27) показало, что она образуется преимущественно из фенилаланина (24) (схема 7) [26, 27]; предлагавшийся путь ее биогенеза из фенилуксусной кислоты и триптофана менее обоснован [27]. В троповой кислоте сохранены все девять углеродных атомов фенилаланина; результаты изучения трансформации меченного ^{14}C фенилаланина показывают, что перегруппировка в троповую кислоту осуществляется путем миграции карбоксильной группы от С-2 к С-3. Внутримолекулярная миграция карбоксильной группы доказана фактом образования дважды меченных гиосциамина (15) и скополамина (20) из [1,3-$^{13}C_2$]фенилаланина, большая часть молекул которых содержала оба меченых атома; распределение меток в молекулах (15) и (20) согласуется с таким характером миграций [26]. (Межмолекулярный характер миграции привел бы к соединениям с одним меченым атомом в результате разбавления немечеными соединениями в растении.) Интересно, что структурно родственная система в продукте метаболизма микробов тенеллине образуется сходным путем [28].



(7)

Полагают, что промежуточными соединениями в биосинтезе троповой кислоты (27) являются фенилпировиноградная (25) и фенилмолочная (26) кислоты [29], а по последним данным — и коричная кислота [30], хотя первоначальные результаты были отрицательными. (Фенилмолочная кислота является этерифицирующим агентом в биосинтезе алкалоида литторина; доказано ее происхождение из фенилаланина (24) [31].)

Биосинтез остатка тиглиновой кислоты (30) в метелоидине (23) и родственных алкалоидах аналогичен биосинтезу тиглиновой кислоты в организмах животных. Исходным веществом является изолейцин (28), который теряет аминогруппу, превращаясь в 2-метилмасляную кислоту (29) [32, 33]. *L*-Изолейцин является также предшественником 2-метилбутаноильного остатка в молекуле (31), сохраняющего абсолютную конфигурацию аминокислоты [34]. 2-Гидрокси-2-метилмасляная кислота не может служить предшественником тиглиновой кислоты [23]; следовательно, образование двойной связи в последней является результатом не дегидратации, а дегидрирования.

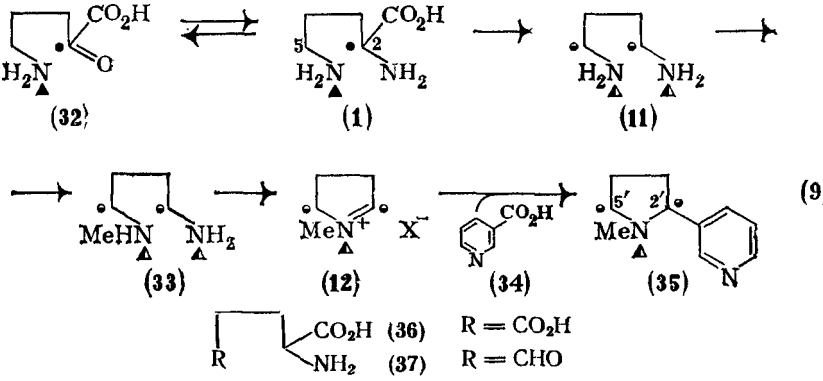


30.1.2.2. Никотин

Пирролидиновое кольцо никотина (35) синтезируется почти так же, как аналогичный элемент структуры тропановых алкалоидов (см. разд. 30.1.2.1); заметное различие заключается только в способе включения орнитина. Так, при включении [2-^{14}C]орнитина в никотин метка равномерно распределяется между C-2′ и C-5′, тогда как в аналогичном эксперименте с тропановыми алкалоидами метка включается только в одно из эквивалентных положений (см. разд. 30.1.2.1). Отсюда следует, что утилизация орнитина (1) в случае никотина (и в отличие от тропановых алкалоидов) происходит через промежуточное соединение симметричного строения, которым, очевидно, является диамин путресцин (11) (схема 9). Действительно, [1,4-$^{14}C_2$]путресцин включается в никотин, причем метка переходит в C-2′ и C-5′ алкалоида [36].

В других работах было показано, что орнитин образуется из глутаминовой кислоты (36) [36, 37]. Но наибольший интерес представляют результаты изучения включения [2-^{14}C,α-^{15}N]- и [2-^{14}C,δ-^{15}N]орнитина [38]. Во-первых, оказалось, что ^{15}N включается в пирролидиновое кольцо никотина только из последнего предшественника, т. е. из δ-аминогруппы. Таким образом была исключена возможность промежуточного образования 2-амино-5-

оксовалериановой кислоты (полуальдегида глутаминовой кислоты) (37) (в этом случае должна была бы теряться δ-аминогруппа), а также свободного путресцина путем прямого декарбоксилирования орнитина (или известным альтернативным путем через аргинин [39]), так как в таком варианте метка должна была бы включаться в никотин как из α-, так из δ-аминогруппы. Все же путресцин может являться промежуточным соединением в биосинтезе никотина при условии, что в процессе потери α-аминогруппы и до превращения в путресцин устанавливается равновесие между орнитином и δ-амино-α-оксовалериановой кислотой (32) (см. схему 9). Во-вторых, оказалось, что в никотине содержится только половина меченого азота из [2-^{14}C,δ-^{15}N]орнитина, что согласуется с путем биосинтеза никотина из орнитина через путресцин, метилирование которого (в равной вероятности по любой аминогруппе) дает *N*-метилпутресцин (**10**) (сам по себе являющийся предшественником никотина [40]), меченный так, как это показано в формуле (**33**). Соединение (**33**) затем превращается в *N*-метил-Δ^1-пирролин (**12**), теряя половину ^{15}N.

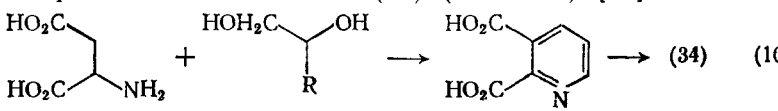


Дальнейшим подтверждением пути биосинтеза, приведенного на схеме (9), явился тот факт [41], что *N*-метил-Δ^1-пирролин (**12**) является интактным предшественником никотина (метка из С-2 предшественника переходит к С-2′ алкалоида). Более того, меченое соединение (**12**) было выделено из продуктов метаболизма растений после введения, например, радиоактивного орнитина [42]. Окончательным доказательством справедливости этой схемы послужило выделение из листьев табака двух ферментов, катализирующих превращение путресцина (**11**) в соединение (**33**) и далее диамина (**33**) в соединение (**12**) [43].

Исследование биогенеза никотина с помощью двух изомерных меченых *N*-метилорнитинов привело к результатам, противоречащим рассмотренной выше схеме: α-*N*-метилорнитин вообще не включался в никотин, а δ-*N*-метильное производное утилизировалось полностью [44]. В то же время, если δ-*N*-метилорнитин яв-

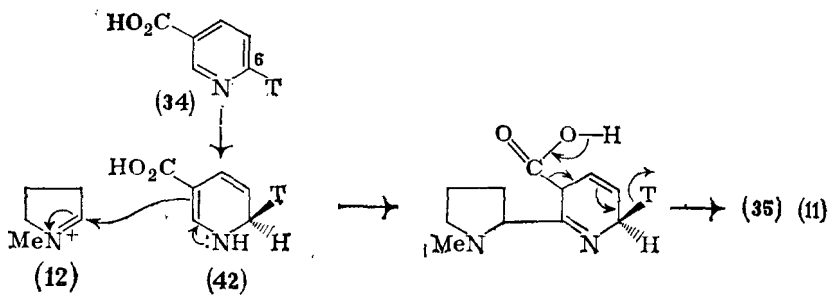
ляется промежуточной стадией между орнитином и никотином, это неизбежно должно привести к несимметричному характеру его включения. Дополнительные осложнения возникли после длительных экспериментов с $^{14}CO_2$, результаты которых свидетельствовали о том, что образование пирролидинового кольца происходит, с одной стороны, через некоторое промежуточное соединение симметричного строения, а с другой — при участии только несимметрично построенных промежуточных веществ. Более тщательное изучение показало, что одни эксперименты приводят к симметричному распределению метки, а другие — к несимметричному [45]. Отсюда следует, что, наиболее вероятно, никотин образуется двумя различными путями или что нормальный биосинтез никотина и, возможно, также тропановых алкалоидов отчасти напоминает путь биосинтеза пиперидиновых алкалоидов (см. разд. 30.1.3); иными словами, вариабельная и(или) неполная десорбция и повторная адсорбция связанного с ферментом путресцина (который образуется путем катализируемого ферментом декарбоксилирования орнитина) приводит к никотину, который частично образуется несимметрично (из путресцина, связанного с ферментом), а частично — симметрично (из путресцина, десорбированного с поверхности фермента и вновь адсорбированного до вступления в дальнейшие превращения). Эту схему можно распространить и на тропановые алкалоиды (несмотря на противоположные результаты работ по включению меченых соединений), если принять, что в этом случае равновесие между связанным и несвязанным путресцином не достигается, и поэтому алкалоиды будут образовываться только несимметричным образом.

Пиридиновое кольцо никотина, как оказалось, образуется из никотиновой кислоты (**34**). Последняя включается в молекулу никотина таким образом, что пирролидиновое кольцо связывается с тем же атомом углерода, который теряет карбоксильную группу. В никотин включается и хинолиновая кислота (**41**); никотиновая кислота (**34**) образуется из кислоты (**41**) и затем реагирует с соединением (**12**), образуя никотин (**35**) [46]. Механизм последней реакции предложен на основании результатов исследования дейтерированных и тритированных производных никотиновой кислоты; они свидетельствуют об отщеплении водорода (и его изотопов) только от С-6. Специфичность реакции обусловлена не гидроксилированием при С-6, поскольку 6-гидроксиникотиновая кислота не является предшественником никотина. Предполагают, что истинным промежуточным соединением в синтезе никотина (**35**) является дигидроникотиновая кислота (**42**) (схема 11) [42].



(10)

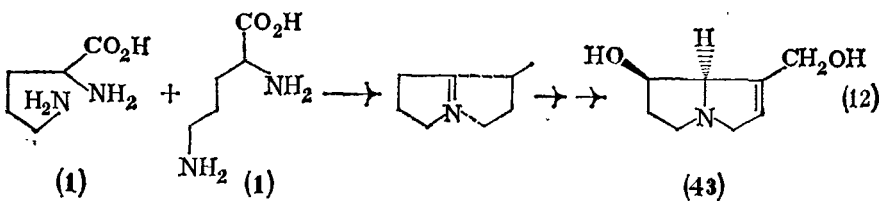
(**38**) (**39**) R = CH_2OH (**40**) R = CHO (**41**)



Установлено, что никотиновая кислота в организмах животных и некоторых микроорганизмах образуется посредством деградации триптофана, тогда как в растениях она синтезируется из аспарагиновой кислоты и глицерина. Точно так же формируется и пиридиновое кольцо никотина (35). Глицерин (39) сначала превращается в глицериновый альдегид (40), который является источником атомов С-4, С-5 и С-6 никотина, а атомы С-2 и С-3 вводятся предшественником, образующимся из аспарагиновой кислоты (38) (см. схему 10) [48].

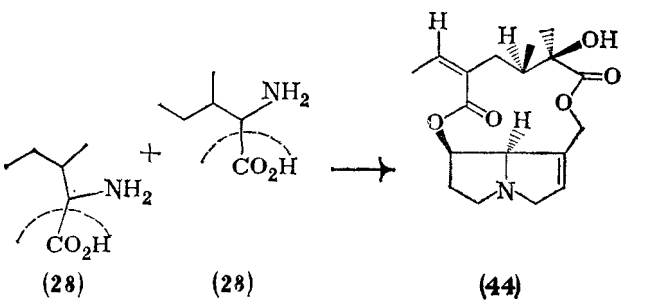
30.1.2.3. Пирролизидиновые алкалоиды

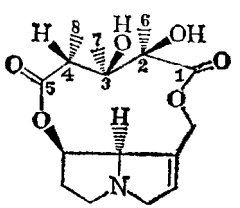
Примером пирролизидиновых алкалоидов может служить сенеционин (44). Установлено, что основной элемент его структуры, ретронецин (43), образуется из орнитина (1) (а также из его предшественника аргинина [49]) (схема 12); в этом сходятся результаты, полученные различными группами исследователей. Однако в работах одной группы показано, что образование алкалоидов из орнитина идет через несимметричное промежуточное соединение [50], в работах другой — через симметричное, по меньшей мере для одного цикла [51] (ср. приведенное выше обсуждение биосинтеза никотина; объяснение может быть аналогичным). Для выяснения и уточнения биосинтеза ретронецина, очевидно, необходимы дальнейшие исследования.

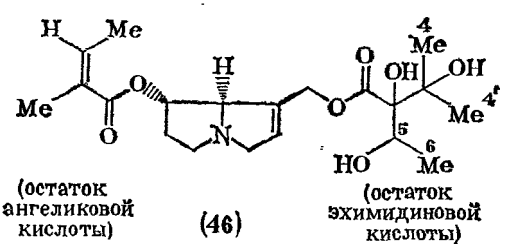


Сенеционин (44) и родственные алкалоиды построены из остатков ретронецина и нециевых кислот; имеющиеся данные свидетельствуют о том, что последние во всех случаях образуются из α-аминокислот с разветвленной боковой цепью, но механизм этого процесса неизвестен. C_{10}-Нециевые кислоты типа сенециевой кислоты, входящей в состав алкалоидов типа сенеционина (44), об-

разуются из двух остатков *L*-изолейцина (28) (схема 13); предшественником сенециевой кислоты является также треонин, причем, судя по характеру распределения метки, сначала он превращается в изолейцин [52]. Установлено, что сходным путем образуется монокроталовая кислота, составная часть монокроталина (45); в этом случае изолейцин является источником атомов С-1, С-2, С-3, С-6 и С-7. Остальные атомы (С-4, С-5 и С-8), скорее всего, образуются из пропионовой кислоты [53]. Остаток ангеликовой кислоты в гелиосупине (46) имеет такое же происхождение, как и ее геометрический изомер, тиглиновая кислота, которая входит в состав некоторых тропановых алкалоидов и образуется из изолейцина [54] (см. разд. 30.1.2.1). Остаток эхимидиновой кислоты в гелиосупине частично образуется из другой аминокислоты с разветвленной боковой цепью, валина [54]. Эта аминокислота ответственна за весь углеродный скелет эхимидиновой кислоты, за исключением атомов С-5 и С-6.

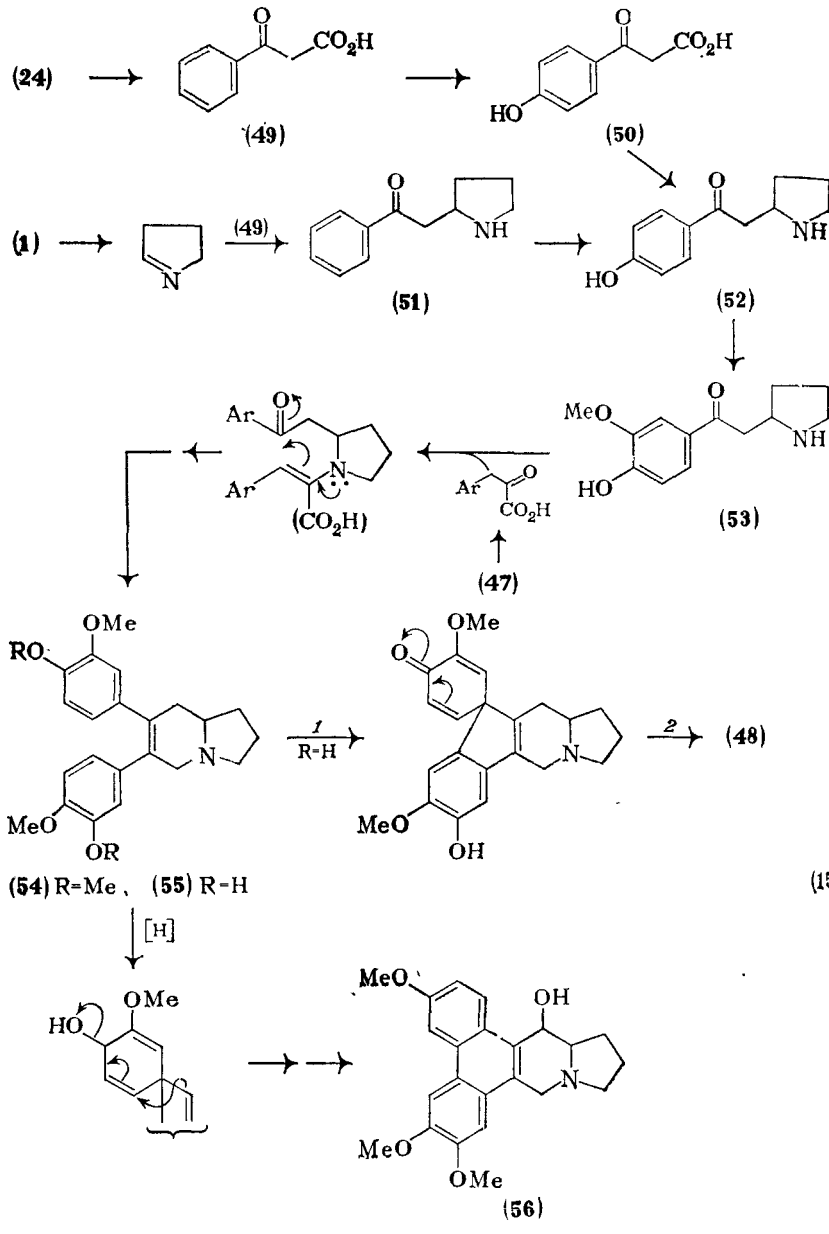






30.1.2.4. Фенантроиндолизидиновые алкалоиды

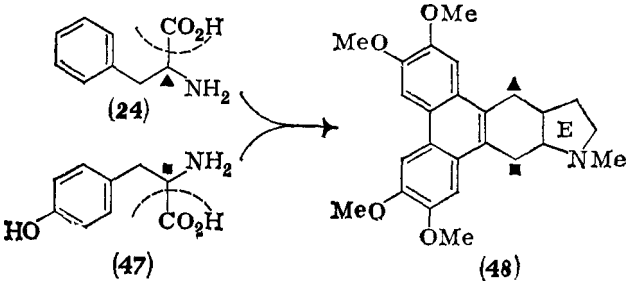
Фенантроиндолизидиновые алкалоиды, например тилофорин (56), в настоящем обзоре рассматриваются в разделе пирролидиновых алкалоидов, поскольку промежуточными соединениями в их биосинтезе являются 2-фенацилпирролидины, например соединение (51). Алкалоиды этой группы являются пятичленными аналогами некоторых пиперидиновых алкалоидов типа седамина (см. разд. 30.1.3.1) и имеют также сходство с гигрином (2). В соответствии с этим, из орнитина, очевидно, формируется кольцо Е тилофорина (48), но основная часть молекулы синтезируется из аро-



(15)

1-окислительная конденсация, *2*-перегруппировка и метилирование

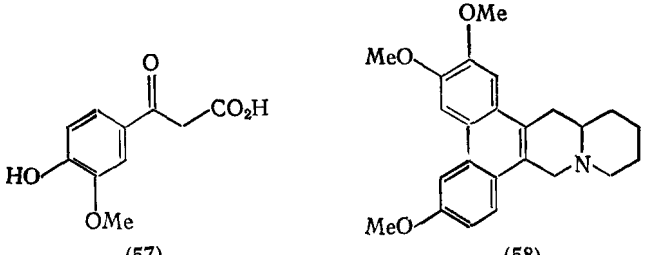
матнческих аминокислот **фенилаланина (24)** и **тирозина (47)** (схема 14) [55].



(14)

Включение в тилофоринин (56) интактных молекул 2-фенацилпирролидинов (51), (52) и (53), а также кетокислот (49) и (50), но не (57), позволило предложнть часть путн его биосинтеза (см. схему 15) [56]. О последующих стадиях биосинтеза тилофоринина можно судить по наличию в природных источниках септицина (54), а также на основании различного распределения кислородсодержащих заместителей в соединениях, родственных тилофорининну (56); вероятными способами превращения соединений типа септицина в алкалоиды типа тилофоринина (см. схему 15) являются реакции с участием енаминов и фенольные конденсации (см. разд. 30.1.1).

Биосинтез хинолизидиновых алкалоидов, например, криптоплеврина (58), пока не изучался, но, возможно, он аналогичен биогенезу фенантроиндолизидиновых оснований, поскольку их структуры очень близки и поскольку в природных источниках встречаются шестичленные аналоги соединений (53) и (54).



30.1.3. БИОСИНТЕЗ ПИПЕРИДИНОВЫХ И ПИРИДИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ

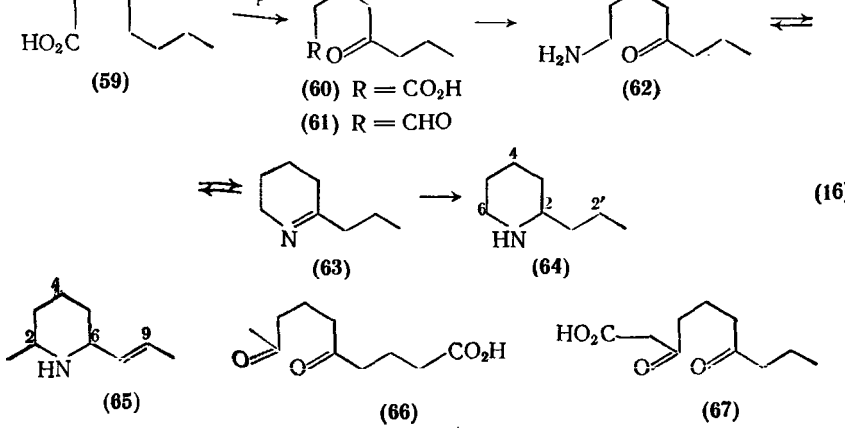
30.1.3.1. Простые пиперидиновые основания

Примерами простых пиперидиновых оснований могут служить *N*-метилпельтьерин (70) и алкалоид болиголова крапчатого кониин (64). Сходство структур этих соединений предполагает сходный биогенез, однако эксперименты с мечеными соединениями

показали, что *N*-метилпельтьерин образуется из лизина и ацетата, и углеродный скелет кониина формируется исключительно из ацетата.

Включение метки из [1-^{14}C]ацетата в чередующиеся атомы C-2′, C-2, C-4 и C-6 кониина указывает на его происхождение из C_8-поликетида или его эквивалента [57]. В таком случае вероятным промежуточным соединением является 5-оксооктановая кислота (**60**); действительно, эксперименты с мечеными соединениями показали, что кислота (**60**) и соответствующий альдегид (**61**) участвуют в биосинтезе кониина [58]. В ходе этих исследований неожиданно выяснилось, что предшественником кониина является также октановая кислота (**59**). Отсюда следует, что кониин образуется путем окисления жирной C_8-кислоты (октановой), а не путем восстановления C_8-поликетида. Если эти выводы верны, то кониин представляет собой уникальное явление в сфере вторичного метаболизма, поскольку до сих пор не известно ни одного другого метаболита (за исключением полиацетиленов), который синтезировался бы по ацетатному пути из жирной кислоты.

Логически представляется наиболее вероятным, что следующим промежуточным соединением в биосинтезе кониина после альдегида (**61**) является продукт трансаминирования (**62**), находящийся в равновесии с γ-коницеином (**64**) (также обнаруженным в болиголове). Веское свидетельство в пользу такого предположения [а также в пользу участия соединения (**61**)] получено после выделения из болиголова двух ферментов, один из которых катализирует превращение альдегида (**61**) в γ-коницеин (**63**) в присутствии аланина [59], а другой — превращение (**63**) в кониин (**64**) [60]. Более того, эксперименты с мечеными соединениями показывают, что реакция превращения коницеина (**63**) в кониин (**64**) легко обратима [58, 61]. Наконец, с помощью $^{14}CO_2$ была подтверждена последовательность превращений (**63**)→(**64**)→*N*-метилкониин [62].



(59) (60) R = CO_2H (61) R = CHO (62) (63) (64) (65) (66) (67)

(16)

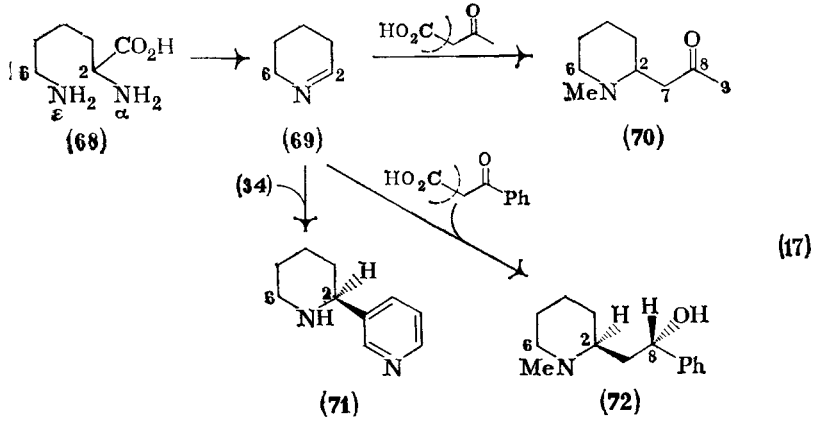
Алкалоид пинидин (65) по структуре напоминает кониин и образуется также исключительно из ацетата [63]; его углеродный скелет построен простейшим линейным способом: метка из [1-^{14}C]ацетата переходит в С-2, С-4, С-6 и С-9 алкалоида. Однако решение вопроса о потенциальных непосредственных предшественниках в случае пинидина не так просто, как в случае кониина, поскольку образование пинидина, очевидно, сопровождается потерей C_1-звена (карбоксильной группы), от одной из концевых группировок C_{10}-цепи. Следовательно, предшественниками могут быть как соединение (66), так и кислота (67). Положение осложняется тем, что незначительное включение метки в пинидин наблюдалось при использовании как соединения (66), так и продукта декарбоксилирования соединения (67), а также декановой кислоты. Все же наиболее вероятным предшественником является соединение (66), а не (67), поскольку добавление вместе с диэтил[1-^{14}C]малонатом немеченого ацетата натрия снижает удельную радиоактивность при С-2; следовательно, диэтилмалонат должен входить в состав «стартового» ацильного звена [64].

Пути биосинтеза кониина и пинидина представляют собой исключение из общих правил биогенеза алкалоидов. Предполагаемый путь биосинтеза *N*-метилпельтьерина (70) более типичен для пиперидиновых алкалоидов, так как в нем важную роль играет аминокислота лизин (68). Различные данные указывают на сходство путей биосинтеза *N*-метилпельтьерина, седамина (72) и аналога никотина, анабазина (71); поэтому целесообразно рассмотреть одновременно образование всех трех алкалоидов.

Изучение различных меченых лизинов позволило достаточно точно определить степень и тип ассимиляции этой аминокислоты алкалоидами. Так, атомы С-2 и С-6 предшественника становятся атомами С-2 и С-6, соответственно, в основаниях (70) [65, 66], (72) [67, 68] и (71) [69] (схема 17). Следовательно, включение лизина должно протекать таким образом, чтобы эти атомы сохранили свою химическую «индивидуальность» в ходе всего биосинтеза; в частности, исключается образование симметричных промежуточных соединений типа кадаверина (77). Тритий при С-2 и С-6 лизина сохраняется в седамине (72) [67]. Отсюда следует важный вывод (подтвержденный изучением включения меченного ^{15}N лизина [70]), что в ходе образования алкалоида сохраняется аминогруппа при С-6, и, следовательно, теряется аминогруппа при С-2. Этот процесс может быть связан с элиминированием карбоксильной группы при условии, что никакие превращения в этом центре не затрагивают протон при С-2. Как именно это происходит, мы рассмотрим позднее.

Фрагменты углеродных скелетов соединений (70), (71) и (72), происхождение которых не связано с лизином, образуются следующим образом. C_3-Боковая цепь *N*-метилпельтьерина (70) синтезируется из ацетата, включающегося, вероятно, в виде ацетоацетата (метка из [1-^{14}C]ацетата переходит в С-8, а из [2-^{14}C]аце-

тата — в С-7 и С-9 алкалоида) [66]. Боковая цепь седамина образуется из фенилаланина, вероятно, через промежуточную коричную кислоту [68]. Бензоилуксусная кислота, обычный продукт трансформации коричной кислоты, также может считаться промежуточным соединением в биосинтезе этого алкалоида (ср. фенантроиндолизидиновые алкалоиды, разд. 30.1.2.4, и рассматриваемый ниже лобелин). Пиридиновое кольцо анабазина (**71**), как и в случае никотина (см. разд. 30.1.2.2), образуется из никотиновой кислоты (**34**); последняя, разумеется, синтезируется из тех же предшественников, что и в ходе биосинтеза никотина [71].



(17)

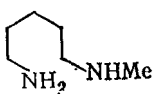
Можно с достаточным основанием полагать, что формирование молекулы анабазина из трансформированного лизина и никотиновой кислоты осуществляется аналогично синтезу никотина (см. разд. 30.1.2.2) с тем отличием, что в конденсации с дигидроникотиновой кислотой вместо *N*-метил-Δ^1-пирролина (**12**) участвует Δ^1-пиперидеин (**69**) (ср. схему 11). Это предположение подтверждено специфическим включением [6-^{14}C]-Δ^1-пиперидеина в анабазин (**71**) с сохранением метки только при С-6 [72]. Альтернативная конденсация Δ^1-пиперидеина (**69**) с β-кетокислотами приводит к седамину (**72**) и *N*-метилпельтьерину (**70**) (см. схему 17).

Установлено, что кадаверин (**77**), подобно лизину, является предшественником пиперидиновых колец в анабазине, седамине, *N*-метилпельтьерине и псевдопельтьерине (**73**) [73]. Симметричный кадаверин, однако, не может быть промежуточным соединением в процессе превращения лизина в пиперидиновые алкалоиды, так как в этом случае будет потеряна химическая индивидуальность атомов С-2 и С-6 аминокислоты, что противоречит результатам работ с мечеными соединениями. Предполагали, что сохранение индивидуальности этих атомов обеспечивается *N*-метилированием, т. е. сначала из лизина образуется ε-*N*-метиллизин, а затем *N*-метилкадаверин (**74**) (аналогично биосинтезу пирролидиновых алкалоидов). Последующие эксперименты, однако, не подтвердили это

предположение. Во-первых, хотя ε-*N*-метиллизин сосуществует с седамином (**72**) в одном и том же растительном источнике (*Sedum acre*), соотношение удельных радиоактивностей изотопов ^{3}H и ^{14}C при его образовании из [6-^{3}H]лизина и [Me-^{14}C]метионина настолько отличается от соотношения тех же изотопов в образующемся одновременно седамине, что возможность существования между этими двумя соединениями взаимосвязи типа «предшественник — продукт» исключается [73а, 74]. Кроме того, не удалось доказать наличие *N*-метилкадаверина в растениях видов *Sedum* и *Nicotiana glauca* (источник анабазина) [73а]. Во-вторых, если бы ε-*N*-метиллизин был предшественником алкалоида, то такую же роль должен был бы играть и *N*-метил-Δ^1-пиперидеин (**75**). Однако хотя из меченого (**75**) образуются анабазин (**71**) и *N*-метиланабазин, последний не является природным алкалоидом, поскольку он сохраняет всю специфическую активность предшественника, но не включает метку из [2-^{14}C]лизина в параллельном эксперименте. Следовательно, трансформация (**75**) в алкалоиды представляет собой некую биохимическую аномалию [75].



(73)



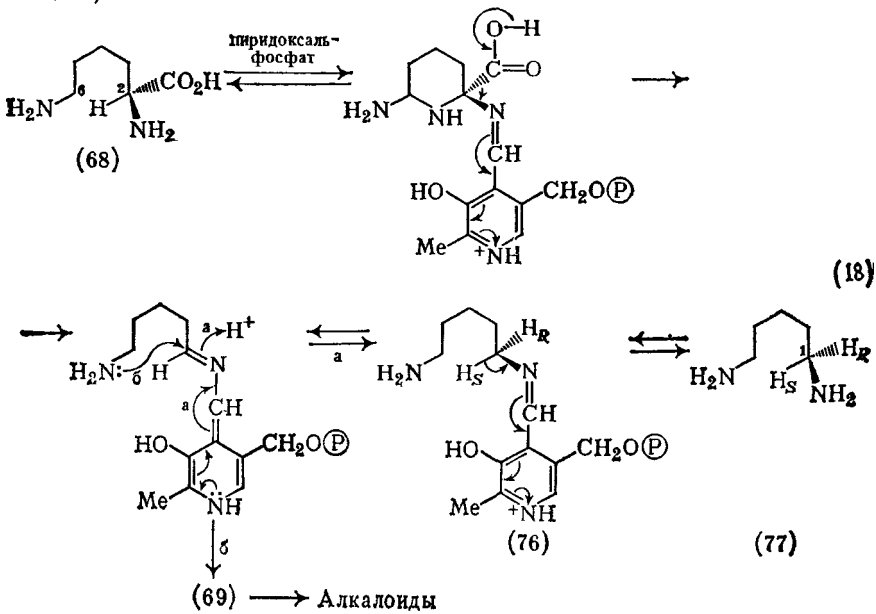
(74)



(75)

В работе [73а] было предложено исключительно простое и вполне удовлетворительное решение проблемы включения лизина и кадаверина, согласующееся со всеми экспериментальными фактами, в том числе и с сохранением различия между атомами, включенными из С-2 и С-6 лизина, а также с возможностью включения кадаверина (**77**). В его основе лежит катализируемое ферментом декарбоксилирование лизина, протекающее через обычные промежуточные соединения лизина с пиридоксальфосфатом (схема 18). Это предположение тем более привлекательно, что оба фермента (*L*-лизиндекарбоксилаза и диаминоксидаза), участвующие, вероятно, в превращении лизина в Δ^1-пиперидеин, в качестве кофермента используют пиридоксальфосфат. В этом случае промежуточное соединение (**76**) может образовываться не только из лизина, но и из кадаверина (**77**), и может превращаться в последний. Таким образом удовлетворительно объясняется включение в пиперидиновые алкалоиды (**70**), (**71**) и (**72**) как лизина (**68**), так и кадаверина (**77**). Существенно, что если кадаверин, образующийся из лизина, связан с ферментом, то сохраняется необходимое различие между атомами С-2 и С-6, которое передается в Δ^1-пиперидеин (**69**) и, следовательно, в алкалоиды. Наличие равновесия связанного с ферментом кадаверина со свободным кадаверином привело бы к утрате этого различия; поэтому

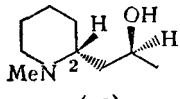
постулируется, что в ходе нормального биосинтеза алкалоидов такое равновесие не имеет места. Однако, как будет показано ниже, существуют некоторые пиперидиновые алкалоиды, образующиеся из лизина таким образом, что атомы, происходящие от C-2 и C-6 этой аминокислоты, становятся эквивалентными. В рамках рассматриваемой гипотезы этот факт легко объясняется, если допустить наличие равновесия между (73) и несвязанным кадаверином. (Как указывалось в разд. 30.1.2, эта гипотеза в несколько измененном виде применима и к биосинтезу пирролидиновых алкалоидов.)



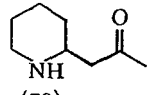
В свете рассмотренной гипотезы кадаверин (77) является нормальным предшественником пиперидиновых алкалоидов. Доказано, что его включение в *N*-метилпельтьерин сопровождается стереоспецифическим элиминированием одного из протонов при C-1 [*pro*-(*S*)-атома водорода] (см. схему 18) [73а, 76].

Стереоспецифичность наблюдается и при превращении лизина в пиперидиновые алкалоиды; действительно, *L*-лизин является более эффективным предшественником, чем *D*-изомер при биосинтезе седамина (72), соединений (71) и (70), *N*-метилаллоседридина (78) (имеющего противоположную седамину конфигурацию при C-2) и ликоподина (99) (образующегося из лизина через симметричный интермедиат; см. ниже). Напротив, широко распространенная в растениях, животных и микроорганизмах пипеколиновая кислота (81) образуется преимущественно из *D*-лизина [77, 78]. Существенно, что биосинтез [67, 69] пипеколиновой кислоты (81)

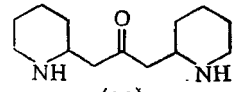
(схема 19) отличается от пути биосинтеза, ведущего к пиперидиновым алкалоидам (см. схему 17).



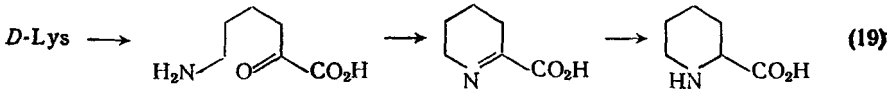
(78)



(79)



(80)

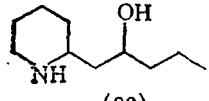


(81)

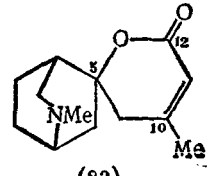
(19)

Следует подчеркнуть, что это всего лишь второй случай изучения хиральности α-центра аминокислоты в биосинтезе растительных алкалоидов (первый относится к алкалоидам *Amaryllidaceae*, где не было обнаружено различия между включением *L*- и *D*-тирозина в норплювиин и ликорин [80]); в то же время имеется большое число работ такого рода по биосинтезу продуктов метаболизма микроорганизмов.

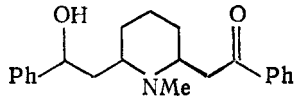
По аналогии с биосинтезом тропановых алкалоидов (см. разд. 30.1.2.1) можно было бы ожидать, что для анаферина (80) и псевдопельтьерина (73) характерен близкий генезис через промежуточное соединение типа *N*-метилпельтьерина. Действительно, *N*-метилпельтьерин (70) является предшественником псевдопельтьерина (73), а пельтьерин (79) — анаферина (80). Более того, с таким путем биогенеза согласуются способы включения лизина и ацетата [66]. Основание (82) также образуется из лизина с обычным сохранением индивидуальности атомов С-2 и С-6 аминокислоты. Боковая цепь из пяти атомов углерода должна синтезироваться из ацетата, однако до сих пор не удалось доказать, что [2-^{14}C]ацетат включается в нее [81]. С определенными трудностями столкнулись и при изучении диоскорина (83) [82]. Ацетат удалось включить в виде C_7-звена (метка из [1-^{14}C]ацетата в равной мере переходила в С-5, С-10 и С-12), но лизин и Δ^1-пиперидеин, которые должны были бы использоваться для построения оставшейся части углеродного скелета (выделена жирными линиями), не передавали метки в (83). Судя по структуре диоскорина (83), промежуточным веществом в его биосинтезе, как и в случае многих других пиперидиновых алкалоидов, мог бы служить пельтьерин (79).



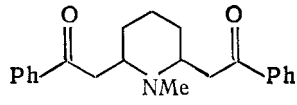
(82)



(83)



(84)

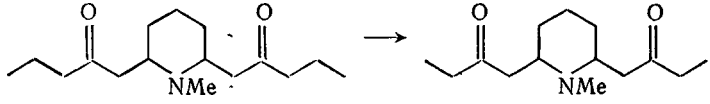


(85)

8-Фениллобелол-I, отличающийся от седамина (72) только конфигурацией при С-8, содержится в *Lobelia inflata* наряду с лобелином (84). Можно предполагать, что биосинтез этих оснований также протекает рассмотренным выше путем. Действительно, лизин и Δ^1-пиперидеин (69) являются предшественниками лобелина [83, 84]. Однако в отличие от седамина (72), включение лизина в (84) происходит таким путем, что атомы С-2 и С-6 аминокислоты становятся эквивалентными; это свидетельствует о симметричном строении по меньшей мере одного промежуточного соединения, образующегося в ходе биосинтеза [83]. Почти симметричная структура лобелина предполагает симметризацию на одной из последних стадий, что подтверждается высокоэффективным включением «симметричного» лобеланина (85) [85], а также меньшей эффективностью включения кадаверина (77) по сравнению с лизином [84].

Правомерно допустить, что лобелин (84) и лобеланин (85) образуются в результате двух последовательных реакций присоединения бензоилуксусной кислоты к Δ^1-пиперидеину (69). Это предположение подтверждается фактом региоспецифичного включения изотопной метки в обе боковые цепи лобелина при использовании в качестве меченых предшественников (84) соединений, являющихся предшественниками бензоилуксусной кислоты: фенилаланина, коричной кислоты и 3-гидрокси-3-фенилпропионовой кислоты [83, 84].

Известны и такие алкалоиды из рода *Lobelia*, у которых боковые цепи содержат четыре атома углерода; это отличает их от алкалоидов типа *N*-метилпельтьерина (70), для которых характерны боковые цепи из трех атомов С. Распределение метки в алкалоидах вышеуказанного типа при подпитке растений растворами меченого лизина или ацетата показывает, что образование боковых C_4-цепей может происходить в результате укорочения соответствующих C_5-цепей, например по типу превращения (86) в (87) [84].

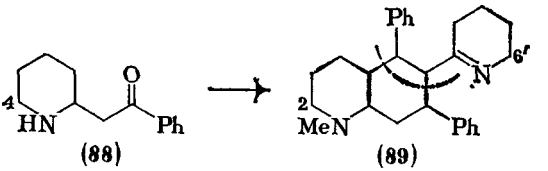


(20)

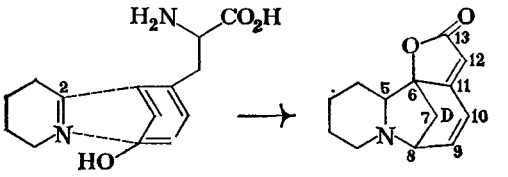
(86) (87)

Более сложным алкалоидом *Lobelia* является лобиналин (89), но сложность его структуры обманчива. В самом деле, если рассечь формулу (89) так, как показано пунктирной линией, становится понятным происхождение лобиналина из двух остатков типа

седамина (12). Эта гипотеза подтверждается специфическим включением фенилаланина, коричной кислоты и лизина в обе «половины» алкалоида. Метка появляется в ожидаемых местах, причем при включении лизина сохраняется различие между атомами С-2 и С-6 аминокислоты, а между двумя «половинами» молекулы алкалоида радиоактивность распределяется поровну. Окончательно эта «димерная» гипотеза и весь путь биосинтеза алкалоида были доказаны включением [4-^{14}C]-2-фенацилпиперидина (88) с равным распределением метки между атомами С-2 и С-6′ алкалоида (89) [86].



(21)

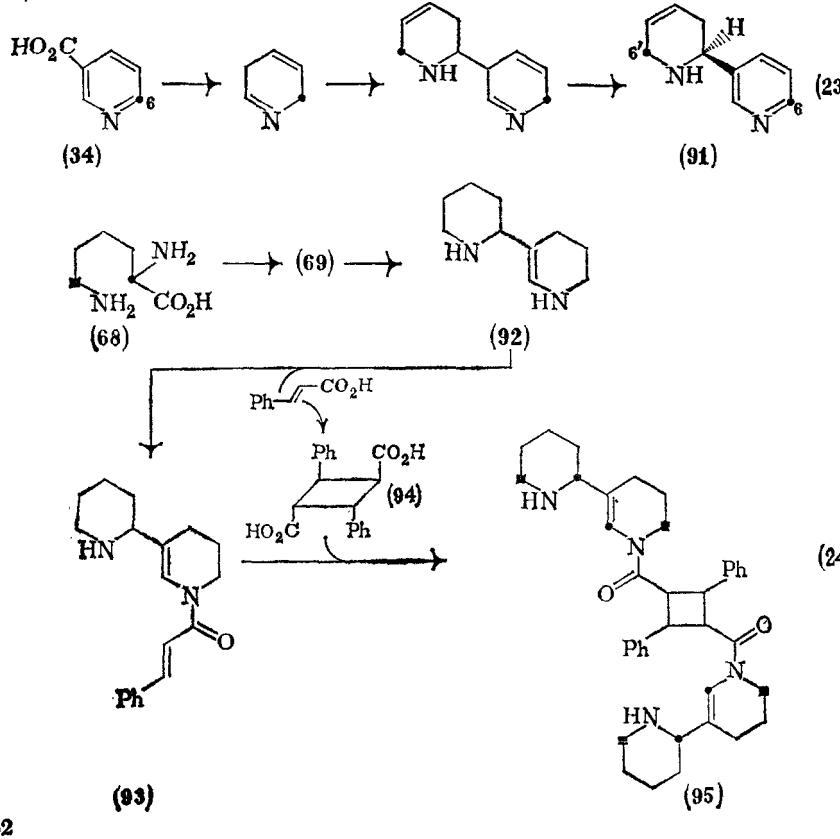


(22)

Общим элементом путей биосинтеза многих пиперидиновых алкалоидов, как было показано выше, является стадия конденсации β-кетокислоты с Δ^1-пиперидеином, в результате которой образуются либо алкалоиды, либо промежуточные соединения типа (79) и (88). Существуют и исключения из этого правила; одним из них является анабазин (71), другие будут рассмотрены ниже. В частности, оригинальным путем образуется секуренин (90), чему, вероятно, способствует его уникальная тетрациклическая структура. Известно, что атомы углерода от С-6 до С-13 секуренина (90) образуются из тирозина (47) [87, 88], но механизм такой трансформации тирозина совершенно не ясен. Установлено, что на одной из стадий биосинтеза секуренина происходит конденсация с Δ^1-пиперидеином (69), универсальным промежуточным соединением в биосинтезе пиперидиновых алкалоидов, поскольку и (69), и лизин, и кадаверин являются специфическими предшественниками пиперидинового кольца секуренина, в которое они включаются так, как этого и следовало ожидать: метка при С-2 из первых двух предшественников занимает положение С-5 в алкалоиде и тем самым определяет ориентацию двойной связи в Δ^1-пиперидеине [89]. Интересно отметить, что секуренин (90) является единственным известным основанием с атомом азота, общим для двух циклов, в ходе биосинтеза которого лизин включается несимметрично [89].

30.1.3.2. Алкалоиды, структурно родственные анабазину

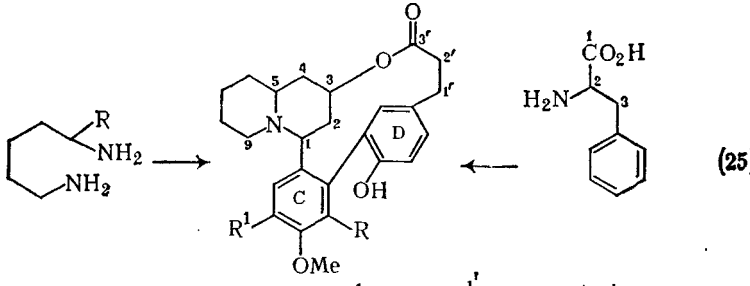
Анатабин (**91**) и тетрагидроанабазиновые алкалоиды аденокарпин (**93**) и сантиагуин (**95**) структурно близки к анабазину (**71**) (анабазин и анатабин даже содержатся в одном и том же растении), однако их биогенез заметно различен. Это особенно удивительно при сравнении структур анатабина (**91**) и анабазина (**71**); тем не менее ни известный предшественник анабазина лизин (см. разд. 30.1.3.1), ни 4-гидроксилизин не включаются в анатабин (**91**), а результаты экспериментов с $^{14}CO_2$ показывают, что анабазин также не является предшественником анатабина. В то же время из [6-^{14}C]никотиновой кислоты (**34**) образуется радиоактивный анатабин [90], но активность в равной мере распределяется между атомами C-6 и C-6′ алкалоида. Отсюда следует, что никотиновая кислота (**34**) является источником обоих колец алкалоида, в отличие от анабазина, где из нее образуется только одно кольцо. Равное распределение метки говорит о близком сходстве (если не идентичности) двух звеньев, из которых формируется молекула анатабина (**91**). Предложенный путь биосинтеза приведен на схеме (23).



Тетрагидроанабазиновые звенья аденокарпина (**93**) и сантиагуина (**95**) строятся различными путями. Лизин (**68**) включается во все четыре пиперидиновых кольца сантиагуина (**95**) без участия симметричного промежуточного соединения [91]. Более близкими предшественниками основания (**95**) являются Δ^1-пиперидеин (**69**) [91] и аденокарпин (**93**) [92]. Предшественником (**95**) может считаться и димер пиперидеина (**92**), поскольку он выполняет роль промежуточного соединения в биосинтезе аденокарпина (**93**) [93]. Сантиагуин (**95**) образуется путем [2π + 2π]-димеризации аденокарпина; возможен и другой, очевидно, менее важный путь, заключающийся в конденсации труксилловой кислоты (**94**) с димером (**92**). В свою очередь, труксилловая кислота (**94**) синтезируется из фенилаланина через коричную кислоту [91, 92].

30.1.3.3. Алкалоиды Lythraceae

Для алкалоидов Lythraceae криогенина (**96**) и декодина (**97**) характерно звено C_6—C_3, которое может образовываться из 4-гидроксикоричной кислоты. Это звено [кольцо *D* и боковая цепь в (**96**)] путем окислительной конденсации (см. разд. 30.1.1), очевидно, может быть соединено со вторым окисленным ароматическим звеном [кольцо С в (**96**)]; при этом не ясно, однако, сколько углеродных атомов последнего звена участвуют в биосинтезе хинолизидинового кольца этих алкалоидов. От этого зависит также и ответ на вопрос о происхождении других атомов кольцевой системы.



(25)

(**68**) R= CO_2H (**96**) R= H, R^1= OMe, $\Delta^{1'}$ (**24**)

(**77**) R= H (**97**) R= OH, R^1= H

(**98**) R= H, R^1= OMe

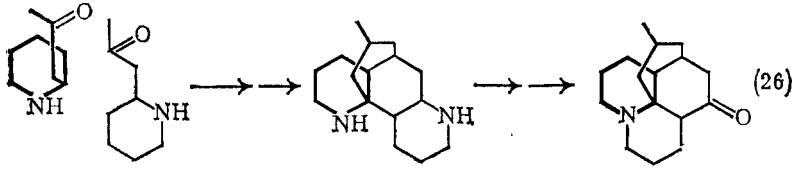
Из [1,3-$^{14}C_2$] фенилаланина (**24**) образуется [94] декодин (**97**) с мечеными С-1′, С-3′ и С-1. Следовательно, эта аминокислота является источником кольца D и атомов С-1′, С-2′ и С-3′, а также кольца С и атома С-1. Очевидно, атом С-3 возникает не из фенилаланина, но на вопрос о происхождении С-2 эти результаты не дают ответа. При рассмотрении возможных путей биосинтеза остальных частей молекулы ясно, что наиболее вероятным пред-

шественником является пельтьерин (79), в этом случае источником С-2 служит не фенилаланин, а ацетат.

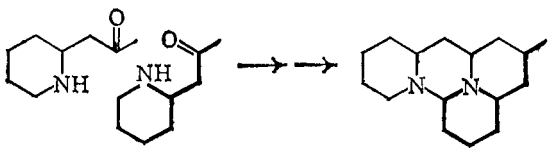
Лизин (68) включается в состав декодина (97) и децинина (98) таким образом, что метка от С-2 или С-6 аминокислоты оказывается в равной мере распределенной между С-5 и С-9 в молекулах алкалоидов [95]. Следовательно, утилизация лизина должна проходить через некоторое симметрично построенное соединение, возможно, через кадаверин (77). Этот вывод противоречит способу включения лизина в другие пиперидиновые алкалоиды, но согласуется с рассмотренной выше гипотезой (см. схему 18), объясняющей включение лизина и кадаверина в такого рода основания (см. разд. 30.1.3.1).

30.1.3.4. Алкалоиды Lycopodium

Биосинтез сложных в структурном отношении алкалоидов Lycopodium, например ликоподина (99) и цернуина (100), оказывается довольно простым, если считать, что при этом происходит димеризация двух пельтьериновых звеньев (79) (схемы 26, 27). Это подтверждается результатами изучения включения меченых ацетата, лизина и Δ^1-пиперидеина (69) в ликоподин (99) [96, 97] и цернуин (100) [98], в молекулах которых метки располагались именно там, где и ожидалось (ср. биосинтез алкалоидов, родственных пельтьерину, разд. 30.1.3.1). Эти алкалоиды, однако, как и алкалоиды Lythraceae (см. разд. 30.1.3.3), в отличие от простых пиперидиновых алкалоидов, синтезируются из лизина через некоторое симметрично построенное промежуточное соединение. Роль последнего может выполнять кадаверин, что подтверждается специфическим включением этого диамина в молекулы алкалоидов (99) и (100) [96, 98, 99].



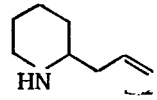
(79) (79) (99) (26)



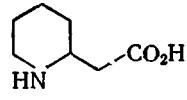
(100) (27)

Наиболее удивительным результатом исследований было равномерное включение лизина, кадаверина и Δ^1-пиперидеина в оба предполагаемых остатка пельтьерина (C_8N). Таким образом было

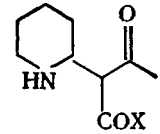
получено веское свидетельство в пользу «димерной» гипотезы (см. схемы 26, 27), но решающим тестом было изучение в роли предшественника самого пельтьерина. Результаты такого изучения оказались совершенно неожиданными: хотя пельтьерин включался целиком, метка переходила только в одно из C_8N-звеньев (выделено жирными линиями) ликоподина (**99**) [97] и цернуина (**100**) [98]. Впоследствии методом изотопного разведения было показано, что пельтьерин является нормальным метаболитом растения, на котором изучался биосинтез ликоподина, и что пельтьерин образуется из тех же предшественников, что и ликоподин. Кроме того, было установлено, что немеченый пельтьерин при введении вместе с радиоактивным кадаверином или Δ^1-пиперидеином очень эффективно снижает активность в одном из C_8N-звеньев (выделенном жирными линиями) ликоподина (**94**), предшественником которого он является [99]. Отсюда следует, что пельтьерин действительно является промежуточным соединением в биосинтезе ликоподина (и цернуина), но в отличие от ацетата, лизина и Δ^1-пиперидеина он участвует в биосинтезе только одного звена. Поскольку метка из лизина и Δ^1-пиперидеина переходит в одинаковой степени в оба C_8N-звена при биосинтезе алкалоидов (**99**) и (**100**), то встраивающимся в них вторым C_8N-звеном должно быть очень близкое пельтьерину соединение (значительное различие в структурах означало бы различные пути биосинтеза и, следовательно, неравномерное включение метки в оба C_8N-звена). Эти результаты свидетельствуют в пользу «димерного» пути биосинтеза, но в модифицированном виде. Не так просто, однако, предложить конкретный вариант схемы биосинтеза, который согласовывался бы со всеми экспериментальными данными. Предлагавшиеся в качестве возможных промежуточных соединений основания (**101**) и (**102**) не выдержали экспериментальной проверки [77, 99]. Таким образом, эта задача так и осталась нерешенной. Предполагают, что возможным источником второго C_8N-звена может быть соединение (**103**), образующееся при конденсации Δ^1-пиперидеина (**69**) с ацетоацетатом и логически являющееся непосредственным предшественником пельтьерина (ср. схему 2); это предположение еще не проверено.



(**101**)



(**102**)

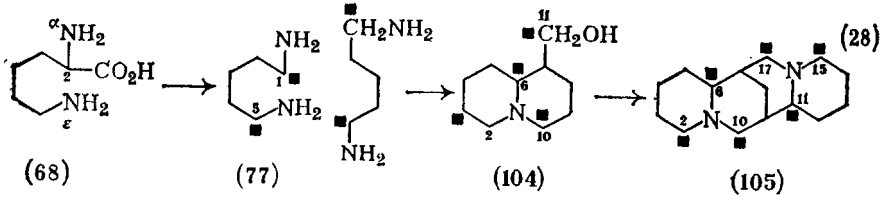


(**103**)

30.1.3.5. Хинолизидиновые алкалоиды

Простейшим хинолизидиновым алкалоидом является лупинин (**104**). Специфическое включение [100] [1,5-$^{14}C_2$]кадаверина (схема 28) свидетельствует об его образовании из двух молекул

кадаверина (77) (ср. разд. 30.1.2.3). Тетрациклическое основание спартеин (105), как и лупинин, является основным алкалоидом горького желтого люпина и, возможно, образуется сходным путем из кадаверина (77). Действительно, по одной шестой от удельной радиоактивности [1,5-$^{14}C_2$]кадаверина переходит в атомы С-2, С-15 и С-17 спартеина; еще по одной шестой от исходной радиоактивности в таком случае должно приходиться на атомы С-6, С-10 и С-11 [101, 102]. При включении [2-^{14}C]лизина в лупинин (104) [103] и спартеин (105) [101] метка локализуется в тех же центрах, что и при включении кадаверина. Следовательно, в данном случае, как и во всех пиперидиновых алкалоидах с атомом азота, общим для двух циклов (за исключением секуренина, см. выше), лизин (68) включается через промежуточное симметричное соединение, которым, скорее всего, является кадаверин (77) (более полный анализ вероятного механизма включения этих предшественников описан в разд. 30.1.3.1).

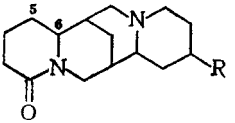


Из [2-^{14}C,ε-^{15}N]- и [2-^{14}C,α-^{15}N]лизина в спартеин (105) переходит в три раза больше ^{14}C, чем ^{15}N. Это согласуется с происхождением спартеина из кадаверина: именно таким должно быть отношение ^{14}C : ^{15}N, если учесть, что в (105) включаются три остатка лизина (или кадаверина) и только два атома азота [101, 104]. Другими доказательствами роли кадаверина как промежуточного соединения в биосинтезе алкалоидов этого типа служат выделение меченого кадаверина из люпинов после их подкормки меченым лизином [105], а также подавление включения меченого лизина [в термопсин (108)] неактивным кадаверином [106].

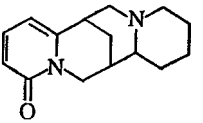
Очевидная взаимосвязь между лупинином (104) и спартеином (105) подтверждается тем фактом, что лупинин является предшественником тетрациклического основания (105) [107].

Лупанин (106) служит предшественником [107, 108] 11-гидроксилупанина (107); оба эти алкалоида образуются из трех молекул лизина через кадаверин [109]. Предполагали [108], что лупанин (106) образуется непосредственно из спартеина (105), однако в экспериментах с $^{14}CO_2$ не наблюдалось корреляции между радиоактивностью соединений (105) и (106) [110]. Напротив, эти опыты показали, что генезис лупанина (106) не связан с образованием спартеина (105) [110]. Основание (106) трансформируется сначала в 5,6-дегидропроизводное и затем в основания с пиридоновым кольцом, например, термопсин (108). Более того, ра-

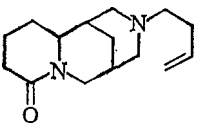
диоактивность из $^{14}CO_2$ появляется в тетрациклических алкалоидах раньше, чем в трициклических, например в (**109**) и (**110**); отсюда следует, что трициклические основания образуются путем деградации тетрациклических. Оказалось также, что ромбифолин (**109**) играет важную роль в синтезе цитизина (**110**) и *N*-метилцитизина. (Эти выводы были подтверждены также экспериментами [106] с [2-^{14}C]лизином.)



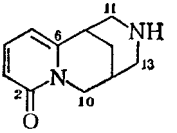
(**106**) R= H
(**107**) R= OH



(**108**)



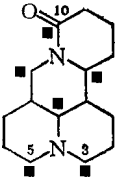
(**109**)



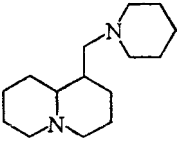
(**110**)

В соответствии с гипотезой о происхождении цитизина (**110**) из тетрациклических предшественников [через промежуточно образующийся ромбифолин (**109**)], в этот алкалоид специфически, в С-2 и С-11, переходит одна пятая активности [2-^{14}C]лизина и [1,5-$^{14}C_2$]кадаверина (считается, что оставшаяся активность переходит в С-6, С-10 и С-13) [111].

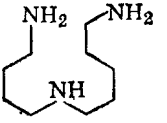
Тетрациклический алкалоид матрин (**111**) отличается от спартеина (**105**) типом полициклической системы, но также образуется из трех молекул лизина через промежуточный кадаверин [зачерненным квадратом, как и в схеме (28), указаны места включения ^{14}C] [112, 113]. Взаимосвязь между алкалоидами этого типа мало изучена [114]. Как и в случае оснований группы лупинина, пока что нет никаких данных о природе промежуточных соединений, связывающих кадаверин с простейшими алкалоидами группы матрина. Соединения (**112**) [109а], (**113**) [105] и (**92**) [115] не являются эффективно используемыми предшественниками алкалоидов. Сообщалось о специфическом включении [2-^{14}C]-Δ^1-пиперидеина (**69**) в матрин (**111**) [113], но оказалось, что активность распределяется очень неравномерно между С-10 (10 %) и С-3 + С-5 (90 %).



(**111**)



(**112**)

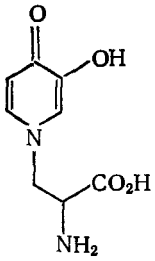


(**113**)

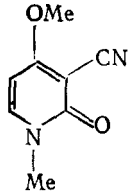
30.1.3.6. Пиридиновые алкалоиды

Биосинтез пиридиновых алкалоидов никотина (**35**), анабазина (**71**) и анатабина (**91**) был рассмотрен выше (см. разд. 30.1.2.2, 30.1.3.1 и 30.1.3.2). Известно, что пиридиновое кольцо в каждом из этих алкалоидов образуется из никотиновой кислоты. Точно так же формируется и тетрагидропиридиновое кольцо анатабина (**91**). Этим, как уже отмечалось, анатабин резко отличается от анабазина, сходный фрагмент структуры которого синтезируется из лизина.

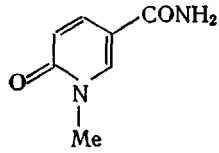
Исключением является также биосинтез мимозина (**114**); для него имеются данные о возможности его происхождения из лизина [116] (боковая цепь, *по-видимому, формируется из аланина*). Рицинин (**115**), очевидно, образуется из никотиновой кислоты (**34**) (и ее предшественников — глицерина и аспарагиновой кислоты), а также из промежуточных соединений метаболического цикла пиридиновых нуклеотидов [117]. Подтверждением связи биосинтеза рицинина с этим циклом служит факт снижения эффективности включения [6-^{14}C]хинолиновой кислоты (**41**) в алкалоид под влиянием ингибиторов NAD-синтетазы [118].



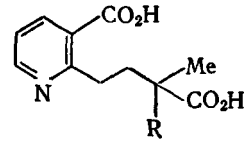
(**114**)



(**115**)



(**116**)



(**117**) R = H
(**118**) R = OH

Как показали эксперименты по включению [$^{15}NH_2$]никотинамида, нитрильная группа рицинина образуется путем дегидратации амидной группировки, а *N*-метильная группа переносится из метионина [117].

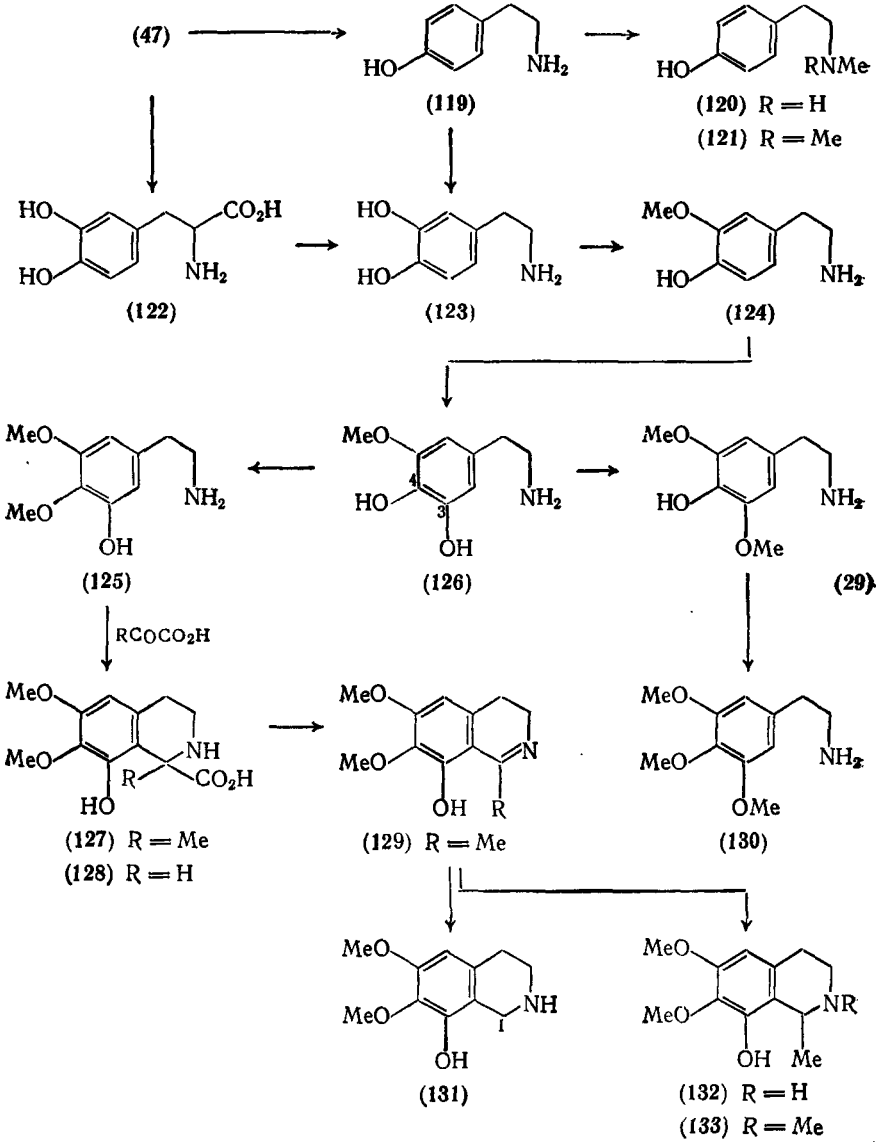
Установлено, что никотиновая кислота и ее амид являются предшественниками соединения (**116**) [119], а также вильфордовой (**117**) и гидроксивильфордовой (**118**) кислот [120] — продуктов гидролиза смеси алкалоидов *Tripterygium wilfordii*.

30.1.4. БИОСИНТЕЗ ИЗОХИНОЛИНОВЫХ И РОДСТВЕННЫХ АЛКАЛОИДОВ

30.1.4.1. Фенетиламины и простые изохинолины

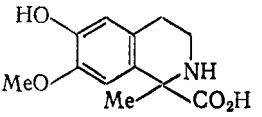
N-Метилтирамин (**120**) и горденин (**121**), обнаруженные в корнях ячменя, являются простейшими представителями фенетиламиновых алкалоидов. Несложный путь их биосинтеза начинается

с ароматической аминокислоты тирозина (47) и проходит через тирамин (119), причем источником *N*-метильных групп служит метионин [121]. Тирозин и тирамин участвуют также в биосинтезе мескалина (130) — галлюциногена из кактусов. Основной путь биогенеза этого соединения (схема 29) был установлен путем изучения включения различных предшественников, идентификации последних как природных оснований [122], а также исследования

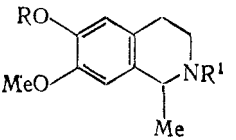


O-метилтрансферазы из кактусов [123]. Важным промежуточным соединением в этой последовательности превращений является производное фенетиламина (**126**). Метилирование гидроксигруппы при С-3 приводит к мескалину (**130**), а метилирование гидроксигруппы при С-4 — к изохинолиновым алкалоидам ангаламину (**131**) и ангалонидину (**132**).

Гипотеза об образовании алкалоидов (**131**) и (**132**) из производного фенетиламина (**126**) через промежуточное соединение (**125**) не объясняет происхождения только одного атома С в (**131**) и двух атомов С в (**132**). Долгое время не удавалось решить такой, казалось бы, простой вопрос об источнике этих «дополнительных» атомов. Так, в пеллотин (**133**) удалось включить [1-^{14}C]- и [2-^{14}C]ацетат, но распределение метки по C_2-звену носило случайный характер [124]. Более того, было установлено, что *N*-ацетил- и *N*-формилфенетиламины не являются предшественниками изохинолиновых алкалоидов [125—127] (ср. противоположные результаты в кажущемся сходным случае β-карболиновых алкалоидов, разд. 30.1.7.2). Обнадеживающие результаты были получены в экспериментах с пировиноградной кислотой, включение которой в (**132**) сопровождалось меньшим разбросом метки [124]. Оказалось, однако, что эта проблема была решена намного раньше [129], но затем забыта. Предполагали, что биосинтез, например, ангалонидина осуществляется путем конденсации фенетиламина с пировиноградной кислотой с последующим декарбоксилированием образующейся аминокислоты типа (**127**). Предположение было подтверждено экспериментально включением промежуточного соединения (**127**) в ангалонидин (**132**), выделением природного (**127**) из кактусов и его декарбоксилированием в свежих срезах кактусов до имина (**129**); доказательство роли последнего как промежуточного соединения явилось дальнейшим развитием первоначальной гипотезы [125]. Ангаламин (**131**) образуется сходным путем из кислоты (**128**) (при ее биосинтезе вместо пировиноградной используется глиоксиловая кислота) [125]; содержащееся в кактусах основание (**134**) является промежуточным веществом в биосинтезе сальсолина (**135**) [130], а также, возможно, сальсолидина (**136**) и карнегина (**137**), первые стадии биосинтеза которых осуществляются обычными путями [131]. Вскоре после выяснения роли таких необычных аминокислот как ключевых промежуточных соединений в биосинтезе про-



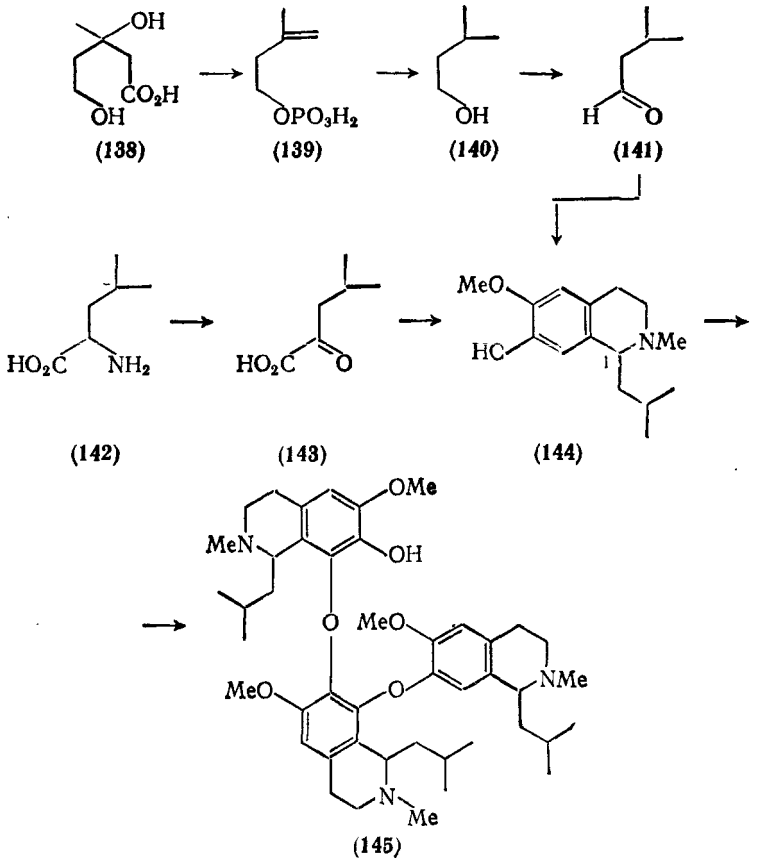
(**134**)



(**135**) R = R^1 = H
(**136**) R = Me, R^1 = H
(**137**) R = R^1 = Me

стых изохинолинов было установлено, что аналогичная аминокислота играет важную роль в биогенезе бензилизохинолиновых алкалоидов (см. разд. 30.1.4.2) и что такого типа аминокислоты, по-видимому, вообще очень важны в биосинтезе алкалоидов.

Лофоцерин (144) отличается от других алкалоидов кактусов наличием изобутильной группы при С-1. Эта группа вместе с атомом С-1 образует C_5-звено, в которое специфически включается метка из мевалоновой кислоты и лейцина [132], причем эффективность первого предшественника несколько выше [133]. 3-Метилмасляная кислота не является предшественником лофоцерина [133]; в виде эфира с коферментом А она представляет собой промежуточное соединение в превращении лейцина в мевалонат; отсюда следует, что C_5-звено должно образовываться из мевалоната и из лейцина независимыми путями. В предложенном пути биосинтеза основания (144) из мевалоната (схема 30), подтвержденном включением соединений (137), (140) и (141), промежуточным соединением является альдегид (141) [133]; этим лофоцерин

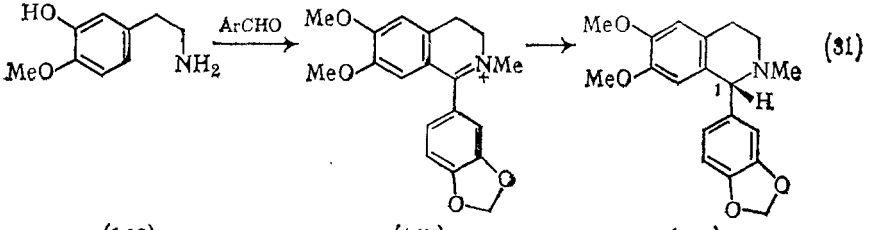


(30)

отличается от других рассмотренных выше изохинолиновых алкалоидов, где такую же роль выполняют α-кетокислоты (см., однако, ниже биосинтез криптостилина). Лейцин может участвовать в биосинтезе соединения (144) через кетокислоту (143), образующуюся из лейцина (142) путем трансаминирования. Меченый тирозин, как и следовало ожидать, включается в ту часть молекулы (144), которая содержит окисленный остаток фенетиламина [132].

Пилоцереин (145) встречается в тех же природных источниках, что и лофоцерин (144). Очевидно, он представляет собой продукт сочетания трех остатков лофоцерина по типу уже упоминавшейся окислительной конденсации фенолов (см. разд. 30.1.1). Действительно, сообщалось о специфическом включении [*N*-метил-^{14}C] лофоцерина в молекулу алкалоида [134].

Криптостилиновые алкалоиды, например криптостилин-I (148), обладают уникальным элементом структуры — 1-фенилизохинолиновым ядром, что придает особый интерес изучению их биогенезиса. Формирование скелета этих алкалоидов (кроме С-1 и связанной с ним фенильной группы) осуществляется обычным путем из тирозина (47), тирамина (119) и ДОФА (122) через промежуточно образующиеся дофамин (123) и производное фенетиламина (146) [но не соединение (124)] [135]. Предшественниками оставшегося C_6—C_1-звена в криптостилине-I (148) могут служить как дофамин, так и ванилин (но не изованилин) [136], однако низкая эффективность включения ванилина свидетельствует о том, что более важным предшественником является, вероятно, протокатехальдегид, источник $C_6 - C_1$-звена в алкалоидах *Amaryllidaceae* (см. разд. 30.1.5.1). Высокоэффективным предшественником криптостилина-I является также соединение (147).

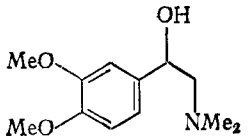


(31)

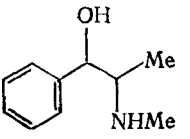
(146) (147) (148)

Некоторые природные фенетиламины, например макромерин (149), содержат гидроксильную группу в β-положении боковой цепи, однако они также образуются из тирозина. Оказалось, что процесс β-гидроксилирования происходит на одной из ранних стадий биосинтеза [137]. У эфедрина (150) кроме β-гидроксигруппы в боковой цепи имеется также *С*-метильная группа. Любопытно, что биосинтез эфедрина отличен от биосинтеза других структурно близких фенетиламинов. В молекулу эфедрина включается фенилаланин (через коричную кислоту), но только в виде

C_6—C_1-звена. Для включения бензойной кислоты и бензальдегида (другие источники C_6—C_1-звена) характерна более высокая эффективность; возможно, что в обычных условиях C_6—C_1-фрагмент эфедрина образуется непосредственно из шикимовой кислоты (предшественника ароматических аминокислот), а не из фенилаланина [138].



(149)



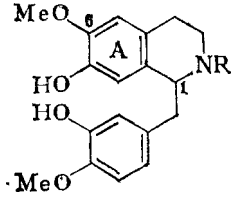
(150)

Источником *N*-метильной группы эфедрина служит метионин, но происхождение оставшегося C_2N-звена не выяснено; предполагают, что в его образовании может принимать участие аспартат или какое-либо родственное соединение.

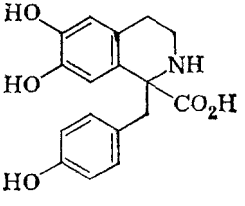
30.1.4.2. Простые бензилизохинолины

1-Бензилтетрагидроизохинолиновая группировка чрезвычайно часто встречается в структурах растительных алкалоидов; по распространенности с ней может сравниться только терпеноидноиндольная группировка. Простейшим природным бензилизохинолиновым алкалоидом является ретикулин (**151**).

Надежные данные о путях построения бензилизохинолинового скелета получены при изучении различных модифицированных изохинолинов; был исследован биосинтез самого ретикулина (**151**) [139]. В ходе этих работ подтвердилось, что ретикулин образуется из двух молекул тирозина (**47**). ДОФА включается в основание (**151**) только через промежуточно образующийся дофамин (**123**), являющийся предшественником кольца А и связанного с ним C_2-звена [140].



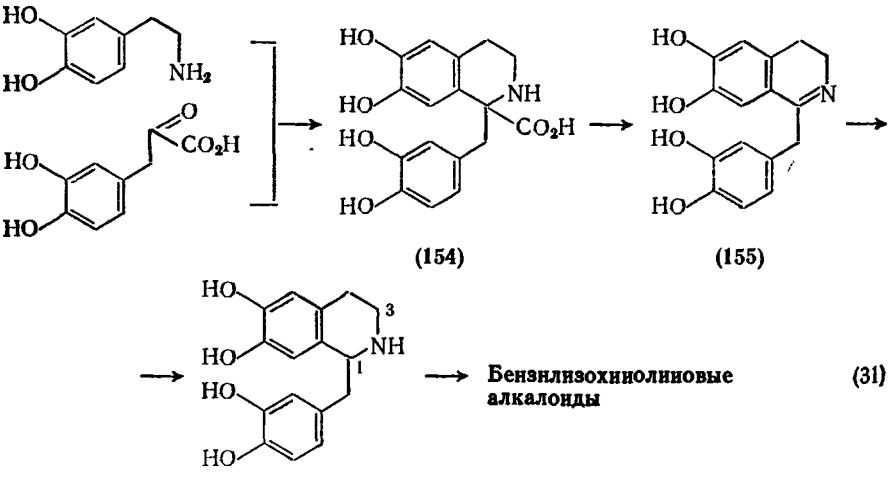
(**151**) R = Me
(**152**) R = H



(**153**)

Известный путь биосинтеза простых изохинолиновых алкалоидов протекает через аминокислоты типа (**127**) (см. схему 29), что позволяет предположить существование аналогичного пути биосинтеза бензилизохинолинов посредством конденсации производ-

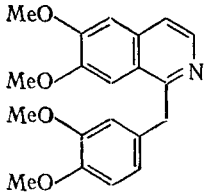
ного дофамина с кетокислотой, образующейся из тирозина; таким путем должно образоваться соединение (154) (схема 31). Экспериментальные данные подтверждают это предположение в целом и, в частности, участие в биосинтезе кислоты (154). Это соединение было выделено в радиоактивной форме после подкормки растений мечеными тирозином и ДОФА [140]; показано, что кислота (154) является специфическим предшественником норлауданосолина (156) [140] и морфина (196) [141]. Тригидроксисоединение (153) как предшественник морфина [141] и ретикулина [139] малоэффективно; отсюда следует, что оба ароматических звена должны подвергаться двукратному гидроксилированию до их конденсации. (Одним из этих звеньев служит дофамин; необходимая α-кетокислота образуется из ДОФА в очень малой степени или вообще не образуется.) Легко протекает химическое декарбоксилирование аминокислоты (154), приводящее к основанию (155); последнее соединение также является предшественником морфина [141] и само способно включать радиоактивный ДОФА [141]. Норлауданосолин (156) и ретикулин (151) также служат специфическими предшественниками морфина (см. разд. 30.1.4.4). Все опубликованные данные согласуются друг с другом; практически не вызывает сомнений, что выясненный таким образом путь биосинтеза (см. схему 31) является общим для всех бензилизохинолиновых алкалоидов.



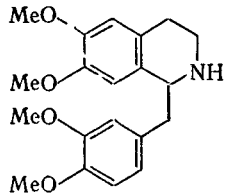
(154) (155) (156) (31)

Одним из простейших 1-бензилтетрагидроизохинолиновых алкалоидов является папаверин (157). Согласно первоначально выдвинутой гипотезе, этот алкалоид синтезируется, подобно норлауданосолину (156), из двух молекул ДОФА [142]. Справедливость гипотезы была подтверждена специфическим включением двух молекул тирозина и норлауданосолина (156) [143, 144]. Далее выяс-

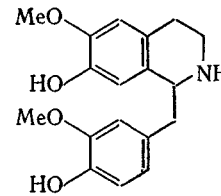
нилось [143], что важным промежуточным соединением в биосинтезе папаверина служит тетрагидропапаверин (158), образующийся, возможно, из норретикулина (152) или из соединения (159). Для биосинтеза папаверина, очевидно, характерна селективность в отношении бензилизохинолинов с определенным распределением метильных групп, а также в отношении стереохимии промежуточных соединений [предпочтительнее включаются (—)-(*R*)-норретикулин и (—)-(*R*)-тетрагидропапаверин].



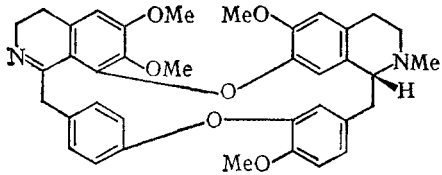
(157)



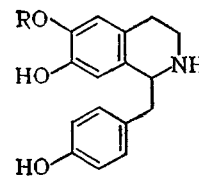
(158)



(159)



(160)



(161) R= Me
(162) R= H

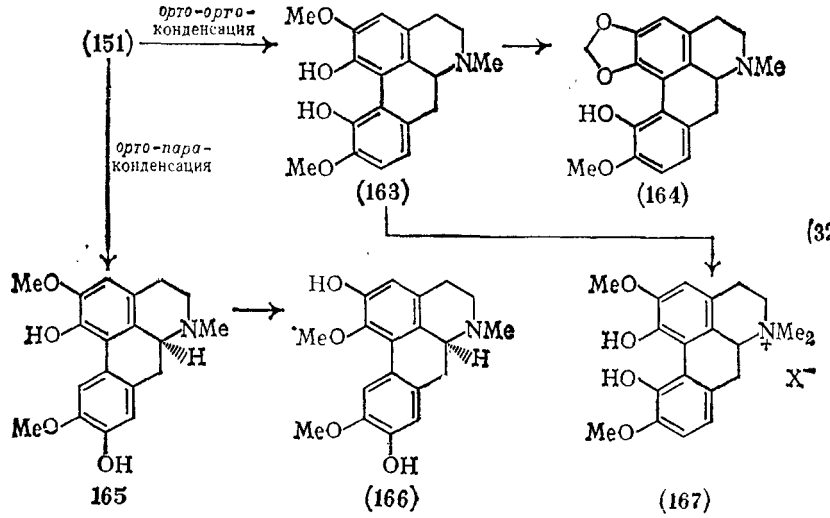
Наиболее вероятным путем образования сложных бис(бензилизохинолиновых) алкалоидов представляется простая межмолекулярная окислительная конденсация двух фенольных бензилизохинолиновых остатков. В результате окисления могут возникать как C—C-, так и C—O-связи. Так, в случае эпистефанина (160), единственного алкалоида этой группы, изучавшегося с помощью меченых соединений, две C—O-связи соединяют бензилизохинолиновые остатки типа коклаурина (161). В эпистефанин включаются и коклаурин (161), и *N*-метилкоклаурин [146], причем последний при этом не теряет метильную группу и переходит только в *N*-метилированную часть молекулы эпистефанина; более эффективным предшественником является (—)-изомер *N*-метилкоклаурина с той же конфигурацией, что и в соединении (160). Как и следовало ожидать, [2-^{14}C]тирозин также служит предшественником эпистефанина; любопытно, что он с одинаковой эффективностью включается в обе половины молекулы.

30.1.4.3. Апорфиины

Для трансформации бензилизохинолинового скелета в апорфиновый, имеющийся, например, в бульбокапнине (164), необходимо создать всего лишь одну новую связь. В принципе эта связь мо-

жет образоваться путем окислительной конденсации фенолов (см. разд. 30.1.1), однако можно представить себе и несколько других вероятных путей ее образования. Интересно, что большинство теоретически возможных способов создания этой связи действительно реализуется в ходе биосинтеза одного или нескольких апорфиновых алкалоидов, а в случае болдина (**166**) биогенез протекает по различным путям в двух разных растениях.

Наиболее просто в растениях синтезируется бульбокапнин (**164**); в этом случае ретикулин (**151**) подвергается *орто-орто*-конденсации, а образующееся соединение (**163**) после несложной модификации превращается в апорфин (**164**) [147] (схема 32). Основание (**163**) является, вероятно, промежуточным соединением и в биосинтезе магнофлорина (**167**), поскольку в последний включается ретикулин (**151**) [но не норпротосиноменин (**172**)] [148]. Ретикулин служит также предшественником изоболдина (**165**), минорного алкалоида *Papaver somniferum*, и морфина, выделяемого из того же растения (см. разд. 30.1.4.4). Теоретически предшественниками изоболдина (**165**) могли бы быть орненталин (**168**), отличающийся от ретикулина только распределением метильных групп, и образующийся из него диенон (**169**), а также еще один изомер ретикулина — норпротосиноменин (**172**). Однако ни орненталин (**168**), ни норпротосиноменин (**172**) не включаются в изоболдин. Следовательно, единственным путем биосинтеза изоболдина (**165**) является окислительная *орто-пара*-конденсация ретикулина (**151**) [149].



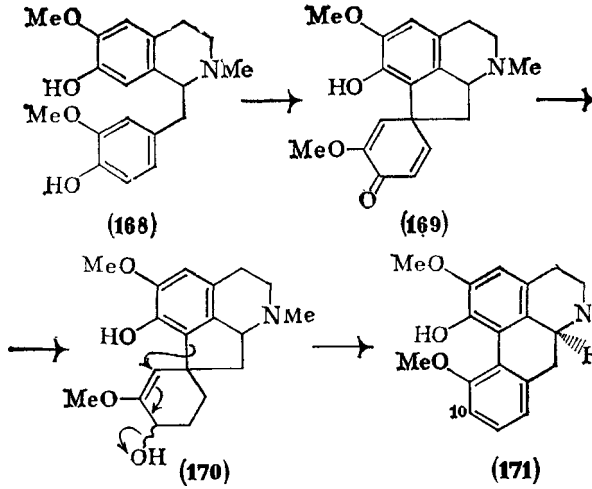
Тщательному изучению были подвергнуты различные возможные бензилизохинолиновые предшественники болдина (**166**) в *Litsea glutinosa* [150]. Оказалось, что алкалоид образуется только из (+)-ретикулина (**151**) (с той же конфигурацией, что и в бол-

дине) через промежуточно образующийся изоболдин (**165**). Следует отметить, что норпротосиноменин (**172**) (предшественник оснований *Dicentra eximia*, в том числе и болдина; см. ниже) не включается в болдин (**166**). Все экспериментальные данные говорят о том, что в процессе биосинтеза болдина (**166**) в *Litsea glutinosa* меняется исходное положение *О*-метильных групп. Истинному направлению процесса соответствует такое расположение метильных групп, которое имеется в изоболдине (**165**); выводы о механизме циклизации, сделанные на основании расположения метильных групп в болдине, некорректны. Превращение изоболдина в болдин (**166**) осуществляется большей частью путем деметилирования и повторного метилирования, а не посредством миграции метильных групп, поскольку превращение [6-O^{14}CH$_3$,1-^{3}H]-ретикулина (**151**) в болдин сопровождается потерей 64 % активности ^{14}C (сходные результаты получены в случае родственного основания кротонозина; см. ниже).

Тебаин (**191**) и изотебаин (**171**) продуцируются *Papaver orientale*. Хотя оба этих алкалоида содержат молекулярный скелет норлауданосолина (**156**), тебаин образуется из ретикулина (см. разд. 30.1.4.4), а изотебаин — из ориенталина (**168**) [151]. Этот пример наглядно показывает, что направление фенольной конденсации определяется местоположением *О*-метильных групп в обоих ароматических кольцах 1-бензилизохинолина.

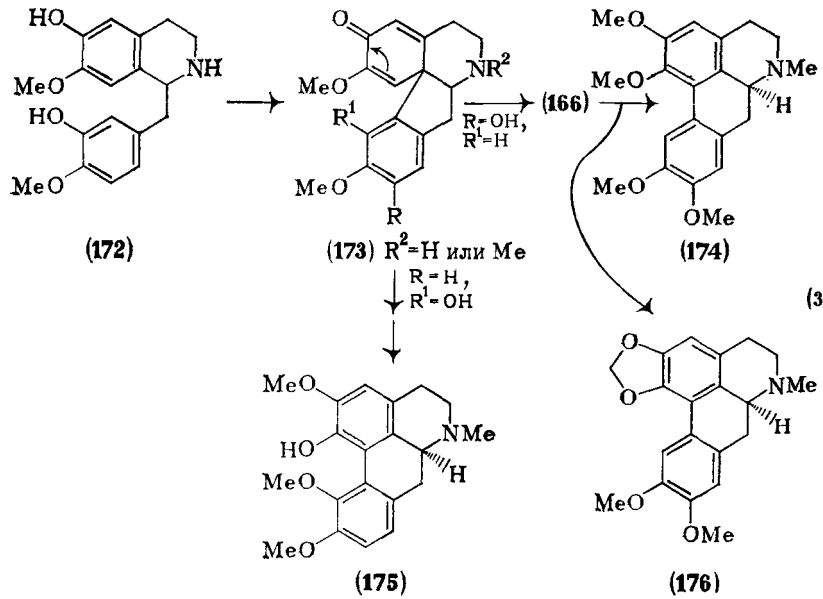
На биосинтез изотебаина (**171**) решающее влияние оказывает отсутствие кислородсодержащей функциональной группировки при С-10 алкалоида. Единственным разумным объяснением является приведенная на схеме (33) последовательность превращений, в которой исходным соединением является ориенталин (**168**), а кислородная функция может теряться в процессе «диенол-бензольной» перегруппировки соединения (**170**). Эксперименты с мечеными соединениями подтвердили правильность этого предположения. Так, оказалось, что диенон (**169**) является специфическим предшественником изотебаина (**171**) и содержится в *P. orientale* [152]. При восстановлении диенона (**169**) было получено два диенола (**170**), один из которых был высокоэффективным предшественником изотебаина, а другой утилизировался с гораздо меньшей эффективностью, что, вероятно, связано с его обратным превращением в диенон (**169**) и первый диенол [153].

Анализ особенностей строения алкалоидов глауцина (**174**), коридина (**175**) и дицентрина (**176**), выделенных из *Dicentra eximia*, позволил предположить, что путь их биосинтеза аналогичен описанному выше. Однако это предположение оказалось совершенно несостоятельным, поскольку в эти алкалоиды не включались ни ретикулин (**151**), ни ориенталин (**168**), хотя соответствующее неметилированное основание норлауданосолин (**156**) утилизировалось [154]. Путем ступенчатого введения метильных групп в различные положения норлауданосолина (**156**) была выяснена природа ключевого промежуточного соединения; им оказался нор-



(33)

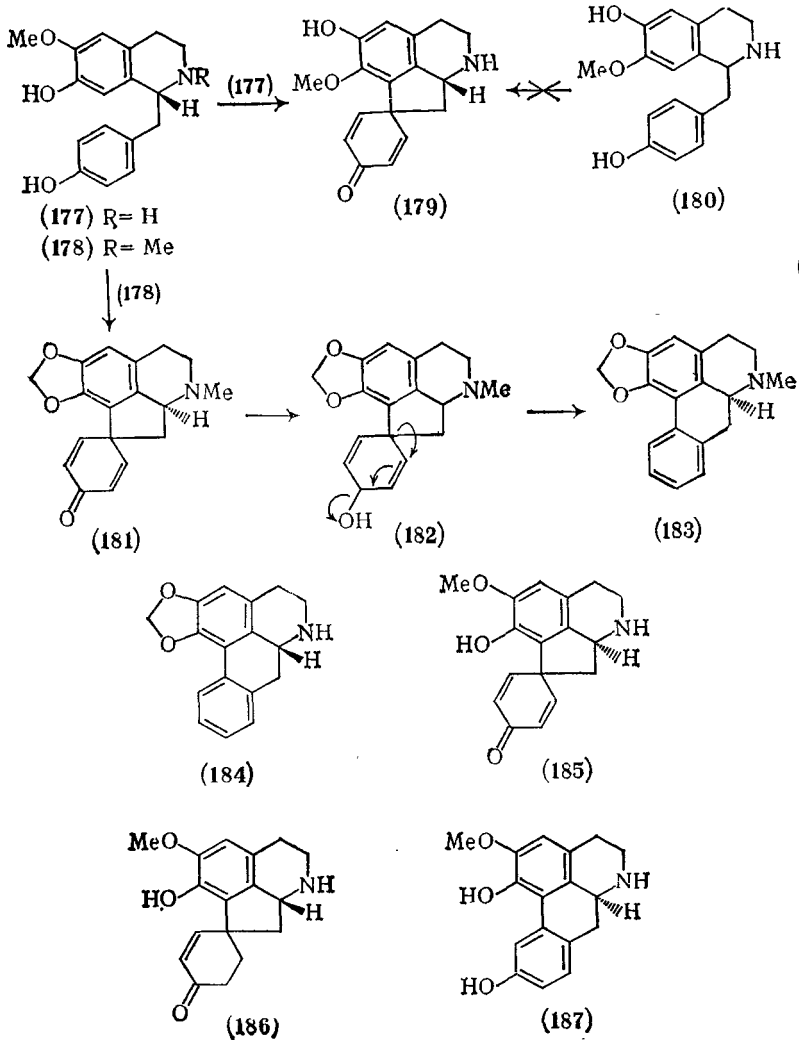
протосиноменин (**172**). Распределение метильных групп в этом соединении позволяет предположить необычный путь биосинтеза (схема 34); момент введения *N*-метильной группы не известен [интересно, что норпротосиноменин и диенон (**173**) выполняют функцию промежуточных соединений в биосинтезе алкалоидов *Erythrina*, имеющих совершенно другое строение; см. разд. 39.1.4.6]. Болдин (**166**), образующийся в *L. glutinosa* из ретикулина (**151**), в этом растении должен быть промежуточным соединением в биосинтезе глауцина (**174**) и дицентрина (**176**) из основания (**172**);



(34)

действительно, было показано, что болдин эффективно включается в оба эти алкалоида [154].

Выше отмечалась важная роль диенонов в биосинтезе апорфинов; эта роль тем более велика, что в ряде случаев свободные диеноны были выделены из природных источников. Одним из таких природных диенонов является кротонозин (**179**), образующийся, как известно, из (+)-коклаурина (**177**), а не из изококлаурина (**180**). Этого и следовало ожидать, поскольку хотя распределение метильных групп в соединении (**180**) такое же, как и в кротонозине, из него, в отличие от изомерного (**177**), кротоно-



(35)

зиновый скелет не может образоваться посредством конденсации фенолов [155]. Следовательно, в ходе биосинтеза кротонозина (**179**) осуществляется деметилирование и повторное метилирование; эти реакции должны происходить после конденсации, так как норкоклаурин (**162**) является менее эффективным предшественником, чем коклаурин.

Биосинтез роемерина (**183**) протекает по пути, аналогичному синтезу кротонозина из коклаурина [156]. В этом случае роль последнего изохинолинового предшественника выполняет (+)-метилкоклаурин (**178**). Следующим известным промежуточным соединением является мекамбрин (**181**), из которого роемерин может образоваться при участии промежуточного диенола (**182**) (ср. выше биосинтез тебаина). Родственное основание анонаин (**184**) синтезируется из коклаурина (**161**), вероятно, по аналогичному пути [156]; возможным промежуточным соединением здесь является кротспарин (**185**), встречающийся в природных источниках. Показано, что кротспарин, как и метаболиты того же растения [кротспаринин (**186**) и спарсифлорин (**187**)], образуются из коклаурина (**161**) [157]. Следовательно, кротспарин является вероятным предшественником и основания (**187**).

30.1.4.4. Морфин и родственные алкалоиды

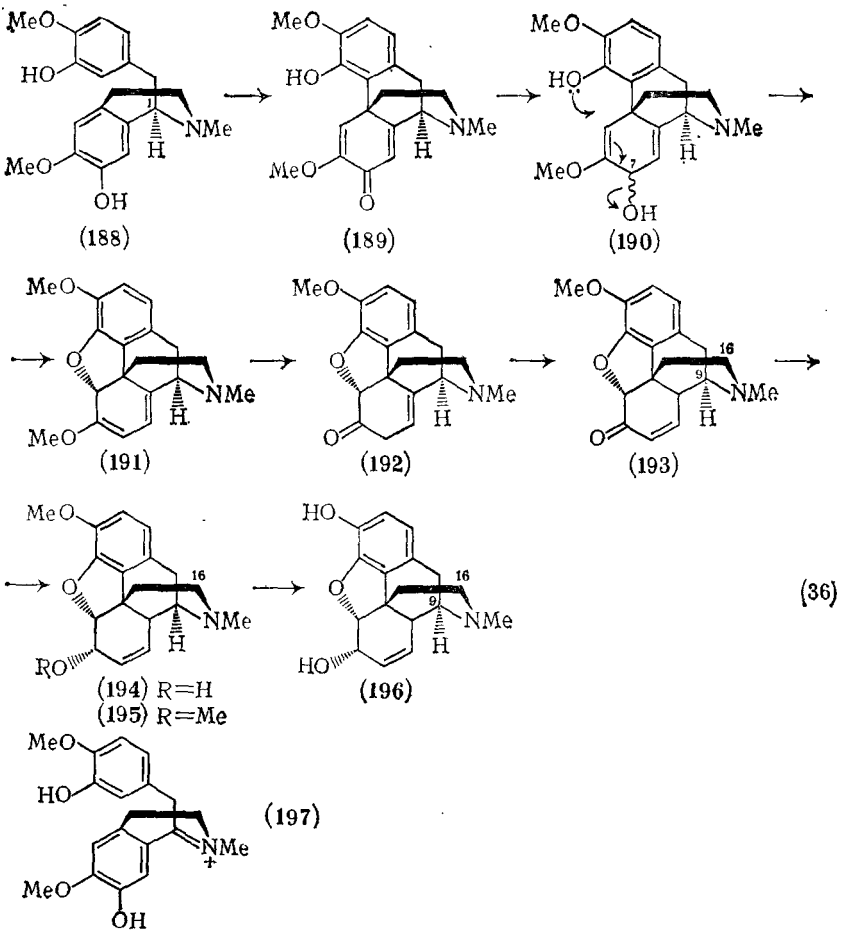
Гипотеза о принадлежности морфина к модифицированным бензилизохинолиновым алкалоидам способствовала установлению строения этого основания; сходство морфина с ретикулином становится особенно очевидным, если структуру последнего изобразить так, как это показано в формуле [(**188**); (—)-(*R*)-ретикулин]. Структурное родство, в свою очередь, предполагает сходство путей их биогенеза [1]. Работы по изучению путей биосинтеза морфина и родственных гидрофенантреновых алкалоидов *Papaver somniferum* тебаина (**191**) и кодеина (**194**) уже стали классическими; они, в частности, подтвердили правильность бензилизохинолиновой гипотезы, расширили и дополнили ее.

Предварительным подтверждением гипотезы [158] были успешные эксперименты по включению метки из [2-^{14}C]тирозина в С-9 и С-16, а также из [1-^{14}C]дофамина в С-16 морфина (**196**) [159, 160], но решающим тестом должна была явиться проверка какого-либо бензилизохинолина в качестве предшественника. Изучение включения [1-^{14}C]- и [3-^{14}C]норлауданосолинов (**156**) явилось первым в истории химии природных соединений экспериментом с использованием меченых сложных предшественников алкалоидов; в результате этих работ было установлено, что метка специфически переходит в С-9 [в случае (**196**)] и в С-16 [в случае (**194**)] из [1-^{14}C]- и [3-^{14}C]норлауданосолинов, соответственно. Таким образом было доказано, что основой генезиса этих алкалоидов является модификация бензилизохинолинового скелета [144, 161].

Проверка различных производных бензилизохинолина в качестве возможных предшественников морфина и его спутников показала, что следующим ключевым промежуточным соединением в их биосинтезе после норлауданосолина является (—)-(*R*)-ретикулин (**188**) [144, 162, 163]. Особый интерес представляет работа, в которой было установлено, что ретикулин (**188**) в одном и том же растении включается в тебаин (**191**), но не в изотебаин (**171**), тогда как ориенталин (**168**) ассимилируется изотебаином, но не тебаином; эти данные свидетельствуют об уникальной роли ретикулина как предшественника гидрофенантреновых алкалоидов [151]. В алкалоиды *P. somniferum* с одинаковой степенью эффективности включаются как (*R*)-ретикулин, так и его (*S*)-изомер, причем и в том, и в другом случае теряется тритиевая метка при С-1 [163]. Вероятно, это обусловлено взаимопревращением этих энантиомеров через промежуточно образующееся соединение (**197**) до их вовлечения в дальнейшие стадии биосинтеза; действительно, соединение (**197**) оказалось эффективным предшественником морфина [163]. Изомер с той же конфигурацией, что и (*R*)-ретикулин, например морфин (**196**), не полностью теряет тритий при С-1; это указывает на не полное превращение ретикулина в (**197**) до вступления в следующую стадию биосинтеза. О роли ретикулина как промежуточного соединения в биосинтезе гидрофенантреновых алкалоидов свидетельствует также наличие его в *P. somniferum* [164] и образование его в радиоактивной форме из $^{14}CO_2$ до появления радиоактивного тебаина [165].

Образование норлауданосолина (**156**) и ретикулина (**188**) из тирозина было рассмотрено выше (см. разд. 30.1.4.2); здесь мы обсудим дальнейшие превращения ретикулина. В результате внутримолекулярной *орто-пара*-конденсации последнего образуется диенон (**189**), из которого может быть получен тебаин (**191**) (схема 36). Свидетельством в пользу этой гипотезы является наличие соединения (**189**) (называемого салютаридином) в продуктах метаболизма другого растения. Салютаридин (**189**) удалось выделить в радиоактивной форме из *P. somniferum* после подкормки последнего [2-^{14}C]тирозином и [3-^{14}C]норлауданосолином. Окончательное доказательство роли салютаридина как промежуточного соединения в биосинтезе гидрофенантреновых алкалоидов вытекает из его высокоэффективного и специфического включения в эти алкалоиды [162].

Для превращения салютаридина (**189**) в тебаин (**191**) необходима еще одна реакция циклизации, осуществляемая химически в очень мягких условиях при обработке двух эпимерных диенолов (**190**) (салютаридинолов-I и -II) кислотой. В противоположность чисто химическому превращению, в растениях тебаин эффективно образуется только из салютаридинола-I. Это свидетельствует о том, что образование тебаина *in vivo* происходит ферментативным путем и, следовательно, является процессом нормального биосинтеза.



(36)

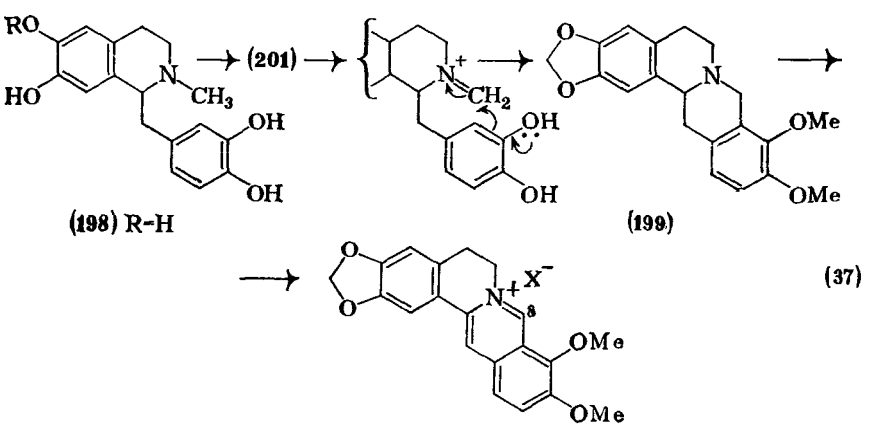
До сих пор принималось как само собой разумеющееся, что первым из гидрофенантреновых оснований синтезируется тебаин. Справедливость этого положения была подтверждена экспериментально, в том числе в опытах с $^{14}CO_2$; оказалось, что алкалоиды образуются в следующей последовательности реакций деметилирования: тебаин (**191**)→кодеин (**194**)→морфин (**196**); промежуточно синтезируются также кодеинон (**193**) и неопинон (**192**), но не соединение (**195**) (см. схему 36) [166].

30.1.4.5. Протоберберин и родственные алкалоиды

Берберин (**200**) является типичным представителем группы алкалоидов с бензилизохинолиновым скелетом, имеющих дополнительный мостиковый атом углерода при С-8, так называемый «берберриновый мостик». Бензилизохинолинам типа норлауданo-

солина (156) структурно ближе протоберберинovые алкалоиды, например стилопин [(204); (*S*)-стилопин], являющийся важным промежуточным соединением в биосинтезе таких разнообразных оснований, как берберин (200), хелидонин (211), наркотин (215) и коридалин (219).

При изучении биосинтеза берберина (200) было установлено, что он, как и другие модифицированные бензилизохинолины, образуется из двух молекул тирозина, одна из которых включается в виде синтезирующегося промежуточно дофамина [167]. Метка из метионина и формиата переходит не только в метилендиоксигруппу и метоксигруппы, но и, что гораздо более существенно, в положение 8 алкалоида [168]. Проблема происхождения этого атома углерода из C_1-предшественников типа метионина удивительно просто решается в рамках гипотезы об окислительной конденсации с участием *N*-метильной группы бензилизохинолинового предшественника (схема 37), осуществляющейся аналогично процессу образования метилендиоксигруппы (см. разд. 30.1.5.1); подтверждением гипотезы служит факт региоспецифичного и практически полного включения метки из *N*-метильных групп лауданосолина (198) и (+)-(*S*)-ретикулина (201) в положение 8 берберина [из различных производных норлауданосолина предшественниками берберина являются только ретикулин (и норретикулин), а также протоберберин канадин (199); (*S*)-изомер ретикулина включается эффективнее, чем (*R*)-изомер] [169, 170].



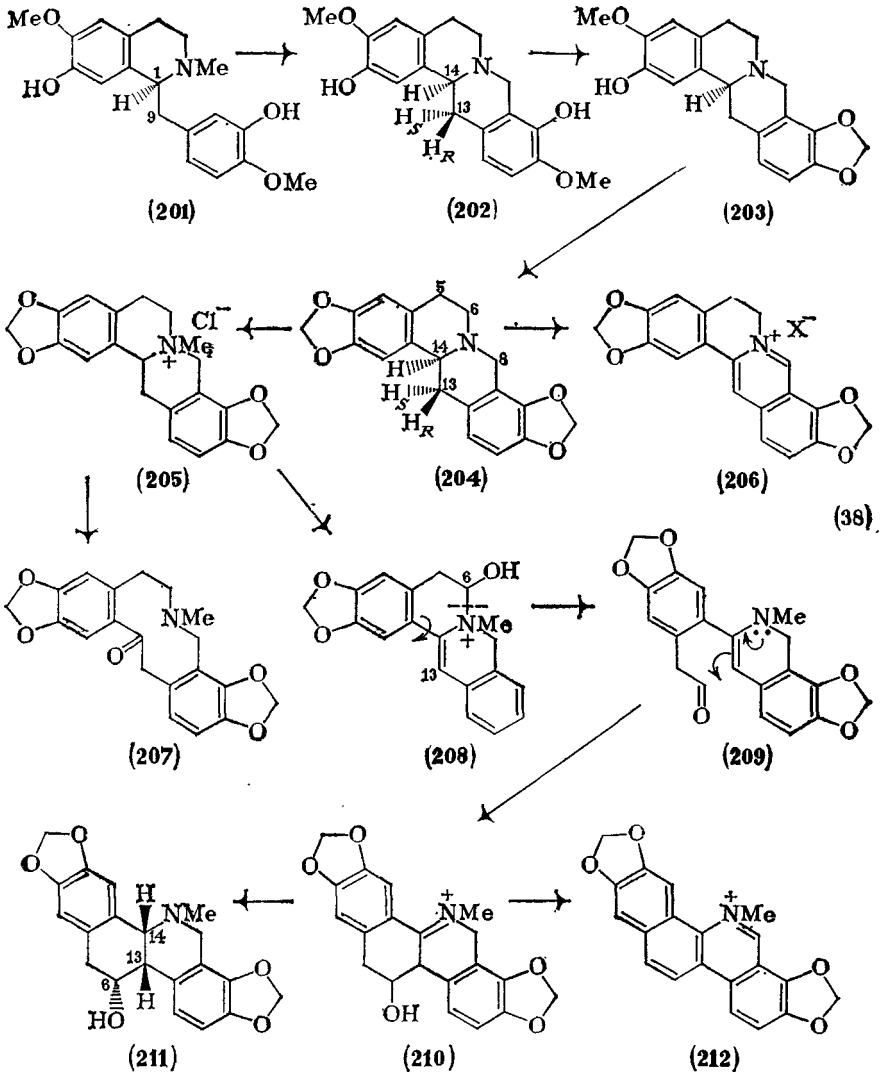
Робинсон предполагал [1], что хелидонин (211) также должен быть отнесен к группе модифицированных протоберберинovых оснований; в пользу такого предположения свидетельствовало и наличие хелидонина (211) в тех же растениях, что и стилопина (204). В принципе, превращение одной из этих структур в другую могло бы быть осуществлено, например, путем разрыва связи

C-6—N в соединении (204) с последующей конденсацией при C-13. Такая точка зрения подтверждается способом включения [2-^{14}C]-тирозина, метка из которого переходит в C-6 и C-13 хелидонина; активность из [1-^{14}C]дофамина концентрируется только в C-6 алкалоида [171]. Более веским свидетельством в пользу этой гипотезы является факт биосинтеза хелидонина (211) и скулерина (202) из стилопина (204) [172, 173], а также биосинтез хелидонина из универсального предшественника бензилизохинолиновых оснований — ретикулина (201) [170, 173]. Таким образом была выяснена последовательность превращений (201)→(202)→(204)→→(211); каждое из соединений участвует в этих превращениях в (*S*)-форме.

Как показывают эксперименты с соединениями, меченными тритием, в ходе превращения ретикулина (201) в скулерин (202) и далее в стилопин (204) не затрагиваются атомы C-1 и C-9 ретикулина. Оказалось также, что в процессе превращения метильной группы ретикулина в C-8-атом «берберинового мостика» стилопина (204), которое обязательно должно сопровождаться потерей одного атома водорода (или трития), тритий удерживается в молекуле в очень большой степени; эти данные согласуются с известным высоким изотопным эффектом трития [170]. В ходе последующей трансформации стилопина в хелидонин тритий сохраняется при C-8 и C-5, но теряется от C-14 [173] и C-13; при этом элиминируется 13-*pro*-(*S*)-атом водорода [*pro*-(*R*)-атом сохраняется] [174]. Это свидетельствует о том, что катализируемое ферментами отщепление протона от C-13 осуществляется после формирования стилопина, а также (вместе с фактом элиминирования трития от C-14) о возможности образования промежуточного енамина типа (208) или (209) на одной из стадий между стилопином (204) и хелидонином (211).

Было показано также, что (*S*)-скулерин (202) является предшественником сангинарина (212), клериантина (213) и протопина (207), (*S*)-стилопин (204) — предшественником коптизина (206) и протопина (207), а хлорид *N*-метилстилопина (205) — предшественником хелидонина (211) [173] и протопина (207) [173, 175]. В то же время, радиоактивная метка из нандинина, изомера соединения (203), не переходит в хелидонин, стилопин или протопин; очевидно, здесь промежуточным соединением является другой изомер соединения (203) [173]. Результаты всех приведенных выше экспериментальных данных обобщены в схеме (38).

Включение тирозина, тирамина, метионина и формиата во фталидилизохинолиновые алкалоиды гидрастин (214) и наркотин (215) [167, 168, 176] происходит так же, как и в случае берберина (200) (см. выше); на этом основании фталидилизохинолиновые алкалоиды относят к модифицированным протоберберинам. Особо следует отметить включение в лактонную карбонильную группу атома углерода из обычных источников C_1-звена.

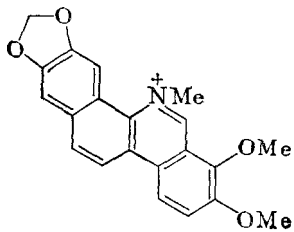


(38)

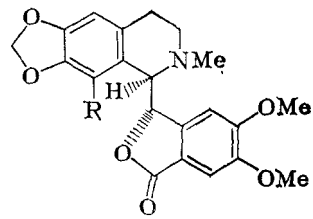
Сходство биогенеза фталидилизохинолиновых алкалоидов с биосинтезом протоберберинов подтверждается включением ретикулина, предпочтительно в виде (+)-изомера (**201**); при этом *N*-метильная группа последнего становится лактонной карбонильной группировкой в алкалоиде (**215**). Наконец, оказалось, что протоберберины (*S*)-скулерин (**202**) [176], изокорипальмин (**216**) и канадин (**199**) [173] являются предшественниками наркотина (**215**). Как и в случае трансформации скулерина (**202**) в хелидонин (**211**), его превращение в наркотин (**215**) сопровождается

элиминированием 13-*pro*-(*S*)-атома водорода [174]. Таким образом, при присоединении атома кислорода к С-13, как обычно, конфигурация сохраняется [177] (см. также [174]).

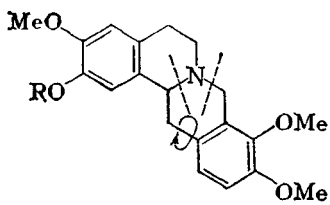
Алкалоиды типа альпинигенина (**218**), вероятно, также представляют собой модифицированные протоберберины. Это подтверждается включением в соединение (**218**) [3-^{14}C]тирозина [соответствующие атомы углерода отмечены в формуле (**218**) зачерненным кружком], метионина [в (**218**) отмечены звездочкой], тетрагидропальматина (**217**) и его *N*-метильного производного. *N*-Метильная группа последнего сохраняется в молекуле (**218**), что указывает на необходимость кватернизации атома азота для реакций расщепления, сопровождающих трансформацию тетрагидропальматина (**217**) в альпинигенин (**218**) [178].



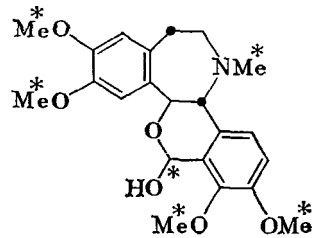
(**213**)



(**214**) R=H; (**215**) R=OMe

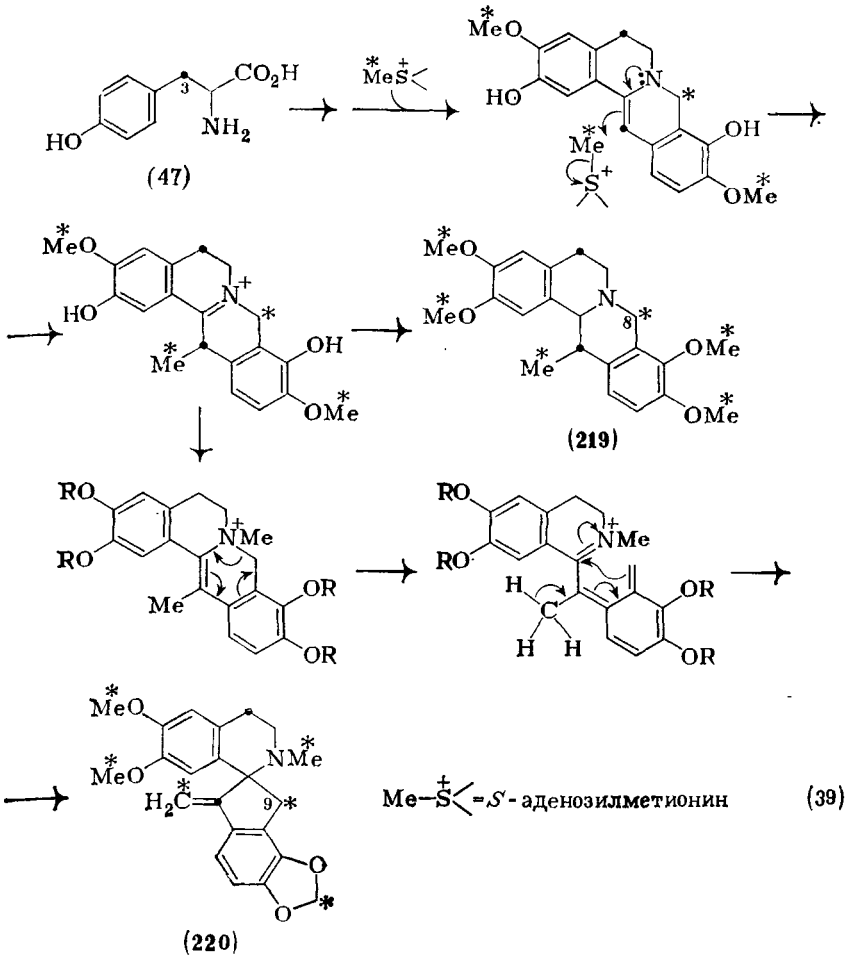


(**216**) R=H
(**217**) R=Me



(**218**)

Другими представителями модифицированных протоберберинов являются коридалин (**219**) и охотензимин (**220**). Связь коридалина (**219**) с протоберберинами более очевидна и подтверждается включением ретикулина (**151**) [179]. Оба алкалоида включают [Me-^{14}C]метионин и [3-^{14}C]тирозин с характерным для протоберберинов распределением метки (схема 39) [180]. В частности, метка из метионина переходит в С-8 коридалина и С-9 охотензимина, что соответствует обычному положению для атомов углерода «берберинових мостиков». Природа предшественника коридалина, подвергающегося *C*-метилированию, не установлена; не выяснен и механизм скелетной перегруппировки, необходимой для образования охотензимина, хотя известна аналогичная химическая реакция.

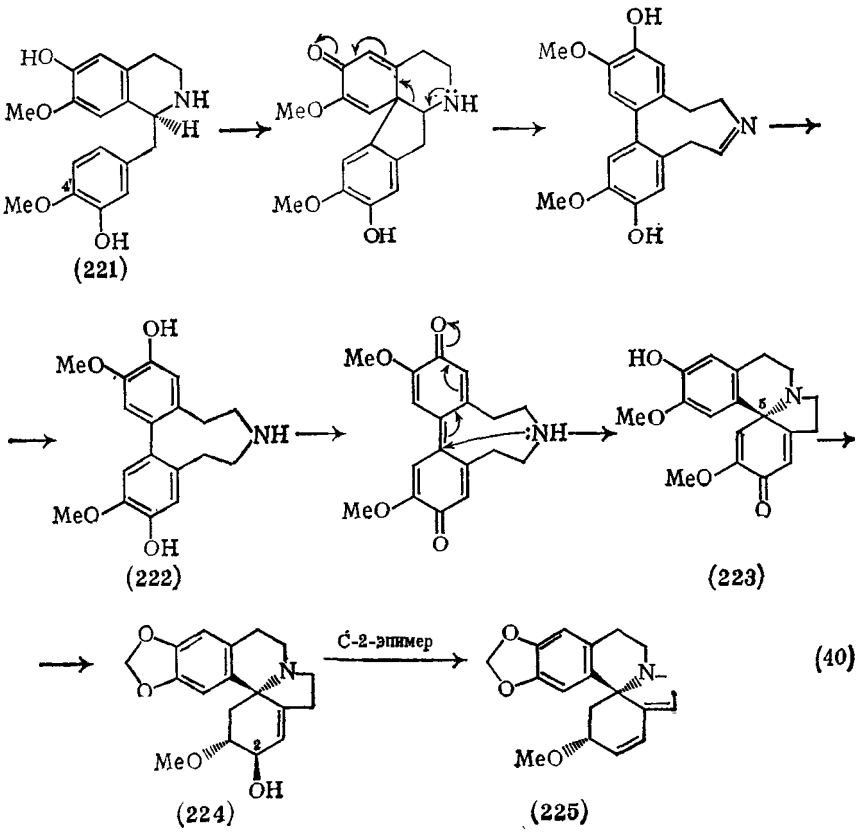


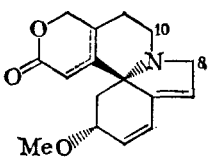
30.1.4.6. Алкалоиды Erythrina

Рассмотрение структур алкалоидов *Erythrina*, например эритралина (**225**), позволяет предположить, что их биосинтез осуществляется необычным путем. Это предположение справедливо, но только в отношении последних стадий биосинтеза, поскольку на первых стадиях формируется изохинолиновый скелет. Интересно, что в биосинтезе некоторых апорфинов из *Dicentra* (см. разд. 30.1.4.3) участвуют те же промежуточные изохинолиновые и диеноновые соединения, что и в биогенезе эритриновых оснований (ср. схемы 34 и 40).

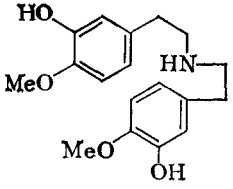
Равное распределение метки из [2-^{14}C]тирозина (**47**) между атомами С-8 и С-10 β-эритроидина (**226**), казалось бы, свидетельствует о наличии промежуточного соединения типа (**227**) (фенил-

аланин в эритроидин не включается) [181]. Однако основание (227) с трудом включается как в эритралин (225), так и в эритратин (224) [182]. В то же время, производное (*S*)-*N*-норпротосиноменина (221) является эффективным предшественником алкалоидов *Erythrina* [182—184]. Этот факт позволяет предложить путь биосинтеза этих алкалоидов (схема 40), в котором роль промежуточных соединений выполняют основание (222) и эризодиенон (223), включающиеся в алкалоиды без фрагментации их молекул [182, 184]. Более того, только (—)-эризодиенон (223), обладающий 5(*S*)-хиральностью природных алкалоидов, способен участвовать в их биосинтезе [185]. В эритралине (225), образовавшемся из [4′-метокси-^{14}C]-*N*-норпротосиноменина (221), метка равномерно распределяется между метокси- и метилендиоксигруппами; следовательно, на одной из стадий биосинтеза должно образовываться симметричное промежуточное соединение типа (222) [184], так что асимметрия структуры производного (*S*)-норпротосиноменина (221) не передается (*S*)-эризодиенону (223) [185].

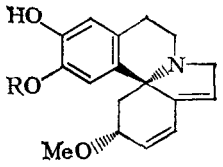




(226)



(227)

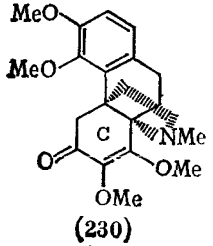


(228) R = H
(229) R = Me

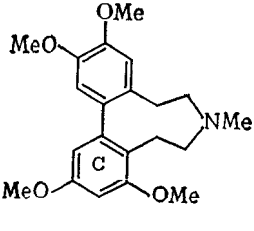
В дальнейших экспериментах было показано, что эритралин (225) образуется из 2-эпиэритратина (224) [182] и что эритроидины лактонной природы (226) синтезируются из оснований (228) и (229) эритралинового типа [185]. Очевидно, при последней трансформации происходит редкое явление в биосинтезе растительных алкалоидов — расщепление ароматического кольца (ср. с биосинтезом беталаинов, разд. 30.1.10).

30.1.4.7. Хасубанонин и протостефанин

На первый взгляд кажется очевидным, что хасубанонин (230) и протостефанин (231), продуцируемые *Stephania japonica*, являются модифицированными бензилизохинолиновыми основаниями, но попытки подтвердить тот или иной путь их биосинтеза экспериментально долгое время оставались безуспешными [186]. Попытки использования многих потенциальных предшественников бензилизохинолиновой природы и бис(фенетил)аминов типа (227) давали только отрицательные результаты. Тем не менее, тирозин, ДОФА, тирамин и дофамин включались в эти алкалоиды, что позволило частично прояснить картину их биосинтеза. Оба они построены из $C_6 — C_2$-звеньев, источником одного из которых служит тирозин (47), а на основе ДОФА (122), дофамина (123) и тирамина (119) строится второе звено — кольцо С с остатком этиламина. Последнее звено имеет явно фенетиламиновую природу; результаты испытаний различных меченых предшественников такого типа показывают, что до конденсации с первым $C_2 — C_6$-звеном оно дополнительно претерпевает реакции оксигенирования и *О*-метилирования и, следовательно, имеет строение типа (126). На основе этих данных можно предложить ряд потенциально возможных бензилизохинолиновых и бис(фенетил)аминовых предшественников, однако о результатах таких исследований не сообщалось.



(230)



(231)

30.1.4.8. Колхицин

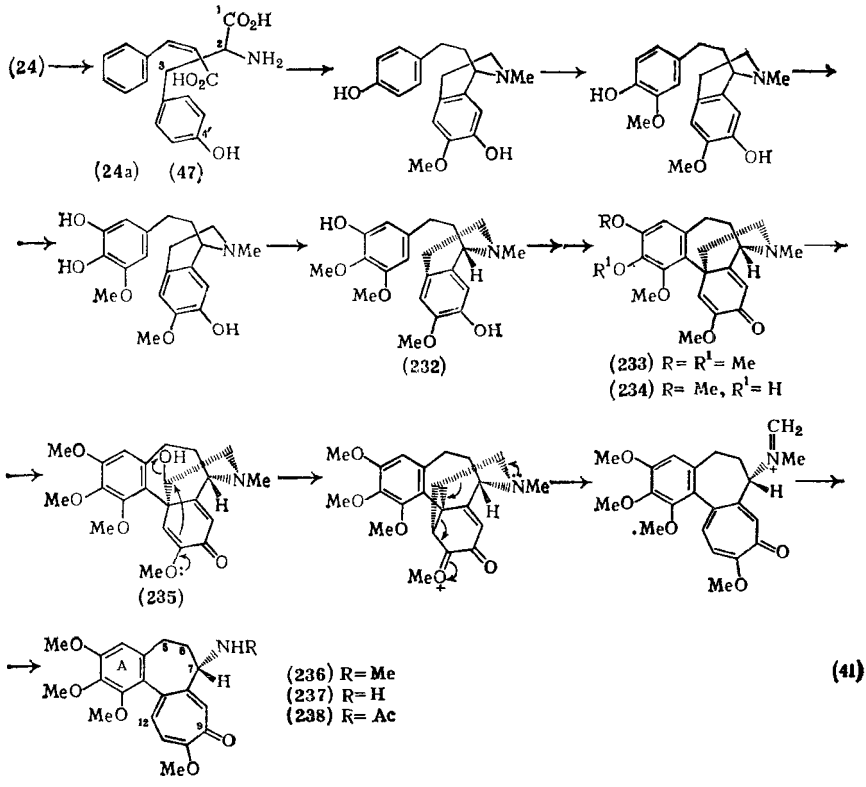
Наиболее интересным элементом уникальной структуры колхицина (238) является трополоновое кольцо, поэтому можно было бы ожидать, что этот алкалоид синтезируется в растениях необычным путем. Отчасти это так, но справедливо и то, что биосинтез колхицина (238) складывается из самых обычных биосинтетических реакций [187].

Фенилаланин (24), точнее образующаяся из него коричная кислота (24а), в алкалоидах *Colchicum* служит источником кольца А, а также атомов С-5, С-6 и С-7 [188]. Семь углеродных атомов трополонового кольца образуются из тирозина; при этом атомы С-1 и С-2 аминокислоты теряются, а метки из [4′-^{14}C]- и [3-^{14}C]-тирозинов обнаруживаются соответственно в С-9 и С-12 соединения (238) [189]. Отсюда следует, что трополоновое кольцо формируется путем расширения ароматического кольца тирозина (47) за счет включения бензильного атома углерода (аналогичный процесс расширения кольца наблюдался в случае грибных трополонов, например стипитатоновой кислоты, хотя последняя имеет ацетатное происхождение [190]).

Дальнейший прогресс в изучении биосинтеза колхицина был связан с неожиданно обнаруженным его структурным родством с андроцимбином из растения, близкого *Colchicum*. Андроцимбину была приписана диеноновая структура (234), которая, как предполагалось, могла бы образоваться из фенетилизохинолинового соединения типа (232), в то время в свободном состоянии не известного. Отсюда был сделан вывод о возможности аналогичного биогенеза для колхицина (238) [191]. В принципе переход от соединений ангидроцимбинового ряда к колхициновым алкалоидам может быть осуществлен посредством гидроксилирования с последующим гомоаллильным расширением цикла продукта гидроксилирования (235) и с незначительными завершающими модификациями (схема 41).

Эта гипотеза была подтверждена путем изучения соединений типа (232) и (234) в роли предшественников колхицина. Оказалось, что очень эффективными и высокоспецифичными предшественниками колхицина являются *О*-метиландроцимбин (233) и фенетилизохинолиновый алкалоид аутумналин (232) [192]. (Эти результаты подтверждены в экспериментах с [^{13}C]аутумналином [193].) Более широкое изучение различных фенетилизохинолиновых предшественников позволило выяснить и другие детали биосинтеза колхицина (см. схему 41) [192]; так, оказалось, что в биосинтезе этого алкалоида участвует только (*S*)-изомер аутумналина (232) с той же абсолютной конфигурацией, что и колхицин (238), причем окислительная коиденсация этого основания осуществляется между двумя *пара*-положениями, а не между *орто*- и *пара*-положениями [194]. Кроме того, было установлено, что на последних стадиях биосинтеза колхицина образуются демеколцин

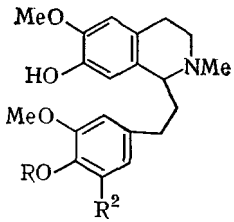
(236) и деацетилколхицин (237) [194].



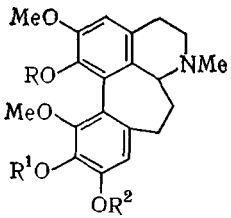
30.1.4.9. Гомоапорфины

В биогенезе гомоапорфинов, например флорамультина (241), фенетилизохинолиновый скелет претерпевает менее глубокие трансформации, чем в процессе биосинтеза колхицина. Уже по названию этой группы алкалоидов можно было бы ожидать, что они образуются аналогично апорфиновым основаниям, т. е. через промежуточные соединения фенетилизохинолинового ряда. Действительно, выделенные из *Kreysigia multiflora* флорамультин (241), мультифлорамин (242) и крейсигин (243) синтезируются из предшественника колхицина — аутумналина (239). Напротив, соединение (245) плохо утилизируется в биосинтезе гомоапорфинов; это свидетельствует об образовании последних посредством прямой окислительной конденсации основания (239), в результате чего прежде других алкалоидов образуется, вероятно, флорамультин (241). В этой схеме не принимают участия промежуточные соединения диеноновой природы; в то же время диенон крейсигинон (244) и соответствующее дигидропроизводное были выде-

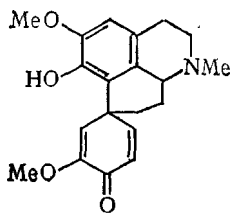
лены из *K. multiflora*. Очевидно, они образуются из основания (240), которое, как оказалось, является еще одним предшественником гомоапорфинов в этом растении [195].



(239) R= Me, R^1= OH
(240) R= R^1= H



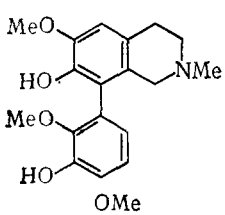
(241) R= R^2= H, R^1= Me
(242) R= R^1= H, R^2= Me
(243) R= H, R^1= R^2= Me



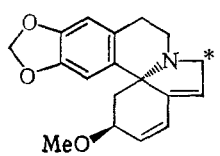
(244)

30.1.4.10. Шельхаммеридин и цефалотаксин

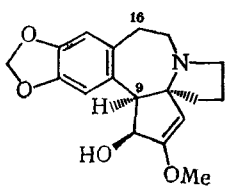
Шельхаммеридин (246), судя по строению, является алкалоидом гомоэритриновой природы. Логично было бы ожидать, что в его биогенезе, как и в случае алкалоидов *Erythrina* (см. разд. 30.1.4.6), участвуют фенетилизохинолиновые соединения типа (239). Предварительно эта гипотеза была подтверждена включением тирозина (метка из С-2 аминокислоты появляется в отмеченном звездочкой атоме углерода), фенилаланина, дофамина и коричной кислоты [196] (точно так же эти соединения включаются в колхицин, см. выше).



(245)



(246)



(247)

Цефалотаксин (247) содержится в тех же растениях, что и алкалоиды типа шельхаммеридина; учитывая очевидную структурную близость этих соединений, можно было бы предположить, что и цефалотаксин образуется из фенилаланина и тирозина через промежуточные соединения фенетилизохинолинового типа. Действительно, тирозин является предшественником цефалотаксина, но распределение метки оказалось совершенно своеобразным: С-3 тирозина переходил в С-9 и С-16 алкалоида. Кроме того, в биосинтезе участвовали две молекулы тирозина вместо одной молекулы тирозина и одной молекулы фенилаланина; отсюда следует, что биосинтез цефалотаксина не связан с фенетилизохинолиновыми основаниями [197].

30.1.5. БИОСИНТЕЗ АЛКАЛОИДОВ AMARYLLIDACEAE И АЛКАЛОИДОВ ГРУППЫ МЕЗЕМБРИНА

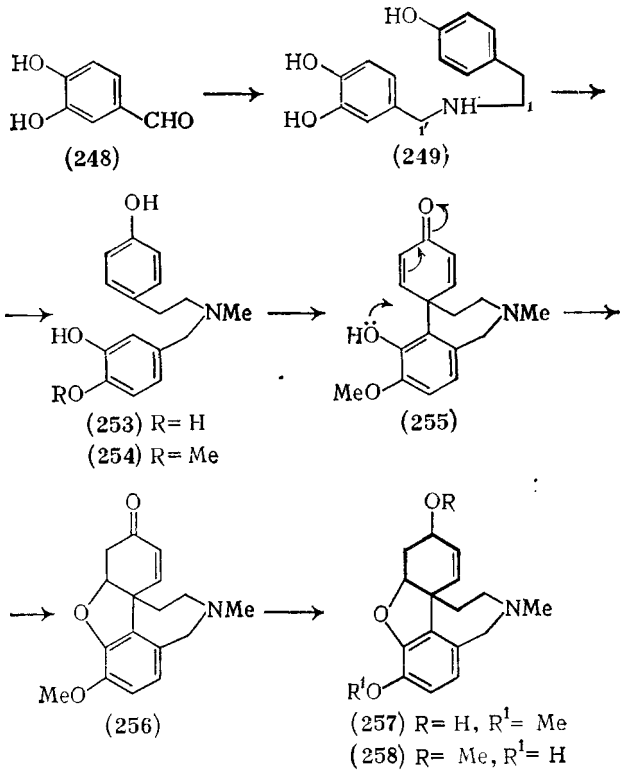
30.1.5.1. Алкалоиды Amaryllidaceae

Среди алкалоидов Amaryllidaceae встречаются соединения различного строения; все они, однако, могут быть разбиты на три группы, типичными представителями которых являются основания (**259**), (**261**) и (**257**). Поворотным пунктом в изучении биосинтеза этих разнообразных алкалоидов явилась блестящая догадка [2] о том, что все они образуются в результате различных вариантов окислительной фенольной конденсации (см. разд. 30.1.1) одного и того же промежуточного соединения типа (**249**); последующие работы подтвердили справедливость гипотезы.

На основании структурного анализа исходного соединения (**249**) можно предположить, что оно образуется из звеньев $C_6 - C_2$ и $C_6 - C_1$, которые сохраняются и в структурах алкалоидов (**259**), (**261**) и (**257**) (выделены жирными линиями). В экспериментах с мечеными соединениями было показано, что во всех алкалоидах этой группы звенья $C_6 - C_2$ образуются только из тирозина [198—201], а звенья $C_6 - C_1$ — из фенилаланина через промежуточную коричную кислоту [198, 202, 203]. Имеются также свидетельства в пользу того, что тирозин включается в виде тирамина (**119**) [198, 202], но не в виде ДОФА (**122**) [204], а коричная кислота сначала дважды гидроксилируется, а затем (до ее включения) превращается в протокатехальдегид (**248**) [198, 202, 203, 205]. Действительно, в ходе биосинтеза наблюдается полная потеря трития от С-3 фенилалаиина, что, вероятно, связано с окислением С-3 аминокислоты на одной из стадий до карбонильной или карбоксильной группы [206].

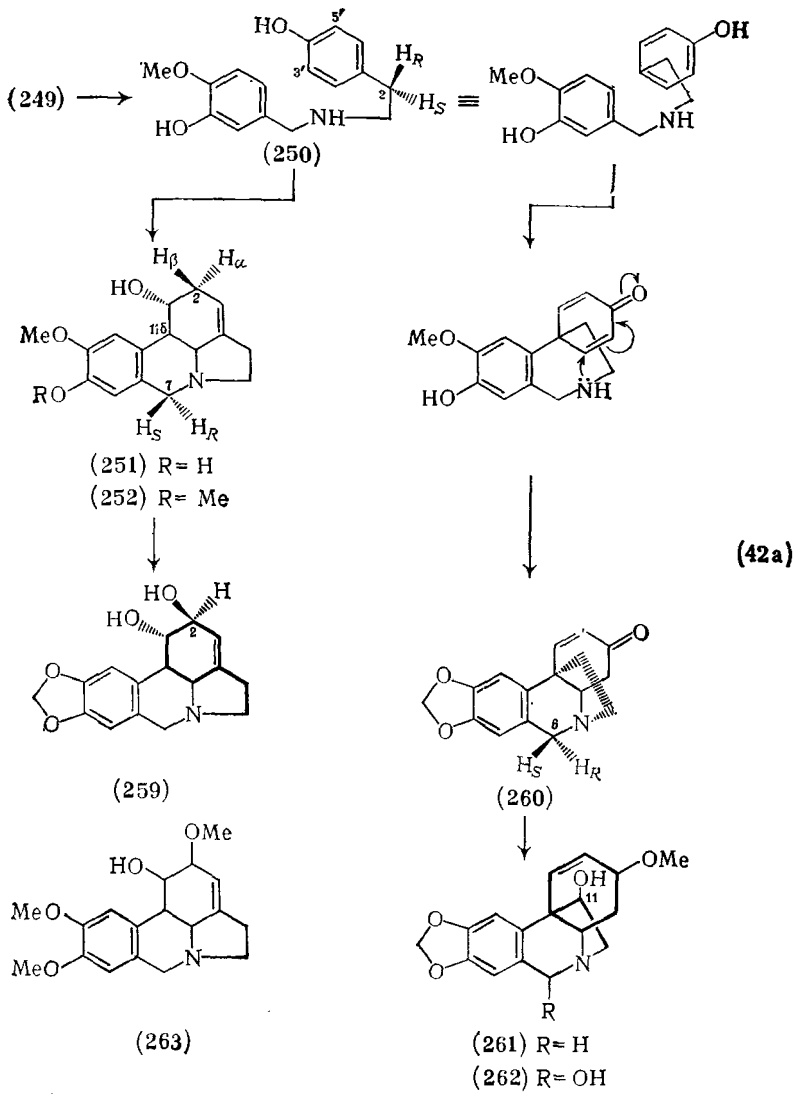
В каждом из алкалоидов метка любого из перечисленных выше предшественников занимает положение, полностью согласующееся с приведенной схемой биосинтеза (схемы 42, 42а). Ключевым промежуточным соединением здесь является норбелладин (**249**). Весомым аргументом в пользу участия последнего в биосинтезе является включение радиоактивного (**249**) без фрагментации его молекулы в ликорин (**259**), гемантамин (**261**) и галантамин (**257**), причем в каждом случае метки распределяются в местах, предсказываемых гипотезой. Следовательно, норбелладин выполняет роль общего предшественника всех трех групп алкалоидов [198, 200, 201]. Изучение производных норбелладина показало, что *O*-метилнорбелладин (**250**) участвует в биосинтезе гемантамина (**261**), норплювиина (**251**) и галантина (**263**) [201, 204], однако в случае галантамина (**257**) на одном из растений были получены положительные результаты, а на другом — отрицательные [201, 207]. *N*-Метильные производные (**253**) и (**254**) участвуют в биосинтезе только галантамина. Была показана также необходимость наличия определенных заместителей в производных норбелладина для

включения последних в тот или иной путь биосинтеза. Представляет интерес, кроме того, выделение из одного из растений рода Amaryllidaceae фермента, способного в присутствии *S*-аденозилметионина практически количественно превращать норбелладин (**249**) в *O*-метилнорбелладин (**250**) [208].

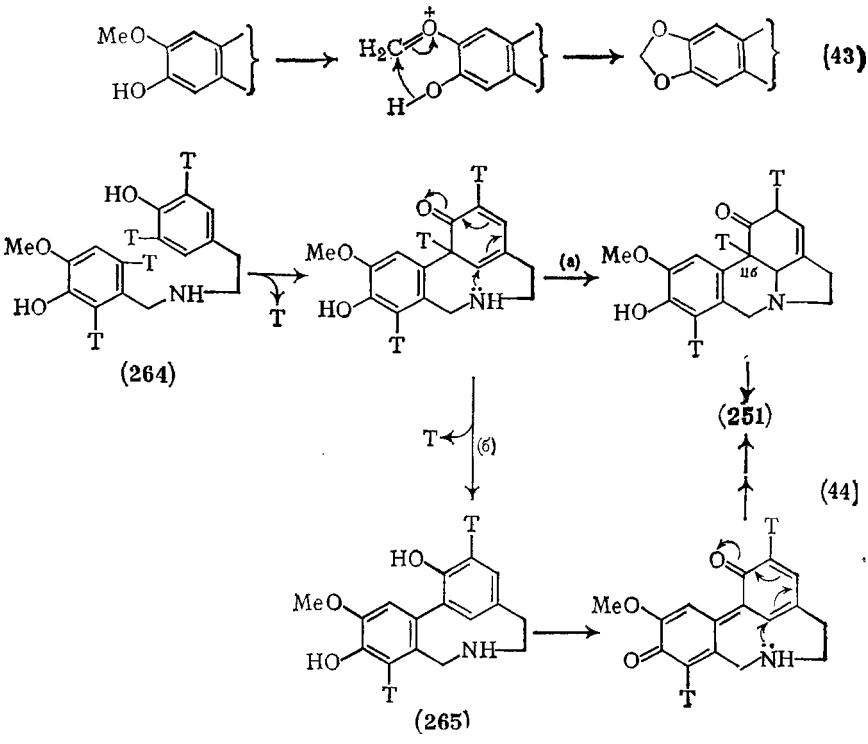


(42)

В ходе изучения включения [метил-^{14}C]-*O*-метилнорбелладина (**250**) в гемантамин (**261**) было впервые обнаружено, что метилендиоксигруппа в основании (**261**) образуется путем окислительной конденсации о-метоксифенола типа (**250**) [201]. Последующие работы по биосинтезу других алкалоидов показали, что эта реакция имеет самый общий характер. Процесс может осуществляться при участии как свободных радикалов, так и катионов (схема 43). Аналогичным путем происходит окислительная циклизация *N*-метильной группы и ароматического ядра при превращении изохинолиновых оснований в протоберберинновые (см. разд. 30.1.4.5). Следует отметить, что в производных норбелладина — (**250**) и (**254**), являющихся промежуточными соединениями в биосинтезе, фенольные гидроксильные группы расположены таким образом, что в соот-



ветствии с гипотезой [2] окислительная конденсация может осуществляться как в *орто*-, так и в *пара*-положениях (см. схему 42). Так, в результате *орто-пара*-конденсации из основания (**254**) образуется диенон (**255**), простой эфир (**256**) которого является природным алкалоидом нарведином. Более того, нарведин (**256**) служит эффективным и специфическим предшественником галантамина (**257**), а из последнего в свою очередь образуется хлидантин (**258**) [209].

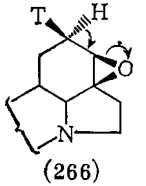


пара-орто-Конденсация в молекуле соединения (250) приводит к норплювиину (251), который, как и исходный (250), является эффективным предшественником ликорина (259). Отсюда следует, что дополнительная гидроксильная группа в ликорине возникает путем аллильного окисления норплювиина (251) [198]. Включение основания (250), меченного тритием так, как это показано в формуле (264), в норплювиин (251) сопровождается сохранением двух атомов трития из четырех; один из сохраняющихся атомов трития связан с С-2. В то же время простейший путь превращения (250)→(251) (путь *а* на схеме 44) требует сохранения трех атомов трития. Очевидно, эта реакция протекает каким-то другим путем, например через промежуточное соединение (265) (путь *б*), обеспечивающим элиминирование тритиевой метки от С-11b норплювиина [204].

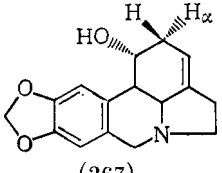
Судьба трития при С-5′ (≡ С-3′) *О*-метилнорбелладина (250) в ходе его превращения в ликорин (259) была изучена в двух растениях и оказалась совершенно различной. В одном случае тритий из (250) появился при С-2 норплювиина (251) в β-конфигурации и сохранился в образовавшемся затем ликорине, но уже в α-конфигурации, что свидетельствовало об обращении конфигурации в процессе гидроксилирования. Такое необычное течение био-

логической реакции заставило предположить, что здесь промежуточно образуется эпоксид (**266**), раскрытие кольца которого с последующей аллильной перегруппировкой образующегося спирта приводит к ликорину (**259**), сохраняющему атом трития [80]. В другой работе [210] тритий при С-5′ соединения (**250**) терялся в ходе биосинтеза ликорина, но удерживался в 2α-положении каранина (**267**); следовательно, в этом растении при гидроксилировании конфигурация не изменяется [177].

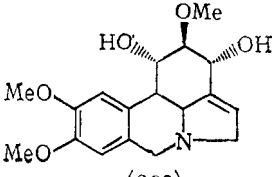
При предварительном анализе возможных путей биосинтеза нарциссидина (**268**) может показаться весьма вероятным, что и здесь на одной из стадий образуется эпоксид (**269**), аналогичный соединению (**266**). Вероятным исходным соединением для эпоксида мог бы служить природный алкалоид галантин (**263**). Экспериментальная проверка показала, однако, что хотя галантин (**263**) и является предшественником нарциссидина (**268**), образование последнего из *О*-метилнорбелладина (**250**) сопровождается сохранением 2-*pro*-(*R*)-атома водорода [соответствующего 4-*pro*-(*S*)-протону эпоксида (**269**)] и потерей 2-*pro*-(*S*)-протона, тогда как при перегруппировке эпоксида (**269**) должен был бы элиминироваться 4-*pro*-(*S*)-атом водорода последнего [211]. Следовательно, эпоксид (**269**) не является промежуточным соединением в биосинтезе нарциссидина (**268**).



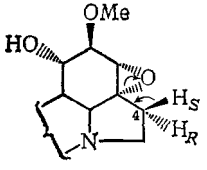
(266)



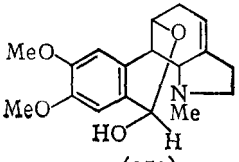
(267)



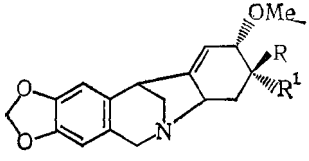
(268)



(269)



(270)



(271) R= H, R^1= OH
(272) R= OH, R^1= H

Биологические превращения протокатехальдегида (**248**) в ликоренин (**270**) формально включают процессы присоединения атома водорода к атому углерода альдегидной группы при образовании *О*-метилнорбелладина (**250**) и затем отщепления атома водорода при введении гидроксильной группы в плювиин (**252**), из которого при этом образуется ликоренин (**270**). В результате

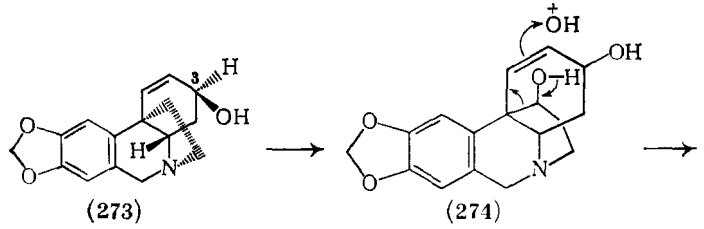
тщательных экспериментов с меченными тритием предшественниками было показано, что как присоединение, так и элиминирование протона осуществляется стереоспецифически, причем теряется именно тот атом водорода, который был присоединен на первой стадии [к обратной стороне молекулы альдегида (**248**)], т. е. 7-*pro*-(*R*)-протон в соединении (**251**) [212, 213].

Примером третьей группы алкалоидов, образующихся путем внутримолекулярной фенольной окислительной *пара-пара*-конденсации норбелладина (**249**), служит гемантамин (**261**). В ходе биосинтеза этих алкалоидов промежуточно возникают соединения типа (**260**). Гемантамин (**261**) обладает дополнительной гидроксильной группой при С-11; было показано [214], что ее введение протекает обычным путем, с сохранением конфигурации.

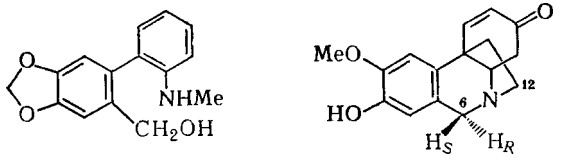
Гемантамин (**261**) является предшественником гемантидина (**262**). Превращения протокатехальдегида (**248**) в последовательности реакций (**250**)→(**261**)→(**262**) сопровождаются стереоспецифическим присоединением атома водорода к атому углерода альдегидной группы и последующим отщеплением этого же протона [212]. В этом отношении биосинтез гемантидина не отличается от биогенеза ликоренина (**270**) (см. выше).

Химическое превращение соединений типа гемантамина (**261**) в алкалоиды типа (**271**) наводит на мысль о возможности аналогичного биосинтеза оснований, подобных мантину (**271**) и монтанину (**272**). Потенциальная взаимосвязь между последними и гемантамином (**261**) в некоторой степени подтверждается образованием соединений (**271**) и (**272**) из *О*-метилнорбелладина (**250**) [215]. Однако в ходе биосинтеза теряется 2-*pro*-(*S*)-протон основания (**250**); это свидетельствует о том, что функциональная группа вводится в положение С-11 вероятного промежуточного соединения типа (**261**) таким образом, что ее стереохимия оказывается противоположной стереохимии введения гидроксильной группы в процессе биосинтеза гемантамина (**261**) (см. выше).

Структура алкалоида нарциклассина (**275**) такова, что в принципе можно представить себе его образование как из промежуточных соединений типа норплювиина (**251**), так и из других предшественников, например из оксокринина (**260**). Эксперименты с мечеными соединениями показали, что в действительности реализуется последний путь, в котором роль промежуточных веществ играют оксокринин (**260**), виттатин (**273**) и соединения типа кринина, аналогичные (**273**), но с псевдоаксиальной гидроксильной группой или с карбонильной функцией при С-3 (образование метилендиоксигруппы не зависит от степени окисления С-3) [216]. Процесс элиминирования двууглеродного мостика при превращении (**273**) в (**275**), вероятно, может начинаться с реакции, обратной реакции Принса, на стадии 11-гидроксивиттатина (**274**) (схема 45); подтверждением этому служит способность последнего эффективно выполнять функции предшественника нарциклассина (**275**) [217] (ср. близкий процесс в биосинтезе колхицина, разд. 30.1.4.8).



(273) (274) (275) (45)



(276) (277)

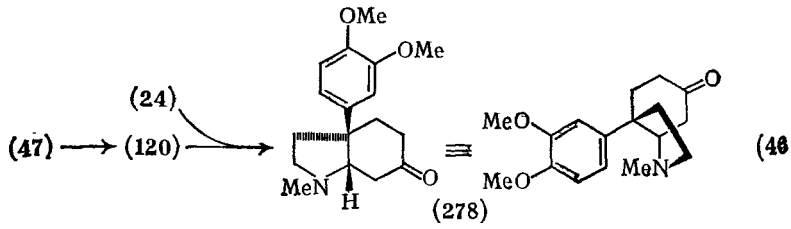
Биосинтез исмина (**276**), как показано исследованиями с применением меченых соединений, сходен с биосинтезом нарцикласси-на; в частности, здесь также промежуточно образуются соединение (**277**) и оксокринин (**260**) [218]. В то же время образование исмина сопровождается более глубокими изменениями скелета молекулы. Так, при включении основания (**277**) теряется С-12 (и, следовательно, *N*-метильная группа исмина образуется не из этого атома углерода); теряется также 6-*pro*-(*R*)-атом водорода. Интересно, что аналогичный *pro*-(*R*)-атом водорода элиминируется в ходе превращений (**261**) в (**262**) и (**251**) в (**270**).

30.1.5.2. Алкалоиды группы мезембрина

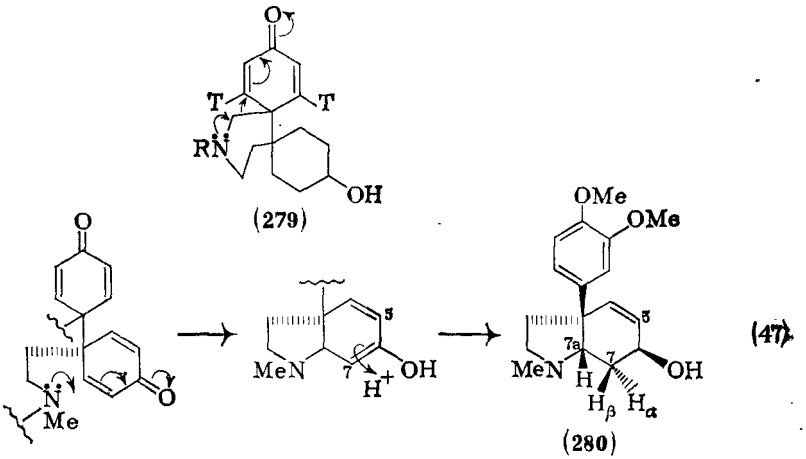
Мезембриновые алкалоиды, примером которых может служить сам мезембрин (**278**), в структурном отношении очень близки алкалоидам Amaryllidaceae типа гемантамина (**261**). Тщательное изучение показало, однако, что единственным общим элементом их биосинтеза является происхождение из фенилаланина (**24**) и

тирозина (47). Ряд производных норбелладина (249), ключевого промежуточного соединения в биосинтезе алкалоидов Amaryllidaceae, включается в мезембрин только после их глубокого распада [219].

В ходе биосинтеза мезембрина C_6—C_2-звено октагидроиндольной группировки образуется из тирозина (47) через промежуточные тирамин и *N*-метилтирамин (120) [220, 221]. Весьма необычное для алкалоидов ангулярное ароматическое C_6-звено мезембрина формируется из фенилаланина (24) [220].



Хотя природа более близких мезембрину предшественников все еще не выяснена, изучение включения меченных тритием фенилаланина, тирозина (и *N*-метилтирамина) позволило частично воссоздать путь биосинтеза этого алкалоида. Тритий в положениях C-2′ и C-6′ фенилаланина сохраняется и в молекуле мезембрина (278). Это еще подчеркивает, что в данном случае нет промежуточных соединений типа кринина [например, оксокринина (260)], типичных для алкалоидов Amaryllidaceae, так как тогда сохранился бы только один из атомов трития. Далее, в образовании связи между фенилаланиновым и тирозиновым звеньями должен принимать участие атом углерода, соответствующий C-1′ фенилаланина. Эти данные позволяют предложить в качестве промежуточного соединения диенон типа (279), который может подвергаться, как показано, частичному расщеплению и ароматизации без потери трития [219]. Циклизация с участием атома азота захватывает также атом C-7a в соединении типа (280), о чем свидетельствуют результаты экспериментов с тирозином, тирамином и *N*-метилтирамином, меченными тритием в положениях C-3′ и C-5′. При включении этих предшественников теряется половина трития, а оставшийся тритий распределяется поровну между H-5 и H-7a. Описанные результаты согласуются с приведенным на схеме (47) путем биосинтеза, протекающего через стадию внутримолекулярного присоединения азота к сопряженной системе с последующим стереоспецифическим α-протонированием получающегося енолята при C-7. Поскольку оставшийся тритий равномерно распределен между C-5 и C-7a мезембренола (280), отщепление трития должно осуществляться в тот момент, когда эти два центра эквивалентны, т. е. до образования диенона [221].



(47)

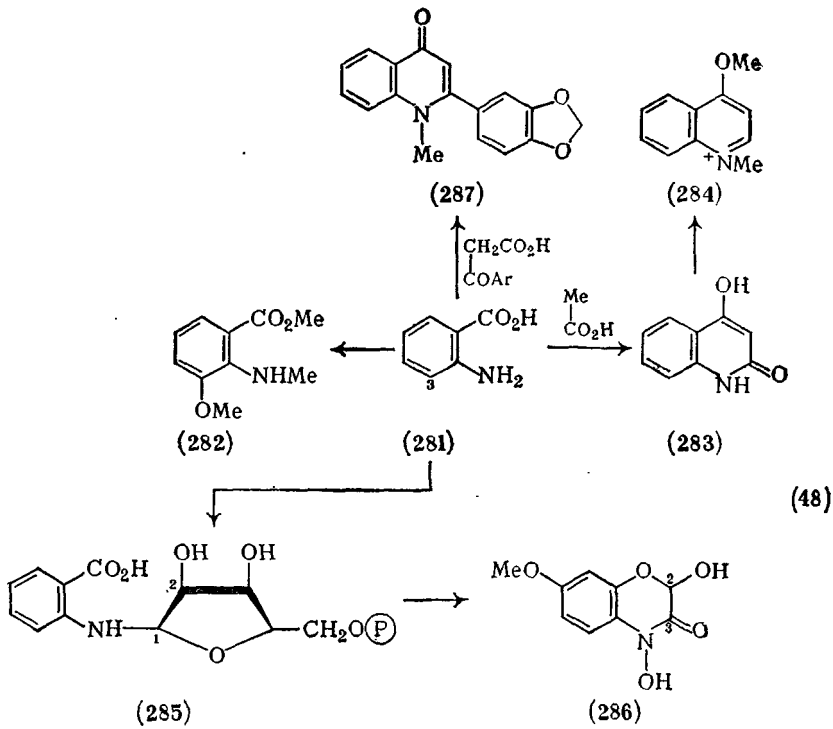
30.1.6. БИОСИНТЕЗ ХИНОЛИНОВЫХ И РОДСТВЕННЫХ АЛКАЛОИДОВ

30.1.6.1. Простые производные антраниловой кислоты

Происхождение всех рассматриваемых в разд. 30.1.6 алкалоидов частично связано с антраниловой кислотой, промежуточным соединением в биосинтезе триптофана. Примером такого типа алкалоидов может служить дамасценин (282), который, как и другие обсуждаемые здесь основания, образуется непосредственно из антраниловой кислоты (281) без превращения ее в триптофан. Об этом свидетельствует включение метки из карбоксильной группы антраниловой кислоты в метоксикарбонильную группу алкалоида (282) (включение антраниловой кислоты через триптофан привело бы к потере карбоксильной группы). Более близким к дамасценину промежуточным соединением в его биосинтезе является 3-метоксиантраниловая кислота [222].

Производное хинолина эхинорин (284) образуется из антраниловой кислоты и ацетата; роль промежуточного соединения, возможно, играет 4-гидроксихинолон-2 (283) [223]. Структура алкалоида гравеолина (287) чуть более сложна; тем не менее его генезис также прост и заключается в конденсации антраниловой кислоты с соединением, образовавшимся из фенилаланина, вероятно, с гидроксибензоилуксусной кислотой [224].

Необычный бензоксазинон (286) также образуется из антраниловой кислоты. Интересно, что атомы С-2 и С-3 в его молекуле имеют совершенно необычное происхождение: они возникают из рибозы (соответственно, из С-2 и С-1). Предполагают, что соединение (285), образующееся из антраниловой кислоты в процессе биосинтеза триптофана, является более близким предшественником алкалоида (286), чем антраниловая кислота [225].

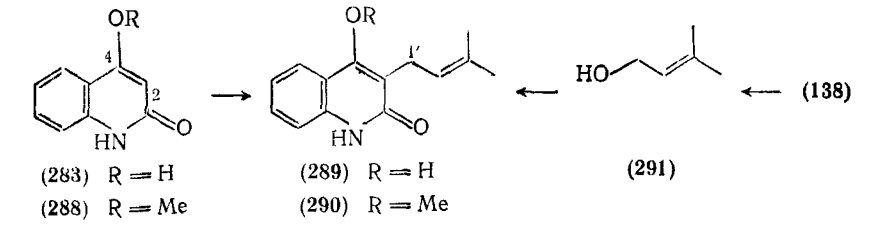


30.1.6.2. Фурохинолиновые алкалоиды

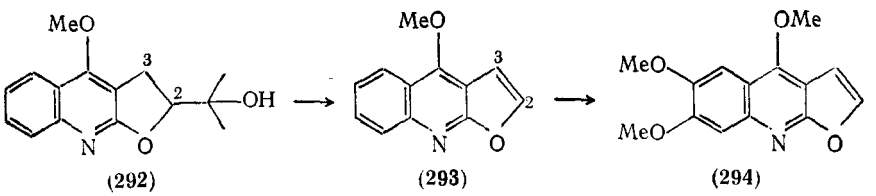
Фурохинолиновые алкалоиды, например диктамнин (**293**), подобно эхинорину (**284**), частично образуются из антраниловой кислоты (но не из триптофана) и ацетата; источником метильных групп служит метионин [226]. Атомы С-2 и С-3 основания (**293**) этими предшественниками не метятся. Обнаружение в природных источниках соединений типа (**292**) позволило установить, что источником этих атомов является мевалоновая кислота. Действительно, мевалоновая кислота (**138**) и диметилаллиловый спирт (**291**) специфически и с удовлетворительной эффективностью включаются в скиммианин (**294**) [227], причем метка из С-4 и С-5 мевалоновой кислоты переходит соответственно в С-2 и С-3 алкалоида.

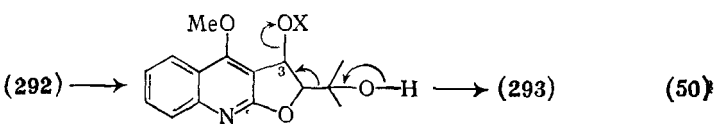
Далее было установлено, что промежуточными веществами в биосинтезе алкалоидов типа диктамнина являются 4-гидроксихинолон-2 (**283**), соединение (**289**) и платидесмин (**292**) [228, 229]. Пренилированию могут подвергаться хинолины как с гидрокси-, так и с метоксигруппой при С-4; в самом деле, любое из соединений (**283**), (**288**)—(**290**) может служить эффективным предшественником алкалоидов, причем основание (**290**), как оказалось, включается без потери метильной группы. Напротив, метилированное

при С-2 производное соединения (288) не включается в биосинтез алкалоидов [229, 230].



(49)





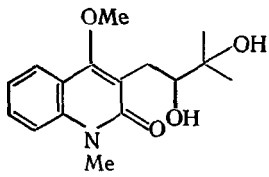
(50)

Превращение платидесмина (292) в диктамнин (293) включает элиминирование гидроксиизопропильной группы при С-2. Предложенный механизм реакции включает стереоспецифическое гидроксилирование при С-3 соединения (292) и последующее расщепление (схема 50); это подтверждается потерей половины трития при включении соединения (290), меченного при С-1′, в скиммианин (294) (в этой схеме вместо гидроксильной группы может отщепляться гидрид-ион, но образование промежуточных кетонов исключается) [230].

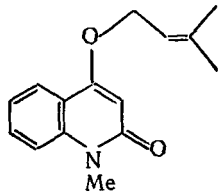
Аналогичная реакция расщепления наблюдается в ходе биосинтеза фурокумаринов; сходство путей биосинтеза этих двух групп соединений подтверждается гидроксилированием бензольного кольца на одной из последних стадий: скиммианин (294) (как и два более сложных алкалоида хоизиин и эвоксин) образуется из диктамнина (293) [231].

Дополнительные данные по биосинтезу фурохинолиновых алкалоидов в растениях получены в ходе изучения продуцирования этих оснований и эдулинина (295) в культурах суспензий клеток *Ruta graveolens*. В частности, было выяснено, что точкой разветвления путей биосинтеза этих двух групп алкалоидов служит соединение (283); *N*-метилирование последнего является исходным пунктом биогенеза алкалоидов типа эдулинина. По-видимому, так же

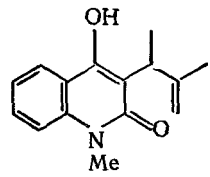
осуществляется биосинтез и в целом растении. В синтезе эдулинина (295) в качестве промежуточных соединений образуются *N*-метилированные производные оснований (289) и (290) [232].



(295)



(296)

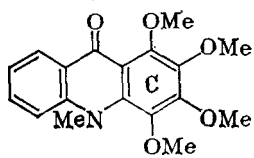


(297)

Равенин (296) является предшественником алкалоида другого типа, равенолина (297). Это превращение, вероятно, осуществляется по механизму перегруппировки Клайзена; последняя может играть определенную роль и в биосинтезе других алкалоидов [233].

30.1.6.3. Акридоновые алкалоиды

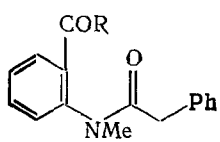
Акридоновые алкалоиды, например меликопицин (298), обнаружены в растениях того же семейства (Rutaceae), что и фурохинолиновые основания; в их биосинтезе также участвуют антраниловая и уксусиая кислоты, причем из последней, по всей вероятности, формируется целиком кольцо С. Промежуточными соединениями в биосинтезе акридоновых алкалоидов являются *N*-метилантраниловая кислота, 4-гидроксихинолон-2 (283) и его *N*-метильное производное [234, 235]



(298)

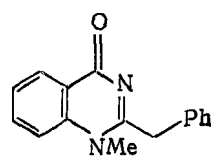
30.1.6.4. Хиназолиновые алкалоиды

Подобно гравеолину (287) арборин (301) образуется из антраниловой кислоты и фенилаланина, но природа промежуточных соединений, за исключением *N*-метилантраниловой кислоты, не выяснена. Наиболее вероятными предшественниками арборина являются фенилуксусная кислота, соединения (299) и (300) [235, 236].



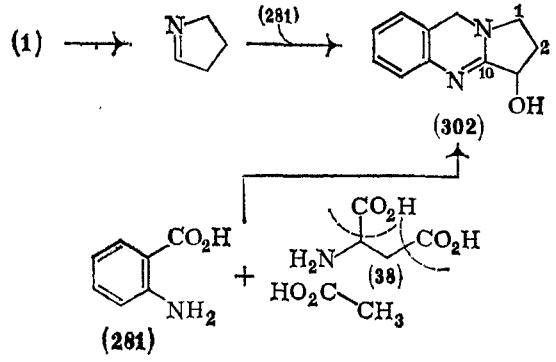
(299) R = OH

(300) R = NH_2

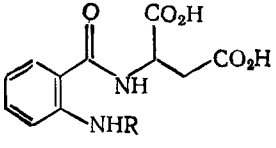


(301)

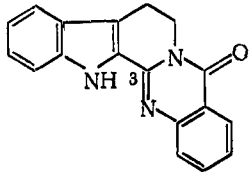
Биосинтез пеганина (вазицина) (**302**) еще менее ясен. Было показано [237, 238], что в двух растениях различных семейств этот алкалоид образуется различными путями (схема 51), причем общим промежуточным соединением является только антраниловая кислота (**281**) [239]. В одном из растений предшественником пеганина наряду с антраниловой кислотой является орнитин (**1**) (и путресцин); метка как из [2-^{14}C]-, так и из [5-^{14}C]орнитина специфически и в равной степени включается в С-1 и С-10 пеганина [237]. В случае другого растения не обнаружено включение орнитина или его производных. Напротив, C_2-звено (С-1 и С-2 пеганина) образовывалось здесь из аспарагиновой кислоты (**38**), а атомы С-3 и С-10 — из ацетата, что было подтверждено включением интактной *N*-ацетилантраниловой кислоты [238]. Достаточно специфическим предшественником пеганина является также антраноиласпарагиновая кислота (**303**), откуда следует, что ключевым промежуточным соединением в биосинтезе этого алкалоида может быть аминокислота (**304**) [240]. Если данные о существовании двух столь различных путей биосинтеза пеганина подтвердятся (а они нуждаются в подтверждении), тогда последний будет уникальным явлением среди алкалоидов. До сих пор не известно другого случая видовой специфичности в биосинтезе растительных алкалоидов (ср. биосинтез грамина, разд. 30.1.7.1), если не считать существенно различные пути биосинтеза кониина (**64**) и *N*-метилпельтьерина (**70**) (см. разд. 30.1.3.1), а также гипотетические пути биосинтеза, рассмотренные в разд. 30.1.3.2.



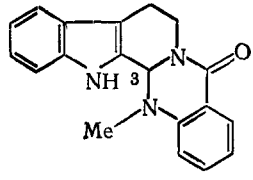
(51)



(303) R = H
(304) R = Ac



(305)



(306)

Происхождение алкалоидов рутекарпина (**305**) и эводиамина (**306**) более ясно: в них включаются как антраниловая кислота, так и триптофан, а метионин служит источником С-3 в обоих алкалоидах и источником *N*-метильной группы в случае (**306**) [241]. Логично предположить, что С-3 возникает в процессе биосинтеза из *N*-метильной группы (ср. происхождение «берберинового мостика»; разд. 30.1.4.5).

30.1.7. БИОСИНТЕЗ ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ

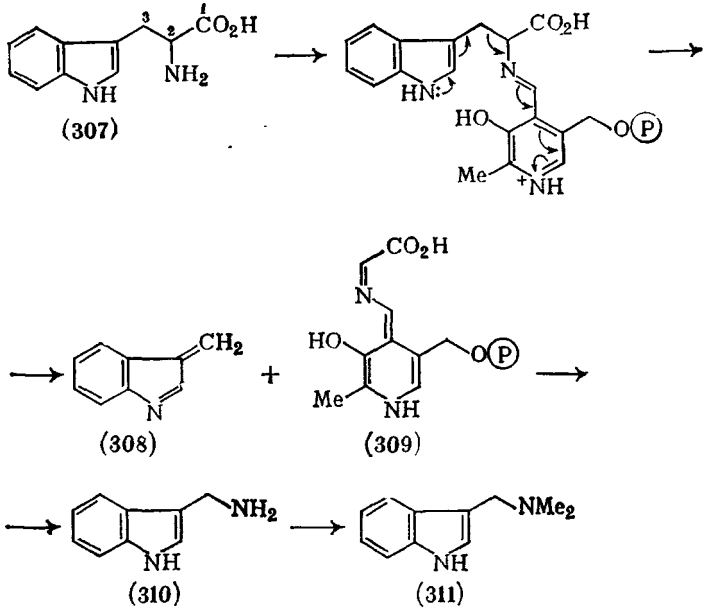
В настоящем обзоре не рассматривается биосинтез эргоалкалоидов и родственных соединений; этому вопросу посвящен отдельный подробный обзор [242].

30.1.7.1. Простые производные индола

Индольный алкалоид ячменя грамин (**311**) представляет собой один из наиболее простых продуктов модификации ароматической аминокислоты триптофана (**307**). Изучение биосинтеза грамина явилось поворотным пунктом в развитии исследования по биосинтезу растительных алкалоидов; эксперименты [243] по специфическому включению метки из [3-^{14}C]триптофана в метиленовую группу боковой цепи грамина были первыми из множества такого рода экспериментов (если не считать работ по изучению метилирования). Впоследствии было однозначно доказано, что в грамин (**311**) включается вся индольная кольцевая система триптофана (**307**) и атом С-3 с двумя атомами водорода [244]. Оказалось также, что в боковую цепь грамина из триптофана переходит и атом азота [245], а метильные группы последовательно вводятся в соединение (**310**) [246]. Эти данные согласуются с возможным механизмом биосинтеза грамина, где промежуточным соединением является аддукт триптофана с пиридоксальфосфатом (схема 52) [247]. Согласно предлагаемому механизму, атом азота из аминогруппы триптофана попадает в конечный продукт в результате аминирования интермедиата (**308**); для этого, однако, в растениях должен иметь место специфический процесс, обеспечивающий перенос атома азота от соединения (**309**) к (**308**).

Показано, что в растении другого семейства биосинтез грамина протекает точно таким же путем, как и в ячмене; следовательно, биогенез этого алкалоида не обладает видовой специфичностью [248].

Другими простыми производными индола являются основания (**312**) и (**313**), а также псилоцибин (**315**). Установлено, что биосинтез псилоцибина осуществляется в последовательности: триптофан (**307**) → триптамин → *N*-метилтриптамин → *N*,*N*-диметилтриптамин → → псилоцин (**314**) → псилоцибин (**315**) [249]. Биосинтез оснований (**312**) и (**313**) более сложен; он протекает почти всеми теоретически возможными путями, включающими реакции декарбоксилиро-



(52)

вания, гидроксилирования, *O*- и *N*-метилирования в различных последовательностях [250]. Эти результаты предостерегают от упрощенного представления о том, что вторичные метаболиты всегда образуются одним единственным путем.

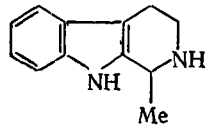


(312) R = H
(313) R = OMe
(314) R = H
(315) R = PO_3H_2

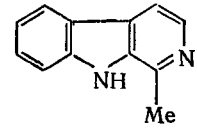
30.1.7.2. β-Карболиновые алкалоиды

Между β-карболиновыми алкалоидами, например элеагнином (**316**), и простыми изохинолиновыми алкалоидами, например ангалонидином (**132**), существует очевидное структурное сходство. Казалось бы, по аналогии с биосинтезом ангалонидина (см. разд. 30.1.4.1), что в биосинтезе β-карболиновых оснований должны принимать участие промежуточные соединения типа (**127**) и (**129**). Однако единственным косвенным свидетельством в пользу такого механизма является включение гармалана (**318**) в гарман (**317**) в растении *Passiflora edulis* [251]. Элеагнин (**316**) также включается в алкалоиды (**317**) и (**318**); следовательно, здесь имеет место последовательное дегидрирование; (**316**)→(**318**)→(**317**) [251].

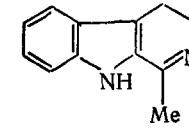
Наконец, в гарман (317) в растении *P. edulis* эффективно включается *N*-ацетилтриптофан, по-видимому, без его расщепления [251] (в биосинтезе изохинолинов аналогичные соединения вообще не участвуют). Однако *N*-ацетилтриптофан не является предшественником элеагнина (316) в *Eleagnus angustifolia* [127], хотя в этом растении ацетат и триптофан специфически включаются в этот алкалоид [252]. Возможно, что его биогенез протекает различными путями в разных растениях, поскольку методом изотопного разведения удалось выделить *N*-ацетилтриптамин из *P. edulis* [251], но не из *E. angustifolia* [127]. В качестве предшественников β-карболиновых алкалоидов и в том, и в другом растении в первую очередь заслуживают внимания соединения типа (319).



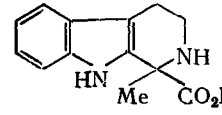
(316)



(317)



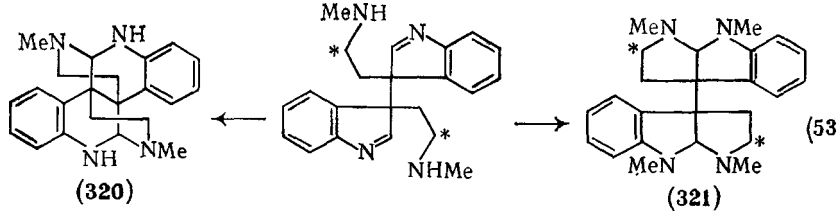
(318)



(319)

30.1.7.3. Каликантин и фоликантин

Кажется весьма вероятным, что каликантин (320) и фоликантин (321) представляют собой различные димеры метилтриптамина (схема 53). В пользу этого предположения говорит включение [2-^{14}C]триптофана (307) в оба алкалоида [253, 254]. В более простом случае фоликантина (321) удалось определить положение меток (отмечены звездочками) [253].



(320) (321) (53)

30.1.7.4. Терпеноидно-индольные алкалоиды

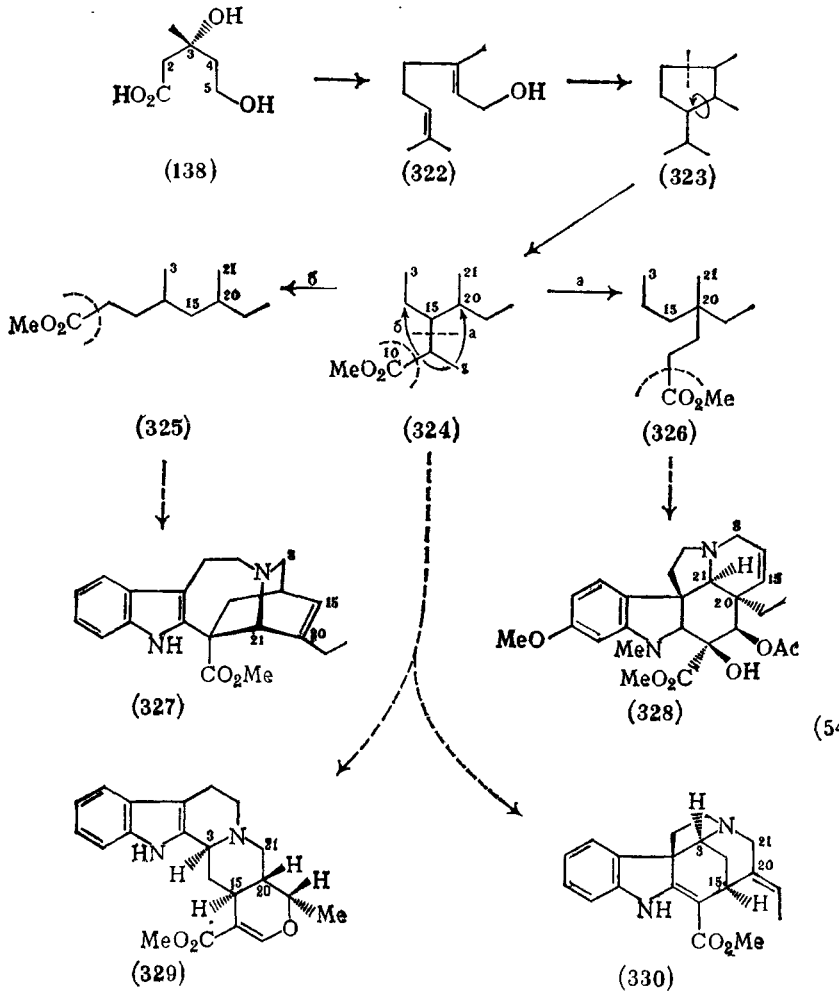
Известно более тысячи различных терпеноидно-индольных алкалоидов, образующихся путем различных структурных трансформаций. Для алкалоидов этой группы характерно наличие инвариантного триптаминового звена и C_9—C_{10}-звена различного строения. Во всех изученных случаях триптаминовое звено формируется

из триптамина, который в свою очередь образуется из триптофана [255—257]. Разнообразие структур таких алкалоидов большей частью обусловлено модификациями в C_9—C_{10}-звене. Как это на первый взгляд ни удивительно, все многочисленные терпеноидно-индольные алкалоиды можно разбить на три группы: а) алкалоиды Corynanthé — Strychnos, например аймалицин (**329**) и акуаммицин (**330**), с C_9—C_{10}-звеном типа (**324**); б) алкалоиды Aspidosperma, например виндолин (**328**), с C_9—C_{10}-звеном типа (**326**); в) алкалоиды Iboga, например катарантин (**327**), с C_9—C_{10}-звеном типа (**325**) [если нетриптаминовая часть молекулы алкалоида содержит только девять атомов углерода, теряется один атом углерода, как показано в формулах (**324**) — **326**)].

Различные предположения о биогенезе звеньев C_9—C_{10}, присутствующих во всех алкалоидах рассматриваемого типа, не выдержали экспериментальной проверки [8, 10], за исключением гипотезы об их терпеноидном происхождении [247, 258], согласно которой любое из C_9—C_{10}-звеньев образуется посредством расщепления циклопентанового кольца монотерпена с последующими модификациями (схема 54). Справедливость этого предположения была доказана экспериментально, уточнены детали механизма биосинтеза. Так, удалось доказать, например, что C_9—C_{10}-звено всех трех групп алкалоидов формируется путем обычной конденсации двух мевалонатных звеньев по типу «голова к хвосту» и проходит через стадии гераниола (**322**) или нерола (**331**) [259, 260] и ключевого циклического монотерпеноида логанина (**335**) [261]. Далее было показано, что логанин (**335**) является специфическим предшественником терпеноидно-индольных оснований и что он сам присутствует в *Vinca rosea*, растении, использовавшемся в большинстве экспериментов, где образуется из гераниола [262].

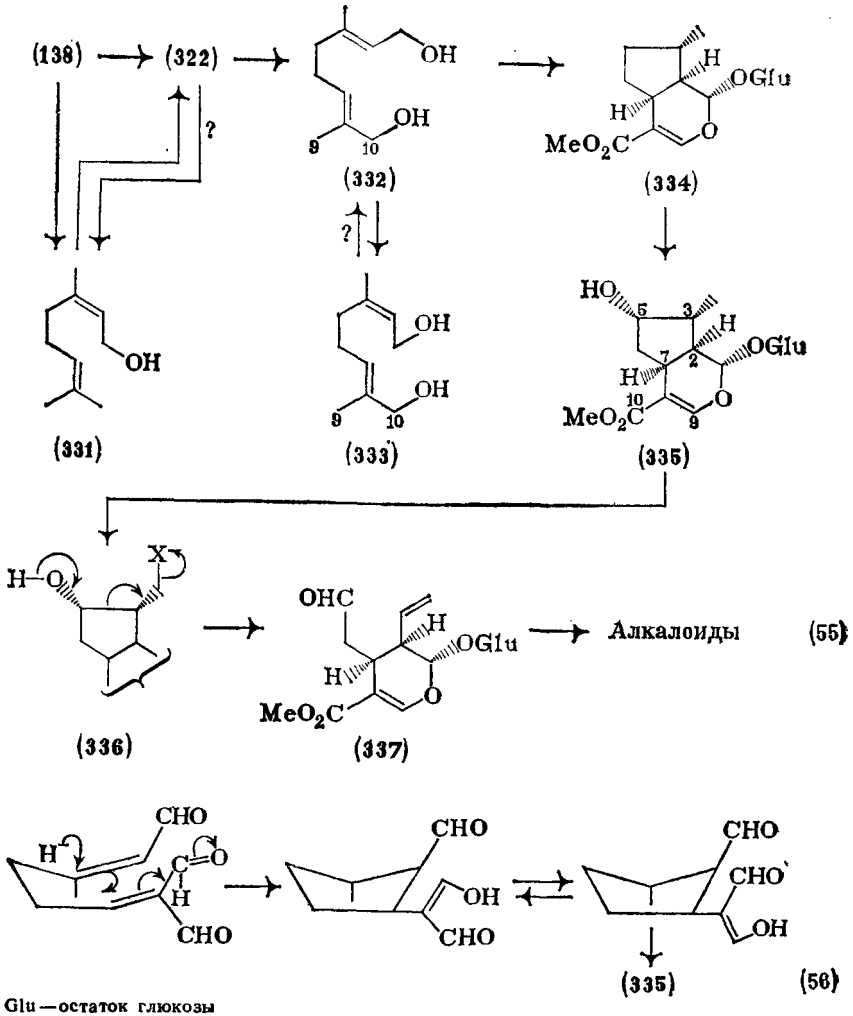
Как и в случае других биологических систем, в биосинтезе алкалоидов участвует только 3-(*R*)-изомер мевалоната (**138**) [260]. При включении мевалоната, меченного по С-2 или С-3′, концевые атомы С-9 и С-10 промежуточного соединения типа (**324**) утрачивают свою «индивидуальность»; аналогичное явление наблюдалось при изучении биосинтеза циклопентаноидных монотерпенов [263].

В последующих экспериментах было показано, что в ходе превращения гераниола (**322**) или нерола (**331**) в логанин (**335**) промежуточно образуется дезоксилоганин (**334**) [264], а также гидроксилированные при С-10 производные гераниола и нерола (**332**) и (**333**), соответственно (схема 55) [263а, 265]. Другие производные нерола и гераниола не включаются в биосинтез терпеноидно-индольных алкалоидов, что ограничивает круг возможных предшественников. Это позволило предложить наиболее вероятный механизм циклизации (схема 56) с учетом равномерного распределения метки из мевалоната через атомы С-9 и С-10 промежуточных соединений (**332**) и (**333**) между С-9 и С-10 логанина (**335**) и между соответствующими положениями алкалоидов [263а].



(54)

Превращение логанина (335) в индольные алкалоиды должно проходить через стадию расщепления циклопентанового кольца [ср. (323)→(324) в схеме (54)]; можно предположить, что механизм этой стадии соответствует изображенному в (336) процессу, в результате которого образуется секологанин (337). Это подтверждается включением секологанина в алкалоиды и его обнаружением в свободном состоянии в *V. rosea* [266]. Следующими вероятными промежуточными соединениями являются продукты конденсации триптамина (338) с секологанином (337) — винкозид (340) и изовинкозид (339) [257, 267]. Оба эти основания содержатся в *V. rosea* и образуются из логанина [257, 268], но далее в биосинтезе терпеноидно-индольных алкалоидов участвует только

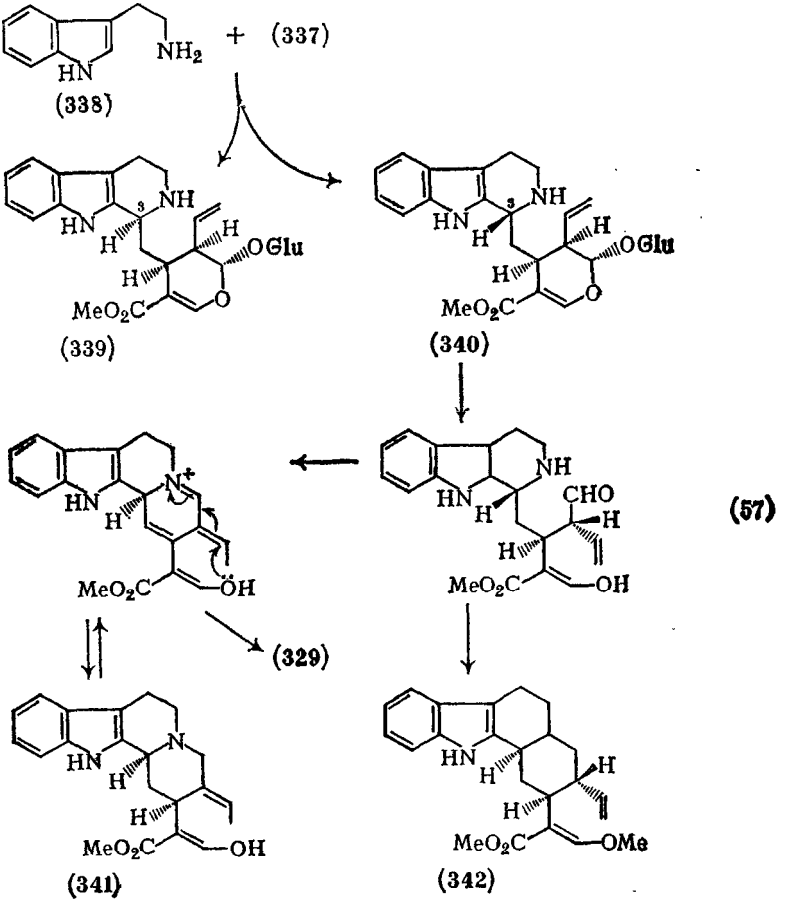


Glu—остаток глюкозы

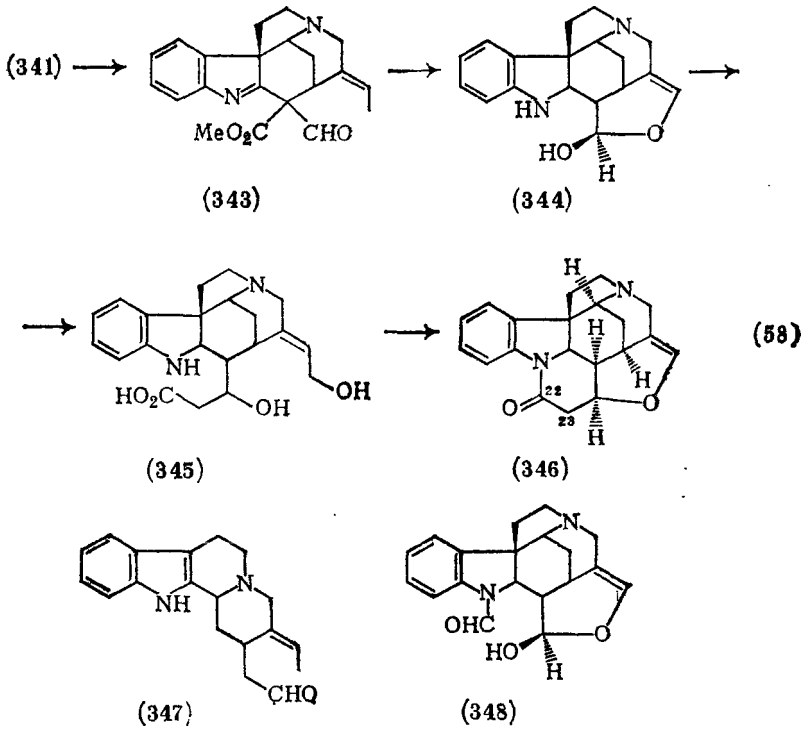
винкозид (340) [257]. Этот факт не может не вызвать удивления, поскольку изовинкозид обладает той же конфигурацией при С-3, что и, например, соединения (329) и (341); последние, вероятно, являются предшественниками оснований типа (327) и (328) (см. ниже), и в таком случае включение винкозида (340) должно быть связано с инверсией этого центра [267]. Далее, тритий при С-5 логанина (335) (что отвечает положению С-5 в молекуле винкозида) сохраняется и в алкалоидах, образующихся из винкозида [269]; следовательно, эпимеризация не сопровождается потерей протона от С-3 соединения (340) и должна протекать путем расщепления связи С—С или, что более вероятно, связи С—N. Позднее было

однозначно показано, что истинным предшественником терпеноидно-индольных алкалоидов является не винкозид (340), а изовинкозид (339) (Glu — остаток глюкозы) [270].

Образование соединений типа алкалоидов Corynanthé, например коринантеина (342) и аймалицина (329), из винкозида не требует никаких скелетных перегруппировок. Считают, что первой стадией процесса является ферментативное отщепление остатка глюкозы, а дальнейшие превращения происходят так, как показано на схеме (57) [257]. Резонно считать, что этот тип алкалоидов является предшественником для оснований с молекулярным скелетом, подвергшимся перегруппировкам. Действительно, было показано [271], что алкалоиды типа Corynanthé появляются в ростках *V. rosea* раньше, чем алкалоиды типов Aspidosperma и Iboga, а алкалоид типа Corynanthé гейсошизин (341) является ключевым промежуточным соединением в биосинтезе оснований с перегруппировавшимися C_9—C_{10}-звеньями. Молекула гейсошизина целиком

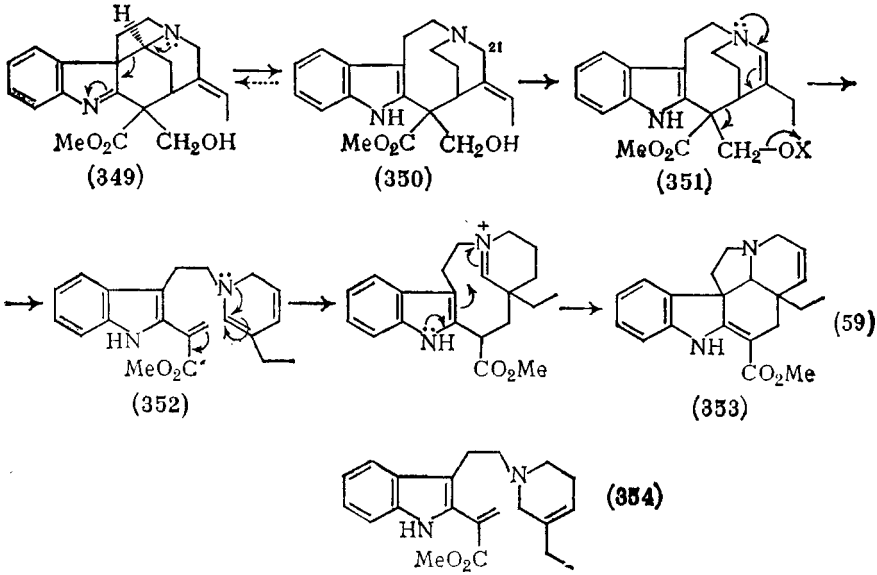


включается в алкалоиды типов Aspidosperma и Iboga [272], а также в алкалоиды группы Strychnos, например в акуаммицин (330) [272] и стрихнин (346) [273]. Стрихнин образуется обычным образом из мевалоната (через промежуточный гераниол) и триптофана, а необычное C_2-звено (C-22 и C-23) формируется из ацетата [274]. Поиски промежуточных соединений в биосинтезе стрихнина показали [273], что его предшественником является альдегид Виланда — Гумлиха (344), а отрицательные результаты с гейсошизалем (347) и диаболином (348) позволяют предположить, что промежуточно при этом образуются также соединения (343) и (345) (схема 58).



Результаты стандартных экспериментов с мечеными соединениями и опытов по выяснению последовательности биосинтеза алкалоидов путем определения появления метки в индивидуальных основаниях в зависимости от времени показали [271, 275], что важными промежуточными соединениями в биогенезе терпеноидно-индольных алкалоидов являются также стеммаденин (350), таберсонин (353) и преакуаммицин (349). Установлено, что в биосинтезе катарантина (327) (тип Iboga) и виндолина (328) (тип Aspidosperma) принимает участие стеммаденин (350), утилизирующийся при синтезе таберсоиина (353); предполагаемый меха-

низм образования последнего приведен на схеме (59). Ключевым соединением в этой гипотетической схеме является енамин (352) — продукт частичного расщепления стеммаденина (350). Экспериментально доказанное включение таберсонина (353) в катарантин (327) свидетельствует против других путей циклизации стеммаденина, которые могли бы непосредственно привести к алкалоидам типа Iboga, например (327), и типа Aspidosperma, например (353). Участие енамина (352) в биосинтезе подтверждается выделением из растений простых производных секодина (354) и специфическим включением меченого секодина (354) в виндолин (328); потеря атома трития дегидропиперидиновым кольцом секодина (354) в последнем превращении согласуется с предполагаемым образованием промежуточных соединений типа (352) более высокой степени окисления [276].

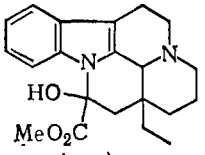


До сих пор в настоящем разделе только кратко упоминалось об использовании соединений, меченных тритием, для изучения биосинтеза терпеноидно-индольных алкалоидов. На самом деле меченные тритием соединения применялись в этой области очень широко, и именно с их помощью была получена большая часть описанных выше результатов. [В последующем тексте цифры в скобках указывают места введения меток в логанин (335).] В этих экспериментах применяли меченные тритием геранил (C-1 и C-2), нерол (C-2), мевалонат (C-2 и C-7) и логанин (C-5). Оказалось, что тритий при C-1, C-5 и C-7 сохраняется при образовании алкалоидов любого из трех типов, в то время как тритий при C-2 теряется [метка при C-5 занимает положение C-3 в молекулах оснований (327), (328) и (329)]. Эти данные полностью согласуются

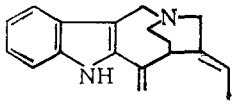
с описанными здесь путями биосинтеза. Следует также отметить, что в гипотетической схеме превращения соединения (350) в (351) миграция двойной связи протекает стереоспецифично и не затрагивает атом водорода при С-21, образующийся из С-1 логанина [260, 269].

30.1.7.5. Винкамин

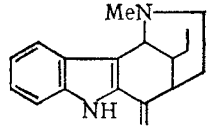
Предполагают, что винкамин (355) образуется из терпеноидно-индольных алкалоидов типа Aspidosperma, поскольку в его молекулу в ходе биосинтеза включаются триптофан (307), стеммаденин (350) и таберсонин (353) [277].



(355)



(356)



(357)

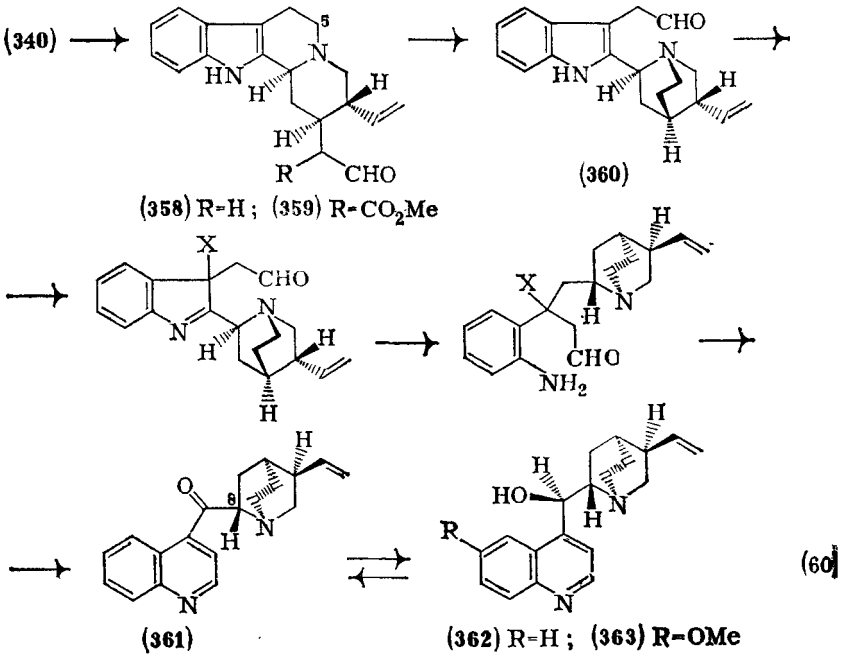
30.1.7.6. Аппарицин и улеин

Из рассмотрения структур алкалоидов аппарицина (356) и улеина (357) видно, что их биосинтез сопровождается модификациями боковой цепи триптамина. По биосинтезу улеина данных практически нет, а в отношении аппарицина (356) выяснено, что он образуется из триптофана (307), причем последний, как и следовало ожидать, теряет С-2 [279]. Предшественниками аппарицина являются стеммаденин (350) и секодин (354); следовательно, перегруппировка, в результате которой образуется скелет аппарицина, должна осуществляться на одной из последних стадий биосинтеза [280].

30.1.7.7. Алкалоиды Cinchona

Первые стадии сложного пути биосинтеза алкалоидов Cinchona, например цинхонидина (362) и хинина (363), близки биогенезу алкалоидов Corynanthé и родственных оснований (см. разд. 30.1.7.4); доказано, что в нем принимают участие триптофан (307), триптамин (338), гераниол (322), логанин (335) и винкозид (340) [259а, 281—283]. Вероятно, последним из промежуточных соединений типа Corynanthé является основание (358) [в алкалоиды Cinchona включается (358), но не (359)] [282], из которого на следующей стадии образуется соединение (360) [282], поскольку соответствующий спирт не включается в алкалоиды Cinchona и поскольку из [1-$^3H_2$]триптамина [положение метки соответствует С-5 в соединении (358)] удерживается половина трития, что исключает возможность образования в качестве промежуточ-

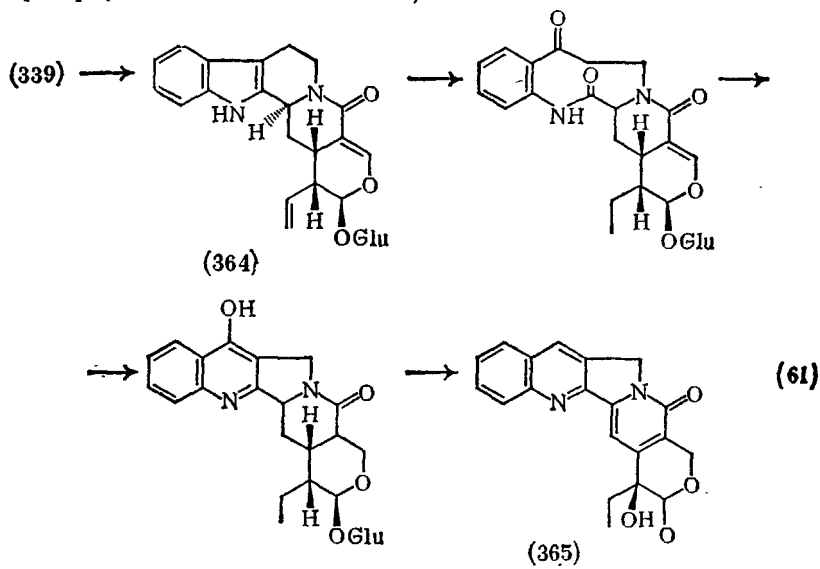
ного соединения соответствующей карбоновой кислоты [283]. Относительно последующих стадий биосинтеза, в которых участвует основание (360), экспериментальные данные отсутствуют; можно предположить, однако, что далее биосинтез протекает так, как это показано на схеме (60). Одним из последних промежуточных соединений является цинхонидинон (361); было показано, что он присутствует в растениях семейства Cinchona и способен превращаться в алкалоиды Cinchona [283]. Установлена также обратимость реакции (361) ⇄ (362) и возможность ароматического гидроксилирования и эпимеризации при C-8 на стадии кетона (361) [283].



30.1.7.8. Камптотецин

Предполагали, что камптотецин (365) образуется аналогично терпеноидно-индольным алкалоидам (см. разд. 30.1.7.4). С помощью меченых соединений было показано, что биосинтез этих оснований протекает по одному и тому же пути вплоть до стадии образования винкозида и(или) изовинкозида [284, 285]. В отличие от биосинтеза терпеноидно-индольных алкалоидов, в котором участвует винкозид (340) (см., однако, работу [270]), предшественником камптотецина является лактам (364), образующийся из изовинкозида (339) (изучение эпимерных лактамов, проводившееся с использованием ^{13}C, было одним из первых случаев применения

этого изотопа для выяснения биосинтеза растительных алкалоидов) [284] (Glu — остаток глюкозы).

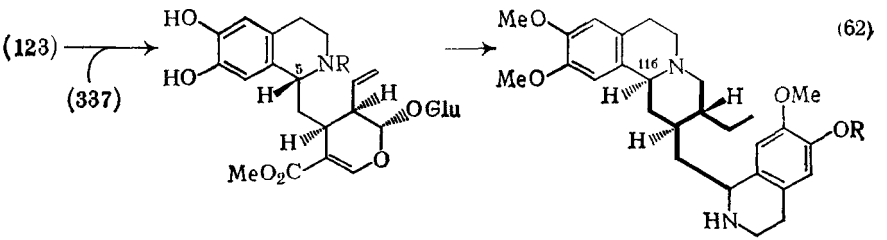


30.1.8. БИОСИНТЕЗ АЛКАЛОИДОВ ИПЕКАКУАНЫ

Алкалоиды цефелин (**368**) и эметин (**369**), с одной стороны, являются изохинолиновыми алкалоидами, а с другой — содержат терпеноидные остатки из девяти атомов углерода. По этой причине они рассматриваются отдельно. C_9-Звено в этих алкалоидах (выделено жирной линией) очень напоминает аналогичное звено терпеноидно-индольных алкалоидов (см. разд. 30.1.7.4); действительно, сообщалось о специфическом включении в алкалоиды ипекакуаны мевалоната, гераниола (**322**), логанина (**335**) и секологанина (**337**) [286—288] (ряд других вероятных предшественников был отвергнут) [287]. Гераниол, логанин и секологанин включаются также в алкалоид ипекозид (**366**) [286, 288], терпеноидная природа которого более очевидна. Деацетильное производное последнего (**367**) оказалось ключевым промежуточным соединением в биосинтезе более сложных алкалоидов — эметина (**369**) и цефелина (**368**) [288]. В синтезе этих алкалоидов участвует только деацетилипекозид (**367**), но не его эпимер при C-5. Следует подчеркнуть, что в этих алкалоидах конфигурация при C-11b противоположна конфигурации эквивалентного центра (C-5) в предшественнике. Сохранение трития, находившегося при C-5 логанина (**335**) [что отвечает C-5 в соединении (**367**)], в образующихся из него алкалоидах показывает, что эпимеризация, осуществляющаяся на стадиях превращения (**367**) в (**368**) и (**369**), не связана с отщеплением и замещением протона (трития) [288]. Таким образом, процесс

эпимеризации очень близок аналогичному процессу в терпеноидно-индольных алкалоидах (см. разд. 30.1.7.4). Вероятно, он связан с расщеплением связи C—N, но механизм реакции не ясен. Не установлена и биологическая значимость такого рода реакций.

Нетерпеноидные фрагменты цефелина (368) и эметина (369) имеют явно выраженное фенетиламиновое происхождение и, следовательно, (см. разд. 30.1.4), их специфическим предшественником является тирозин. Результаты изучения биосинтеза этих алкалоидов суммированы на схеме (62; Glu — глюкозил).



(62)

(366) R = Ac
(367) R = H

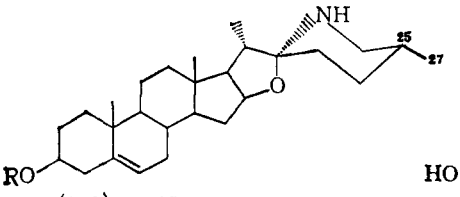
(368) R = H
(369) R = Me

30.1.9. БИОСИНТЕЗ СТЕРОИДНЫХ И ТЕРПЕНОИДНЫХ АЛКАЛОИДОВ

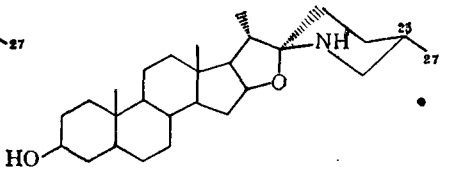
30.1.9.1. Стероидные алкалоиды

Можно с полным основанием полагать, что природные стероидные алкалоиды, например соласодин (370), соланидин (374) и иервин (376), образуются путем сравнительно несложных трансформаций обычных стероидов. Действительно, ацетат и мевалонат являются предшественниками, например, соласодина (370) и томатидина (373) [289, 290], из холестерина образуются томатидин (373) и соланидин (374), а также основания *Veratrum* — иервин (376) и вератрамин (378) [291]; циклоартенол и ланостерин, возможно, служат предшественниками соланидина (374), соланокапсина (379) и томатидина (373) [292]. 3-Аминопрегненоновые алкалоиды с совершенно другими заместителями — голафиллин (381) и голафилламин (382) также образуются из холестерина, причем промежуточным соединением в этом случае оказался не прогестерон, а прегненолон (380) [293].

Можно полагать, что модификация стероидной боковой цепи, в результате которой образуются стероидные алкалоиды типа томатидина (373) и соласодина (370), происходит так, как это показано на схеме (63). Поскольку метильная группа при C-27 25(*R*)-алкалоида соласодина (370) возникает из C-2 мевалоната (138) [289], то насыщение промежуточного Δ^{24}-соединения должно происходить путем присоединения водорода со стороны 24-*si*, 25-*si* (путь *a*). Такова же стереохимия образования 25(*S*)-алкалоида



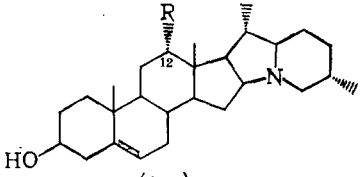
(370) R = H



(373)

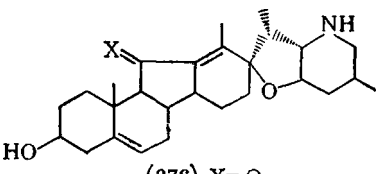
(371) R = *D*-Gal(*D*-Glc, *L*-Rha)

(372) R = *D*-Glc(*L*-Pha, *L*-Rha)



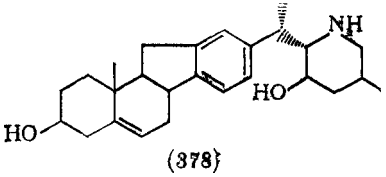
(374) R = H

(375) R = OH

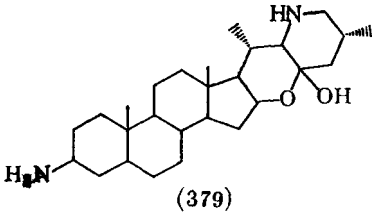


(376) X = O

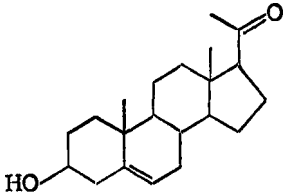
(377) X = H



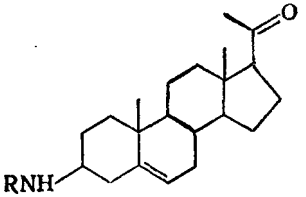
(378)



(379)



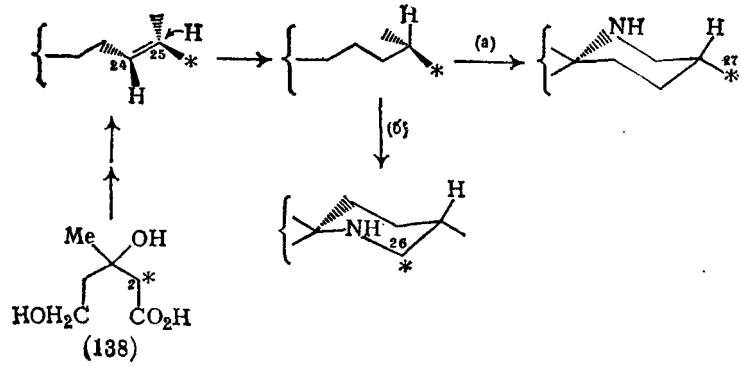
(380)



(381) R = Me

(382) R = H

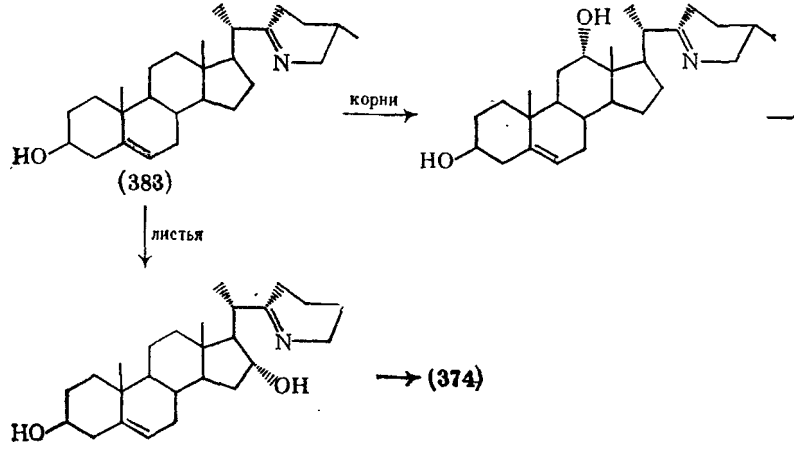
томатидина (373) (путь *б*), поскольку С-26 образуется из С-2 мевалоната [294]. Далее, в экспериментах с мечеными соединениями было выяснено, что осуществляющееся в ходе биосинтеза оснований (370) и (373) введение аминогруппы в концевое положение боковой цепи стероида происходит до формирования тетрагидрофуранового кольца [295].



(138) (63)

Некоторые стероидные алкалоиды в природных источниках существуют в виде гликозидов. На примере гликоалкалоидов соламаргина (372) и соласонина (371) было показано, что они, как и следовало ожидать, образуются из соответствующего агликона соласодина (370), вероятно, ступенчатым путем [296].

Кольцевая система соланидина (374) и рубиервина (375) несколько отличается от скелета соласодина (370). Тщательными экспериментами на бутонизирующем *Veratrum grandiflorum* и на корневых срезах растения в период покоя было показано, что имеющееся в структурах этих соединений дополнительное кольцо образуется на одной из последних стадий биосинтеза; интересно, что пути биосинтеза этих очень близких алкалоидов расходятся, уже начиная от веразина (383), одного из самых ранних предшественников (схема 64) [297].



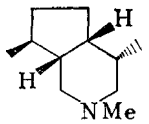
(64)

Приведенные выше данные говорят о том, что интересные С-нор-D-гомостероидные алкалоиды, например иервин (376), образуются из молекулярного скелета обычных стероидов. Возможно, что оригинальные структуры такого типа формируются из произ-

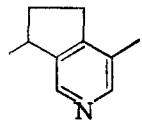
водного соланидина (374) с экваториальной гидроксильной группой при С-12. Это подтверждается фактом переноса метки из [1-^{14}C]ацетата в гликозид соланидина в *V. grandiflorum*, выросшем в темноте, и затем, при освещении, — в иервин (376) и вератрамин (378) [298]. Установлено также, что промежуточным соединением в биосинтезе иервина является 11-дезоксиервин (377) [299].

30.1.9.2. Терпеноидные алкалоиды

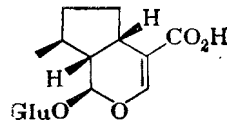
Монотерпеноидное C_9—C_{10}-звено терпеноидно-индольных алкалоидов (см. разд. 30.1.7.4) содержится и в более простых основаниях типа скитантина (384) и актинидина (385). Во всех изученных случаях в терпеноидные алкалоиды включались обычным для терпеноидов способом мевалонат (и ацетат), а промежуточно образовывался гераниол (322) [300, 301]. Вероятным промежуточным соединением является также логанин (335), но имеющиеся данные пока что свидетельствуют в пользу другого производного циклопентана, дезоксилогановой кислоты (386; Glu — глюкозил) [301].



(384)

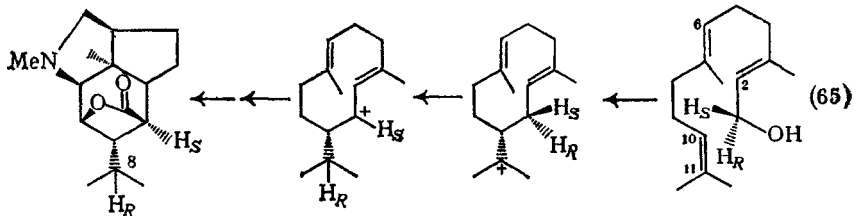


(385)



(386)

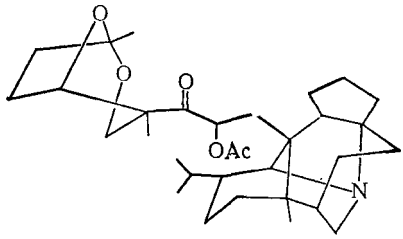
Биосинтез сесквитерпеноидного алкалоида дендробина (388) изучен более подробно. Мевалонат включается в дендробин через промежуточно образующийся 2-*транс*-6-*транс*-фарнезол (387) [303]. Эксперименты с мечеными соединениями показывают, что в ходе превращения фарнезола (387) в дендробин (388) 1-*pro*-(*R*)-атом водорода мигрирует к С-8 алкалоида. Эти результаты могут быть объяснены в рамках механизма, приведенного на схеме (65) [303]. Интересно отметить, что в биосинтезе родственного сесквитерпена *pro*-(*S*)-атом водорода также мигрирует от С-1, но не к С-10, а к С-11 (нумерация по фарнезолу) [304].



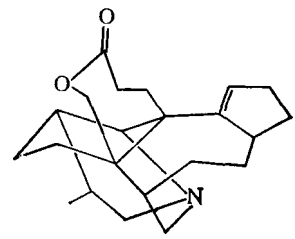
(388) (387) (65)

Несмотря на сложность структуры алкалоидов *Daphniphyllum*, например дафнифиллина (389), удалось установить, что в его биосинтезе участвуют шесть мевалонатных звеньев; предложен наибо-

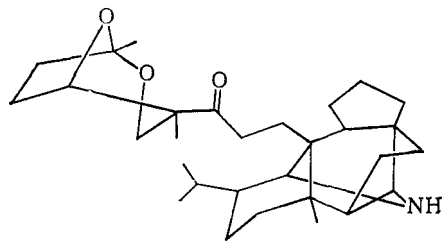
лее вероятный путь его биогенеза [305]. Тритерпеноидные алкалоиды типа дафнилактона B (**390**), содержащие 22 атома углерода, образуются, по-видимому, из промежуточных C_{30}-соединений, например секодафнифиллина (**391**), что подтверждается результатами предварительных опытов с [2-^{14}C]мевалонатом [306].



(389)



(390)

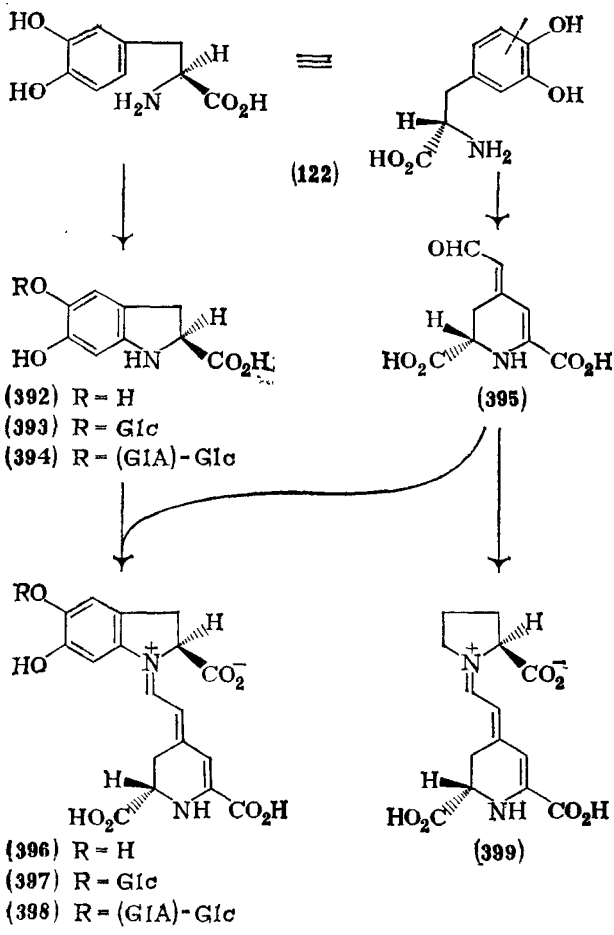


(391)

30.1.10. БИОСИНТЕЗ НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ АЛКАЛОИДОВ

Из всех растительных алкалоидов, рассмотренных в гл. 30.1, ни один не обладает столь четко выраженной биологической функцией, как беталаины, например бетанин (**397**). Беталаины представляют собой группу красно-фиолетовых и желтых пигментов; они широко распространены только в растениях отряда Centrospermae и ответственны, например, за окраску некоторых цветов.

Изучение биосинтеза бетанина (**397**) показало, что он образуется своеобразным путем из двух молекул тирозина через промежуточный ДОФА (**122**) [307]. Как показано на схеме (66), одна из молекул тирозина включается в биосинтез бетанина без осложнений, в то время как вторая, из которой формируется остаток беталамовой кислоты (**395**), предварительно претерпевает расщепление ароматического кольца; с помощью меченных тритием соединений было показано, что расщепление происходит так, как это представлено на схеме (66), и в случае бетанина (**397**), и в случае индикаксантина (**399**) [309]. Расщепление фенольного кольца наблюдается *in vivo* довольно часто, но в биосинтезе алкалоидов известен еще только один пример такой трансформации в случае оснований Erythrina (см. разд. 30.1.4.6).

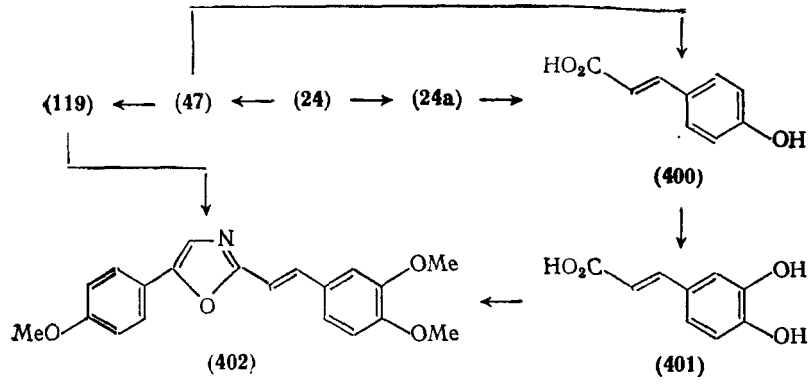


(66)

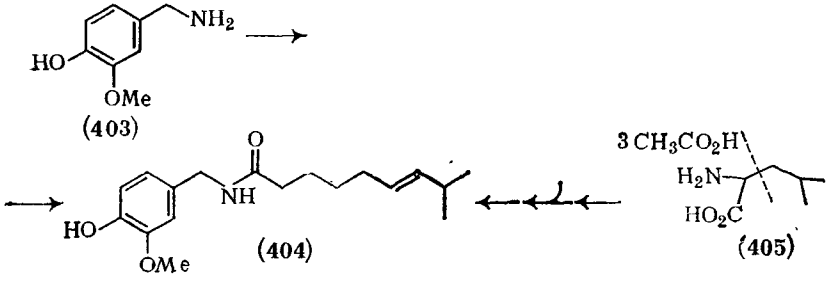
GlA и Glc - остатки глюкуроновой кислоты и глюкозы, соответственно

Превращение бетанидина (396) в бетанин (397) свидетельствует о том, что гликозилирование представляет собой, вероятно, последнюю стадию биосинтеза [310]. В то же время, образование другого беталаина амарантина (398) протекает, по-видимому, по другому пути: (392)→(393)→(394)→(398) [311].

Аннулолин (402) — единственный алкалоид, содержащий оксазольное кольцо, образуется из тех же продуктов метаболизма тирозина (47) и фенилаланина (24) [тирамина (119) и коричной кислоты (24а)], которые участвуют в биосинтезе многих других алкалоидов [312]. Предложенный путь его биосинтеза приведен на схеме (67).



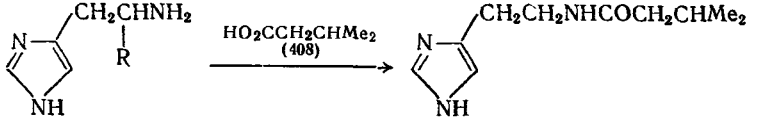
Особенно интересной деталью биосинтеза аннулолина (**402**) является переход метки из одной меченой исходной аминокислоты во фрагменты, образующиеся первоначально из второй аминокислоты; в то же время в биосинтезе колхицина (см. разд. 30.1.45.8) и алкалоидов Amaryllidaceae (см. разд. 30.1.5.1) фенилаланин и тирозин включаются в строго определенные участки молекул. Одно из возможных объяснений такого необычного пути биосинтеза аннулолина приведено на схеме (67). Биосинтез капсаицина (**404**) является другим примером замещения фенилаланина на тирозин [вероятно, также через промежуточную *n*-кумариновую кислоту (**400**)]. В этом случае фенилаланин является первичным предшественником ванилиламинного остатка алкалоида (**404**), а тирозин включается в этот же участок молекулы со значительно меньшей эффективностью [313, 314]. Очевидно, в биосинтезе капсаицина (**404**) участвуют *n*-кумариновая (**400**) и кофейная (**401**) кислоты, а также 4-гидрокси-3-метоксибензиламин (ванилиламин) (**403**), который образуется из кофейной кислоты (**401**) через промежуточный протокатеховый альдегид (**248**), важный биосинтетический предшественник алкалоидов Amaryllidaceae (см. разд. 30.1.5.1) [313].



Предшественником части остальных атомов молекулы капсаицина (**404**) служит валин (**405**) (но не лейцин). По-видимому, он

утилизируется для синтеза изобутирил-КоА, из которого посредством присоединения трех ацетатных звеньев формируется ацильная часть молекулы капсаицина (**404**) [314].

В уникальном по структуре алкалоиде кактусов долихотенине (**409**) имеется 1,3-диазольная система, в какой-то мере напоминающая оксазольное кольцо аннулолина (**402**). Диазольная система долихотенина образуется из гистамина (**407**), который в свою очередь синтезируется из гистидина (**406**); предшественниками изовалерильного звена являются лейцин (и валин) и образующаяся из него изовалериановая кислота (**408**) [315]. Другое интересное и новое направление в изучении биосинтеза долихотенина связано с использованием способности растений продуцировать неприродные аналоги алкалоидов [6] (см. разд. 30.1.1).

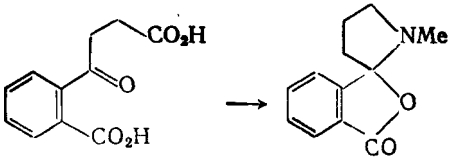


(406) R = CO_2H

(407) R = H

(409)

(69)



(410) (411)

(70)

Алкалоид шихунин (**411**) продуцируется орхидеей *Dendrobium pierardii*. Его предшественником является необычная для алкалоидов кетокислота (**410**) [316], которая также выполняет роль промежуточного соединения в биосинтезе некоторых 1,4-нафтохинонов растительного и бактериального происхождения. Кетокислота (**410**) образуется из шикимовой кислоты — предшественника ароматических аминокислот; было бы интересно выяснить, не является ли последняя предшественником шихунина (**411**). (Относительно биосинтеза нафтохинонов см. гл. 30.3.)

ЛИТЕРАТУРА

1. *R. Robinson*, 'The Structural Relations of Natural Products', Oxford University Press, 1955
2. *D. H. R. Barton and T. Cohen*, in 'Festschrift Dr. A. Stoll', Birkhäuser, Basle, 1957, p. 117.
3. *C. Poupat and G. Kunesch*, Compt. rend., 1971, **273C**, 433.
4. *S. A. Brown, in* 'Biosynthesis', ed. T. A. Geisman (Specialist Periodical Reports), The Chemical Society, London, 1972, vol. 1, p. 1.
5. *M. L. Rueppel and H. Rapoport*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 7021; *E. Leete, G. B. Bodem, and M. F. Manuel*, Phytochemistry, 1971, **10**, 2687; *G. W. Kirby, S. R. Massey, and P. Steinreich*, J. C. S. Perkin I, 1972, 1642.

6. *H. Rosenberg and S. J Stohs*, Phytochemistry, 1976, **15**, 501 и приведенные там ссылки
7. *E. Leete, in* 'Biogenesis of Natural Compounds', 2nd edn., ed. P. Bernfeld, Pergamon, Oxford, 1967, p. 953.
8. *K. Mothes and H. R. Schütte*, 'Biosynthese der Alkaloide', V. E. B. Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1969.
9. *I. D. Spenser*, in 'Chemistry of the Alkaloids', ed. S W. Pelletier, Van Nostrand Reinhold, New York, 1970, p. 669.
10. *I. D. Spenser*, in 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1968, vol. 20, p. 231.
11. 'The Alkaloids', ed. J. E. Saxton (vols. 1—5) and M. F. Grundon (vols. 6 and 7) (Specialist Periodical Reports), The Chemical Society, London, 1971—1977.
12. 'Biosynthesis', ed. T. A. Geissman (vols. 1—3) and J. D. Bu'Lock (vol. 4) (Specialist Periodical Reports), The Chemical Society, London, 1972—1976.
13. *R. Robinson*, J. Chem. Soc., 1917, 762.
14. *E. Leete*, J. Amer. Chem. Soc., 1962, **84**, 55.
15. *E. Leete and S. J. Nelson*, Phytochemistry, 1969, **8**, 413.
16. *H. W. Liebisch, H. R. Schütte, and K. Mothes*, Annalen, 1963, **668**, 139.
17. *H. W. Liebisch, H. Ramin, I. Schöffinius, and H. R. Schütte*, Z. Naturforsch., 1965, **20b**, 1183.
18. *F. E. Baralle and E. G. Gros*, Chem. Comm., 1969, 721 и приведенные там ссылки; *A. Ahmad and E. Leete*, Phytochemistry, 1970, **9**, 2345.
19. *H. W. Liebisch, A. S Radwan, and H. R. Schütte*, Annalen, 1969, **721**, 123.
20. *J. M. Essery, D. J. McCaldin, and L. Marion*, Phytochemistry, 1962, **1**, 209 и приведенные там ссылки.
21. *E. F. L. J. Anet, G. K. Hughes, and E. Ritchie*, Austral. J. Sci. Res., 1949, **Ser. 2A**, 616.
22. *D. G. O'Donovan and M. F. Keogh*, J. Chem. Soc. (C), 1969, 223.
23. *F. E. Baralle and E. G. Gros*, Phytochemistry, 1969, **8**, 849, 853; *I. Kaczkowski, H. R. Schütte, and K. Mothes*, Biochim. Biophys. Acta, 1961, **46**, 588.
24. *E. Leete*, Phytochemistry, 1972, **11**, 1713.
25. *A. Romeike and G. Fodor*, Tetrahedron Letters, 1960, **No. 22**, 1.
26. *E. Leete, N. Kowanko, and R. A. Newmark*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 6826.
27. *E. Leete*, in 'Biosynthesis', ed T. A. Geissman (Specialist Periodical Reports), The Chemical Society, London, 1973, vol. 2, p. 115.
28. *E. Leete, N. Kowanko, and R A. Newmark*, Tetrahedron Letters, 1975, 4103.
29. *W. C. Evans and J. G. Woolley*, Phytochemistry, 1976, **15**, 287.
30. *B. V. Prabhu, C. A. Gibson, and L. C. Schramm*, Lloydia, 1976, 39, 79.
31. *W. C. Evans and V. A. Woolley*, Phytochemistry, 1969, **8**, 2183.
32. *P. J. Beresford and J. G. Woolley*, Phytochemistry, 1974, **13**, 2143; *E. Leete*, ibid., 1973, **12**, 2203 и приведенные там ссылки.
33. *K. Basey and J. G. Woolley*, Phytochemistry, 1973, **12**, 2197.
34. *P J. Beresford and J. G Woolley*, Phytochemistry, 1974, **13**, 2511.
35. *E. Leete and K. J. Siegfried*, J. Amer. Chem. Soc., 1957, **79**, 4529; *B. L. Lamberts, L. J. Dewey, and R. U. Byerrum*, Biochim. Biophys. Acta, 1959, **33**, 22.
36. *E. Leete*, J. Amer. Chem. Soc., 1958, **80**, 2162.
37. *P.-H. L. Wu and R U. Byerrum*, Biochemistry, 1965, **4**, 1628 и приведенные там ссылки.
38. *E. Leete, E. G. Gros, and T. J. Gilbertson*, Tetrahedron Letters, 1964, 587.
39. *D. Yoshida and T. Mitake*, Plant Cell Physiol., 1966, **7**, 301.
40. *H. R. Schütte, W. Maier, and U. Stephan*, Z. Naturforsch., 1968, **23b**, 1426.
41. *E. Leete*, J. Amer. Chem. Soc., 1967, **89**, 7081.
42. *S. Mizusaki, T. Kisaki, and E. Tamaki*, Plant Physiol. 1968, **43**, 93.
43 *S. Mizusaki, Y. Tanabe, M. Noguchi, and E. Tamaki*, Plant Cell Physiol., 1971, **12**, 633; Phytochemitsry, 1972, **11**, 2757.
44. *T. J. Gilbertson and E. Leete*, J. Amer. Chem Soc., 1967, **89**, 7085.
45. *M. L. Rueppel, B. P. Mundy, and H. Rapoport*, Phytochemistry, 1974, **13**, 141; более ранние работы см. в приведенной там литературе.

46. *T. A. Scott and J. P. Glynn*, Phytochemistry, 1967, **6**, 505; *G. M. Frost, K. S. Yang, and G. R Waller*, J. Biol. Chem., 1967, **242**, 887.
47. *E. Leete and Y.-Y. Liu*, Phytochemistry, 1973, **12**, 593 и приведенные там ссылки.
48. *H. R Zielke, C. M. Reinke, and R. U. Byerrum*, J. Biol. Chem., 1969, **244**, 95 и приведенные там ссылки.
49. *N. M. Bale and D. H. G. Crout*, Phytochemistry, 1975, **14**, 2617.
50. *C. A. Hughes, R. Letcher, and F. L. Warren*, J. Chem. Soc., 1964, 4974.
51. *W. Bottomley ond T. A. Geissman*, Phytochemistry, 1964, **3**, 357.
52. *N. M. Davies and D. H. G Crout*, J. C. S. Perkin I, 1974, 2079; *D. H. G. Grout, N. M. Davies, E. H. Smith, and D. Whitehouse*, ibid., 1972, 671.
53. *D. J. Robins, N. M. Bale, and D. H. G. Crout*, J. C. S. Perkin I, 1974, 2082.
54. *D. H. G. Crout*, J. Chem. Soc. (C), 1967, 1233; ibid., 1966, 1968.
55. *N. B. Mulchandani, S. S. Iyer, and L. P. Badheka*, Phytochemistry, 1969, **8**, 1931; ibid., 1971, **10**, 1047.
56. *R. B. Herbert, F. B. Jackson, and I. T. Nicolson*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 865.
57. *E. Leete*, J. Amer. Chem Soc., 1964, **86**, 2509.
58. *E. Leete and J. Olsen*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 5472.
59. *M. F. Roberts*, Phytochemistry, 1971, **10**, 3057.
60. *M. F. Roberts*, Phytochemistry, 1975, **14**, 2393.
61. *J. W. Fairbairn and P. N Suwal*, Phytochemistry, 1961, **1**, 38.
62. *S. M. C. Dietrich and R. O. Martin*, Biochemistry, 1969, 8, 4163.
63. *E. Leete and K. N. Juneau*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 5614.
64. *E. Leete and R. A. Carver*, J. Org. Chem., 1975, **40**, 2151; *E. Leete, J. C. Lechleiter, and R A. Carver*, Tetrahedron Letters, 1975, 3779.
65. *R. N. Gupta and I. D. Spenser*, Phytochemistry, 1969, 8, 1937.
66. *M. F. Keogh and D. G O'Donovan*, J. Chem. Soc. (C), 1970, 1792.
67. *R. N. Gupta and I. D. Spenser*, Phytochemistry, 1970, **9**, 2329.
68. *R. N. Gupta and I. D Spenser*, Canad. J. Chem., 1967, **45**, 1275.
69. *E. Leete*, J. Amer. Chem. Soc., 1956, 78, 3520.
70. *E. Leete, E. G. Gros, and T. J Gilbertson*, J. Amer. Chem. Soc., 1964, **86**, 3907.
71. *E. Leete and A. R. Friedman*, J. Amer. Chem. Soc., 1964, **86**, 1224 и приведенные там ссылки.
72. *E. Leete*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 1697.
73. (а) *E. Leistner and I. D. Spenser*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 4715; (б) см. приведенные там ссылки.
74. *P. Korzan and T. J. Gilbertson*, Phytochemistry, 1974, **13**, 435.
75. *E. Leete and M. R. Chedekel*, Phytochemistry, 1972, **11**, 2751.
76. *E. Leistner and I. D. Spenser*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 378.
77. *T. J. Gilbertson*, Phytochemistry, 1972, 11, 1737; *E. Leistner, R. N. Gupta, and I. D. Spenser*, J. Amer. Chem Soc., 1973, **95**, 4040.
78. *W. D. Marshall, T. T Nguyen, D. B. MacLean, and I. D. Spenser*, Canad. J. Chem., 1975, **53**, 41.
79. *R. N. Gupta and I. D. Spenser*, J. Biol. Chem., 1969, **244**, 88.
80. *I. T. Bruce and G. W. Kirby*, Chem. Comm., 1968, 207.
81. *D. G. O'Donovan and P. B. Creedon*, Tetrahedron Letters, 1971, 1341.
82. *E. Leete and A. R. Pinder*, Phytochemistry, 1972, **11**, 3291.
83. *M. F. Keogh and D G. O' Donovan*, J. Chem Soc. (C), 1970, 2470.
84. *D. G. O'Donovan, D. J. Long, E. Forde, and P. Geary*, J. C. S. Perkin I, 1975, 415.
85. *D. G. O'Donovan and T. Forde*, J. Chem. Soc. (C), 1971, 2889.
86. *R. N. Gupta and I. D. Spenser*, Canad. J. Chem., 1971, **49**, 384.
87. *R. J. Parry*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 144; Tetrahedron Letters, 1974, 307.
88. *U. Sankawa, K. Yamasaki, and Y. Ebizuka*, Tetrahedron Letters, 1974. 1867.
89. *M. W. Golebiewski, P. Horsewood, and I. D. Spenser*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 217.
90. *E. Leete*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 9.
91. *D. G. O'Donovan and P. B. Greedon*, J. C. S. Perkin 1, 1974, 2524.
92. *D G. O'Donovan and P. B. Creedon*, J. Chem. Soc. (C), 1971, 1604.

93. *H. R. Schütte, K.-L. Kelling, D. Knöfel, and K. Mothes*, Phytochemistry, 1964, 3, 249.
94. *S. H. Koo, F. Comer, and I. D. Spenser*, Chem. Comm., 1970, 897.
95. *S. H. Koo, R. N. Gupta, I. D. Spenser, and J. T. Wrobel*, Chem. Comm., 1970, 396.
96. *M. Castillo, R. N. Gupta, D. B. MacLean, and I. D. Spenser*, Canad. J. Chem., 1970, 48, 1893.
97. *M. Castillo, R. N. Gupta, Y. K. Ho, D. B. MacLean, and I. D. Spenser*, Canad. J. Chem., 1970, 48, 2911.
98. *Y. K. Ho, R. N. Gupta, D. B. MacLean, and I. D. Spenser*, Canad. J. Chem., 1971, 49, 3352.
99. *J.-G. Braekman, R. N. Gupta, D. B. MacLean, and I. D. Spenser*, Canad. J. Chem., 1972, 50, 2591.
100. *M. Souček and H. R. Schütte*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1962, 1, 597.
101. *H. R. Schütte, H. Hindorf, K. Mothes, and G. Hübner*, Annalen, 1964, 680, 93.
102. *H. R. Schütte, F. Bohlwann, and W. Reusche*, Arch. Pharm., 1961, 294, 610.
103. *H. R. Schütte and H. Hindorf*, Z. Naturforsch., 1964, 19b, 855.
104. *H. R. Schütte and G. Seelig*, Annalen, 1968, 711, 221.
105. *H. R. Schütte and D. Knöfel*, Z. Pflanzenphysiol., 1968, 59, 80.
106. *E. K. Nowacki and G. R. Waller*, Phytochemistry, 1975, 14, 155.
107. *E. Nowacki, D. Nowacka, and R. U. Byerrum*, Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol., 1966, 14, 25.
108. *H. R. Schütte, E. Nowacki, P. Kovacs*, and *H. W. Liebisch*, Arch. Pharm., 1963, 296, 438.
109. (а) *H. R. Schütte and H. Hindorf*, Annalen, 1965, 685, 187; (б) см. приведенные там ссылки.
110. *Y. D. Cho, R. O. Martin, and J. N. Anderson*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, 93, 2087; *Y. D. Cho and R. O Martin*, Canad. J. Biochem., 1971, 49, 971.
111. *H. R. Schütte and J. Lehfeldt*, J. prakt. Chem., 1964, Ser. 4, 24, 143.
112. *H. R. Schütte, J. Lehfeldt, and H. Hindorf*, Annalen, 1965, 685, 194.
113. *S. Shibata and U. Sankawa*, Chem. and Ind. (London), 1963, 1161
114. *J. K. Kuschmuradov, D. Gross, and H. R. Schütte*, Phytochemistry, 1972, 11, 3441.
115. *H. R. Schütte, G. Sandke, and J. Lehfeldt*, Arch. Pharm., 1964, 297, 118.
116. *H. P. Tiwari, W. R. Penrose, and I. D. Spencer*, Phytochemistry, 1976, 6, 1245 и приведенные там ссылки.
117. *S. R. Johns and L. Marion*, Canad. J. Chem., 1966, 44, 23; *D. Gross, P. Banditt, J. W. Kurbatow, and H. R. Schütte*, Z. Pflanzenphysiol., 1968, 58, 410; *K. S. Yang and G. R. Waller*, Phytochemistry, 1965, 4, 881 и приведенные там ссылки.
118. *R. D. Johnson and G. R. Waller*, Phytochemistry, 1974, 13, 1493.
119. *S. D. Sastry and G. R. Waller*, Phytochemistry, 1972, 11, 2241.
120. *H. J. Lee and G. R. Waller*, Phytochemistry, 1972, 11, 2233.
121. *E Leete and L. Marion*, Canad. J. Chem., 1953, 31, 126; ibid., 1954, 32, 646; *E. Leete, S. Kirkwood, and L. Marion*, ibid., 1952, 30, 749.
122. *J. Lundström*, Acta Pharm. Suecica, 1971, 8, 275; Acta Chem. Scand., 1971, 25, 3489; *H. Rosenberg, K L. Khanna, M. Takido, and A. G. Paul*, Lloydia, 1969, 32, 334; *A. G. Paul, K. L. Khanna, H. Rosenberg, and M. Takido*, Chem. Comm., 1969, 838 и приведенные там ссылки.
123. *G. P. Basmadjian and A. G. Paul*, Lloydia, 1971, 34, 91.
124. *A. R. Battersby, R Binks, and R. Huxtable*, Tetrahedron Letters, 1968, 6111; ibid., 1967, 563.
125. *G. J. Kapadia, G. S. Rao, E. Leete, M. B. E. Fayez, Y. N. Vaishnav, and H. M. Fales*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, 92, 6943.
126. *J. Lundström*, Acta Pharm. Suecica, 1971, 8, 485.
127. *I. J. McFarlane and M. Slaytor*, Phytochemistry, 1972, 11, 229.
128. *E. Leete and J. D. Braunstein*, Tetrahedron Letters, 1969, 451.
129. *G. Hahn, L. Barwald, O. Schales, and H. Werner*, Annalen, 1935, 520, 107; *G. Hahn and F. Rumpf*, Ber., 1938, 71, 2141; *G. Hahn and K. Stiehl*, Ber., 1936, 69, 2627.

130. *I. J. McFarlane and M. Slaytor*, Phytochemistry, 1972, **11**, 235.
131. *J. G. Bruhn, U. Svensson, and S. Agurell*, Acta Chem. Scand., 1970, **24**, 3775.
132. *D. G. O'Donovan and H. Horan*, J. Chem. Soc. (C), 1968, 2791; *H. R. Schütte and G. Seelig*, Annalen, 1969, **730**, 186.
133. *D. G. O'Donovan and E. Barry*, J. C. S. Perkin I, 1974, 2528.
134. *D. G. O'Donovan and H. Horan*, J. Chem. Soc. (C), 1969, 1737.
135. *S. Agurell, I. Granelli, K. Leander, B. Lüning, and J. Rosenblom*, Acta Chem. Scand., 1974, **B28**, 239.
136. *S. Agurell, I. Granelli, K. Leander, and J. Rosenblom*, Acta Chem. Scand., 1974, **B28**, 1175.
137. *W. J. Keller, L. A. Spitznagle, and L. R. Brady*, Lloydia, 1973, **36**, 397; *T. A. Wheaton and I. Stewart*, Phytochemistry, 1969, **8**, 85.
138. *K. Yamasaki, T. Tamaki, S. Uzawa, U. Sankawa, and S. Shibata*, Phytochemistry, 1973, **12**, 2877.
139. *S. Tewari, D. S. Bhakuni, and R. S. Kapil*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 554.
140. *M. L. Wilson and C. J Coscia*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 431.
141. *A. R. Battersby, R. C. F. Jones, and R. Kazlauskas*, Tetrahedron Letters, 1975, 1873.
142. *E. Winterstein and G. Trier*, 'Die Alkaloide', Bornträger-Verlag, Berlin, 1910, p. 307.
143. *A. R. Battersby and B. J. T. Harper*, J. Chem. Soc., 1962, 3526.
144. *A. R. Battersby, R. Binks, R. J. Francis, D. J. McCaldin, and H. Ramuz*, J. Chem. Soc., 1964, 3600.
145. *E. Brochmann-Hanssen, C. Chen, C. R. Chen, H. Chiang, A. Y. Leung, and K. McMurtrey*, J. C. S. Perkin I, 1975, 1531; *H. Uprety, D. S. Bhakuni, and R. S. Kapil*, Phytochemistry, 1975, **14**, 1535.
146. *D. H. R. Barton, G. W. Kirby, and A. Wiechers*, J. Chem. Soc. (C), 1966, 2313.
147. *G. Blaschke, G. Waldheim, M. von Schantz, and P. Peura*, Arch. Pharm., 1974, 307, 122; *G. Blaschke*, ibid., 1970, **303**, 358; ibid., 1968, **301**, 432.
148. *E. Brochmann-Hanssen, C.-H. Chen, H.-C. Chiang, and K. McMurtrey*, J. C. S. Chem. Comm., 1972, 1269.
149. *E. Brochmann-Hanssen, C.-C. Fu, and L. Y. Misconi*, J. Pharm. Sci., 1971, **60**, 1880; *E. Brochmann-Hansser, C.-H. Chen, H.-C. Chiang, C.-C. Fu, and H. Nemoto*, ibid., 1973, **62**, 1291.
150. *S. Tewari, D. S. Bhakuni, and R. S. Kapil*, J. C. S. Chem. Comm., 1974, 940.
151. *A. R. Battersby, R. T. Brown, J. H. Clements, and G. G. Iverach*, Chem. Comm., 1965, 230.
152. *A. R. Battersby and T. H. Brown*, Chem. Comm., 1966, 170.
153. *A. R. Battersby, T. J. Brocksom, and R. Ramage*, Chem. Comm., 1969, 464.
154. *A. R. Battersby, J. L. McHugh, J. Staunton, and M. Todd*, Chem. Comm., 1971, 985.
155. *L. J. Haynes, K. L. Stuart, D. H. R. Barton, D. S. Bhakuni, and G. W. Kirby*, Chem. Comm., 1965, 141.
156. *D. H. R. Barton, D. S. Bhakuni, G. M. Chapman, and G. W. Kirby*, J. Chem. Soc. (C), 1967, 2134.
157. *D. S. Bhakuni, S. Satish, H. Uprety, and R. S. Kapil*, Phytochemistry, 1974, **13**, 2767.
158. *A. R. Battersby, R. Binks, and B. J. T. Harper*, J. Chem. Soc., 1962, 3534 и приведенные там ссылки.
159. *A. R. Battersby and R. J. Francis*, J. Chem. Soc., 1964, 4078.
160. *E. Leete and J. B. Murrill*, Tetrahedron Letters, 1964, 147.
161. *A. R. Battersby and R. Binks*, Proc. Chem. Soc., 1960, 360.
162. *D. H. R. Barton, G. W. Kirby, W. Steglich, G. M. Thomas, A. R. Battersby, T. A. Dobson, and H. Ramuz*, J. Chem. Soc., 1965, 2423.
163. *A. R. Battersby, D. M. Foulkes, and R. Binks*, J. Chem. Soc., 1965, 3323.
164. *E. Brochmann-Hanssen and B. Nielsen*, Tetrahedron Letters, 1965, 1271; *A. R. Battersby, G. W. Evans, R. O. Martin, M. E. Warren, jun., and H. Rapoport*, ibid., p. 1275; *E. Brochmann-Hanssen and T. Furuya*, J. Pharm. Sci., 1964, **53**, 575.

165. *R. O. Martin, M. E. Warren, jun., and H. Rapoport*, J. Amer. Chem. Soc., **1964, 86,** 4726.
166. *H. I. Parker, G. Blaschke, and H. Rapoport*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94,** 1276 и приведенные там ссылки; *A. R. Battersby and B. J. T. Harper*, Tetrahedron Letters, 1960, No. 27, p. 21.
167. *J. R. Gear and I. D. Spenser*, Canad. J. Chem., 1963, **41,** 783; *I. Monkovic and I. D. Spenser*, ibid., 1965, **43,** 2017.
168. *R. N. Gupta and I. D. Spenser*, Canad. J. Chem., 1965, **43,** 133.
169. *D. H. R. Barton, R. H. Hesse, and G. W. Kirby*, J. Chem. Soc., 1965, 6379; *A. R. Battersby, R. J. Francis, M. Hirst, and J. Staunton*, Proc. Chem. Soc., 1963, 268.
170. *A. R. Battersby, R. J. Francis, M. Hirst, E. A. Ruveda, and J. Staunton*, J. C. S. Perkin I, 1975, 1140.
171. *E. Leete*, J. Amer. Chem. Soc., **1963, 85,** 473.
172. *E. Leete and J. B. Murrill*, Phytochemistry, 1967, **6,** 231.
173. *A. R. Battersby, J. Staunton, H. R. Wiltshire, R. J. Francis, and R. Southgate*, J. C. S. Perkin I, 1975, 1147.
174. *A. R. Battersby, J. Staunton, H. R. Wiltshire, B. J. Bircher, and C. Fuganti*, J. C. S. Perkin I, 1975, 1162.
175. *C. Tani and K. Tagahara*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), **1974, 22,** 2457.
176. *A. R. Battersby, M. Hirst, D. J. McCaldin, R. Southgate, and J. Staunton*, J. Chem. Soc. (C), 1968, 2163.
177. *R. Bentley*, 'Molecular Asymmetry in Biology', Academic Press, New York, 1970, vol. 2.
178. *H. Rönsch*, European J. Biochem., 1972, **28,** 123 и приведенные там ссылки.
179. *G. Blaschke*, Arch. Pharm., 1968, **301,** 439.
180. *H. L. Holland, M. Castillo, D. B. MacLean, and I. D. Spenser*, Canad. J. Chem. 1974, **52,** 2818.
181. *E. Leete and A. Ahmad*, J. Amer. Chem. Soc., 1966, **88,** 4722.
182. *D. H. R. Barton, R. James, G. W. Kirby, D. W. Turner, and D. A. Widdowson*, J. Chem. Soc. (C), 1968, 1529.
183. *D. H. R. Barton, C. J. Potter, and D. A. Widdowson*, J. C. S. Perkin 1, 1974, 346.
184. *D. H. R. Barton, R. B. Boar, and D. A. Widdowson*, J. Chem. Soc. (C), 1970, 1213.
185. *D. H. R. Barton, R. D. Bracho, C. J. Potter, and D. A. Widdowson*, J. C. S. Perkin I, 1974, 2278.
186. *A. R. Battersby, R. C. F. Jones, R. Kazlauskas, C. Poupat, C. W. Thornber, S. Ruchirawat, and J. Staunton*, J. C. S. Chem. Comm., 1974, 773
187. *A. R. Battersby*, Pure Appl. Chem., 1967, **14,** 117.
188. *A. R. Battersby, R. Binks, J. J. Reynolds, and D. A. Yeowell*, J. Chem. Soc., 1964, 4257; *E. Leete and P. E. Nemeth*, J. Amer. Chem. Soc., 1960, **82,** 6055; *E. Leete*, ibid., 1963, **85,** 3666.
189. *A. R. Battersby, T. A. Dobson, D. M. Foulkes, and R. B. Herbert*, J. C. S. Perkin I, 1972, 1730; *E. Leete*, Tetrahedron Letters, 1965, 333.
190. *A. I. Scott and K. J. Wiesner*, J. C. S. Chem. Comm., 1972, 1075.
191. *A. R. Battersby, R. B. Herbert, L Pijewska, F. Šantavý and P. Sedmera*, J. C. S. Perkin I, 1972, 1736.
192. *A. R. Battersby, R. B. Herbert, E. McDonald, R. Ramage, and J. H. Clements*, J. C. S. Perkin I, 1972, 1741.
193. *A. R. Battersby, P. W. Sheldrake, and J. A. Milner*, Tetrahedron Letters, **1974,** 3315.
194. *A. C. Barker, A. R. Battersby, E. McDonald, R. Ramage, and J. H. Clements*, Chem. Comm., 1967, 390.
195. *A. R. Battersby, P. Böhler, M. H. G. Munro, and R. Ramage*, J. C. S. Perkin I, 1974, 1399.
196. *A. R. Battersby, E. McDonald, J. A. Milner, S. R. Johns, J. A. Lamberton, and A. A. Stourn s*, Tetrahedron Letters, 1975, 3419.
197. *R. J. Parry and J. M. Schwab*, J. Amer. Chem. Soc., **1975, 97,** 2555.

198. *A. R. Battersby R. Binks, S. W. Breuer, H. M Fales, W. C. Wildman, and R. J. Highet*, J. Chem. Soc., 1964, 1595.
199. *P. W Jeffs*, Proc. Chem Soc., 1962, 80; *W C. Wildman, H. M. Fales, and A. R. Battersby*, J Amer. Chem Soc., 1962, **84**, 681.
200. *A. R. Battersby, H. M. Fales, and W. C. Wildman*, J. Amer. Chem. Soc., 1961, **83**, 4098.
201. *D H. R. Barton, G. W. Kirby, J. B. Taylor, and G. M. Thomas*. J. Chem. Soc., 1963, 4545.
202. *R. J. Suhadolnik, A. G. Fischer, and J. Zulalian*, J. Amer. Chem. Soc., 1962, **84**, 4348.
203. *R. J. Suhadolnik and A G. Fischer*, Proc. Chem. Soc., 1963, 132; *R. J. Suhadolnik and J. Zulalian*, ibid., p. 216.
204. *G. W. Kirby and H. P. Tiwari*, J. Chem. Soc. (C), 1966, 676.
205. *J. Zulalian and R. J. Suhadolnik*, Proc. Chem. Soc., 1964, 422.
206. *R. H. Wightman, J. Staunton, A. R. Battersby, and K. R. Hanson*, J. C. S. Perkin I, 1972, 2355.
207. *C. Fuganti*, Chim Ind. (Milan), 1969, **51**, 1254.
208. *H. M. Fales, J. Mann, and S. H. Mudd*, J. Amer. Chem. Soc., 1963, **85**, 2025.
209. *J. G. Bhandarkar and G. W. Kirby*, J. Chem. Soc. (C), 1970, 1224.
210. *C. Fuganti and M. Mazza*, J. C. S. Chem. Comm., 1972, 936.
211. *C. Fuganti, D. Ghiringhelli, and P. Grasselli*, J. C. S. Chem. Comm., 1974, 350.
212. *C. Fuganti and M. Mazza*, Chem. Comm., 1971, 1196.
213. *C. Fuganti and M. Mazza*, J C. S. Perkin I, 1973, 954.
214. *A. R. Battersby, J. E. Kelsey, J. Staunton, and K. E. Suckling*, J. C. S. Perkin I, 1973, 1609; *G. W. Kirby and J. Michael*, ibid., p. 115.
215. *C. Fuganti, D. Ghiringhelli, and P. Grasselli*, J. C. S. Chem. Comm., 1973, 430.
216. *C. Fuganti, J. Staunton, and A. R. Battersby*, Chem. Comm., 1971, 1154; *C. Fuganti and M Mazza*, ibid., p. 1388; J. C. S. Chem. Comm., 1972, 239.
217. *C. Fuganti*, Gazzetta, 1973, **103**, 1255.
218. *C. Fuganti and M. Mazza*, Chem. Comm., 1970, 1466; *C. Fuganti*, Tetrahedron Letters, 1973, 1785.
219. *P. W. Jeffs, H. F. Campbell, D. S. Farrier, G. Ganguli, N. H. Martin, and G. Molina*, Phytochemistry, 1974, **13**, 933.
220. *P. W. Jeffs, W. C. Archie, R. L. Hawks, and D. S. Farrier*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 3752
221. *P. W. Jeffs, D. B. Johnson, N. H. Martin, and B. S. Rauckman*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 82.
222. *D. Munsche and K. Mothes*, Phytochemistry, 1965, **4**, 705.
223. P. Schröder, in 'Biochemie und Physiologie der Alkaloide', Fourth International Symposium, 1969, ed. K. Mothes, K. Schreiber, and H. R. Schütte, Akademie-Verlag, Berlin, 1972, p. 519; *P. Schröder and M. Luckner*, Pharmazie, 1966, **21**, 642.
224. *M. Blaschke-Cobet and M. Luckner*, Phytochemistry, 1973, **12**, 2393.
225. *C. L. Tipton, M.-C. Wang, F. H.-C. Tsao, C. L. Tu, and R. R. Husted*, Phytochemistry, 1973, **12**, 347; *J. E. Reimann and R. U. Byerrum*, Biochemistry, 1964, **3**, 847.
226. *I. Monkovic, I. D. Spenser, and A. O. Plunkett*, Canad. J. Chem., 1967, **45**, 1935; *M. Matsuo and Y. Kasida*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1966, **14**, 1108; *M. Matsuo, M. Yamasaki, and Y. Kasida*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1966, **23**, 679.
227. *A. O. Colonna and E. G. Gros*, Phytochemistry, 1971, **10**, 1515.
228. *M. Cobet and M. Luckner*, Phytochemistry, 1971, **10**, 1031; European J. Biochem., 1968, **4**, 76.
229. *J. F. Collins, W. J. Donnelly, M. F. Grundon, and K. J. James*. J. C. S. Perkin I, 1974, 2177.
230. *M. F. Grundon, D. M. Harrison, and C. G. Spyropoulos*, J. C. S. Perkin I, 1975, 302.

231. *M. F. Grundon, D. M. Harrison, and C. G. Spyropoulos*, J. C. S. Perkin I, 1974, 2181.
232. *D. Boulanger, B K. Bailey, and W. Steck*, Phytochemistry, 1973, **12**, 2399.
233. *T. R. Chamberlain, J. F. Collins, and M. F. Grundon*, Chem. Comm., 1969, 1269.
234. *R. H. Prager and H. M. Thredgold*, Austral. J. Chem., 1969, **22**, 2627.
235. *D. Gröger and S. Johne*, Z. Naturforsch., 1968, **23b**, 1072.
236. *S. Johne, K. Waiblinger and D. Gröger*, European J. Biochem., 1970, **15**, 415; *D. G. O'Donovan and H. Horan*, J. Chem. Soc (C), 1970, 2466.
237. *D. R. Liljegren*, Phytochemistry, 1971, **10**, 2661.
238. *K. Waiblinger, S. Johne, and D. Gröger*, Phytochemistry, 1972, **11**, 2263; *S. Johne and D. Gröger*, ibid., 1968, 7, 429.
239. *S. Johne, D. Gröger, and G. Richter*, Arch. Pharm. 1968, **301**, 721; *D. Gröger, S. Johne, and K. Mothes*, Experientia, 1965, **21**, 13; *D. Gröger and K. Mothes*, Arch. Pharm., 1960, 293, 1049.
240. *S. Johne, K. Waiblinger, and D. Gröger*, Pharmazie, 1973, **28**, 403.
241. *M. Yamazaki, A. Ikuta, T. Mori, and T. Kawana*, Tetrahedron Letters, 1967, 3317; *M. Yamazaki and A. Ikuta*, ibid., 1966, 3221.
242. *H. G. Floss*, Tetrahedron, 1976, **32**, 873.
243. *K. Bowden and L. Marion*, Canad. J. Chem., 1951, **29**, 1037.
244. *D. Gross, H. Lehman, and H. R. Schütte*, Tetrahedron Letters, 1971, 4047; *D. O'Donovan and E. Leete*. J. Amer. Chem. Soc., 1963, **85**, 461 и приведенные там ссылки.
245. *D. Gross, A. Nemeckova, and H. R. Schutte*, Z. Pflanzenphysiol., 1967, **57**, 60.
246. *B. G. Gower and E. Leete*, J Amer. Chem. Soc., 1963, **85**, 3683.
247. *E. Wenkert*, J. Amer. Chem. Soc., 1962, **84**, 98.
248. *E. Leete*, Phytochemistry, 1975, **14**, 471.
249. *S. Agurell and J. L. G. Nilsson*, Acta Chem. Scand., 1968, **22**, 1210.
250. *C. Baxter and M. Slaytor*, Phytochemistry, 1972, **11**, 2767.
251. *M. Slaytor and I. J. McFarlane*, Phytochemistry, 1968, **7**, 605.
252. *D. G. O'Donovan and M. F. Kenneally*, J. Chem. Soc. (C), 1967, 1109.
253. *D. G. O'Donovan and M. F. Keogh*, J. Chem. Soc. (C), 1966, 1570.
254. *H. R. Schütte and B. Maier*, Arch. Pharm., 1965, **298**, 459.
255. *E. Leete, A. Ahmad, and I. Kompis*, J. Amer. Chem. Soc., 1965, **87**, 4168; *Y. Yamasaki and E. Leete*, Tetrahedron Letters, 1964, 1499; *E. Leete*, J. Amer. Chem. Soc., 1960, **82**, 6338; Tetrahedron, 1961, **14**, 35.
256. *J. P. Kutney, W. J. Cretney, J. R. Hadfield, E. S. Hall, V. R. Nelson, and D. C. Wigfield*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, **90**, 3566.
257. *A. R. Battersby, A. R. Burnett, and P. G. Parsons*, J. Chem. Soc. (C), 1969, 1193.
258. *R. Thomas*, Tetrahedron Letters, 1961, 544; см. также сс. 187.
259. (а) *A. R. Battersby, R. T. Brown, R. S. Kapil, J. A. Knight, J. A. Martin, and A. O. Plunkett*, Chem. Comm., 1966, 888; (б) см. приведенные там ссылки, а также *T. Money, I. G. Wright, F. McCapra, E. S. Hall, and A. I. Scott*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, **90**, 4144; *D. Gröger, K. Stolle, and K. Mothes*, Arch. Pharm., 1967, **300**, 393.
260. *A. R. Battersby, J. C. Byrne, R. S. Kapil, J. A. Martin, T. G. Payne, D. Arigoni, and P. Loew*, Chem. Comm., 1968, 951.
261. *A. R. Battersby, R. T. Brown, R. S. Kapil, J. A. Martin, and A. O. Plunkett*, Chem. Comm., 1966, 890; *A. R. Battersby, R. S. Kapil, J. A. Martin, and L. Mo*, ibid., 1968, 133; *P. Loew and D. Arigoni*, ibid., p. 137.
262. *A. R. Battersby, E. S. Hall, and R. Southgate*, J. Chem. Soc. (C), 1969, 721 и приведенные там ссылки.
263. (а) *S. Escher, P. Loew, and D. Arigoni*, Chem. Comm., 1970, 823; (б) см. приведенные там ссылки.
264. *A. R. Battersby, A. R. Burnett, and P. G. Parsons*, Chem. Comm., 1970, 826.
265. *A. R. Battersby, S. H. Brown, and T. G. Payne*, Chem. Comm., 1970, 827.
266. *A. R. Battersby, A. R. Burnett, and P. G. Parsons*, J. Chem. Soc. (C), 1969, 1187.

267. *K. T. De Silva, G. N. Smith, and K. E. H. Warren*, Chem. Comm., 1971, 905; *W. P. Blackstock, R. T. Brown and G. K. Lee*, ibid., p. 910.
268. *R. T. Brown, G. N. Smith, and K. S. J. Stapleford*, Tetrahedron Letters, 1968, 4349.
269. *A. R. Battersby, A. R. Burnett, E. S. Hall, and P. G. Parsons*, Chem. Comm., 1968, 1582; *A. R. Battersby and K. H. Gibson*, ibid., 1971, 902.
270. *M. Rueffer, N. Nagakura, and M. H. Zenk*, Tetrahedron Letters, 1978, 1593 и приведенные там ссылки.
271. *A. A. Qureshi and A. I. Scott*, Chem. Comm., 1968, 948.
272. *A. R. Battersby and E. S. Hall*, Chem. Comm., 1969, 793; *A. I. Scott, P. C. Cherry, and A. A. Qureshi*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 4932.
273. *S. I. Heimberger and A. I. Scott*, J. C. S. Chem. Comm., 1973, 217.
274. *Ch. Schlatter, E. E. Waldner, H. Schmid, W. Maier, and D. Gröger*, Helv. Chim. Acta, 1969, **52**, 776.
275. *A. I. Scott, P. B. Reichardt, M. B. Slaytor, and J. G. Sweeny*, Bioorg. Chem., 1971, **1**, 157.
276. *J. P. Kutney, J. F. Beck, N. J. Eggers, H. W. Hanssen, R. S. Sood, and N. D. Westcott*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 7322.
277. *J. P. Kutney, J. F. Beck, V. R. Nelson, and R. S. Sood*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 255.
278. *J. P. Kutney*, Heterocycles, 1976, **4**, 429.
279. *J. P. Kutney, V. R. Nelson, and D. C. Wigfield*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 4278.
280. *J. P. Kutney, V. R. Nelson, and D. C. Wigfield*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 4279; *J. P. Kutney, J. F. Beck, C. Ehret, G. Poulton, R. S. Sood, and N. D. Westcott*, Bioorg. Chem., 1971, **1**, 194.
281. *N. Kowanko and E. Leete*, J. Amer. Chem. Soc., 1962, **84**, 4919; *E. Leete and J. N. Wemple*, ibid., 1969, **91**, 2698; *A. R. Battersby and E. S. Hall*, Chem. Comm., 1970, 194
282. *A. R. Battersby and R. J. Parry*, Chem. Comm., 1971, 30.
283. *A. R. Battersby and R. J. Parry*, Chem. Comm., 1971, 31.
284. *C. R. Hutchinson, A. H. Heckendorf, P. E. Daddona, E. Hagaman, and E. Wenkert*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 5609 .
285. *G. M. Sheriha and H. Rapoport*, Phytochemistry, 1976, **15**, 505.
286. *A. R. Battersby and B. Gregory*, Chem. Comm., 1968, 134.
287. *A. R. Battersby, R. Binks, W. Lawrie, G. V. Parry, and B. R. Webster*, J. Chem. Soc., 1965, 7459.
288. *A. R. Battersby and R. J. Parry*, Chem. Comm., 1971, 901.
289. *А. Р. Гусева, В. А. Пасешниченко*, Биохимия, 1962, **27**, 721.
290. *H. Sander and H. Grisebach*, Z. Naturforsch., 1958, **13b**, 755.
291. *E. Heftmann, E. R. Lieber, and R. D. Bennett*, Phytochemistry, 1967, **6**, 225; *K. Kaneko, H. Mitsuhashi, K. Hirayama, and N. Yoshida*, ibid., 1970, **9**, 2489; *R. Tschesche and H. Hulpke*, Z. Naturforsch., 1966, **21b**. 893; ibid., 1967, **22b**, 791.
292. *H. Ripperger, W. Moritz, and K. Schreiber*, Phytochemistry, 1971, **10**, 2699.
293. *R. D. Bennett and E. Heftmann*, Phytochemistry, 1965, **4**, 873; Arch. Biochem. Biophys., 1965, **112**, 616.
294. *F. Ronchetti and G. Russo*, J. C. S. Chem. Comm., 1974, 785.
295. *F. Ronchetti, G. Russo, G. Ferrara, and G. Vecchio*, Phytochemistry, 1975, **14**, 2423.
296. *D. R. Liljegren*, Phytochemistry, 1971, **10**, 3061.
297. *K. Kaneko, H. Seto, C. Motoki, and H. Mitsuhashi*, Phytochemistry, 1975, **14**, 1295.
298. *K. Kaneko, M. Watanabe, S. Taira, and H. Mitsuhashi*, Phytochemistry, 1972, **11**, 3199.
299. *K. Kaneko, H. Mitsuhashi, K. Hirayama, and S. Ohmori*, Phytochemistry, 1970, **9**, 2497.
300. *H. Auda, G. R. Waller, and E. J. Eisenbraun*, J. Biol. Chem., 1967, **242**, 4157; *H. Auda, H. R. Juneja, E. J. Eisenbraun, G. R. Waller, W. R. Kays and H. H. Appel*, J. Amer. Chem. Soc., 1967, **89**, 2476.

301. *D. Gross, W. Berg, and H. R. Schütte*, Biochem. Physiol. Pflanzen, 1972, **163**, 576.
302. *M. Yamazaki, M. Matsuo, and K. Arai*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1966, **14**, 1058.
303. *A. Corbella, P. Gariboldi, G. Jommi, and M. Sisti*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 288; *A. Corbella, P. Gariboldi, and G. Jommi*, ibid., 1973, 729.
304. *J. R. Hanson and R. Nyfeler*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 171, Ibid. p. 824.
305. *K. T. Suzuki, S. Okuda, H. Niwa, M. Toda, Y. Hirata, and S. Yamamura*, Tetrahedron Letters, 1973, 799.
306. *H. Niwa, Y. Hirata, K. T. Suzuki and S. Yamamura*, Tetrahedron Letters, 1973, 2129.
307. *H. E. Miller, H. Rösler, A. Wohlpart, H. Wyler, M. E. Wilcox, H. Frohofer, T. J. Mabry, and A. S. Dreiding*, Helv. Chim. Acta, 1968, **51**, 1470; *E. Dunkelblum, H. E. Miller, and A. S. Dreiding*, ibid., 1972, **55**, 642; *C. Chang, L. Kimler, and T. J. Mabry*, Phytochemistry, 1974, **13**, 2771.
308. *N. Fischer and A. S. Dreiding*, Helv. Chim. Acta, 1972, **55**, 649.
309. *G. Impellizzeri and M. Piattelli*, Phytochemistry, 1972, **11**, 2499.
310. *S. Sciuto, G. Oriente, and M. Piattelli*, Phytochemistry, 1972, **11**, 2259.
311. *S. Sciuto, G. Oriente, M. Piattelli, G. Impellizzeri, and V. Amico*, Phytochemistry, 1974, **13**, 947.
312. *D. G. O'Donovan and H. Horan*, J. Chem. Soc. (C), 1971, 331.
313. *D. J. Bennett and G. W. Kirby*, J. Chem. Soc. (C), 1968, 442.
314. *E. Leete and M. C. L. Louden*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, **90**, 6837.
315. *H. Horan and D. G. O'Donovan*, J. Chem. Soc. (C), 1971, 2083; *H. Rosenberg and A. G. Paul*, Lloydia, 1972, **34**, 372.
316. *E. Leete and G. B. Bodem*, J. C. S. Chem. Comm., 1973, 522.

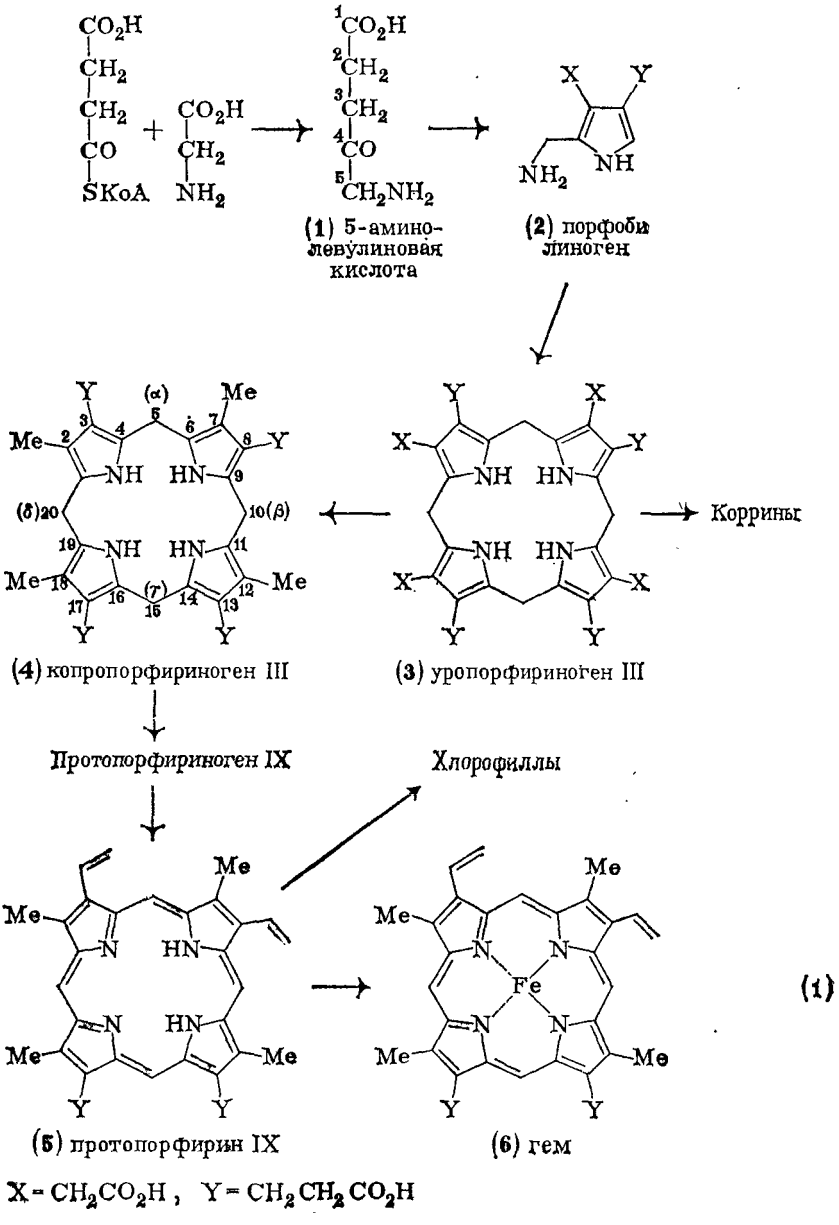
30.2. БИОСИНТЕЗ ПОРФИРИНОВ, ХЛОРОФИЛЛОВ И КОРРИНОВ

М. АХТАР, П. М. ДЖОРДАН (University of Southhampton)

30.2.1. ВВЕДЕНИЕ

Изучение порфиринов, хлорофиллов и корринов, особенно в течение последних 30 лет, потребовало много усилий и мастерства со стороны как химиков-органиков, так и биохимиков. Еще в 1880 г. сходство спектров гема и хлорофилла навело на мысль об их структурном родстве. Строение гема было выяснено в 20-х годах Вильштеттером [1] и Фишером [2] и подтверждено синтезом уже в 1929 г. Химический синтез хлорофилла был осуществлен только в конце 60-х годов [3], хотя его строение было известно уже в 1934 г. Структура витамина B_{12}, биологически важного производного коррина, была выяснена в 1955 г. [4], а спустя почти 20 лет Вудварду [5] и Эшенмозеру [6] удалось осуществить его полный синтез.

Природа некоторых ферментов, участвующих в биосинтезе гема, была выяснена в ставших теперь классическими работах Шемина и сотр., выполненных с применением меченых соединений в конце 40-х — начале 50-х годов [7]. Граник [8] на мутантах *Chlorella* показал, что начальные стадии биосинтеза хлорофилла аналогичны тем же стадиям в биосинтезе гема. Позднее было установлено, что


(1) 5-амино-левулиновая кислота
(2) порфобилиноген
(3) уропорфириноген III
(4) копропорфириноген III
Протопорфириноген IX
Хлорофиллы
(5) протопорфирин IX
(6) гем
Коррины
X = CH2CO2H , Y = CH2CH2CO2H

(1)

коррины формируются из тех же предшественников, что и хлорофиллы, и гем [9], и выяснено [10], в какой мере параллельны пути биосинтеза этих соединений. Общий путь биосинтеза гема, хлорофиллов и корринов приведен на схеме (1)*. Более детально механизм биосинтеза этих трех групп соединений рассматривается в трех последующих разделах: биосинтез гема, биосинтез хлорофиллов и биосинтез корринов.

30.2.2. БИОСИНТЕЗ ГЕМА

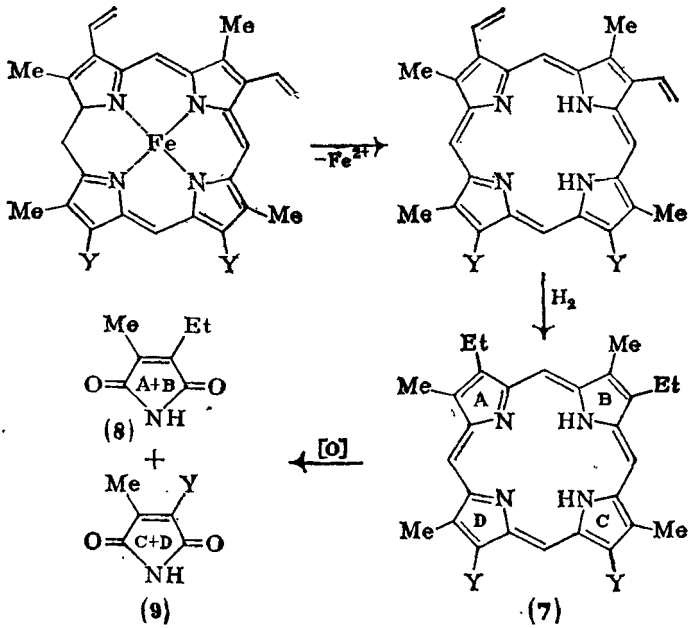
30.2.2.1. Введение

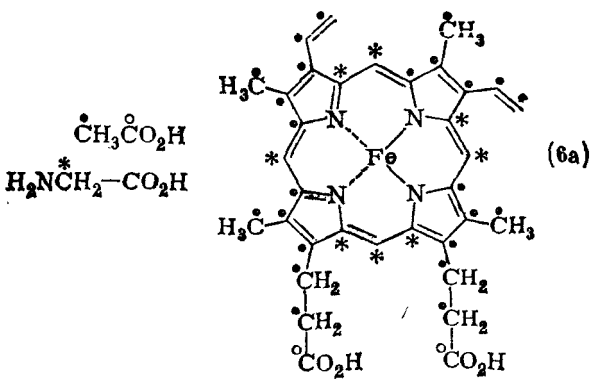
В 1945 г. Шемин в опытах на самом себе установил, что пероральное введение [^{15}N]глицина приводит к эффективному включению метки в гем (**6**) [11]. Позднее на препаратах эритроцитов птиц было показано, что в гем переходит также метка из [2-^{14}C]глицина, но не из [1-^{14}C]глицина [12, 13]. Определяющим этапом в изучении биосинтеза гема явилась разработка метода химической деградации, который позволяет получать различные наборы «осколочных» молекул, содержащие в совокупности все углеродные атомы гема, и однозначно определить положение каждого изотопно-меченного атома С в макроциклической молекуле. Согласно этому методу деградации (схема 2), гем сначала превращают в мезопорфирин IX (**7**), который затем действием CrO_3 расщепляют до метилэтилмалеимида (**8**) и гематиновой кислоты (**9**). Положение атомов углерода в исходном геме определяют путем последующей деградации малеимидов. Далее с помощью меченых соединений удалось установить, что [1-^{14}C]- и [2-^{14}C]ацетаты [13, 14] включаются в гем только после их превращения в цикле трикарбоновых кислот [15] в сукцинил-КоА [16]. Определенная таким образом биогенетическая природа всех атомов углерода и азота в геме показана в структуре (**6а**).

30.2.2.2. Биосинтез 5-аминолевулиновой кислоты

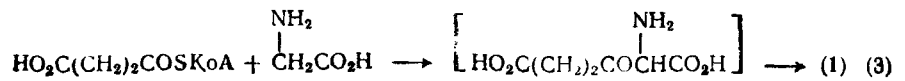
Результаты изучения включения радиоактивных глицина и ацетата, а также факт отщепления карбоксильной группы глицина в процессе биосинтеза гема позволили предположить [17], что при конденсации глицина с сукцинил-КоА (карбоксипропионил-КоА) образуется промежуточное соединение (**10**), декарбоксилирование которого приводит к 5-аминолевулиновой кислоте (АЛК) (**1**) (схема 3; эта реакция катализируется АЛК-синтетазой). Это предположение было подтверждено включением синтезированной химическим путем [5-^{14}C]АЛК в гем с высоким выходом, причем меченые атомы распределялись в геме точно так же, как при

* В настоящем обзоре используется система нумерации 1—20, показанная в формуле (4). Положения 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 и 18 по этой системе соответствуют положениям 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 в системе нумерации 1—8.

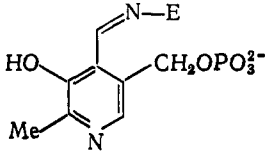




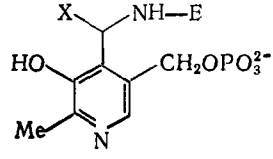
включении [2-^{14}C]глицина [18]. Соответствующий фермент, АЛК-синтетазу, превращающий глицин и сукцинил-КоА в АЛК как в бактериях [19], так и в организмах птиц [20], удалось идентифицировать только в 1958 г. Фермент из бактериальных источников [21] и млекопитающих [22] удалось выделить в высокоочищенном состоянии; к настоящему времени получены обширные сведения о его свойствах и физиологической роли [23].



Для проявления ферментативной активности АЛК-синтетазе любого происхождения необходим кофермент пиридоксальфосфат. Спектроскопические данные [24] свидетельствуют о том, что при pH 5 или 8,5 фермент связывается с пиридоксальфосфатом в основном посредством образования основания Шиффа (11), поглощающего при 415 нм. В области pH 7,2, когда фермент проявляет каталитическую активность, спектроскопические данные (поглощение при 330 нм) согласуются с наличием аминоспирта (12) или какой-либо другой эквивалентной структуры.

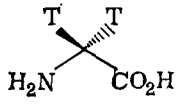


(11)
E = фермеит

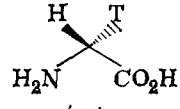


(12) X = OH или нуклеофильная группа фермеита

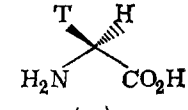
Механизм конденсации глицина с сукцинил-КоА изучался [25] с помощью глицина, меченного в положении 2, т. е. в положении, по которому осуществляется процесс конденсации. Установлено, что С-2 глицина становится С-5 АЛК (см. схему 3). Поэтому для превращения в АЛК посредством высокоочищенной АЛК-синтетазы из *Rhodopseudomonas spheroides* были взяты [2(*RS*)-$^3H_2$]глицин (13) и [2-^{14}C]глицин. В целях предотвращения хаотического распределения метки и потери трития при С-5 АЛК восстанавливали $NaBH_4$ и образовавшийся аминоспирт расщепляли периодатом до формальдегида. Сравнение отношения $^3H/^{14}C$ в исходном глицине и формальдегиде, полученном из АЛК описанным выше путем, показало, что в ходе ферментативной конденсации теряется ~50 % трития. В последующих опытах с [2(*R*)-^{3}H]глицином (14) и [2(*S*)-^{3}H]глицином (15) было установлено, что тритий полностью переходит в АЛК только из соединения (15) (100 %), а АЛК, биосинтезированная из [2(*R*)-^{3}H]глицина (14), почти не содержит трития (3 %) [25].



(13)



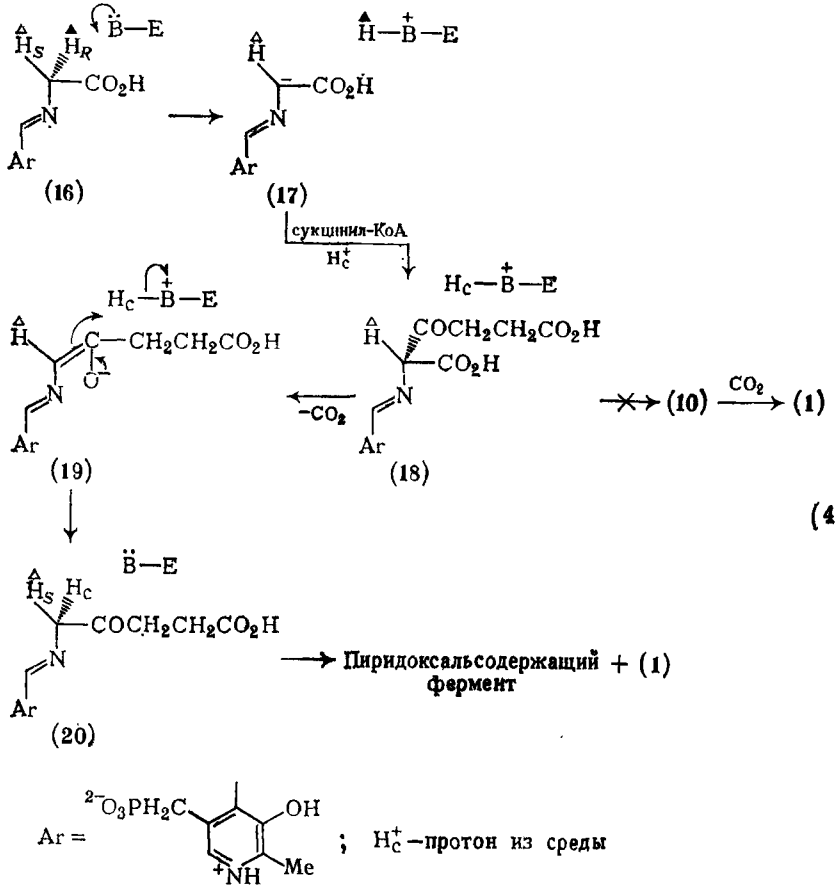
(14)



(15)

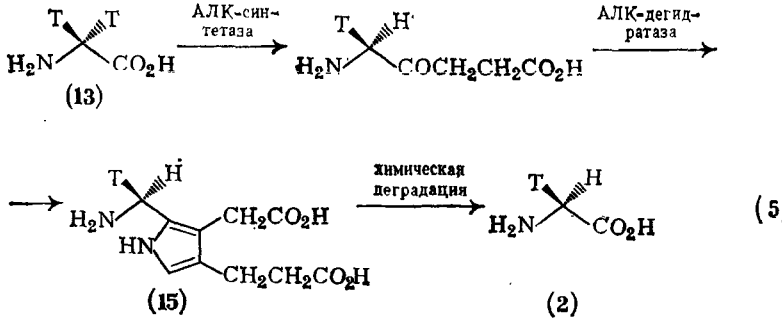
Полученные данные позволили предположить, что первой стадией после образования основания Шиффа (16) из пиридоксальфосфатсодержащего фермента и глицина является реакция, приводящая к потере *pro*-(*R*)-атома водорода глицина и возникновению карбаниона или эквивалентного соединения (17), которое затем конденсируется с сукцинил-КоА, образуя промежуточное соединение (18). Гипотетический механизм и стереохимия действия

АЛК-синтетазы приведены на схеме (4)*. Дальнейшие превращения соединения (18) могут осуществляться двумя путями. В первом из них под влиянием двойного электроноакцепторного эффекта карбонильной группы и пиридинового кольца соединение (18) декарбоксилируется с образованием соединения (19), протонирование которого и последующий гидролиз основания Шиффа (20) дает АЛК (1). Альтернативный механизм заключается в гидролизе комплекса (18) до свободного 1-амино-2-оксоадипата (10), который далее декарбоксилируется без участия ферментов, образуя АЛК (1) (см. схему 4).

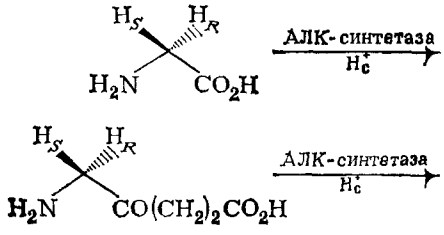


* Считают, что в превращении (17) → (18) атом водорода (отмечен зачерненным треугольником), отрываемый от основания Шиффа основной группой фермента, обменивается с протонами среды (H_c^+), и что превращение (16) → (18) протекает с сохранением конфигурации, а превращение (18) → (20) — с обращением конфигурации. С экспериментальными данными согласуется и противоположная стереохимия реакций [27].

В ходе работ по определению абсолютной конфигурации прохирального центра С-5 АЛК было установлено, что на самом деле верен первый механизм [26]. Это было доказано экспериментами по включению [2(*RS*)-$^3H_2$]глицина (**13**) в АЛК с последующим ее превращением в порфобилиноген (**2**) при помощи порфобилиногенсинтетазы (называемой также АЛК-дегидратазой). Расщепление порфобилиногена (**2**) до глицина (схема 5) и последующее определение хиральности показали, что биосинтетическая АЛК содержит большую часть радиоактивной метки в *pro*-(*S*)-положении при С-5. Стереоспецифичность образования АЛК может быть обеспечена только в том случае, если декарбоксилирование промежуточного соединения (**18**) осуществляется на поверхности фермента и если образовавшееся таким образом соединение (**19**) далее протонируется, присоединяя атом водорода из среды, и только после этого образуется АЛК. Имеющиеся стереохимические данные могут быть интерпретированы таким образом, что в ходе процесса, изображенного на схеме (4), один раз происходит обращение конфигурации и один раз конфигурация сохраняется [27].



Для простоты в настоящем обзоре принимается, что конденсация (**16**)→(**17**)→(**18**) протекает с сохранением конфигурации, а обращение конфигурации происходит при протонировании енола (**19**), образующегося путем декарбоксилирования промежуточного соединения (**18**); в результате протонирования образуется соединение (**20**). Возможно, что в реакции протонирования принимает участие тот же активный центр фермента, на котором осуществляется депротонирование глицина в реакции (**16**)→(**17**). В этой связи следует отметить, что АЛК-синтетаза способна катализировать две реакции стереоспецифического обмена с участием *pro*-(*R*)-атомов водорода при С-2 глицина [28] и С-5 АЛК [29] в отсутствие сукцинил-КоА или КоА (схемы 6 и 7).



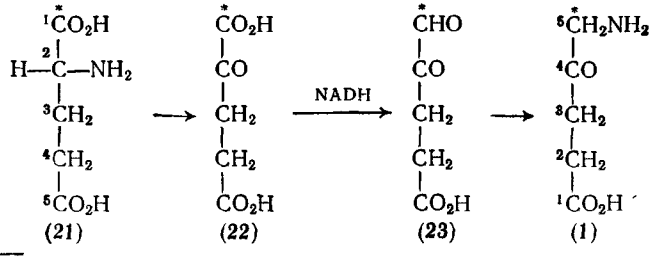
(6)

(7)

H_C^+ - протон из среды

30.2.2.3. Биосинтез 5-аминолевулиновой кислоты в растениях

Все попытки выделить АЛК-синтетазу из растений оказались безуспешными, а установленный на самых ранних этапах изучения биосинтеза хлорофилла факт включения в него в одинаковой степени как [1-^{14}C]-, так и [2-^{14}C]глицина противоречит установленному пути биосинтеза гема в животных и фотосинтезирующих бактериях. Более тщательное изучение [30] включения меченых соединений в препараты тканей огурца, ячменя и бобовых в присутствии левулиновой кислоты * показало, что сукцинат, ацетат и глицин включаются в АЛК гораздо менее эффективно, чем глутамат (21) и родственные соединения с пятью атомами углерода типа 2-оксоглутарата (22). Более того, картина распределения меченых атомов свидетельствовала о включении интактной молекулы глутамата таким образом, что C-1 (карбоксильная группа) глутамата становится C-5 АЛК. Очевидно, в растениях биосинтез АЛК осуществляется по иному пути: сначала глутамат превращается в 2-оксоглутарат, а затем в АЛК, причем последняя стадия осуществляется при участии двух ферментов [31]. Первый из них использует NADH в качестве кофермента и катализирует превращение 2-оксоглутарата в 4,5-диоксовалерат (23), а второй, 4,5-диоксовалерат:аланин—трансаминаза, катализирует образование АЛК и пирувата. Показано, что второй фермент присутствует также в *Rhodopseudomonas spheroides*, однако его метаболическая функция в данном организме не ясна. Суммарная схема биосинтеза АЛК в растениях приведена на схеме (8).



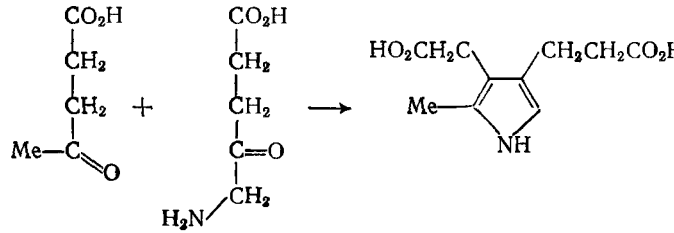
(8)

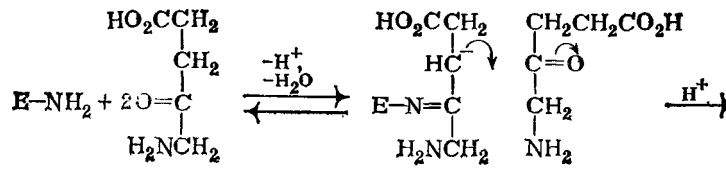
(21) (22) (23) (1)

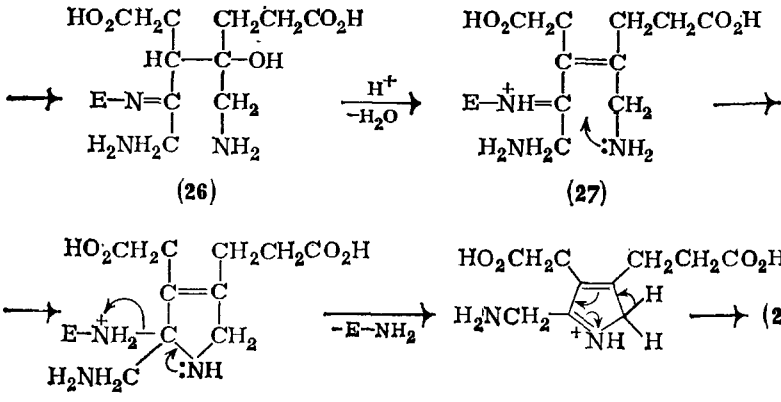
* Левулиновая кислота ингибирует порфобилиногеиситетазу и блокирует образование порфобилиногена из АЛК, способствуя, таким образом, накоплению АЛК.

30.2.2.4. Биосинтез порфобилиногена

Уже много лет назад было известно, что моча пациентов, страдающих порфирией, через несколько часов окрашивается в темно-красный цвет. Ответственное за окраску вещество было выделено Весталлом [32] и позднее идентифицировано как порфобилиноген (ПБГ); в то время еще не было достаточно однозначно установлено, что порфобилиноген является промежуточным соединением в биосинтезе порфиринов. Позднее было показано, что ПБГ включается в гем с большей эффективностью, чем АЛК, и, следовательно, порфобилиноген представляет собой дополнительное звено в биосинтезе порфиринов. Затем из эритроцитов утки были выделены препараты ферментов, эффективно осуществляющие превращение АЛК в ПБГ (2) [33]. Из *Rhodopseudomonas spheroides* и печени коровы фермент порфобилиногенсинтетаза была выделена в высокоочищенном состоянии [34]; в последнем источнике она существует в виде октамера с молекулярной массой около 290 000 [35]. Для проявления максимальной каталитической активности фермента необходимо присутствие тиольных реагентов. Фермент катализирует типичную реакцию Кнорра между двумя молекулами АЛК, протекающую путем альдольной конденсации, дегидратации и образования основания Шиффа (хотя именно такой постадийный порядок не обязателен). Детальное изучение фермента из *Rhodopseudomonas spheroides* [36, 37], показало, что он инактивируется при обработке $NaBH_4$ в присутствии субстрата АЛК или конкурирующего ингибитора, левулиновой кислоты (24). Гетерологичные пирролы типа (25) образуются при инкубации фермента со смесью АЛК (1) и левулиновой кислоты (24); отсюда следует, что молекула субстрата, ковалентно связанная с ферментом по типу основания Шиффа, ответственна за формирование части молекулы ПБГ, несущей боковую карбоксиметильную группу. Предложенный механизм процесса [37] в общих чертах приведен на схеме (10).





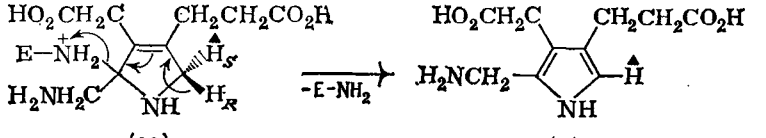


(26) (27) (10)

(28) (29)

Согласно этому механизму, связанная с ферментом в виде основания Шиффа АЛК теряет протон и образует стабилизированный карбанион, конденсирующийся затем со второй молекулой АЛК с образованием соединения (26). Дегидратация [(26)→(27)], циклизация [(27)→(28)] и последующее отщепление фермента [(28)→(29)] приводят к таутомеру соединения (29), из которого порфобилиноген (2) образуется посредством отщепления протона от С-2. Хотя механизм превращения в общих чертах отвечает реакции Кнорра, экспериментальных доказательств именно такого механизма практически не получено.

Показано, что превращение [5(*RS*)-$^3H_2$]АЛК в порфобилиноген, катализируемое ПБГ-синтетазой, сопровождается сохранением 50 % трития из АЛК в положении С-2 порфобилиногена; следовательно, отщепление протона от С-2 осуществляется ферментативным путем [38]. Этот вывод подтверждается включением [5(*S*)-^3H]АЛК в порфобилиноген без потери тритиевой метки [39]. Отсюда следует, что в ходе биосинтеза ароматического кольца [(28)→(2)] стереоспецифически отщепляется *pro*-(*R*)-атом водорода при С-2 АЛК, что также указывает на обязательное участие фермента в этом превращении. Все эти экспериментальные факты укладываются в модифицированный механизм, приведенный на схеме (11).

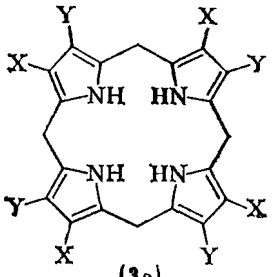


(28) (2) (11)

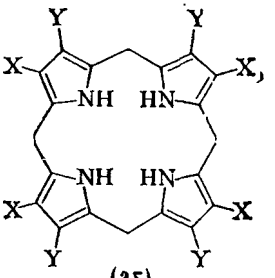
30.2.2.5. Биосинтез уропорфириногенов I и III

Из всех проблем в биосинтезе порфиринов наибольшее внимание исследователей привлекал механизм образования уропорфириногена III (3), поскольку именно это соединение утилизируется

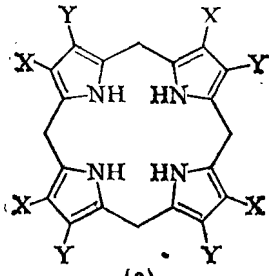
в биосинтезе гема, хлорофиллов и корринов, а уропорфириноген I (**3а**) образуется в биологических системах только в исключительных случаях. Известно, что два других изомерных уропорфириногена, II (**3б**) и IV (**3в**), синтезируются только в неферментативных процессах. Широко изучалась химическая реакционная способность порфобилиногена и родственных пирролов, а также природа соединений, образующихся при их полимеризации в различных условиях [40]. При катализируемой кислотами автоконденсации порфобилиногенов образуются все четыре теоретически возможных изомера III, IV, II, I в отношении 4 : 2 : 1 : 1; более того, при обработке любого из этих изомеров кислотой в атмосфере азота образуется точно такая же равновесная смесь [41].



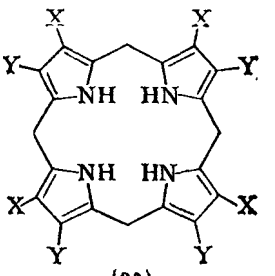
(**3а**)



(**3б**)



(**3**)



(**3в**)

X = CH_2CO_2H, Y = $CH_2CH_2CO_2H$

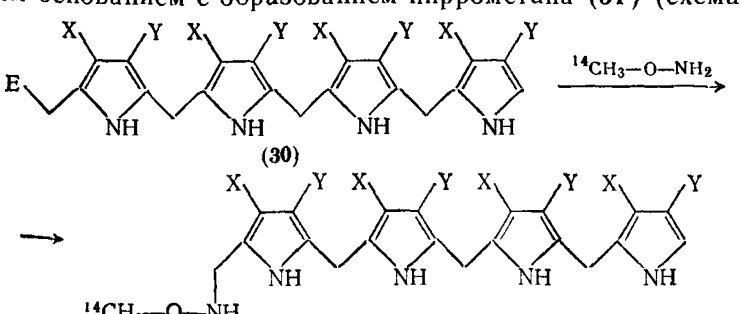
Уже в первых экспериментах было показано, что для ферментативного образования уропорфириногена III из порфобилиногена необходимо координированное участие двух ферментов — уропорфириноген-I-синтетазы и уропорфириноген-III-косинтетазы [42]. Эти ферменты были выделены в виде неочищенного комплекса (называемого порфобилиногеназой), а также в виде отдельных белков [43]. Уропорфириноген-I-синтетаза из различных источников имеет молекулярную массу около 36 000 и способна превращать порфобилиноген только в уропорфириноген I.

Изучение уропорфириноген-III-косинтетазы долгое время тормозилось из-за отсутствия прямого метода определения ее активности. Выделенный из проросших зерен пшеницы и листьев шпината фермент имеет молекулярную массу около 60 000 [44]. Сама

по себе косинтетаза при инкубации с порфобилиногеном не проявляет каталитической активности; не способна она и промотировать изомеризацию уропорфириногена I в уропорфириноген III. При смешении двух ферментов способность продуцировать уропорфириноген III восстанавливается; в присутствии фиксированного количества уропорфириноген-I-синтетазы количество образующегося уропорфириногена III пропорционально концентрации косинтетазы. Следовательно, косинтетаза может проявлять активность только в виде комплекса с уропорфириноген-I-синтетазой, в котором она модулирует активность последнего фермента, направляя ее в сторону образования изомера III [45].

Одной из наиболее удивительных сторон биосинтеза уропорфириногенов I и III является отсутствие в нормальных условиях образования каких-либо свободных промежуточных соединений (за исключением данных, приведенных в отдельном сообщении [46]). По этой причине изучение механизма образования уропорфириногенов было в очень большой степени стимулировано фактом идентификации полипиррометанов в продуктах инкубации ПБГ с уропорфириноген-I-синтетазой в присутствии больших количеств аммиака или гидроксиламина [47].

Эти основания не влияют в заметной степени на утилизацию порфобилиногена ферментом, но резко подавляют образование уропорфириногенов; вместо последних синтезируются соединения, которым было приписано строение полипиррометанов (**32**) и (**33**) (или соответствующих производных, в которых группа NH_2 заменена на NHOH) [48]. Очевидно, реакция конденсации порфобилиногенов с образованием промежуточных пиррометанов гораздо менее чувствительна к ингибирующему действию этих оснований, чем реакция циклизации, в результате которой образуется уропорфириноген I. Эксперименты с использованием [^{14}C]метоксиамина [49] показали, что ингибирующее основание включается в полипиррометан (**31**). Эти данные свидетельствуют о возможности существования (но не доказывают ее) ковалентной связи между ферментом и промежуточным соединением (**30**), которое отщепляется ингибирующим основанием с образованием пиррометана (**31**) (схема 12).



(12)

X = CH_2CO_2H, Y = $CH_2CH_2CO_2H$, E = фермент

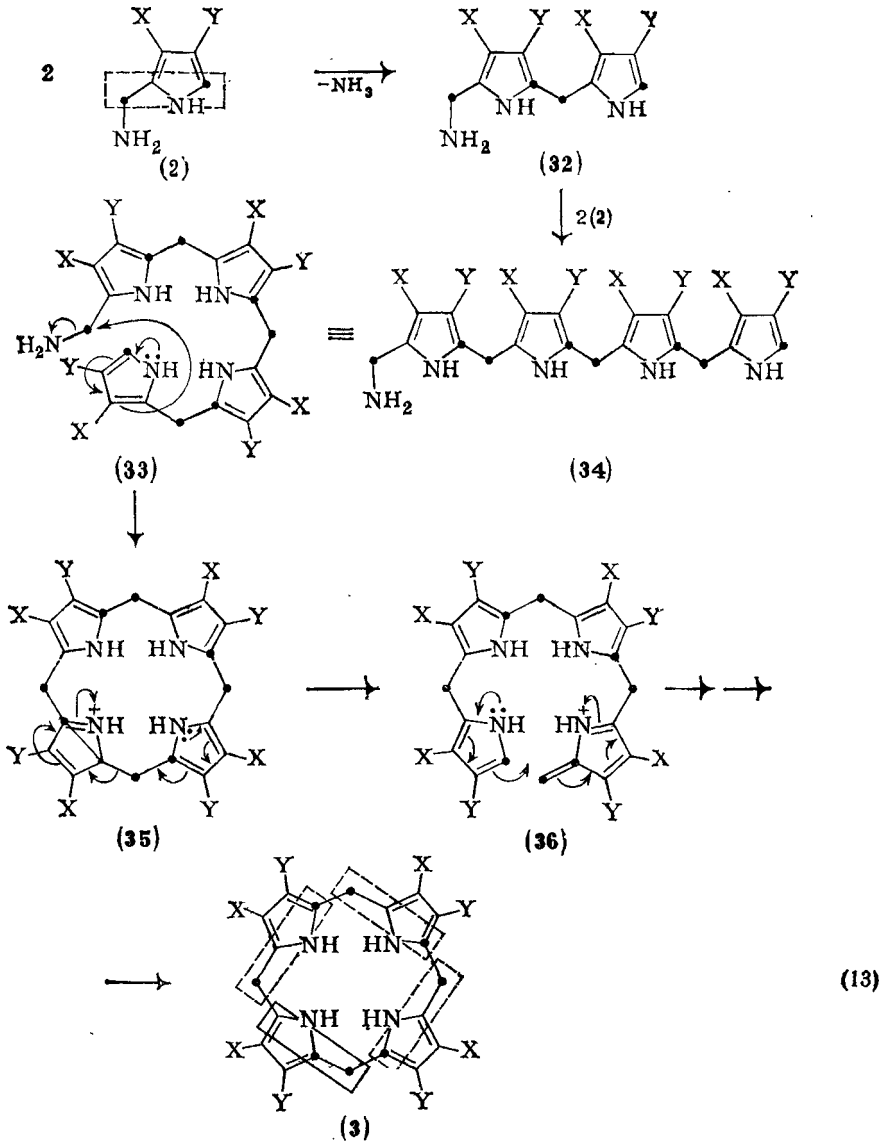
Выяснение роли пиррометанов как промежуточных соединений в биосинтезе уропорфириногена I стимулировало начало интенсивных работ в области синтетической органической химии двумя группами исследователей во главе с Фридманом [50] и Баттерсби [51]. Основные усилия при этом были направлены на синтез различных пиррометанов [(**32**), (**39**) и т. п.] в надежде на то, что один из них окажется субстратом в ферментативном синтезе уропорфириногена III. Основой для разработки стратегии синтетических исследований послужили многочисленные гипотезы биосинтеза уропорфириногена III, высказанные в течение последних 20 лет. Все эти гипотезы могут быть сведены к трем основным механизмам.

Спиро-механизм. Согласно этому механизму, предложенному Мэтьюсоном и Корвином [52] (схема 13)*, тетрапиррометан или билан типа (**33**) образуется из порфобилиногена в три последовательные стадии. Далее билан (**33**) циклизуется с образованием промежуточного спиросоединения (**35**), расщепление С—С-связи которого приводит к изомерному билану или эквивалентному соединению (**36**). При циклизации последнего образуется уропорфириноген III (**3**). Этот механизм предусматривает включение в уропорфириноген III дипиррометана (**32**) и 1,3-углерод-углеродную миграцию только в одном из порфобилиногеновых звеньев уропорфириногена III.

Механизм однократной перегруппировки. В этом механизме, предложенном Буллоком [53] (схема 14), внутримолекулярная перегруппировка осуществляется в самом начале процесса в ходе конденсации (*а*) с участием заместителя при С-5 одной молекулы порфобилиногена (**2**) с аминометильной группой второй молекулы порфобилиногена с образованием соединения (**37**). При расщеплении С—С-связи последнего и миграции аминометильной группы (*б*, *в*) образуется дипиррометан (**39**). Последующее присоединение двух молекул порфобилиногена без перегруппировок приводит к промежуточному соединению (**40**), при циклизации которого образуется уропорфириноген III (**3**). Этот механизм требует включения в уропорфириноген III дипиррометана (**39**), трех интактных молекул порфобилиногена и одной — после 1,3-перегруппировки; в этом отношении механизм Буллока не отличается от спиро-механизма.

Механизм тройной перегруппировки. В предложенном впервые Робинсоном [54] механизме центром максимальной нуклеофильности в ПБГ считается тетразамещенный атом С-5, который и является местом осуществления трех конденсаций. Это обусловливает необходимость трех 1,3-миграций и образования нерегулярного билана (**41**), циклизация которого приводит непосредственно

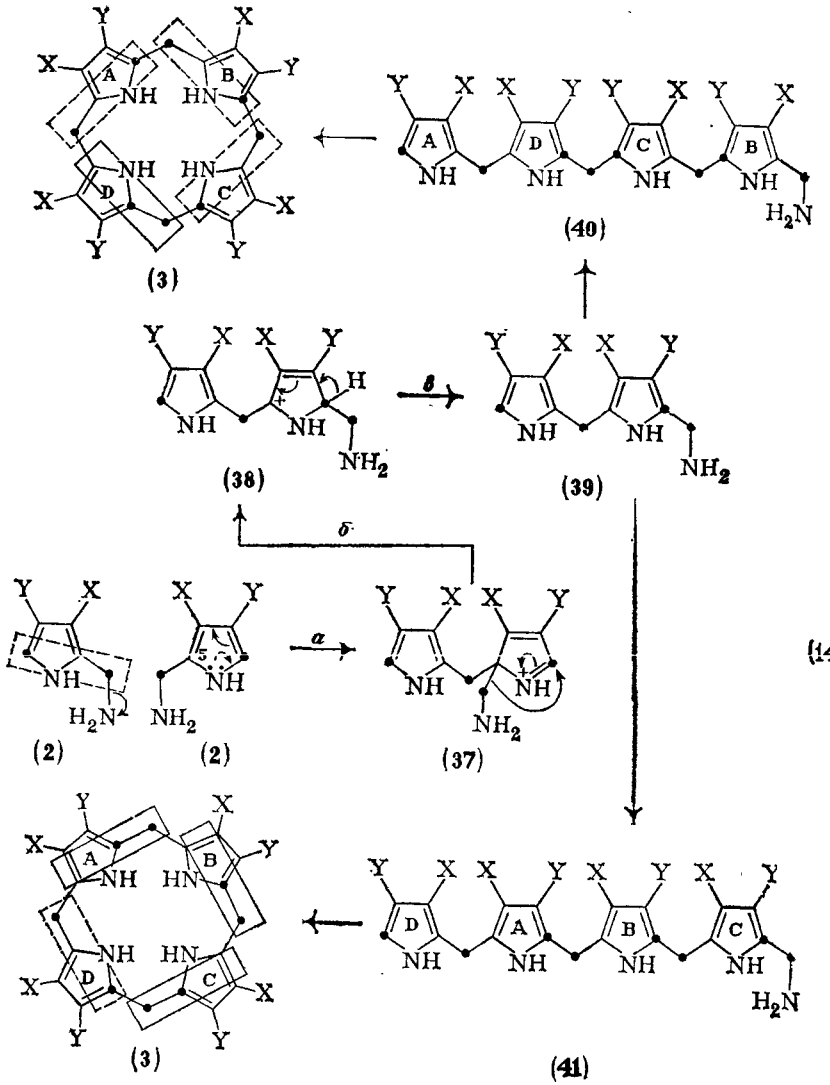
* На приведенных ниже схемах сплошным прямоугольником выделено перегруппировавшееся звено ПБГ, пунктирными прямоугольниками выделены неперегруппированные звенья ПБГ.



(13)

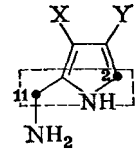
к уропорфириногену III. Согласно этому механизму, в уропорфириноген III должен включаться дипиррометан типа (39), а включению трех ПБГ-звеньев должна предшествовать их перегруппировка.

Число внутримолекулярных перегруппировок, осуществляющихся в процессе биосинтеза, можно определить с помощью спектроскопии ЯМР ^{13}C. Этот метод позволяет однозначно определить

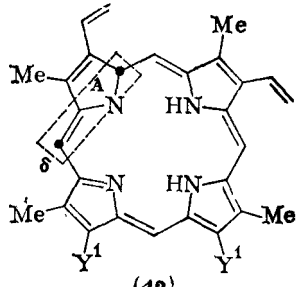


положение ^{13}C в молекуле, особенно по отношению к другим соседним или близлежащим атомам ^{13}C. Для использования в биосинтетических экспериментах из [5-^{13}C]АЛК ферментативным путем был синтезирован порфобилиноген, меченный ^{13}C в положениях С-2 и С-11 [51]. Основным экспериментальным приемом группы Баттерсби было пятикратное разведение меченного ^{13}C порфобилиногена немеченым порфобилиногеном. Затем порфобилиноген ин-

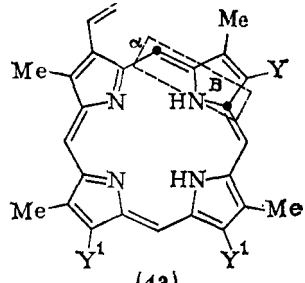
кубировали с культурой эритроцитов птиц с целью синтеза уропорфириногена III. Культура эритроцитов содержит также ферменты, необходимые для последующего превращения уропорфириногена III в протопорфирин IX. Вследствие разведения меченного ^{13}C порфобилиногена в большинство образующихся молекул уропорфириногена III в среднем включалась одна молекула меченого и три молекулы немеченого порфобилиногена. Поскольку ферментативное превращение уропорфириногена III в протопорфирин IX, как известно, осуществляется без пер группировки углеродного скелета, изучение спектра ЯМР ^{13}C протопорфирина IX (в виде его диэфира) позволяет непосредственно судить о механизме образования уропорфириногена III. Изучение спектра ЯМР ^{13}C протопорфирина IX в виде смеси (42)—(45) показало, что сигналы α-, β- и δ-*мезо*-углеродных атомов (положения 5, 10 и 20) представляют собой дублеты с константами ССВ 5,5 Гц в результате 1,4-



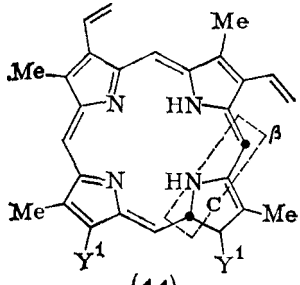
(2)



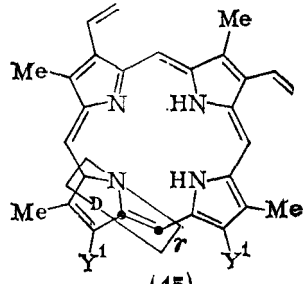
(42)



(43)



(44)



(45)

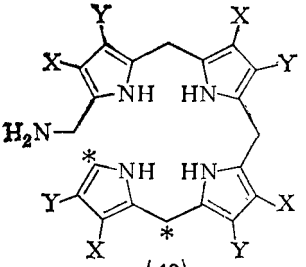
X = CH_2CO_2H; Y = $(CH_2)_2CO_2H$; Y^1 = $(CH_2)_2CO_2Me$

взаимодействия ^{13}C-атомов. Напротив, сигнал γ-*мезо*-углеродного атома представляет собой дублет с константой ССВ 72 Гц, что отвечает взаимодействию соседних ^{13}C-атомов.

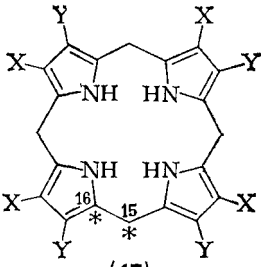
Полученные результаты свидетельствуют о том, что кольцо A и δ-*мезо*-положение, кольцо B и α-*мезо*-положение, кольцо C и β-*мезо*-положение образуются путем включения интактных молекул порфобилиногена без перегруппировки. Напротив, остаток порфобилиногена, из которого образуются кольцо D и γ-*мезо*-углеродный атом, подвергся внутримолекулярной перегруппировке. Таким путем были подтверждены результаты экспериментов Шемина, показана несостоятельность механизма с тройной перегруппировкой, хотя и не был исключен вариант этого механизма, предложенный Расселом [54а], и не удалось отдать предпочтение какому-либо из двух механизмов с однократной перегруппировкой.

В другом подходе к выяснению механизма биосинтеза уропорфириногена III основное внимание уделялось изучению пиррометанов, в особенности типа (**32**), участвующих в процессе по механизму Мэтьюсона — Корвина, и типа (**39**), являющихся промежуточными соединениями в механизме Буллока [50, 51]. Однако поскольку из этих соединений уропорфириногены могут образовываться и неферментативным путем, эксперименты с участием ферментов не дали определенных результатов (исключением является сообщение [54б]).

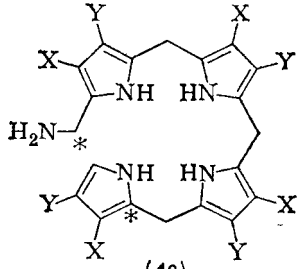
Значительный интерес представляют работы по изучению тетрапиррометанов (или биланов) [55]. Было показано, что в контрольных экспериментах в отсутствие ферментов билан (**33**) превращается в уропорфириноген I. В ферментной системе синтетаза — косинтетаза направление реакции смещается в сторону образования уропорфириногена III. Билан, меченный ^{13}C в положении, указанном в структуре (**46**), в ферментной системе включается таким образом, что метка занимает положение 15 соединения (**47**) [56], причем сигнал от C-15 имеет константу ССВ 50 Гц, что свидетельствует о наличии соседнего атома ^{13}C, вероятно C-16. Из билана, меченного ^{13}C так, как указано в формуле (**48**), образуется уропорфириноген III (**49**), содержащий ^{13}C в положениях 19 и 20 [56]. Следовательно, из четырех пиррольных остатков билана остаток, содержащий аминометильную боковую цепь, становится кольцом A уропорфириногена III, а остаток со свободным α-положением перегруппировывается с образованием кольца D. Если считать доказанным, что в превращении ПБГ в уропорфириноген III промежуточно образуется билан, тогда эти данные вносят значительный вклад в понимание биогенеза уропорфириногена III [55, 56]. Наиболее важный вывод из этих работ заключается в том, что перегруппировка с образованием «обращенного» кольца D в уропорфириногене III осуществляется после синтеза билана (**33**). Отсюда следует, что гипотеза Буллока о перегруппировке на ранних стадиях биосинтеза менее вероятна, чем механизм Мэтьюсона — Корвина или какой-либо его вариант.



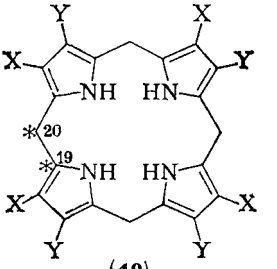
(46)



(47)



(48)

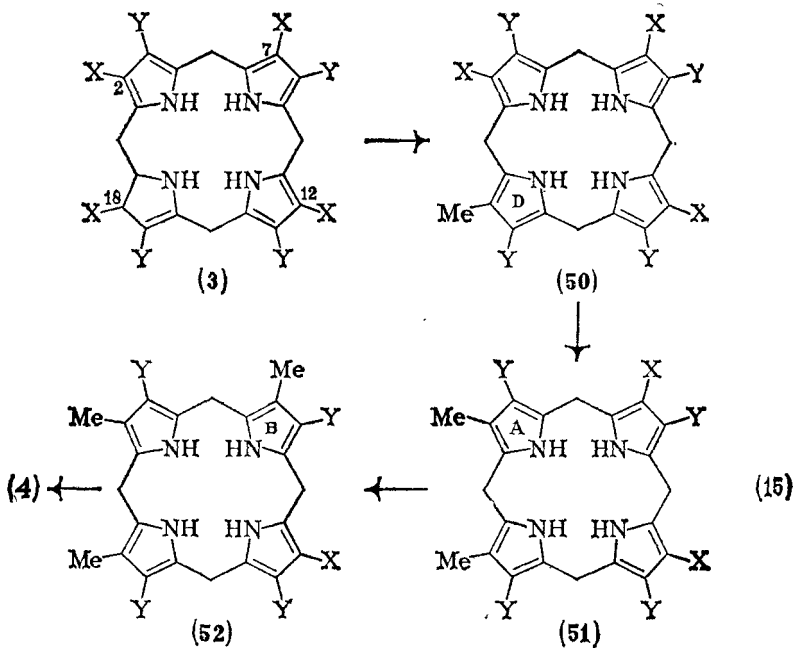


(49)

Одним из таких вариантов является осуществление перегруппировки не через спиросоединение (35), а через промежуточный ковалентно связанный комплекс субстрата с одним или другим ферментом (или с двумя ферментами одновременно). При любом механизме биосинтеза в его последних стадиях должен принимать участие билан (34) нерегулярного строения, его деаминопроизводное (36) или соответствующие комплексы субстратов с ферментами.

30.2.2.6. Превращение уропорфириногена III в копропорфириноген III

Ранее считалось, что промежуточным соединением в биосинтезе гема является уропорфирин III. Теперь мы знаем, что истинным промежуточным соединением в ферментативном синтезе гема является восстановленный порфирин, уропорфириноген III (3) [57], и что окислению макроциклического кольца до порфирина предшествует образование копропорфириногена III (4) и протопорфириногена IX (см. схему 1). Превращение уропорфириногена III в копропорфириноген III посредством декарбоксилирования боковых карбоксиметильных групп в положениях 2, 7, 12 и 18 (схема 15) катализируется одним ферментом — уропорфириноген-III-декарбоксилазой. Этот фермент катализирует также декарбоксилирование уропорфириногена I, а II- и IV-изомеры являются «плохими» субстратами [58]. Гипотетическая последовательность ступенчатого декарбоксилирования боковых карбоксиметильных групп показана на схеме (15).



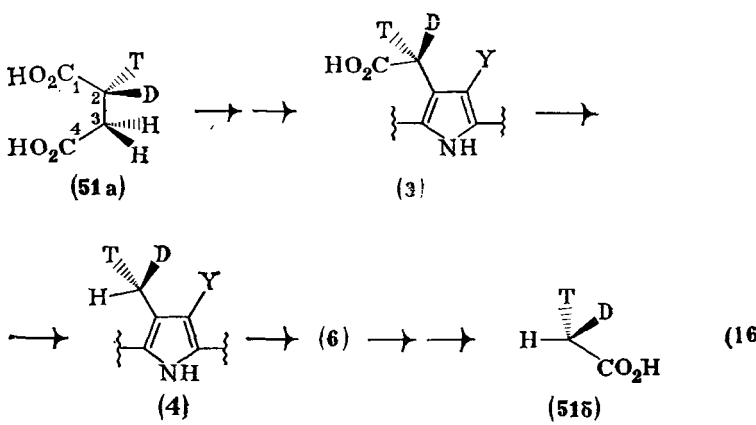
Теоретически в ходе превращения уропорфириногена III в копропорфириноген III могут образоваться 14 промежуточных соединений, содержащих пять, шесть или семь боковых цепей с карбоксильными группами. Некоторые из этих соединений были выделены в виде соответствующих порфиринов из мочи пациентов, страдающих порфирией [59], или в ходе экспериментов на животных, которым вводили лекарственный препарат гексахлорбензол [60]. Последующее химическое декарбоксилирование этих соединений приводит к копропорфирину III, следовательно, они относятся к III-ряду.

Выделенный из различных источников порфирин с семью карбоксильными группами, фриапорфирин (называемый также порфирином 208 и псевдоуропорфирином), как было показано, имеет строение (**50**); он образуется путем декарбоксилирования боковой цепи, карбоксиметильной группы в кольце D уропорфириногена III [61]. Существуют шесть теоретически возможных изомерных порфиринов с шестью карбоксильными группами, образующихся в результате декарбоксилирования двух карбоксиметильных групп уропорфириногена III; из природных источников, а именно из кала крыс, был выделен только один такой изомер, которому по данным спектроскопии ЯМР ^1H и полного синтеза однозначно приписано строение (**51**) [61].

Декарбоксилированием трех карбоксиметильных групп из уропорфириногена III могут образовываться четыре различных пор-

фирина с пятью карбоксигруппами. Поскольку известно, что порфирин с шестью карбоксильными группами образуется путем декарбоксилирования в кольцах A и D, то при образовании порфирина с пятью карбоксигруппами возможны два типа промежуточных соединений; в первом случае декарбоксилированию подвергались бы группировки колец A, B и D, а в другом — A, C и D. Выбор между этими двумя структурами был сделан с помощью химического синтеза и последующего сравнения спектров ЯМР ^1H синтезированного соединения (**52**) и образца, выделенного из кала крыс [61]. Таким путем было установлено, что превращение уропорфириногена III в копропорфириноген III осуществляется путем ступенчатого декарбоксилирования боковых цепей колец D, A, B и C, причем промежуточно образуются соединения (**50**), (**51**) и (**52**). Тот факт, что вся последовательность реакций декарбоксилирования катализируется одним ферментом, уропорфириноген-III-декарбоксилазой, и в условиях нормального биосинтеза в раствор практически не выделяются промежуточные соединения, представляет очень интересную проблему.

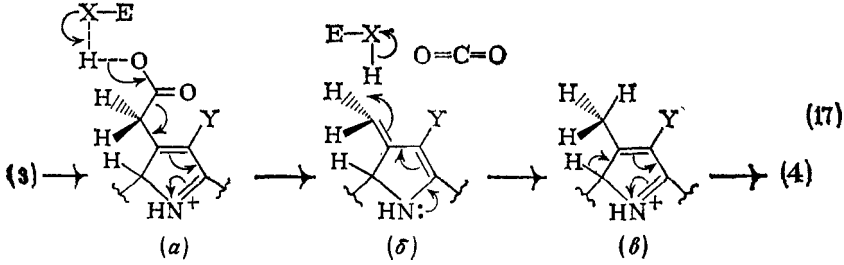
Стереохимия процесса декарбоксилирования была изучена с помощью сукцината, стереоспецифически меченного дейтерием и тритием в положении 2 [62]; C-2 каждой молекулы сукцината через АЛК в конце концов превращается в метильную группу (четыре Me) копропорфириногена (**4**) и, следовательно, гема (**6**) (схема 16),



Из продуктов инкубации меченой (*R*)-[2-$^2H_1$, 2-$^3H_1$]янтарной кислоты (**51а**) с гемолизированными эритроцитами был выделен гем. Далее путем расщепления гема до этилметилмалеимида и гематиновой кислоты с последующим расщеплением малеимидов в мягких условиях была получена (*S*)-[$^2H_1$, $^3H_1$]уксусная кислота (**51б**) (из колец A + B или C + D). *S*-Хиральность этой кислоты была доказана с использованием методов, разработанных независимо и одновременно группами Аригони [63] и Корнфорта [64]. Сравнение структуры (*S*)-ацетата со структурами соответствующих

центров уропорфириногена III (см. схему 16) позволило сделать вывод о том, что декарбоксилирование осуществляется с сохранением конфигурации [62].

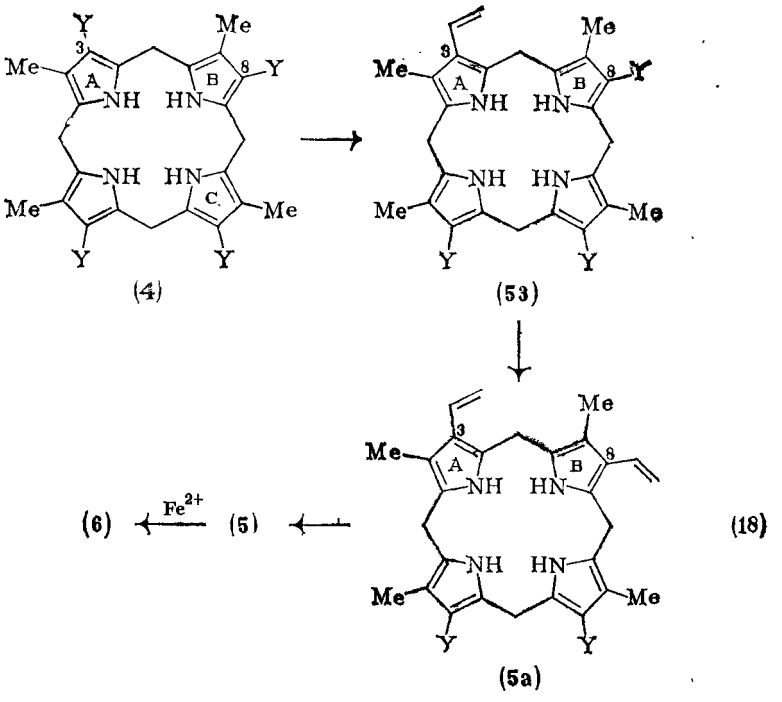
Сам факт участия в процессе декарбоксилирования в качестве субстратов уропорфириногенов, а не уропорфиринов, предполагает некоторый механизм, в котором протонированное пиррольное кольцо выполняет роль электроноакцепторной группы, облегчающей расщепление С—С-связи (схема 17). В свете имеющейся информации о стереохимии процесса декарбоксилирования логично предположить, что активный центр фермента, участвующий в отщеплении атома водорода от карбоксигруппы или в связывании уже диссоциированной карбоксигруппы, может содействовать и протонированию промежуточного соединения (*б*) (схема 17).



30.2.2.7. Превращение копропорфириногена III в протопорфириноген IX

Образование протопорфириногена IX (**5а**) из копропорфириногена III (4) сводится к окислительному декарбоксилированию боковых карбоксиэтильных группировок в кольцах А и В (положения 3 и 8) до винильных групп. Гипотетическая последовательность этих групп в кольцах А и В показана на схеме (18). Для проявления каталитической активности соответствующего фермента необходимо присутствие молекулярного кислорода, однако в анаэробных организмах могут использоваться и другие акцепторы электронов.

При изучении превращения копропорфириногена III в протопорфириноген IX внимание исследователей привлекали в основном два вопроса: во-первых, последовательность реакций декарбоксилирования и возможное участие других промежуточных соединений и, во-вторых, механизм образования винильной группы. При нормальном метаболизме содержание свободных порфиринов в тканях чрезвычайно мало, но при некоторых генетических заболеваниях, затрагивающих биосинтез гема, или в некоторых специализированных тканях типа железы Гардера они продуцируются в больших количествах. Некоторые из этих порфиринов, имеющих довольно интересные структуры, дали ценную информацию о путях и вероятном механизме ферментативных превращений порфиринов. Одним из наиболее важных соединений этой группы является гарде-



ропорфириноген (**53**) [66], отличающийся от копропорфириногена только наличием винильной группы в положении 3. Потенциальная ценность гардеропорфириногена как промежуточного соединения в синтезе гема стала очевидной, когда было установлено, что он превращается в протопорфириноген IX в десять раз быстрее, чем изомерный изогардеропорфириноген [67], у которого винильная группа находится в положении 8. Очевидно, в ходе биосинтеза гема предпочтительно декарбоксилируется сначала кольцо А и только затем — кольцо В [61] (см. схему 18). Копропорфириноген I не является субстратом для копропорфириногеноксидазы; в то же время этот фермент способен превращать неприродный копропорфириноген IV в протопорфириноген XIII.

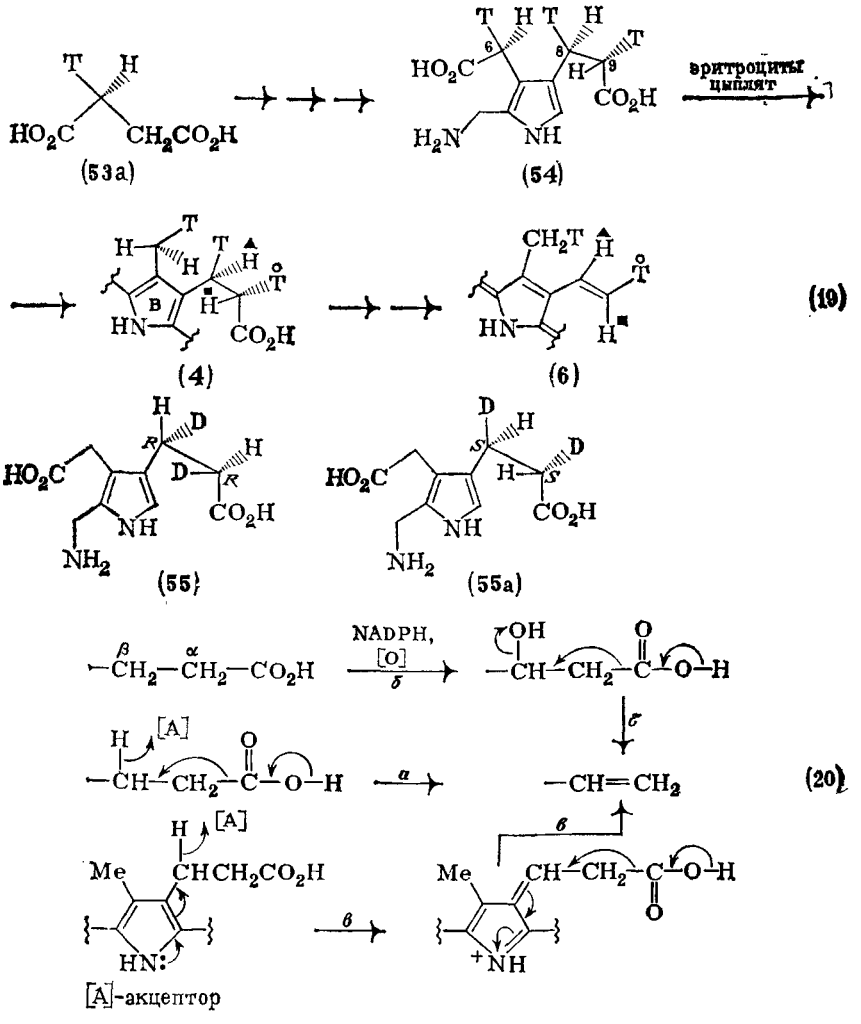
Информация о механизме окислительного декарбоксилирования копропорфириногена III до протопорфириногена IX может быть получена при изучении превращений карбоксиэтильных боковых цепей, меченных дейтерием или тритием, в винильные группы. В ходе этого превращения биохимические процессы, происходящие с участием α- и β-положений карбоксиэтильных боковых цепей, могут быть охарактеризованы по содержанию дейтерия или трития в кольцах А и В относительно колец С и D гема. С целью изучения такого рода превращений химическими методами были синтезированы [68] порфобилиногены (**55**) и (**55а**), содержащие дейтерий

в боковой цепи, а биосинтетически [27, 69] из различных тритийсодержащих сукцинатов, например из [2(*S*)-$^3H_1$]сукцината (**53а**), был получен [6*S*,8*S*,9*S*-$^3H_3$]ПБГ (**54**), который далее был превращен в гем (**6**) с помощью гемолизированных препаратов эритроцитов птиц (схема 19)* [27]. Полученный таким образом биосинтетический препарат был далее расщеплен до гематиновой кислоты и метилэтилмалеимида с целью определения содержания в них изотопов водорода. Таким путем было показано, что единственный элиминируемый атом водорода отщепляется от β-положения карбоксиэтильной боковой цепи. Использование в качестве предшественника ПБГ, стереоспецифически меченного тритием в боковой цепи, показало, что элиминируется *pro*-(*S*)-атом водорода (см. схему 19). Отсюда следует, что в процессе образования винильных групп из карбоксиэтильных боковых цепей исключено участие промежуточных производных акриловой кислоты или β-кетокислот. Все приведенные выше данные согласуются с любым из трех близких механизмов, приведенных на схеме (20) [70]. В механизме (*а*) гидрид-ион отщепляется от β-углеродного атома и одновременно осуществляется декарбоксилирование до винильной группы. Механизм (*б*) включает стадию протекающего с участием O_2 гидроксилирования, причем вводимая в β-положение гидроксигруппа облегчает последующее декарбоксилирование. Механизм (*б*) подтверждается ферментативным превращением в протопорфириноген IX под действием препаратов эритроцитов птиц как синтетического 3-(1-гидрокси-2-карбоксиэтил)-8-карбоксиэтилдейтеропорфириногена IX [(4); но заместителем при С-3 является группировка $CH(OH)CH_2CO_2H$], так и (хотя и в меньшей степени) 8-(1-гидрокси-2-карбоксиэтил)-3-карбоксиэтилдейтеропорфириногена IX [(4); но заместитель при С-8 — $CH(OH)CH_2CO_2H$] [45]. Реализация любого из механизмов (*а* или *б*) требует, чтобы реакция осуществлялась как процесс антиперипланарного элиминирования [71] (см. схему 19).

Наконец, в механизме (*в*) предусматривается окислительный процесс с участием β-водородного атома и пиррольной N—H-связи, в результате которого образуется промежуточное основание Шиффа; это основание вследствие своей электроноакцепторности способствует декарбоксилированию с образованием винильной группы. Этот механизм аналогичен некоторым реакциям биологического декарбоксилирования, катализируемым ферментами с пиридоксальфосфатной и тиаминпирофосфатной группировками. В настоящее время невозможно сделать выбор между этими тремя механизмами (см. схему 20), однако очевидно, что при биосинтезе гена в анаэробных организмах осуществление механизма (*б*), пред-

---

* Этот механизм впоследствии был подтвержден в работе [124б]. Антиперипланарный характер элиминирования доказан на образце ПБГ, содержащем смесь (55) и (**55а**).



усматривающего O_2-зависимое образование β-гидроксипроизводного, маловероятно.

30.2.2.8. Превращение протопорфириногена IX в протопорфирин IX

Порфириногены легко превращаются в порфирины и без участия ферментов в присутствии кислорода на свету; но в природе чисто химические (т. е. неферментативные) процессы очень редки. Часто отличить ферментативные процессы от неферментативных можно путем изучения кинетических изотопных эффектов. С этой

целью был получен протопорфириноген IX, нестереоспецифично меченный тритием во всех *мезо*-положениях. Инкубация этого соединения с препаратом эритроцитов цыплят с последующим выделением протопорфирина IX показала, что в ходе превращения теряется ровно 50 % тритиевой метки; следовательно, реакция катализируется ферментом [72]. В контрольном неферментативном превращении копропорфириногена III в копропорфирин III терялось только 4 % трития, что говорит о значительной химической неравноценности изотопов водорода в ходе неферментативного окисления порфириногенов. Катализирующие окисление протопорфириногена IX экстракты * способствуют также окислению протопорфириногена XIII и изогардеропорфириногена, хотя скорость превращения в этих случаях гораздо ниже.

30.2.2.9. Превращение протопорфирина IX в гем

Биологическое включение иона железа(II) в протопорфирин IX катализируется экстрактами из самых разнообразных источников; соответствующий фермент называется феррохелатазой [73]. В большинстве случаев для осуществления этого процесса необходимы анаэробные условия и присутствие восстановительных агентов типа глутатиона. Этот фермент способен также катализировать включение ионов других двухвалентных металлов, например кобальта, цинка, меди, марганца и никеля, но только кобальт и, в меньшей степени, цинк могут сравниться с железом по скорости включения.

На скорость включения металла влияет также структура порфиринового кольца. Например, фермент действует даже более эффективно в случае мезопорфирина и дейтеропорфирина, чем в случае протопорфирина IX. Как правило, связыванию с ферментом благоприятствует наличие двух свободных карбоксигрупп, особенно содержащихся в карбоксиэтильных группировках [74].

Железо может быть введено в протопорфирин IX без участия ферментов путем нагревания с солью железа(II) в уксусной кислоте или в пиридине. При физиологических значениях pH, однако, неферментативное включение железа осуществляется довольно медленно. Железо вообще не включается в порфириногены, конформация пиррольных колец которых не столь идеально соответствует образованию комплекса, как планарная сопряженная кольцевая система порфирина. В то же время цинк способен связываться с порфириногенами и порфиринами как ферментативным путем, так и без участия ферментов; нежелательное образование комплексных соединений с цинком затрудняет изучение железопорфиринов.

---

* Из митохондрий млекопитающих [72а] и из выращенной в анаэробных условия культуры *E. coli* [72б] были выделены соответствующие ферменты в частично очищенном состоянии. Фермент из митохондрий функционирует в присутствии молекулярного кислорода, а в случае фермента из *E. coli* конечным акцептором электронов является фумарат.

30.2.2.10. Образование производных гема и гемопротеинов

Подробное рассмотрение вопроса о включении гема в гемопротеины не является целью настоящего обзора; ниже вкратце рассматриваются только некоторые основные аспекты этой проблемы.

(1) Гем b

В биохимической литературе цитохромы обозначают индексами a, b и c; их простетические группы называют гемами a, b и c. В цитохроме b немодифицированный гем (**6**), называемый в этом случае гемом b, связан с двумя гистидиновыми остатками белка только через центральный атом железа. Гем (**6**) в немодифицированном виде включается также в гемоглобин, миоглобин, пероксидазы, каталазу, эритрокруорин и цитохромы типа P_{450}.

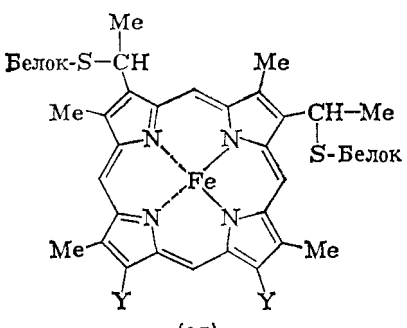
(2) Гем a ***(6а)***

В цитохромах a и a_3 гем модифицирован путем **введения фарнезильной группы в** боковую цепь в положении 3.

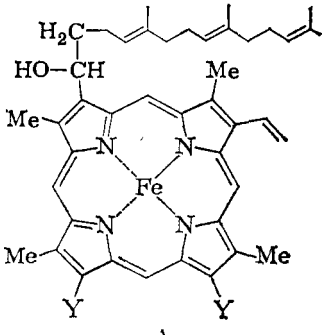
(3) Гем c ***(6б)***

Во всех цитохромах с гем ковалентно связан с белком посредством тиоэфирных связей между винильными боковыми группами в кольцах A и B и SH-группами остатков цистеина белка. В таких случаях простетическую группу называют гемом c. В цитохромах с железо координационно связано с гистидином и метионином.

Биохимии гемов и гемопротеинов посвящен обзор [75].



(6б)



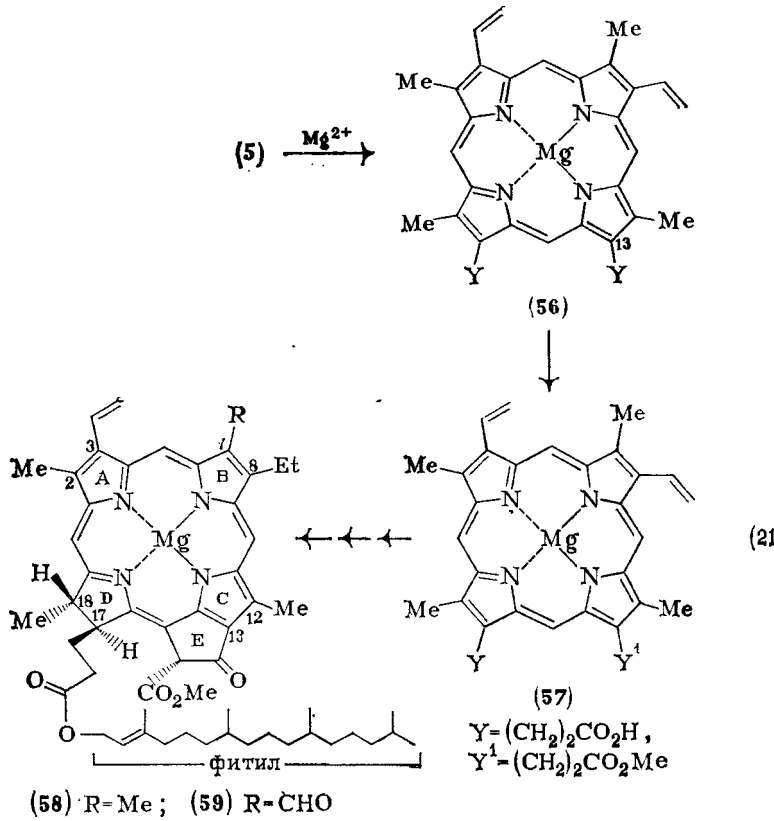
(6а)

30.2.3. БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛОВ [76, 77]

30.2.3.1. Хлорофилл *a*

Современное [77] состояние знаний о биосинтезе хлорофилла *a* (**58**) (схема 21) основано, главным образом, на работах Граника, в которых было показано, что мутанты *Chlorella*, не способные

синтезировать хлорофилл *а*, аккумулируют промежуточные соединения типа протопорфирина IX (5), Mg-протопорфирина IX (56) и метилового эфира Mg-протопорфирина IX (57) (8,77—79]. Позднее эти и родственные промежуточные соединения были выделены также из ячменя, выросшего в темноте, или мутантов ячменя, не способных осуществлять биосинтез хлорофилла [79]. На основании этих данных предположили, что биосинтез гема и хлорофилла идет одним путем вплоть до протопорфирина IX и, следовательно, начальные стадии биосинтеза хлорофилла соответствуют последовательности превращений, приведенной на схеме (21) [77—79].



(21)

Работы по изучению включения меченых АЛК и протопорфирина IX в предшественники хлорофиллов в бесклеточных системах из зеленых семядолей огурцов [80] и этиопластов выросшего в темноте ячменя [81] подтвердили высказанное ранее предположение. Имеющиеся данные суммированы ниже в разделах, посвященных превращению протопорфирина IX в метиловый эфир Mg-протопорфирина IX и затем превращению последнего в хлорофилл *а*.

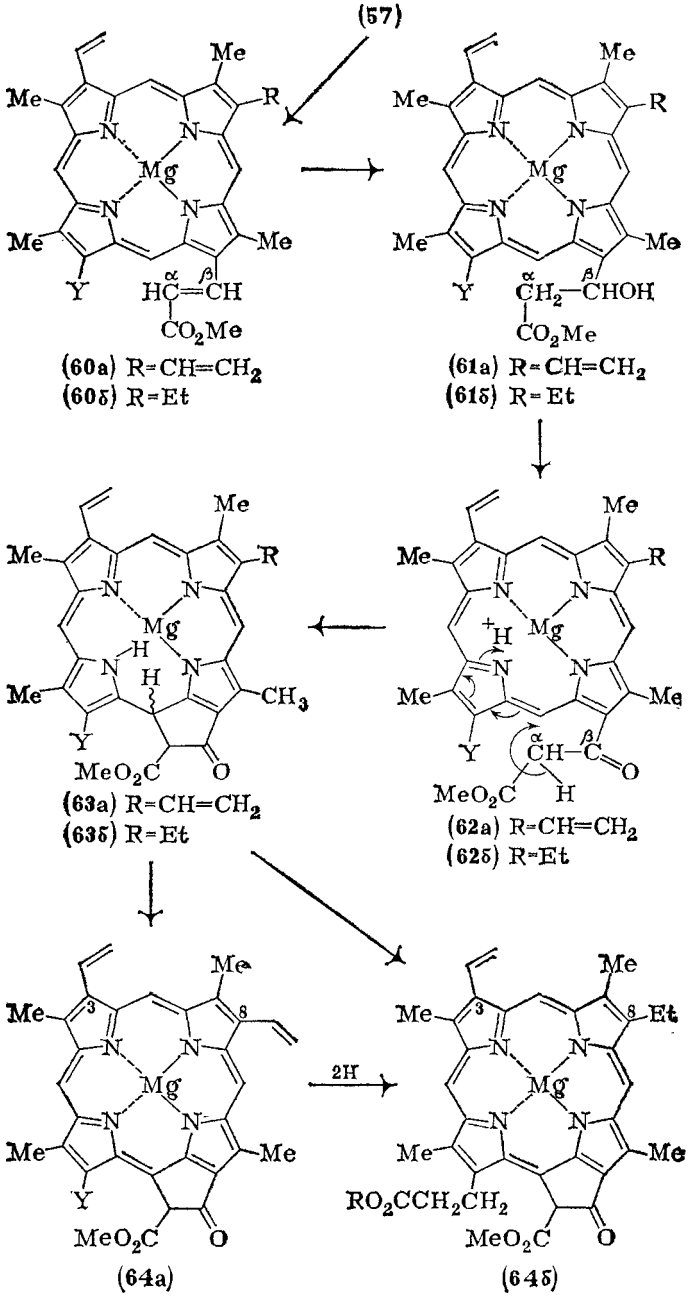
(1) *Превращение протопорфирина IX в метиловый эфир Mg-протопорфирина IX*

Последовательность реакций включения магния в порфириновое ядро и этерификации боковой карбоксильной группы в положении 13 (см. схему 21) точно не установлена. Косвенные данные по накоплению Mg-протопорфирина IX и его метилового эфира в хлорофиллдефицитном мутанте хлореллы говорят о том, что эти реакции протекают последовательно [79]. Почти нет сомнения, что включение магния в протопорфирин IX катализируется ферментом, поскольку соответствующая неферментативная реакция осуществляется только с активированными магниевыми комплексами или в нефизиологических условиях; однако о природе фермента, магнийхелатазы, данных практически нет. После включения магния происходит реакция этерификации *S*-аденозилметионином, катализируемая *S*-аденозилметионин:магнийпротопорфирин—метилтрансферазой. Этот фермент был обнаружен в *R. spheroides* [82], маисе [83] и *Euglena* [84]. Mg-Протопорфирин IX этерифицируется в 15 раз быстрее, чем протопорфирин IX, что еще раз подтверждает правильность приведенной на схеме (21) последовательности превращений. В то же время в *R. spheroides* Mg-протопорфирин IX не образуется в свободном виде, следовательно, в этом случае включение магния и последующая этерификация осуществляются единым мультиферментным комплексом [85, 86].

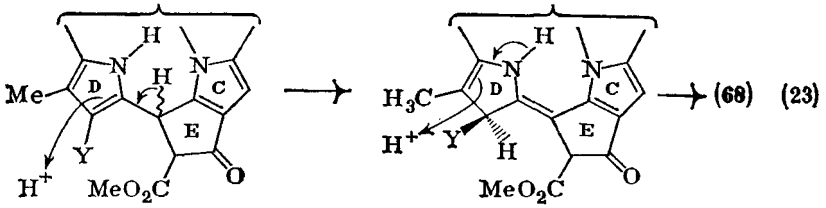
(2) *Превращение метилового эфира Mg-протопорфирина в протохлорофиллид а*

На пути к хлорофиллу *а* метиловый эфир Mg-протопорфирина (57) претерпевает следующие биологические превращения: формирование изоциклического кольца Е из метоксикарбонилэтильной боковой цепи при С-13, в результате чего образуется метиловый эфир Mg-3,8-дивинилфеопорфирина a_5 (64а) (схема 22); (б) восстановление винильной группы при С-8 последнего с образованием протохлорофиллида *а* (64б); (в) *транс*-восстановление двойной связи С-17—С-18 в кольце D протохлорофиллида *а* (64б) с образованием хлорофиллида *а* (68) (см. схему 24); (г) этерификация карбоксиэтильной боковой цепи при С-17 (68) фитолом с образованием хлорофилла *а* (58) (см. схему 24).

Относительно последовательности осуществления первых двух стадий в настоящее время существуют различные мнения [86]. Сначала обсудим механизм построения изоциклического кольца Е. Было показано [87], что в двух мутантах *Chlorella*, не способных к биосинтезу хлорофилла *а*, накапливается ряд промежуточных магнийсодержащих соединений тетрапиррольной природы; с помощью масс-спектрометрии было установлено, что они содержат модифицированные боковые цепи в положении 13 и являются дегидро-, гидрокси- и кетопроизводными (60), (61) и (62),


(57)
(60a) R=CH=CH2
(60δ) R=Et
(61a) R=CH=CH2
(61δ) R=Et
(63a) R=CH=CH2
(63δ) R=Et
(62a) R=CH=CH2
(62δ) R=Et
(22)
2H
(64a)
(64δ)

соответственно [87]. Соединение (**62**) имеет активную метиленовую группу, которая может участвовать в реакции типа присоединения по Михаэлю, приводящей к образованию пятичленного кольца Е (см. схему 22). На основании механизма процесса, изображенного на схеме (22), можно предположить, что хлорофиллид *а* (**68**) может образоваться из промежуточного соединения (**63б**) путем простой перегруппировки двойных связей (схема 23). Однако все опубликованные данные свидетельствуют в пользу другого механизма, согласно которому в процессе замыкания цикла сначала образуется прототип соединения (**64**), а вслед за формированием цикла Е непосредственно происходит реакция окисления (**63а**)→(**64а**) или (**63б**)→(**64б**).



(23)

Вернемся теперь к вопросу о противоречиях относительно момента осуществления восстановления винильной группы при С-8 кольца В. Два факта свидетельствуют о том, что эта реакция может происходить до построения кольца Е. Во-первых, промежуточные соединения типов (**60б**), (**61б**), (**62б**), еще не имеющие кольца Е, уже обладают восстановленными боковыми цепями в положении 8 [87]. Во-вторых, фермент, присутствующий в бесклеточном экстракте этиолированных проростков пшеницы, восстанавливает винильные группы метилового эфира Mg-протопорфирина IX (**57**) в 20 раз эффективнее, чем такие же группировки в метиловом эфире Mg-3,8-дивинилфеопорфирина a_5 (**64а**) [88]. Интересно отметить, что, как и ожидалось, для процесса восстановления необходимо присутствие восстановленного пиридиннуклеотида, а в ходе этого процесса один из атомов водорода мигрирует от С-4 пиридиннуклеотида к боковой этильной группе порфирина [88].

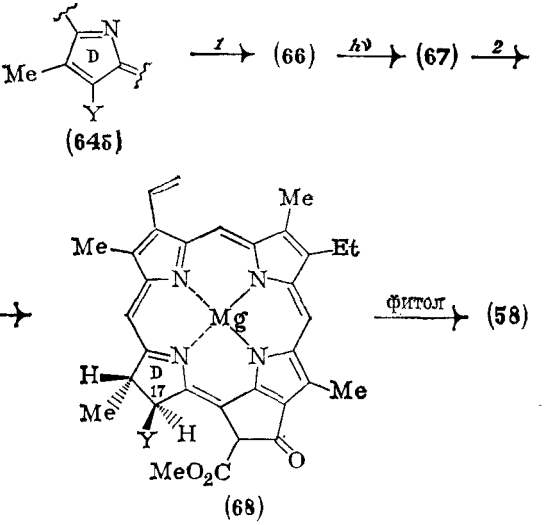
Противоположная точка зрения [86], согласно которой восстановление винильной группы осуществляется после образования кольца Е, основывается, главным образом, на выделении метилового эфира Mg-3,8-дивинилфеопорфирина a_5 (**64а**) [89, 90] из культур *Rhodopseudomonas spheroides*, обработанных 8-гидроксихинолином для ингибирования синтеза бактериохлорофилла *а*. Соединение (**64а**) было выделено из мутанта *R. spheroides*, дефектного в отношении биосинтеза бактериохлорофилла *а*; оказалось, что оно может использоваться в качестве субстрата при образовании хлорофилла *а* в мембранах этиопластов ячменя [91]. Можно предположить, что эти внешне противоречивые результаты

объясняются относительно широкой субстратной специфичностью ферментных систем, катализирующих модификации боковых цепей в положениях 8 и 13, и что фактически процесс может протекать как по первому, так и по второму пути, но с различной эффективностью в зависимости от конкретных условий.

(3) Восстановление двойной связи в кольце D

Протохлорофиллид *a*, отличающийся от хлорофиллида *a* только степенью восстановления кольца D, аккумулируется в небольших количествах в этиопластах проросших семян покрытосеменных, выращенных в темноте [77, 86]. Такие этиопласты не содержат хлорофилл *a*, но быстро образуют это соединение на свету. Интересно отметить, что в этиолированных листьях ячменя, выращенного в темноте в присутствии АЛК, могут накапливаться значительные количества протохлорофиллида *a* [79]. Превращение протохлорофиллида *a* в хлорофиллид *a* осуществляется посредством любопытной светозависимой ферментативной реакции [77, 86, 92].

Все детали механизма этой реакции еще не ясны, а основные известные сведения [86] в обобщенном виде приведены на схеме (24) [93]. Согласно этой схеме, особая форма протохлорофиллида *a*, поглощающая при 635 нм, в темноте присоединяется к восстановленной форме фотофермента, образуя комплекс (66)* с $\lambda_{макс}$



(24)

1 - восстановленная форма фермента;
2 - окисленная форма фермента

* Комплекс типа (66), который состоит из протохлорофиллида *a* и фермента, ответственного за восстановление кольца D, известен под названием «протохлорофиллид-голохром».

650 нм. Из последнего на свету возникает комплекс окисленного фермента с хлорофиллидом *a* (67) ($\lambda_{макс}$ 683 нм), диссоциация которого приводит к хлорофиллиду *a* (68) и окисленному ферменту; после восстановления фермент возвращается в цикл. Предполагают, что субъединица фотофермента связывает одну молекулу протохлорофиллида *a* и имеет молекулярную массу 60 000 [94], а сам фермент существует в виде агрегата с молекулярной массой 300 000—900 000 [82, 95].

(4) Превращение хлорофиллида a в хлорофилл a

Все зеленые листья содержат фермент хлорофиллазу, который катализирует гидролитическое отщепление фитильного остатка от хлорофилла *a*. Фермент сохраняет активность при высоких концентрациях органических растворителей (во время определения его активности часто присутствует до 4 % ацетона) и специфичен в отношении соединений с восстановленным кольцом D [77, 86]. Увеличение активности хлорофиллазы в зеленеющих тканях [96] свидетельствует в пользу классической гипотезы [77], согласно которой этот же фермент может катализировать обратную реакцию синтеза хлорофилла *a* из хлорофиллида *a* и фитола, хотя до сих пор не удалось однозначно доказать, что такая реакция действительно происходит [97]. В этой связи интересно отметить, что в других случаях биохимический гидролиз и синтез сложноэфирных связей обычно катализируется разными ферментами, причем при синтезе сложных эфиров промежуточно образуются активированные эфиры (схема 25).

$$R{-}COOH \xrightarrow{ATP} R{-}\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}{-}OPO_3H_2 \xrightarrow{R^1OH} R{-}COOR^1 \qquad (25)$$

Наличие в этиопластах различных количеств протохлорофиллида *a* (**64б**; R = фитил) послужило причиной другой дискуссии [77, 80]; в частности, высказывалось мнение, что частью биосинтеза хлорофилла *a* (58) может являться последовательность превращений, в которой этерификация C_{20}-изопреноидным спиртом * предшествует восстановлению кольца D (схема 26). По мнению авторов настоящего обзора, наиболее убедительны в этом отношении результаты экспериментов Вольфа и Прайса [98], которые свидетельствуют о наличии корреляции между образованием хлорофилла *a* и исчезновением хлорофиллида *a* (68) и, таким образом, о том, что биосинтез хлорофилла *a* происходит так, как это показано на схемах (24) и (27).

$$(64б;\ R = H) + C_{20}\text{-спирт} \longrightarrow (64б;\ R = \text{фитил}) \xrightarrow[2H]{h\nu} (58) \qquad (26)$$

$$(64б;\ R = H) \longrightarrow (68) \xrightarrow{C_{20}\text{-спирт}} (58) \qquad (27)$$

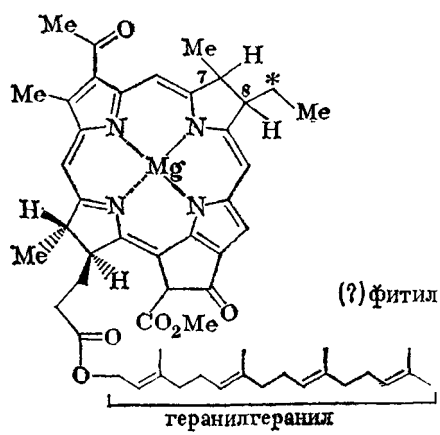
* Предполагают [80а], что изопреноидное C_{20}-звено, по-видимому, переносится в виде геранилгеранильного остатка.

30.2.3.2. Хлорофилл *b*

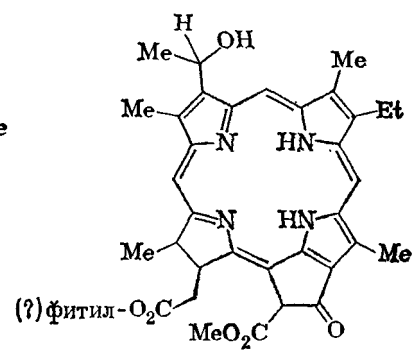
Для образования хлорофилла *b* (**59**) из хлорофилла *a* необходимо только окисление метильной группы в положении 7 до формильной (см. схему 21), но механизм этого превращения не выяснен.

30.2.3.3. Бактериохлорофилл *a*

Фотосинтезирующие бактерии продуцируют множество пигментов, известных под общим названием бактериохлорофиллов. Пурпурные несернистые бактерии *Rhodopseudomonas spheroides*, принадлежащие к отряду Athiorhodacaea, могут развиваться в аэробных условиях как на свету, так и в темноте, а также анаэробно на свету. В последнем случае *R. spheriodes* синтезируют бактериохлорофилл *a* (**69а**), отличающийся от хлорофилла наличием ацетильной группы в положении 3 и двух дополнительных атомов водорода в положениях 7 и 8 кольца В. Все имеющиеся в настоящее время данные говорят о том, что бактериохлорофилл *a* и хлорофилл *a* синтезируются по одному и тому же пути [92, 99, 100]. Так, в продуктах метаболизма *R. spheroides* обнаружены хорошо известные промежуточные соединения в биосинтезе хлорофилла *a* — метиловый эфир Mg-3,8-дивинилфеопорфирина a_5 (**64а**) и соответствующее 8-этильное производное (**64б**) [89, 90, 99]. Выделение метилового эфира 3-девинил-3-(1-гидроксиэтил)феофорбида *a* (**70**) [9, 101] из продуктов метаболизма *R. spheroides*, выращенных в присутствии [101] 8-гидроксихинолина (для ингибирования биосинтеза хлорофилла), считают еще одним свидетельством в пользу единого пути биосинтеза бактериохлорофилла *a* и хлорофилла *a* с той разницей, что в первом случае добавляются стадии гидратации и последующего окисления 3-винильной группы, а также восстановления кольца В [102].



(**69а**), (**69б**)



(**70**)

До последнего времени считалось, что в бактериохлорофилле *a*, как и в хлорофилле *a*, карбоксиэтильная группа при С-17 этерифицируется фитолом; эту точку зрения пришлось пересмотреть после того, как было установлено, что бактериохлорофилл из *Rhodospirillum rubrum* этерифицирован (*E,E,E*)-геранилгераниолом [103].

30.2.3.4. Бактериохлорофилл *b*

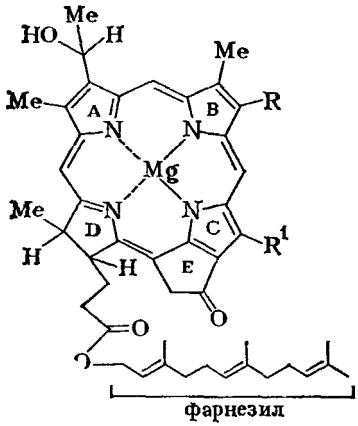
Уточненное строение ядра [104] бактериохлорофилла *b* приведено в формуле (**69б**; двойная связь между С-8 и С*); однако биосинтез его не изучен.

30.2.3.5. Бактериохлорофиллы *c* и *d* (хлорофиллы *Chlorobium*)

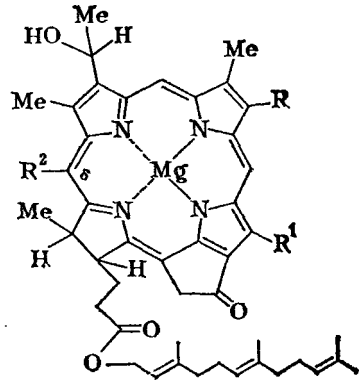
Зеленые сернистые бактерии (Chlorobacteriaceae) продуцируют ряд родственных пигментов, называемых хлорофиллами *Chlorobium*; они могут быть подразделены на две основные группы, каждая из которых представляет собой смесь 4—7 различных гомологов [105, 106]. В одну из этих групп входят бактериохлорофиллы *c* (**72**), поглощающие при 660 нм в эфире, а в другую — бактериохлорофиллы *d* (**71**), поглощающие при 650 нм. В соответствии с их абсорбционными свойствами эти соединения называют иногда хлорофиллами 660 и 650, соответственно [105]. Ниже мы будем придерживаться последней номенклатуры. От бактериохлорофилла *a* хлорофиллы *Chlorobium* отличаются следующими деталями строения [105, 106]. Винильная боковая цепь в положении 3 гидратирована (гидратация, вероятно, протекает по механизму электрофильного присоединения), но не окислена до метилкетона; метоксикарбонильная группа в кольце Е отсутствует, а этерифицирующим спиртом в хлорофиллах *Chlorobium* является (*E,E*)-фарнезол [105, 106]. Наиболее важной отличительной чертой структуры хлорофиллов 650 (**71**) из *Chlorobium*, однако, является наличие дополнительных алкильных групп в боковых цепях при С-8 и С-12. Хлорофиллы 660 (**72**), кроме того, имеют алкильную группу при С-20 [105]. Хлорофиллы 650 и 660 из штаммов *C. thiosulphatophilum* на целитовых колонках разделяются на шесть компонентов (табл. 30.2.1).

Таблица 30.2.1. Хлорофиллы 650 (**71**) *и 660* (**72**) *из штаммов C. thiosulphatophilum*

(71)		(72)			(71)		(72)		
R	R^1	R	R^1	R^2	R	R^1	R	R^1	R^2
изо-Bu	Et	*изо*-Bu	Et	Et	Et	Et	*н*-Pr	Et	Me
н-Pr	Et	*изо*-Bu	Et	Me	*н*-Pr	Me	Et	Et	Me
изо-Bu	Me	*н*-Pr	Et	Et	Et	Me	Et	Me	Me



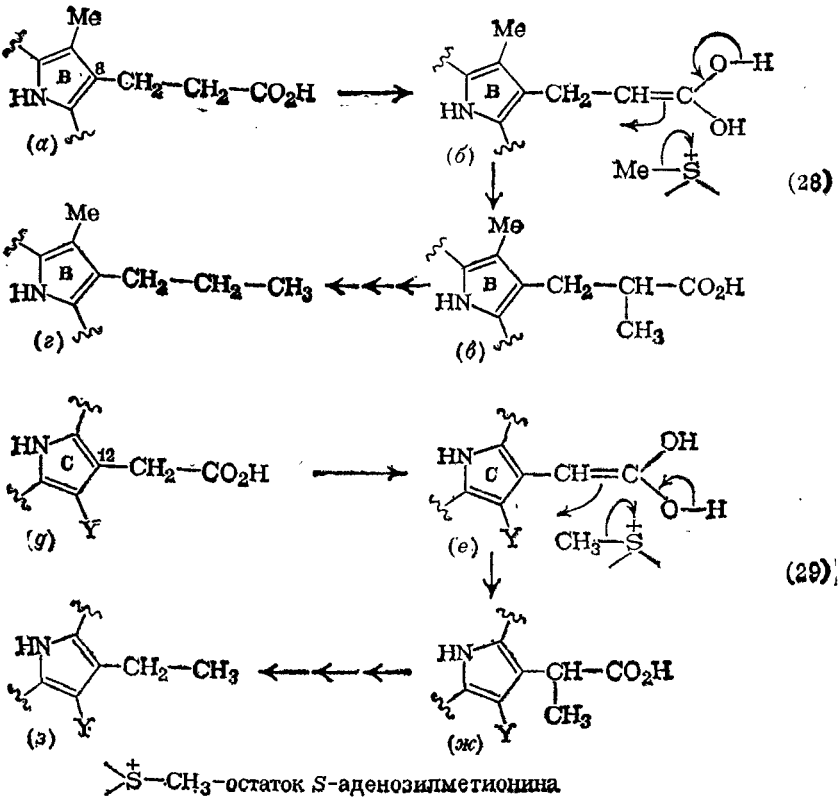
(71)

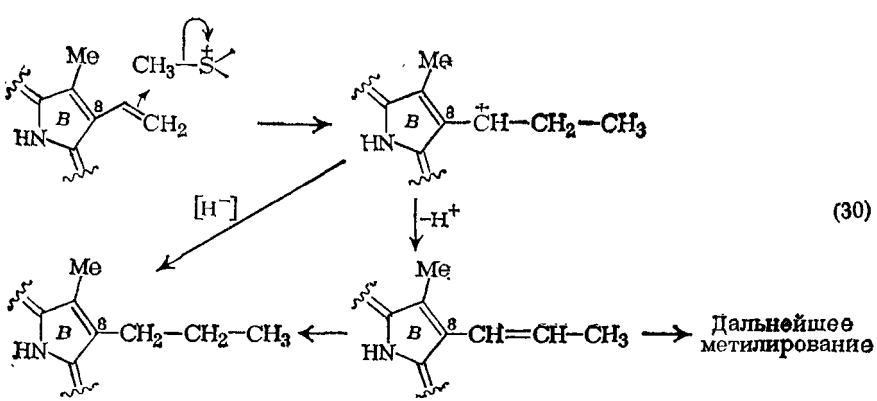


(72)

Известно, что источником дополнительных метильных групп является *S*-аденозилметионин [105], но механизм и последовательность их введения пока не установлены. Ричардс и Рапопорт [107] предположили, что хлорофиллы *Chlorobium* образуются точно так же, как и все другие хлорофиллы вплоть до стадии метилового эфира Mg-протопорфирина IX, но эта гипотеза недавно была оспорена Кеннером и сотр. [105]. Эти исследователи обратили внимание на тот факт, что для переноса метильной группы от *S*-аденозилметионина необходима активация рецепторных углеродных атомов боковой цепи по отношению к электрофильной атаке; соответствующая активация, по их мнению, может быть достигнута посредством образования енолов из карбоксиэтильного и карбоксиметильного остатков, как это показано на структурах (*б*) и (*е*) (схемы 28, 29). Согласно гипотезе Кеннера [105], «дополнительные» метильные группы, необходимые для образования хлорофиллов *Chlorobium*, должны были бы вводиться на стадии уропорфириногена III или эквивалентного соединения, и, следовательно, пути биосинтеза хлорофиллов *Chlorobium* и других хлорофиллов должны расходиться гораздо раньше достижения стадии протопорфирина IX. По мнению авторов настоящего обзора, *C*-метилированию могут подвергаться и более «поздние» промежуточные соединения в биосинтезе хлорофилла путем превращения их винильных групп в этильную, *н*-пропильную и изобутильную группы (схема 30). С помощью аналогичного механизма, как известно, формируются различные боковые цепи в биосинтезе эргостерина и фитостерина [108].

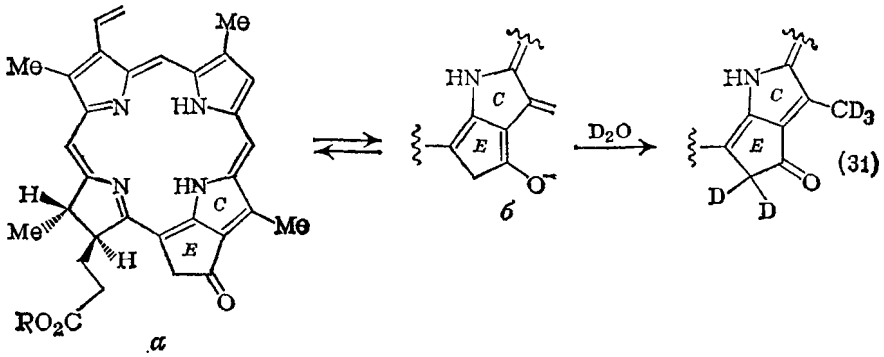
Известно, что атомы водорода метильных групп при C-12 промежуточных соединений типа (*а*) (схема 31) легко отщепляются [109] в реакции (*а*)→(*б*). Нет никаких оснований полагать, что





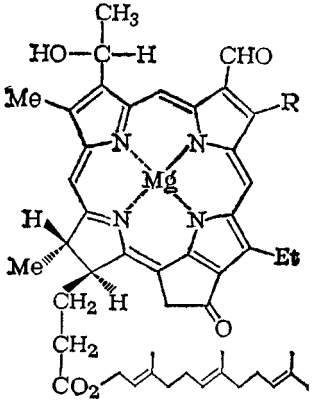
образующиеся в активном центре фермента соединения типа (*б*) не могут подвергаться электрофильной атаке со стороны *S*-аденозилметионина. Таким образом, следует еще раз подчеркнуть, что истинная последовательность осуществления трансформаций в

кольцевой системе и в боковых цепях хлорофиллов *Chlorobium* в настоящее время не известна.



30.2.3.6. Бактериохлорофилл *e*

Выясненное методами масс-спектрометрии и ЯМР строение бактериохлорофиллов *e* выражается формулой (73) [110]. Отличительной чертой бактериохлорофиллов *e* является наличие формильной группы в положении 7 (как и в случае хлорофилла *b*). Структуры боковых цепей в положениях 8 и 12 бактериохлорофиллов *e* не отличаются от бактериохлорофиллов *c* и *d* [110]. Установлена абсолютная конфигурация заместителей при С-17 (*S*) и С-18 (*S*), а также β-гидроксиэтильной группы (*R*) [110]. О биосинтезе этой группы соединений имеется очень мало данных.



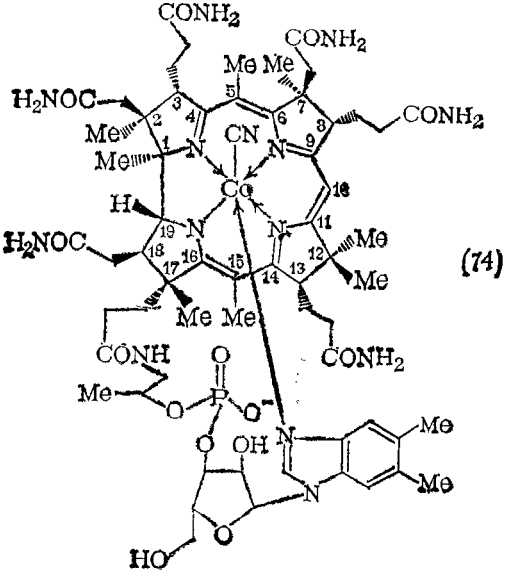
(73) R=Et, *n*-Pr, *изо*-Bu

30.2.4. БИОСИНТЕЗ КОРРИНОВ

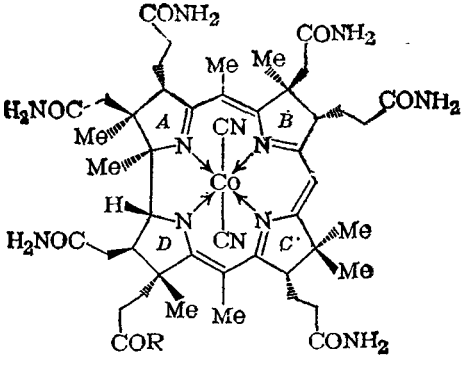
30.2.4.1. Введение

Витамин B_{12} (74) был выделен независимо и почти одновременно двумя группами исследователей [111, 112]; было показано, что он обладает удивительной активностью при терапевтическом

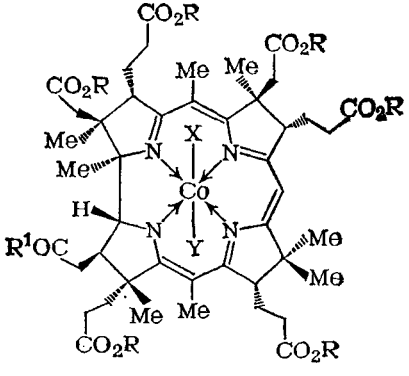
лечении злокачественного малокровия. Строение витамина B_{12} было выяснено в классических работах Дороти Ходжкин [113] с помощью рентгеноструктурного анализа. Молекула витамина B_{12} содержит корриновое ядро с центральным атомом кобальта, который связан с иминным атомом азота необычного основания, диметилбензимидазола *. Последний соединяется с корриновым ядром



(74)



(75) R = OH
(76) R = $NHCH_2CH(Me)OH$



(77) R = H, X = OH, Y = H_2O
(78) R = Me, X = Y = CN

* При растворении витамина B_{12} в 0,1 %-ном растворе KCN образуется дицианокобаламин, отличающийся от витамина B_{12} тем, что в его структуре вместо атома азота нуклеотида в связи Co—N участвует группа CN.

через боковую цепь, в состав которой входят остатки рибозы, фосфорной кислоты и аминопропанола. Все семь карбоксильных групп, окружающих корриновое кольцо, существуют в виде соответствующих амидов. Корриновое ядро с центральным атомом кобальта, но без нуклеотидной петли называют кобировой кислотой (75), а соответствующую свободную гексакарбоновую кислоту — кобириновой кислотой (77). Для соединения (76) часто используют сокращенное название кобинамид (см. гл. 24.4).

30.2.4.2. Начальные предшественники корринового ядра

Структурная близость корриновой и порфириновой кольцевых систем позволяет предположить сходство и их путей биосинтеза [9, 115]. Это было подтверждено в работах Шемина и его группы, которые в 1957 г. показали, что [^{14}C]аминолевулиновая кислота (АЛК) эффективно включается в витамин B_{12} в культуре одного из видов *Streptomycete* [114]. Двумя годами позднее Шварц и сотр. [116] сообщили о включении в витамин B_{12} следующего промежуточного соединения в биосинтезе порфиринов — порфобилиногена (ПБГ).

Наибольшей популярностью пользовалась гипотеза Бернхэма [117] о расхождении путей биосинтеза коррина и путей биосинтеза гема и хлорофиллов после стадии образования уропорфириногена III. Однако попытки включить меченый уропорфириноген III в коррин долгое время оставались безрезультатными, пока в лаборатории Скотта [118] не было показано, что в тщательно контролируемых условиях в интактных клетках *P. shermanii* при инкубации с относительно большими количествами [^{14}C]уропорфириногена III метка переходит в витамин B_{12}. Эти работы послужили стимулом для развертывания дальнейших исследований в этой области [119—121]. В частности, в кобириновую кислоту * удалось включить различные производные уропорфириногена III, меченные одновременно несколькими изотопами, и в бесклеточных препаратах из *P. shermanii* [119—120]. Положения, которые занимают эти специфические метки из уропорфириногена III в биосинтетической кобириновой кислоте [выделенной в виде ее эфира (78)], подтвердили первоначальную гипотезу Скотта и сотр. [118] и показали, кроме того, что уропорфириноген III включается без фрагментации и без перегруппировок во всех четырех кольцах [119—120]. Таким путем было однозначно установлено, что уропорфириноген III является биосинтетическим предшественником витамина B_{12}. Дальнейшее превращение углеродного скелета уропорфириногена III в корриновое ядро может быть разбито на три основных процесса.

---

* В доступных в настоящее время бесклеточных системах биосинтез останавливается на стадии кобириновой кислоты.

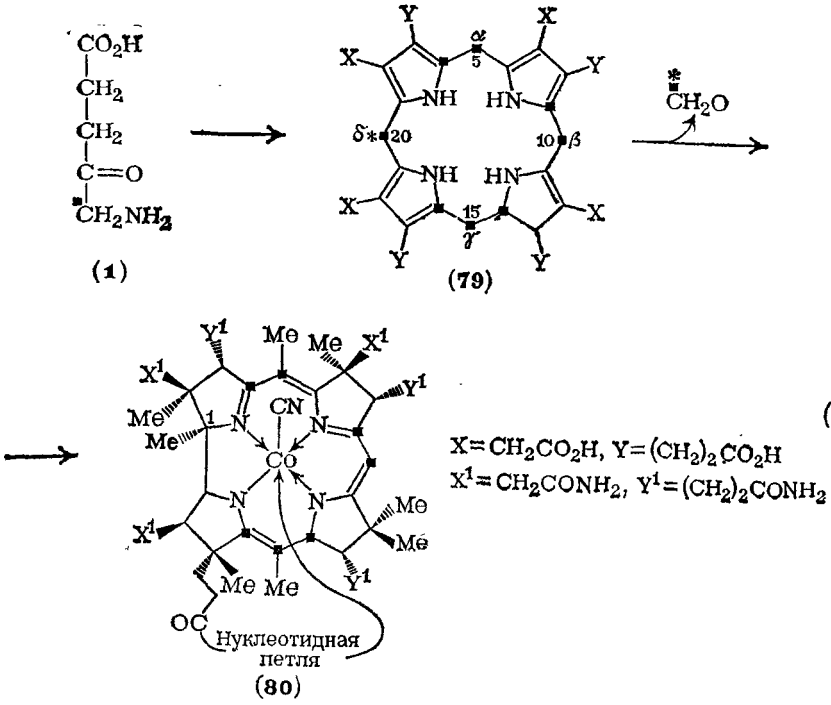
30.2.4.3. Роль углеродного атома С-5 молекулы АЛК в формировании корринового ядра

Четыре гетероциклических кольца корринов образуются из четырех молекул порфобилиногена, которые, в свою очередь, синтезируются из восьми молекул АЛК. Следовательно, в общем случае восемь углеродных атомов корринового ядра могли бы образоваться из атомов С-5 молекул АЛК (схема 32). Положение семи из них было определено Шеминым и сотр. [115] посредством включения [5-^{14}C]АЛК в витамин B_{12}; оно вытекает также из факта участия уропорфириногена III в построении корринового кольца. Шемин также обратил внимание на возможность того, что восьмой углеродный атом из С-5 АЛК, который в порфиринах (и порфириногенах) занимает δ-положение, в корринах (**80**) может стать метильной группой при С-1 (выделена жирным шрифтом). Однако из-за отсутствия соответствующих методов деградации, с помощью которых можно было бы специфически изолировать эту метильную группу, в то время не представлялось возможным подтвердить гипотезу Шемина. Развитие в конце 60-х годов метода спектроскопии ЯМР ^{13}C с использованием преобразования Фурье (Фурье-спектроскопия ЯМР ^{13}C или, сокращенно, ФС ЯМР ^{13}C), а также разработка улучшенных способов включения меченых предшественников в витамин B_{12} без их «разбавления» эндогенными субстратами, позволили решить эту проблему почти одновременно в двух лабораториях [122, 123].

Этим методом был изучен образец витамина B_{12}, синтезированный в интактных клетках *P. shermanii* после введения в них [5-^{13}C]АЛК (см. схему 32). Основой для интерпретации данных ЯМР послужил тот факт, что из восьми изучавшихся углеродных атомов семь [отмечены в формуле (**80**)] находятся в состоянии sp^2 (C=C или C=N) и только один может находиться в состоянии sp^3 ($\mathbf{CH_3}$). Резонансные сигналы в области 180—187 и 100—113 млн$^{-1}$ в спектре витамина были приписаны семи sp^2-атомам углерода. Однако в высокочастотной области спектра в районе 25—30 млн$^{-1}$ не было обнаружено сигнала sp^3-атома углерода *; следовательно, ^{13}C не включался в CH_3-группу при С-1. Эти результаты позволили предположить [122—124а], что в процессе биосинтеза витамина B_{12} элиминируется группировка $^{13}CH_2NH_2$ одной из молекул АЛК и, следовательно, соответствующие атомы углерода порфобилиногена и уропорфириногена. Действительно, один из таких атомов углерода удалось зафиксировать в виде формальдегида [125].

---

* Вероятность появления резонансных сигналов sp^3-атомов углерода в области 20—28 млн$^{-1}$ показана на схеме (35).



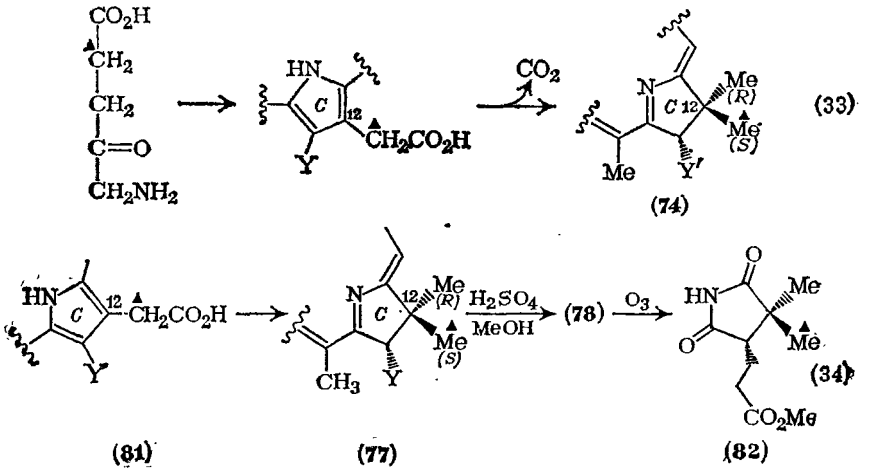
30.2.4.4. Происхождение метильных групп корринового ядра

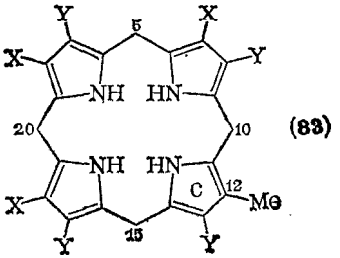
(1) Превращение карбоксиметильной группы при С-12 в метильную группу

В молекуле витамина B_{12} имеется восемь метильных групп. Метильная группа при С-12 в кольце С образуется путем декарбоксилирования карбоксиметильной группы, что было показано включением соединений, меченных ^{14}C [115], и затем подтверждено двумя различными экспериментами. Во-первых [119а], в спектре ФС ЯМР ^{13}C витамина B_{12}, биосинтезированного из [2-^{13}C]АЛК, сигналы двух метильных групп при С-12 имеют повышенную интенсивность; это свидетельствует о том, что эти метильные группы образуются так, как это показано на схеме (33). В подтверждение этих данных было показано [126], что в кобириновой кислоте *, которая образуется в бесклеточной системе *P. shermanii* из уропорфириногена III, специфически меченного ^{14}C в метиленовой группе карбоксиметильной боковой цепи при С-12, атомы ^{14}C располагаются исключительно в одной из метильных групп [*pro*-(*S*)-Me] при С-12 (схема 34). β-Конфигурация метильной группы [*pro*-(*S*)-Me] при С-12, образующейся из карбоксиметильной группы, была доказана

* Выделена в виде кобэфира (78) и расщеплена далее до соединения (82) для отделения кольца С.

в экспериментах, рассматриваемых в заключительной части настоящего раздела. Во-вторых, синтетический 12-декарбоксиуропорфириноген III (83), в котором карбоксиметильная группа при С-12 кольца С заменена на метильную группу, как оказалось, включается в кобириновую кислоту в бесклеточной системе *P. shermanii* [125]. В настоящее время не доказано, что метильная группа при С-12 декарбоксиуропорфириногена III (83) занимает положение С-12 в кобириновой кислоте (77); в то же время показано [125], что превращение (83)→(77) осуществляется без перегруппировок и без фрагментации углеродного скелета. Более того, при образовании кобириновой кислоты из декарбоксиуропорфириногена III, как и из уропорфириногена III, атом С-20 элиминируется в виде формальдегида [125]. Вместе с тем декарбоксиуропорфириноген III не обязательно является промежуточным соединением в биосинтезе корринов [126], поскольку эффективность его включения на порядок ниже [125, 126] эффективности включения истинного предшественника, уропорфириногена III. Тем не менее утилизация декарбоксипроизводного (83) в биосинтезе корринов является еще одним подтверждением образования одной из метильных групп при С-12 витамина B_{12} из карбоксиметильной группы при С-12, а также отражает относительно широкую субстратную специфичность соответствующих ферментов.





(83)

(2) Метильные группы, образующиеся из метионина

Еще в начале 60-х годов Шеминым и сотр. [115] с помощью меченных ^{14}C соединений было показано, что из семи остальных метильных групп витамина B_{12} по меньшей мере шесть образуются из метионина: CH_3-группы при С-2, С-5, С-7, С-12, С-15 и С-17 [см. формулу (84)]. Эти выводы были подтверждены с помощью ЯМР ^{13}C; кроме того, было установлено, что источником метильной группы при С-1 также является метионин. Эти выводы сделаны на основании экспериментов по включению [Me-^{13}C]метионина в витамин B_{12} в интактных клетках *P. shermanii* [123, 124, 124а, 127]. В спектрах ФС ЯМР ^{13}C дицианокобаламина [123, 127] или кобэфира типа (78) [124, 124а], полученных из синтезированного таким образом витамина B_{12}, имеются семь четко выраженных резонансных сигналов* в области 19,6—26 млн$^{-1}$, приписанных семи метильным группам при С-1, С-2, С-5, С-7, С-12, С-15 и С-17 в соединении (84).

(3) Абсолютная стереохимия двух метильных групп при С-12

Из двух метильных групп при С-12 кольца С одна образуется из боковой карбоксиметильной группы, а другая — из метионина. Основой для определения абсолютной стереохимической конфигурации двух метильных групп явился факт обусловленного конформацией кольца С витамина B_{12} *цис*-расположения 12α-метильной группы по отношению к аксиально ориентированной карбамоилэтильной группировке при С-13 [128, 128а]. Такое взаимное расположение заместителей при С-12 и С-13 должно приводить к гамма-эффекту в отношении химического сдвига ^{13}C-сигнала 12α-метильной группы; этот эффект должен исчезать при изменении α-конфигурации карбамоилэтильной боковой цепи на β-конфигурацию, имеющуюся в неопроизводном типа (87). Сравнение [119а, 128, 128а] спектров ФС ЯМР ^{13}C дицианокобинамида (86), биосинтезированного с участием [метил-^{13}C]метионина, и соответствующего неопроизводного (87), полученного катализируемой CF_3CO_2H изомеризацией [128а] С-13-центра в соединении (86), показало, что сигнал при 23,8 млн$^{-1}$ в спектре дицианокобинамида благодаря исчезновению гамма-эффекта смещается до 35,5 млн$^{-1}$ в спектре дицианонеокобинамида (87) (рис. 30.2.1). Эти результаты свидетельствуют о том, что метильная группа, образующаяся из [метил-^{13}C]метионина, должна занимать α- [или *pro*-(*R*)] положение при С-12 биосинтетического образца [119а, 128, 128а]. Баттерсби и сотр. [124, 124а] установили, что из метионина образуется метильная группа, находящаяся в *цис*-положении к карбамоилэтиль-

---

* Спектр обогащенного ^{13}C витамина B_{12} содержит только шесть сигналов, но его превращение в дицианокобаламин или, лучше, в кобэфир упрощает спектр и повышает разрешение.

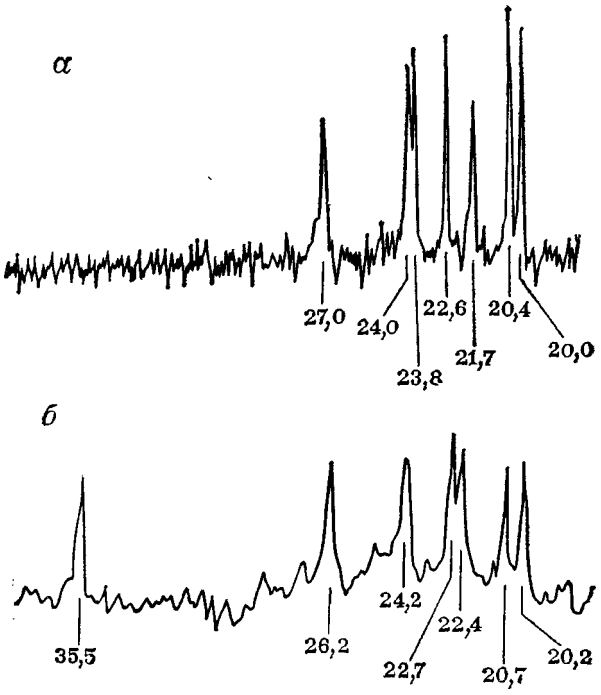


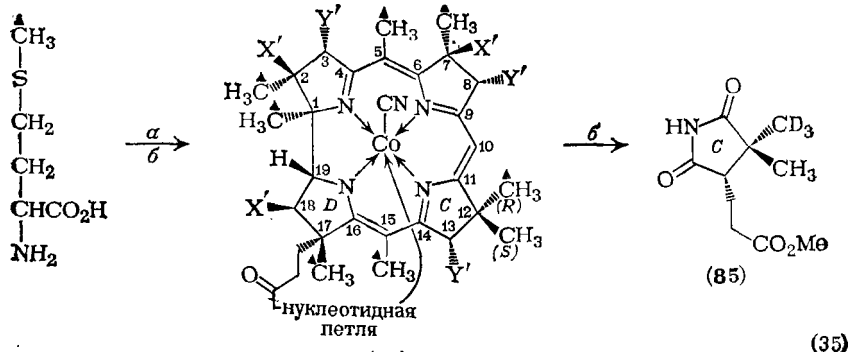
Рис. 30.2.1. Спектры ЯМР ^{13}C дицианокобинамида (86) (*а*) и дицианонеокобинамида (87) (*б*)

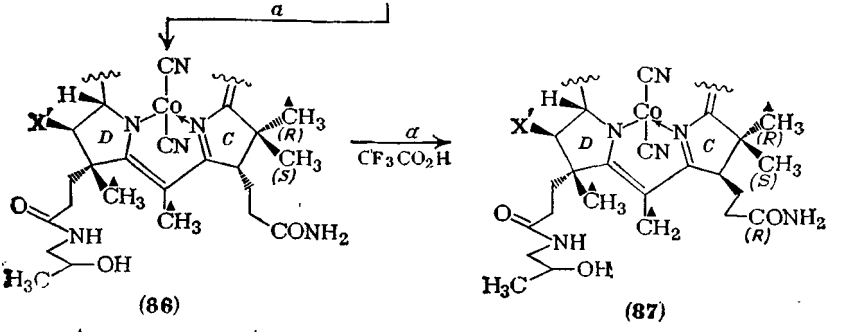
ной группировке [*pro*-(*R*)-метильная группа]. Из продуктов деградации образца витамина B_{12}, биосинтезированного в присутствии [$^{13}CD_3$]метионина, эти исследователи выделили изолированное кольцо С в виде имида (85) (схема 35), абсолютную конфигурацию двух метильных групп в котором им удалось установить с помощью ЯМР ^1H методом, разработанным Дабсом и Эшенмозером [129].

(4) Последовательность метилирования и роль сирогидрохлорина *

Последовательность введения метильных групп метионина в уропорфириноген III в ходе биосинтеза кобириновой кислоты пока еще точно не установлена, хотя некоторые результаты в этом направлении были получены [130] путем выделения промежуточных частично метилированных соединений. В ходе этих работ было

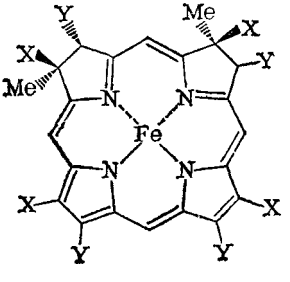
* Описанные в настоящей части раздела данные взяты из рукописей, любезно предоставленных авторам профессором Э. И. Скоттом в июне 1977 г. Теперь эти данные опубликованы (см. [119а, 125, 125а]). Почти одновременно независимо выполнены исследования профессора Э. Р. Баттерсби и сотр. [125б].





$а$ - $\overset{*}{C}H_3 = {}^{13}CH_3$; $б$ - $\overset{*}{C}H_3 = CD_3$
$X' = CH_2CONH_2$; $Y' = (CH_2)_2CONH_2$

установлено, что в бесклеточных препаратах *P. shermanii* при инкубации с АЛК и *S*-аденозилметионином, но в отсутствие кобальта и диметилбензимидазола, накапливается диметильное производное уропорфириногена III, которое оказалось идентичным сирогидрохлорину (88а) [130а], образующемуся при удалении железа из сирогема (88). Последний представляет собой недавно открытую простетическую группу бактериальных нитрит- и сульфит-редуктаз. Полученный описанным выше образом биосинтетический сирогидрохлорин (88а) после восстановления амальгамой натрия удалось включить в кобириновую кислоту в бесклеточной системе; следова-

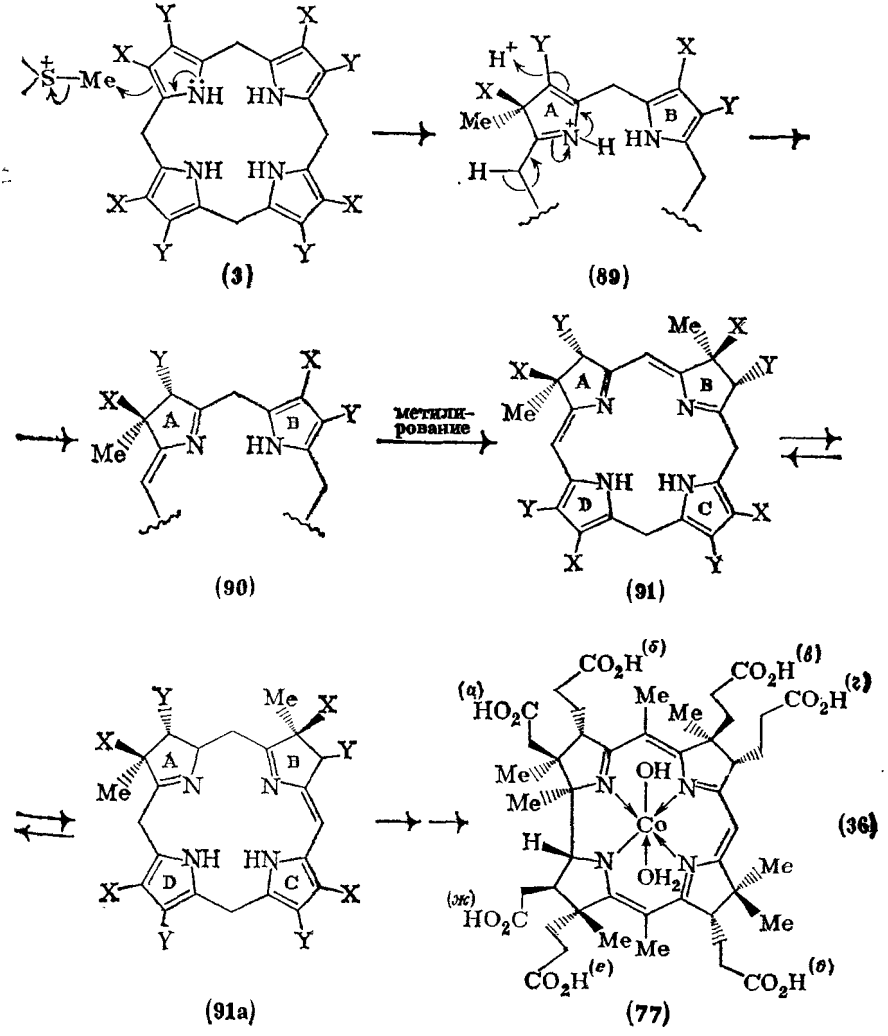


(88)
(88а) Fe=2H

тельно, соединення этого типа являются промежуточными между уропорфириногеном III и кобириновой кислотой. Имеются и данные других исследователей [130а, б], проливающие свет на природу промежуточных соединений.

(5) Механизм реакций метилирования

В настоящем разделе рассматривается механизм переноса метильных групп от *S*-аденозилметионина к уропорфириногену III (3), в результате которого образуется восстановленная форма (91) сирогидрохлорина (схема 36). Можно принять, что считающийся



электрофильным агентом *S*-аденозилметионин атакует центр повышенной электронной плотности — β-положение одного из четырех колец уропорфириногена III. Для удобства будем считать, что первое метилирование осуществляется в кольце А; в результате образуется катион (**89**), который после элиминирования протона перегруппировывается в соединение (**90**). Второе метилирование протекает по такому же механизму и приводит к сиро-производному (**91**) или (**91а**). В общих чертах механизм процесса приведен на схеме (36); он согласуется с данными о включении интактных CD_3-групп [CD_3]метионина в витамин B_{12} [131—133], а также с работами Аригони с сотр. [134], показавших с помощью метионина с хиральной метильной группой, что замещение метильных групп в таких реакциях происходит с обращением конфигурации. Далее из схемы (36) следует, что двойные связи в диметильном производном располагаются так, как это указано в структурах (**91**) или (**91а**). Возможно, что сирогидрохлорин (**88а**), обычно выделяемый в биосинтетических экспериментах [130, 130а], является, в сущности, продуктом окисления истинного промежуточного соединения (**91**) и что именно последнее образуется при химическом восстановлении сирогидрохлорина и далее включается в кобириновую кислоту (**77**). Выяснение последовательности реакций, в результате которых соединения сирогидрохлоринового типа превращаются в кобириновую кислоту, остается одной из многих нерешенных проблем в биосинтезе витамина B_{12}. К их числу относятся также механизм и момент включения кобальта в корриновое ядро.

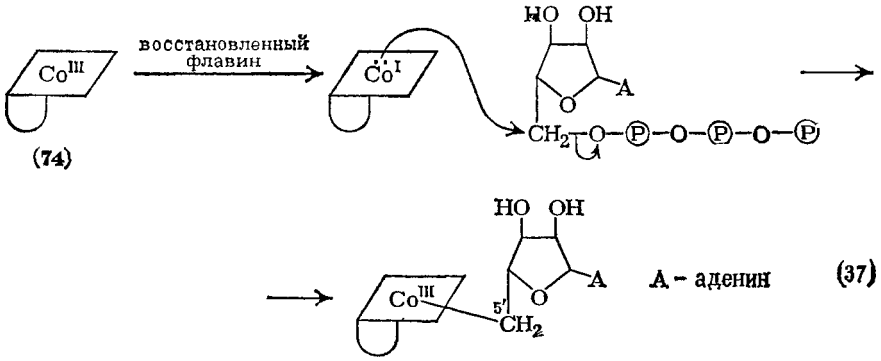
30.2.4.5. Превращение кобириновой кислоты в витамин B_{12}

Одним из самых важных открытий в области биосинтеза витамина B_{12} было выяснение ключевой роли кобириновой кислоты; эта тщательнейшая и очень трудоемкая работа была выполнена в середине 60-х годов группой исследователей во главе с Бернхауэром [135—135б]. Ими, в частности, были разработаны многие из химических и микробиологических приемов, которые впоследствии нашли применение в других исследованиях, описанных в предыдущих разделах. Оказалось, что в молодых растущих культурах *P. shermanii* содержатся большие количества кобириновой кислоты, а в культурах *P. shermanii*, растущих в присутствии кобальта, но без 5,6-диметилбензимидазола, накапливаются производные кобириновой кислоты различных степеней амидирования. Порядок амидирования шести карбоксигрупп кобириновой кислоты и участия седьмой карбоксигруппы в образовании нуклеотидной петли витамина точно не установлен. Тем не менее изучение кинетики накопления промежуточных соединений позволило Вагнеру [135б] предложить наиболее вероятную последовательность биосинтеза витамина B_{12} из кобириновой кислоты в *P. shermanii*. Наиболее важный вывод из этой работы заключается в том, что присоеди-

нение 2′-гидроксипропиламиногруппы к карбоксигруппе (*е*) невозможно без предшествующего амидирования одной из карбоксильных групп, вероятно, той, которая на схеме (36) обозначена буквой *в*; далее протекают последовательное амидирование остальных карбоксигрупп с образованием кобинамида и дальнейшее формирование нуклеотидной петли.

30.2.4.6. Участие витамина B_{12} в ферментативных реакциях

Витамин B_{12} принимает участие в ферментативных процессах после его превращения в 5′-дезоксиаденозил-B_{12} или метил-B_{12}. Превращение витамина B_{12} в 5′-дезоксиаденозил-B_{12} (его называют также коферментом B_{12} или 5′-дезоксиаденозилкобаламином) катализируется ферментной системой (АТР : 5-дезоксиаденозилкоррин—трансферазой) при обязательном участии восстановленного флавина и АТР. Восстановленный флавин используется для превращения Co^{III} в Co^{I}, а приобретенные атомом кобальта два электрона служат для образования кобальт-углеродной связи путем отщепления трифосфата в следующей стадии (схема 37).



Метил-B_{12} в свободном виде не образуется, а генерируется только в активном центре фермента, участвующего в превращении гомоцистеина в метионин. Более подробно эти реакции рассматриваются в гл. 24.4 и в обзорах [136, 137].

ЛИТЕРАТУРА

1. *R. Willstätter*, 'Uber Pflanzenfarbstroffe in Nobel stiftelsen Stockholm Les Prix Nobel en 1914—18', Norstedt, Stockholm, 1920, p. 1.
2. *H. Fischer and H. Orth* 'Die Chemie des Pyrrols', Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1937.
3. *R. B. Woodward*, Angew. Chem., 1960, **72**, 651.
4. *D. C. Hodgkin*, Proc. Roy. Soc. (A), 1955, **288**, 294.
5. *R. B. Woodward*, Pure Appl. Chem., 1973, **33**, 145.
6. *A. Eschenmoser*, '23rd Internat. Congress Pure and Applied Chem.', Butterworths, London, 1971, vol. 2, p. 69.
7. *D. Shemin*, Harvey Lectures, 1955, **50**, 258 и приведенные там ссылки.

8. *S. Granick*, Ann. Rev. Plant Physiol, 1951, **2**, 115.
9. *D. Shemin and R. C. Bray*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, **112**, 615 и приведенные там ссылки.
10. *A. I. Scott*, Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 1976, **273**, 303.
11. *D. Shemin and D. Rittenberg*, J. Biol. Chem., 1945, **159**, 567.
12. *I. M. London, D. Shemin and D. Rittenberg*, J. Biol. Chem., 1950, **183**, 757.
13. *H. M. Muir and A. Neuberger*, Biochem. J., 1950, **47**, 97.
14. *N. S. Radin, D. Rittenberg, and D. Shemin*, J. Biol. Chem., 1950 **184**, 755.
15. *D. Shemin and J. Wittenberg*, J. Biol. Chem., 1952, **192**, 315.
16. *D. Shemin and S. Kumin*, J. Biol. Chem., 1952, **198**, 827.
17. *D. Shemin and C. S. Russell*, J. Amer. Chem. Soc., 1953, **75**, 4873.
18. *D. Shemin, C. S. Russell, and T. Abramsky*, J. Biol. Chem., 1955, **215**. 613.
19. *G. Kikuchi, A. Kumar, P. Talmage, and D. Shemin*, J. Biol. Chem., 1958, **233**, 1214.
20. *K. D. Gibson, W. G. Laver, and A. Neuberger*, Biochem. J., 1958, **70**, 71.
21. *G. W. Warnick and B. F. Burnham*, J. Biol. Chem., 1971, **246**, 6880.
22. *M. J. Whiting and S. Granick*, J. Biol. Chem., 1976, **251**, 1340.
23. *P. M. Jordan and D. Shemin*, 'The Enzymes', 3rd edn., ed. P. Boyer, Academic Press, New York, 1972, vol. 7, p. 339.
24. *M. Fanica-Gaignier and J. Clement-Metral*, European J. Biochem., 1973, **40**, 13, 19.
25. *Z. Zaman, P. M. Jordan, and M. Akhtar*, Biochem. J., 1973, **135**, 257.
26. *M. M. Abboud, P. M. Jordan, and M. Akhtar*, J. C. S. Chem. Comm., 1974, 643.
27. *M. Akhtar, M. M. Abboud, G. Barnard, P. M. Jordan, and Z. Zaman*, Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 1976, **273**, 117.
28. *P. M. Jordan and A. Laghai*, Biochem. Soc. Trans., 1976, **4**, 52.
29. *A. Laghai and P. M. Jordan*, Biochem. Soc. Trans., 1977, **5**, 299.
30. *S. I. Beale*, Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 1976, **273**, 99 и приведенные там ссылки.
31. *J. B. Lohr and H. C. Friedmann*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, **69**. 908.
32. *R. G. Westall*, Nature, 1952, **170**, 614.
33. *R. Schmid and D. Shemin*, J. Amer. Chem. Soc.. 1955, **77**, 506.
34. *D. Shemin*, 'The Enzymes', 3rd edn., ed. P. Boyer, Academic Press, New York, 1972, vol. 7, p. 323.
35. *D. Shemin*, Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 1976, **273**, 109.
36. *D. L. Nandi, K. F. Baker-Cohen, and D. Shemin*, J. Biol. Chem., 1968, **243**, 1224.
37. *D. L. Nandi and D. Shemin*, J. Biol. Chem., 1968, **243**, 1231, 1236.
38. *A. G. Chaudhry and P. M. Jordan*, Biochem. Soc. Trans., 1976, **4**, 760.
39. *M. M. Abboud and M. Akhtar*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 1007.
40. *R. B. Frydman, S. Reil, and B. Frydman*, Biochemistry, 1971, **10**, 1154.
41. *D. Mauzerall*, J. Amer. Chem. Soc., 1960, **82**, 2605.
42. *L. Bogorad*, J. Biol. Chem., 1958, **233**, 501, 510, 516.
43. *A. M. Del C. Batlle and M. V. Rossetti*, Internat. J. Biochem, 1977, **8**, 251 и приведенные там ссылки.
44. *M. Higuchi and L. Bogorad*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, **244**, 401.
45. Глубокий и тщательный обзор по биосинтезу уропорфириногена III см.: *A. R. Battersby and E. McDonald*, 'The Biosynthesis of Porphyrins, Chlorins and Corrins', in 'Porphyrins and Metalloporphyrins', ed. K. M. Smith, Elsevier, Amsterdam, 1975 (там же рассмотрены другие аспекты биосинтеза тетрапирролов).
46. *E. B. C. Llambias and A. M. Del C. Batlle*, F. E. B. S. Letters, 1970, **6**, 285.
47. *L. Bogorad*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1963, **104**, 676.
48. *J. Plusec and L. Bogorad*, Biochemistry, 1970, **9**, 4736.
49. *R. C. Davies and A. Neuberger*, Biochem. J., 1973, **133**, 471.
50. *B. Frydman, R. B. Frydman, A. Valasinas, E. S. Levy, and G. Feinstein*, Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 1976, **273**, 137.
51. *A. R. Battersby and E. McDonald*, Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 1976, **273**, 161.

52. *J. H. Mathewson and A. H. Corwin*, J. Amer. Chem. Soc., 1961, **83**, 135.
53. *E. Bullock*, Nature, 1965, **205**, 70.
54. *R. Robinson*, 'The Structural Relations of Natural Products', Clarendon Press, Oxford, 1955.
54a. *C. S. Russell*, J. Theoret. Biol., 1974, 47, 145.
54б. *A. I. Scott, K. S. Ho, M. Kajiwara, and T. Takahashi*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, 98, 1589.
55. *A. R. Battersby, E. McDonald, D. C. Williams, and H. K. W. Wurziger*, J. C. S. Chem. Comm, 1977, 113.
56. *A. R. Battesrby, C. J. R. Fookes*; *E. McDonald, and M. J. Meegan*, J. C. S. Chem. Comm., 1978, 185.
57. *R. A. Neve, R. F. Labbe, and R. A. Aldrich*, J. Amer. Chem. Soc., 1956, **78**, 691.
58. *D. Mauzerall and S. Granick*, J. Biol. Chem., 1958, **232**, 1141.
59. *L. C. San Martin de Viale and M. Grinstein*, Biochem. Biophys. Acta, 1968, **158**, 79.
60. *L. C. San Martin de Viale, A. A. Viale, S. Nacht, and M. Grinstein*, Clin. Chim. Acta, 1970, 28, 13.
61. *A. H. Jackson, H. A. Sancovich, A. M. Ferramola, N. Evans, D. E. Games, S. A. Matlin, G. H. Elder, and S. G. Smith*, Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 1976, **273**, 191.
62. *G. F. Barnard and M. Akhtar*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 495.
63. *J. Luthy, J. Rétey, and D. Arigoni*, Nature, 1969, **221**, 1213.
64. *J. W. Cornforth, J. W. Redmond, H. Eggerer, W. Buckel, and C. Gutschow*, Nature, 1969, 221, 1212.
65. *S. Sano and S. Granick*, J. Biol. Chem., 1961, **236**, 1173.
66. *G. Y. Kennedy, A. H. Jackson, G. W. Kenner, and C. J. Suckling*, F. E. B. S. Letters, 1970, **6**, 9; 1970, **7**, 205.
67. *J. A. S. Cavaleiro, G. W. Kenner, and K. M. Smith*, J. C. S. Perkin I, 1973, 183.
68. *A. R. Battersby, J. Baldas, J. Collins, D. H. Grayson, K. J. James, and E. McDonald*, J. C. S. Chem. Comm., 1972, 1265.
69. *Z. Zaman, M. M. Abboud, and M. Akhtar*, J. C. S. Chem. Comm., 1972, 1263.
70. *Z. Zaman and M. Akhtar*, European J. Biochem., 1976, **61**, 215.
71. *A. R. Battersby, E. McDonald, H. K. W. Wurziger, and K. J. James*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 493.
72. *A. H. Jackson, D. E. Games, P. Couch, J. R. Jackson, R. V. Belcher, and S. G. Smith*, Enzyme, 1974, **17**, 81.
72a. *R. Poulson*, J. Biol. Chem., 1976, **251**, 3730.
72б. *J. M. Jacobs and N. J. Jacobs*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1977, **78**, 429.
73. *H. A. Dailey, Jnr. and J. Lascelles*, Arch. Biochem. Biophys. 1974, 160, 523 и приведенные там ссылки.
74. *R. J. Porra and O. T. G. Jones*, Biochem. J., 1963, **87**, 181, 186.
75. Детальное обсуждение проблемы гемов и гемопротеинов см.: 'Inorganic Biochemistry', ed. G. L. Eichhorn, Elsevier, Amsterdam, 1973, vol. 2, part VI, pp. 797—1133.
76. Детальное обсуждение структуры хлорофиллов см.: *A. H. Jackson*, in 'Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments', ed. T. W. Goodwin, Academic Press, New York, 1976, vol. 1, chapter 1.
77. Обзор по биохимии хлорофиллов см.: *L. Bogorad*, in 'Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments', ed. T. W. Goodwin, Academic Press, New York, 1976, vol. 1, chapter 2.
78. *S. Granick*, J. Biol. Chem., 1948, **172**, 717; 1948, **175**, 333.
79. *S. Granick*, J. Biol. Chem., 1961, **236**, 1168.
80. *C. A. Rebeiz and P. A. Castelfranco*, Ann. Rev. Plant Physiol., 1973, **24**, 129 и приведенные там ссылки.
80a. *W. Rudiger, P. Hedden, H.-P. Kost, and D. J. Chapman*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1977, **74**, 1268; *S. Schoch, U. Lempert, and W. Rudiger. Z.* Pflanzenphysiol., 1977, **83**, 427; *A. R. Wellburn*, Phytochemistry, 1970, **9**. 2311.

81. *R. K. Ellsworth and A. S. Hsing*, Photosynthetica, 1974, **8**, **228**.
82. *K. D. Gibson, A. Neuberger, and G. H. Tait*, Biochem. J., 1963, **88**, 325.
83. *R. J. Radmer and L. Bogorad*, Plant Physiol., 1967, **42**, 463.
84. *J. G. Ebbon and G H. Tait*, Biochem. J., 1969, **111**, 573.
85. *A. Gorchein*, Biochem. J., 1973, **134**, 833.
86. *O. T. G. Jones*, Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 1976, **273**, 207 и приведённые там ссылки.
87. *R. K. Ellsworth and S. Aronoff*, Arch. Biochem. Biophys., 1969, **130**, 374 и приведенные ссылки.
88. *R. K. Ellsworth and A. S. Hsing*, Biochim. Biophys. Acta, 1973, **313**, 119.
89. *O. T. G. Jones*, Biochem. J., 1963, **88**, 335.
90. *O. T. G. Jones*, Biochem. J., 1966, **101**, 153.
91. *W. T. Griffiths and O. T. G. Jones*, F. E. B. S. Letters, 1975, **50**, 355.
92. *J. H. C. Smith*, in 'Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems', ed. M. B. Allen, Academic Press, New York, 1960, p. 257.
93. Первоначально предложено в работе: *S. Granick and M. Gassman*, Plant Physiol., 1970, **45**, 201; в модифицированиом виде см. сс. 77.
94. *K. W. Henningsen and A. Kahn*, Plant Physiol., 1971, **47**, 685.
95. *P. Schopfer and H W. Siegelman*, Plant Physiol., 1968, **43**, 990.
96. *M. Holden*, Biochem. J., 1961, **78**, 359.
97. *A. O. Klein and W Vishniac*, J. Biol. Chem., 1961, **236**, 2544.
98. *J. B. Wolff and L. Price*, Arch Biochem. Biophys., 1957, **72**, 293.
99. *J. Lascelles*, Biochem. J., 1966, **100**, 175.
100. Обзор по бактериохлорофиллам см.: *R. C. Davies, A. Gorchein, A. Neuberger, J. D. Sandy, and G. H Tait*, Nature, 1973, **245**, 15.
101. *O. T. G. Jones*, Biochem. J , 1964, **91**, 572.
102. *J. Lascelles and T. Altschuler*, Arch. Mikrobiol., 1967, **59**, 204.
103. *J. J. Katz, H. H. Stain, A, L. Harkness, M. H. Studier, W. A. Svec, T. R. Janson, and B. T. Cope*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 7938.
104. *H. Scheer, W. A. Svec, B. T. Cope, M. H. Studier, R. G. Scott, and J. J. Katz*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 3714.
105. *G. W. Kenner, J. Rimmer, K. M. Smith, and J. F. Unsworth*, Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 1976, 273, 255 и приведенные там ссылки.
106. *A. S. Holt, J. W. Purdie, and J. W. F. Wasley*, Canad. J. Chem., 1966, **44**, 88 и приведенные там ссылки.
107. *W. R. Richards and H. Rapoport*, Biochemistry, 1967, **6**, 3830.
108. *M. Akhtar, P. F. Hunt and M. A. Parvez*, Biochem. J., 1967, **103**, 616; *E. Lederer*, Quart. Rev. Chem. Soc., 1969, 23, 453; *L. J. Goad, J. R. Lentom, F. F. Knapp and T. W. Goodwin*, Lipids, 1974, **9**, 382.
109. *C. D. Mengler*, Illinois Inst. Technol. N. M. R. Letters, 1967, **100**, 27, цит. по сс. 105.
110. *H. Brockmann*, Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 1976, **273**, 277 и приведенные там ссылки.
111. *E. L. Smith and L. F. J. Parker*, Biochem., J., 1948, **43**, viii; *K. H. Fantes, J. E. Page, L. E. J. Parker, and E. L. Smith*, Proc. Roy. Soc. (B), 1949, **136**, 592.
112. *E. L. Rickes, N. G. Brink, F. R. Koniuszy, T. R. Wood, and K. Folkers*, Science, 1948, **107**, 396.
113. *D. C. Hodgkin, J. Kamper, M. Mackay, J. Pickworth, K. N. Trueblood, and J. G. White*, Nature, 1956, 178, 64.
114. *J. W. Corcoran and D. Shemin*, Biochim. Biophys. Acta, 1957, **25**, 661.
115. *R. C. Bray and D. Shemin*, J. Biol. Chem., 1963, **238**, 1501.
116. *S. Schwartz, K. Ikeda, I. M. Miller, and C. J. Watson*, Science, 1959, **129**, 40.
117. *B. F. Burnham*, in 'Metabolic Pathways', 3rd edn., ed. D. M. Greenberg, Academic Press, New York, 1969, vol. 3, chapter 18.
118. *A. J. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwara, and R. J. Cushley*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 8269.
119. *A. J. Scott, N. Georgopapadakou, K. S. Ho, S. Klioze, E. Lee, S. L. Lee, G. H. Temme III, C. A. Townsend, and J. M. Armitage*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 2548; J. Amer. Chem. Soc., 1976, 98. 2371.

119а. См. обзор: *A. I. Scott*, Accounts Chem. Res., 1978, **11**, 29.
120. *A. R. Battersby, M. Ihara, E. McDonald, F. Satoh, and D. C. Williams*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 436.
121. *H. Dauner and G. Müller*, Z. physiol. chem., 1975, **356**, 1353.
122. *C. E. Brown, J. J. Katz, and D. Shemin*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1972, **69**, 2585.
123. *A. I. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwara, R. J. Cushley, and P. J. Whitman*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 8267; 1974, **96**, 8069.
124. *A. R. Battersby, M. Ihara, E McDonald, J. R. Stephenson, and B. T. Golding*, J. C. S. Chem. Comm., 1973, 404; *A. R. Battersby, M. Ihara, E. McDonald, J. R. Redfern and B. T. Golding*, J. C. S. Perkin I, 1977, 158 и приведенные там ссылки.
124а. См. обзор: *A. R. Battersby*, Experientia, 1978, **34**, 1.
125. *M. Kajiwara, K. S Ho, H. Klein, A. I. Scott, A. Gossauer, J. Engel, E. Neumann, and H. Zilch*, Bioorg Chem., 1977, **6**, 397.
125а. *A. I. Scott, A. J. Irwin, L. M. Siegel, and J. N. Shoolery*, J. Amer. Chem. Soc., 1978, **100**, 317.
125б. *A. R. Battersby, E. McDonald, M. Thompson, and V. Ya. Bykhovsky*, J. C. S. Chem. Comm., 1978, 150.
126. *A. R. Battersby, E. McDonald, R. Hollenstein, M. Ihara, F. Satoh, and D. C. Williams*, J. C. S. Perkin I, 1977, 166.
127. *C. E. Brown, D Shemin, and J. J. Katz*, J. Biol. Chem., 1973, **248**, 8015.
128. *A. I. Scott, C. A. Townsend, and R. I. Cushley*, J. Amer. Chem Soc., 1973, **95**, 5759 и приведенные там ссылки.
128а. *R. Bonnett*, Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 1976, **273**, 295.
129. *P. Dubs and A. Eschenmoser*, неопубликованные данные; цит. по сс. 124; *P. Dubs*, Dissertation No. 4297, E. T. H. Zurich, 1969.
130. *A. I. Scott, A. J. Irwin, L. M. Siegel, and J. N. Shoolery*, presented at Internat. Symp. Stereochemistry, Kingston, Ontario, June 1976.
130а. *R. Deeg, H. P. Kriemler, K. H. Bergman, and G. Müller*, Z. physiol. Chem., 1977, 358, 399.
130б. *K. H. Bergman, R. Deeg, K D. Gneuss, H. P. Kriemler, and G. Müller*, ibid., p. 1315.
131. *M. Imfeld, C. A. Townsend, and D. Arigoni*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 541.
132. *A. R. Battersby, R. Hollenstein, E. McDonald, and D. C. Williams*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 543.
133. *A. I. Scott, M. Kajiwara, T. Takahashi, I. M. Armitage, P. Demou, and D. Petrocine*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 544.
134. *D. Arigoni*, неопубликованные данные.
135. *K. Bernhauer, O. Müller, and F. Wagner*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1964, 3. 200 и приведенные там ссылки.
135а. *K. Bernhauer, F. Wagner, H. Michna, P. Rapp, and H. Vogelmann*: Z. physiol. Chem., 1968, **349**, 1297.
135б. *F. Wagner*. Ann. Rev. Biochem., 1966, **35**, 405.
136. *H. A. Barker*, Ann. Rev. Biochem., 1972, **41**, 55; *M. Akhtar and D. C. Wilton*, Ann. Reports (B), 1970, **67**, 557; 1972, **69**, 140.
137. *H. Weissbach and R. T. Taylor*. Vitamins and Hormones. 1970, 28, 415.

30.3. МЕТАБОЛИТЫ ШИКИМОВОЙ КИСЛОТЫ

Э. ХАСЛАМ (University of Sheffield)

30.3.1. ШИКИМАТНЫЙ ПУТЬ БИОСИНТЕЗА

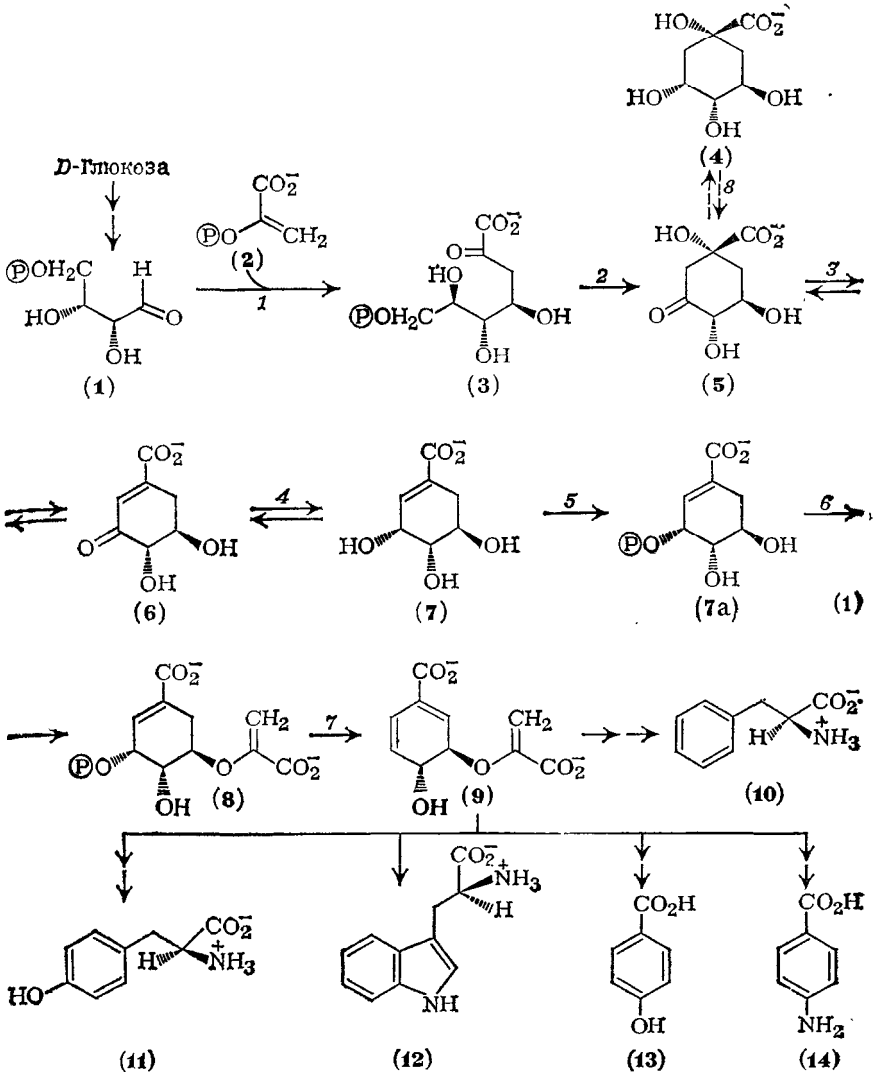
Еще в 1935 г. Фишер и Дангшат [1] впервые отметили близость структур некоторых растительных фенолов, например галловой кислоты, и алициклических кислот — хинной (4) и шикимо-

вой (7) — и постулировали единство их биогенетического происхождения. Однако строгого доказательства этой гипотезы не существовало вплоть до 1950 г., когда сначала Девис [2], а позднее Спринсон [3] и Гибсон [4] и их сотрудники установили путь метаболизма ароматических аминокислот в растениях и микроорганизмах, который теперь известен как «шикиматный путь». Природная (—)-шикимовая кислота (7) впервые выделена в 1885 г. Эйкманом из семян плода аниса *Illicium religiosum* Sieb.; общепринятое название этой кислоты происходит от японского названия этого растения *shikimi-no-ki*. Важнейшие биохимические свойства шикимовой кислоты и разнообразные метаболиты шикиматного пути биосинтеза описаны в обзорах и монографиях [2—6]. Шикиматным путем растения и микроорганизмы синтезируют три ароматических аминокислоты: *L*-фенилаланин (10), *L*-тирозин (11) и *L*-триптофан (12); этим же путем растения синтезируют основные ароматические метаболиты. В отличие от растений и микроорганизмов животные не могут использовать этот биохимический путь для синтеза *de novo* этих аминокислот из углеводных предшественников.

Первой ступенью шикиматного пути (схема 1) является альдольная конденсация фосфоенолпирувата (2) и *D*-эритрозо-4-фосфата (1), в результате которой образуется 3-дезокси-*D*-арабиногептулозонат-7-фосфат (3; ДАГФ). Это соединение далее шестистадийным путем с участием ферментов превращается в хоризмат (9) через 3-дегидрохиннат (5), 3-дегидрошикимат (6), шикимат (7) и его 3-фосфат (7а) и 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат [5-*O*-(1-карбоксивинил)шикимат-3-фосфат] (8). Основное направление шикиматного пути завершается в этой точке; от хоризмата (9) расходятся по меньшей мере пять биосинтетических путей к основным метаболитам: трем α-аминокислотам (*L*-фенилаланину, *L*-тирозину, *L*-триптофану), *n*-аминобензойной кислоте (14), коферментам ряда фолиевой кислоты и изопреноидным хинонам. Важные биохимические и химические особенности каждой стадии общего пути биосинтеза хоризмата из углеводных предшественников были выяснены в результате комплексного исследования, включавшего применение метода меченых атомов, изучение метаболизма ауксотрофных мутантов и подбор соответствующих ферментов.

Роль хинной кислоты (4) в шикиматном пути обсуждается до сих пор, но все имеющиеся данные приводят к мнению, что она не является обычным промежуточным соединением, хотя некоторые микроорганизмы (например, *Aerobacter aerogenes*) могут использовать хинную кислоту в виде 3-дегидрохинната (5) в качестве источника углерода в биосинтезе.

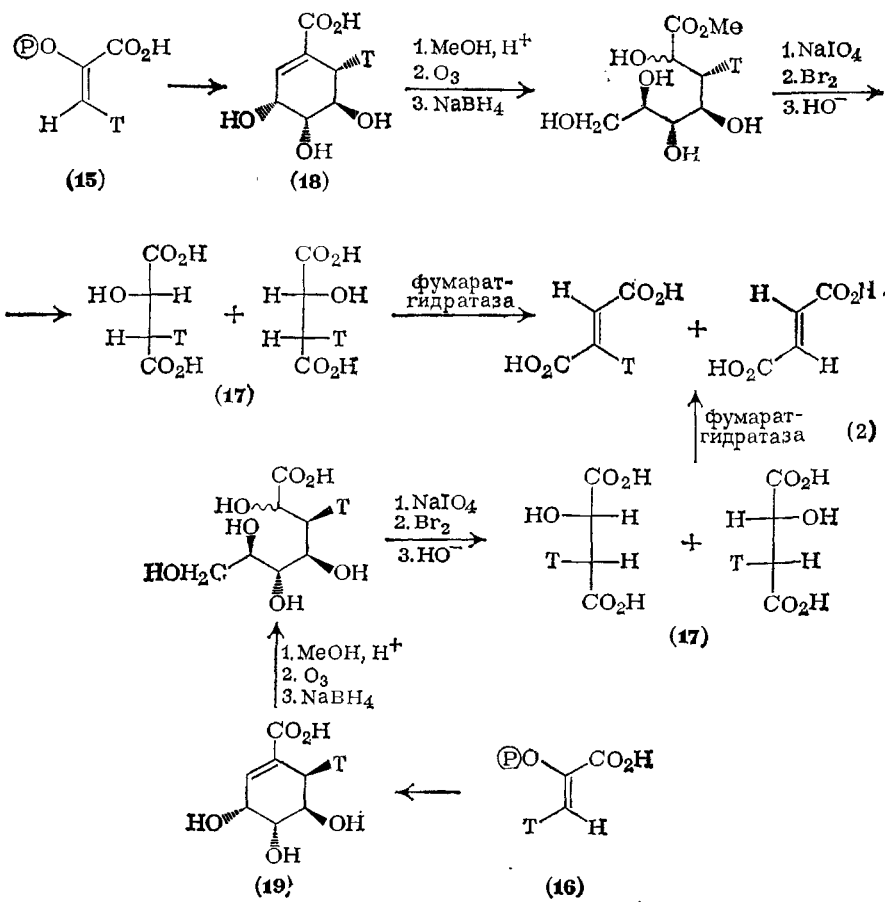
Ферменты, катализирующие каждую стадию главного пути биосинтеза хоризмата (9) из 3-дегидрохинната (5), выделены из бактерий и охарактеризованы. Следует остановиться на некоторых установленных в результате детального исследования особенностях



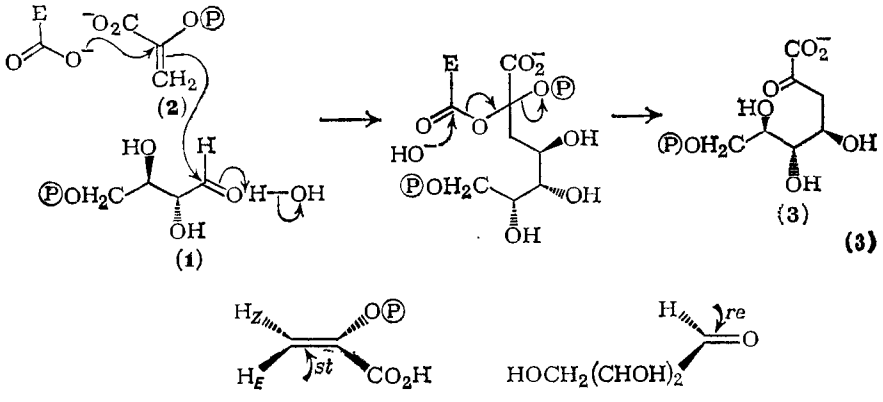
1—ДАФФ-синтетаза; *2*-дегидрохиннатсинтетаза (NAD^+; Co^{2+}); *3*—3-дегидрохиннатдегидратаза; *4*—3-дегидрошикиматредуктаза (NADPH); *5*—шикиматкиназа (ATP); *6*—хоризматсинтетаза; *7*—хиннатдегидрогеназа (NADH)

механизма действия ферментов и, в особенности, на стереохимии катализа. Начальная конденсация фосфоенолпирувата (2; ФЕП) и *D*-эритрозо-4-фосфата (1), катализируемая ДАГФ-синтетазой, впервые изучена Де Лео и Спинсоном [7], а позднее Флоссом

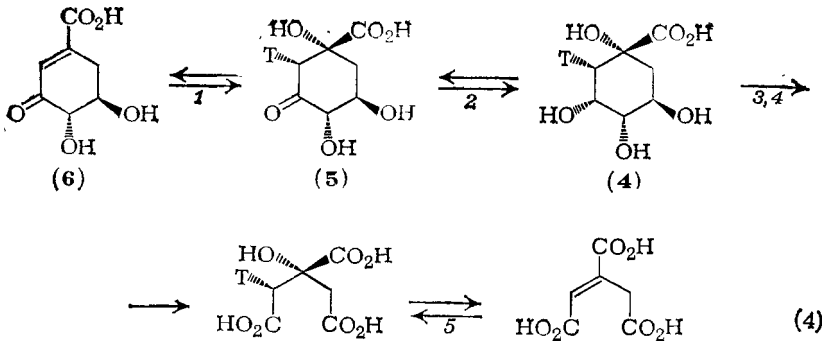
с сотр. [8, 9]. Последние авторы, используя два стереоспецифически меченных ^3H образца ФЕП, (15) и (16) (схема 2), установили, что из 3(*E*)-[3-^3H]ФЕП (15) ферментативно синтезируется преидвойной связи ФЕП) реакцию. Оба изомера ФЕП независимо превращаются в [6-^3H]шикимовую кислоту через ДАГФ (3), а затем шикимовая кислота разрушается до 2(*RS*)-[3-^3H]яблочной кислоты (17). Стереоспецифичность введения тритиевой метки в этих соединениях установлена в результате реакции с фумаратгидратазой (фумаразой). Только 2(*S*)-изомер яблочной кислоты вступает в реакцию с фумаратгидратазой; это позволило Флоссу показать, что конденсация представляет собой энантиофасную (относительно мущественно 6(*S*)-[6-^3H]шикимовая кислота (18), а из 3(*Z*)-[3-^3H]ФЕП (16)—6(*R*)-[6-^3H]шикимовая кислота (19). В этой работе на основании знания абсолютной конфигурации ДАГФ (3) и (—)-шикимовой кислоты (7) установлено, что метиленовая



группа фосфоенолпирувата (2) атакуется с *si*-стороны, а карбонильная группа *D*-эритрозо-4-фосфата (1) — с *re*-стороны. Эти данные согласуются с механизмом, ранее предложенным Флоссом [9] и Де Лео и Спринсоном [7], согласно которому карбанион образуется при С-3-атоме фосфоенолпирувата (2) и затем при конденсации обычно атакует атом углерода альдегидной группы *D*-эритрозо-4-фосфата, в результате чего образуется ДАГФ (3) (схема 3; Е — фермент).



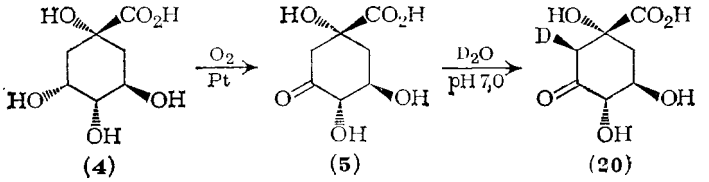
Обратимые реакции *цис*-элиминирования и *цис*-присоединения воды при участии 3-дегидрохиннатдегидратазы, которая катализирует взаимопревращение 3-дегидрохинната (5) и 3-дегидрошикимата (6), являются первыми реакциями такого типа в химии ферментов в отличие от хорошо известных процессов присоединения воды α,β-ненасыщенными карбоксильными системами, такими, как *цис*-аконитат и фумарат. Была изучена [10] обратная реакция — превращение (6) в (5) в тритированной воде; 3-дегидрохинная кислота, содержащая тритиевую метку, была выделена путем превращения ее в хинную кислоту (4) с помощью экстракта из мутанта *Aerobacter aerogenes*. В равновесной системе, содержащей хинную кислоту и тот же самый фермент в тритированной воде, был получен другой образец [2-^{3}H]хинной кислоты (4). Оба образца [2-^{3}H]-хинной кислоты порознь подвергали окислительному расщеплению до лимонной кислоты, которую затем инкубировали с препаратом аконитатгидратазы до установления равновесия между лимонной, изолимонной и аконитовой кислотами. В этих условиях оба образца лимонной кислоты теряли более 95 % тритиевой метки, что дало возможность установить стереохимическое положение трития в хинной кислоте как 2(*R*) и, таким образом, показать, что процесс общего присоединения воды к 3-дегидрошикимату при его превращении в 3-дегидрохиннат протекает как *цис*-присоединение (схема 4).



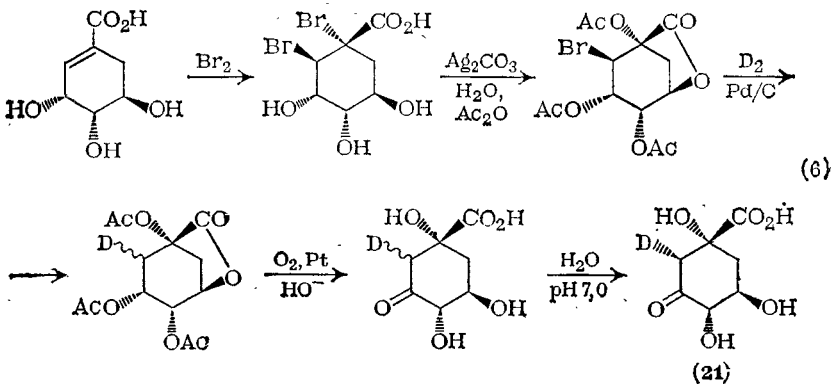
(4)

1–3-дегидрохиннатдегидратаза, TOH; *2*–хиннатдегидрогеназа, NADH; *3*–$NaIO_4$; *4*–Br_2; *5*–аконитаза

В дальнейшем аналогичные наблюдения были сделаны при изучении не обратной, а прямой биосинтетической реакции [11] с использованием 2(*S*)-[2-^{2}H]-3-дегидрохинната (**20**; 0,6—0,7 $^2H_1$) и 2(*R*)-[2-^{2}H]-3-дегидрохинната (**21**; 0,5—0,6 $^2H_1$), полученных химическим путем соответственно из хинной и шикимовой кислот (схемы 5, 6).



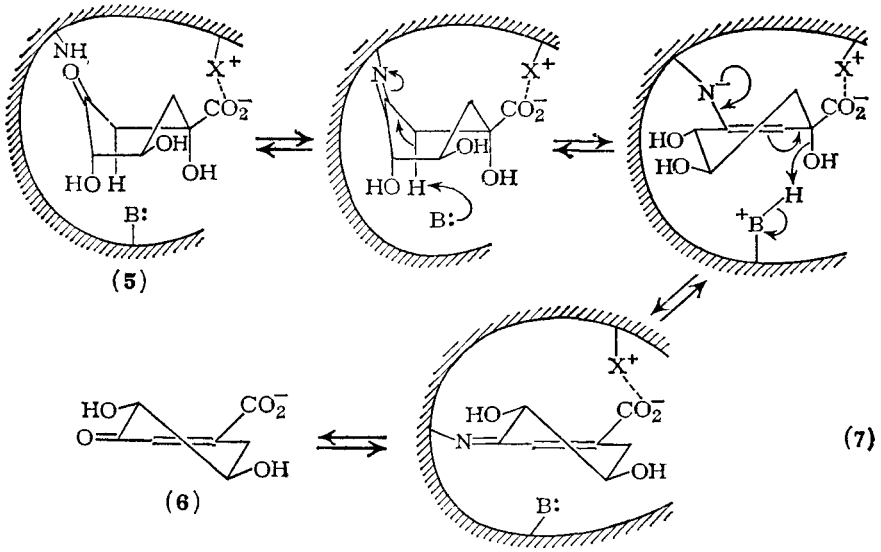
(5)



(6)

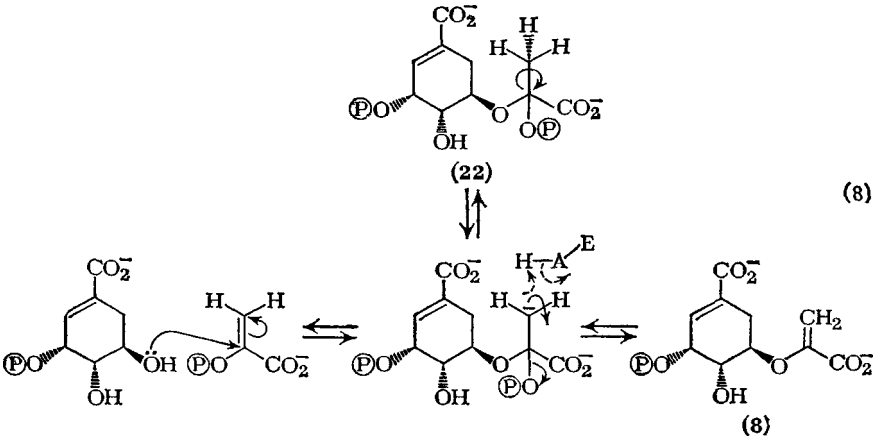
На основании результатов этих исследований предположили [10], что обратимая реакция присоединения — элиминирования

воды протекает в две стадии через енольную форму 3-дегидрохинната или через соответствующий ей анион. Предложенный механизм основан на допущении, что общая стереохимия этой реакции зависит от относительного пространственного расположения каталитических групп в активном центре фермента. На этом был основан предложенный в более поздних работах [11, 12] механизм (схема 7), в котором субстрат, 3-дегидрохиннат, в активном центре фермента приобретает конформацию «ванны» или «скошенной ванны» и образует основание Шиффа со свободной аминогруппой фермента.

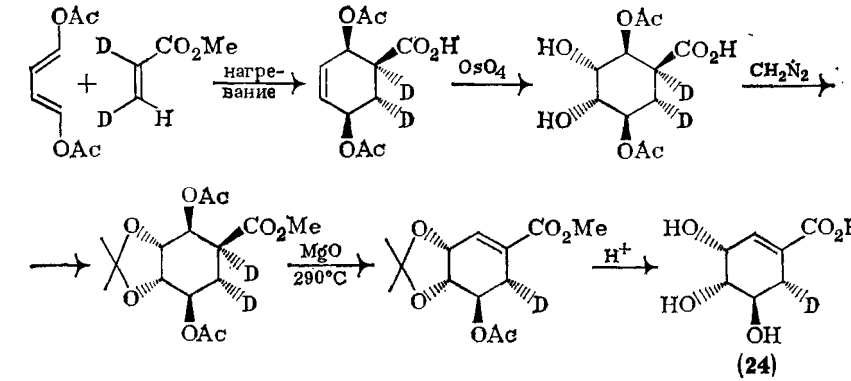


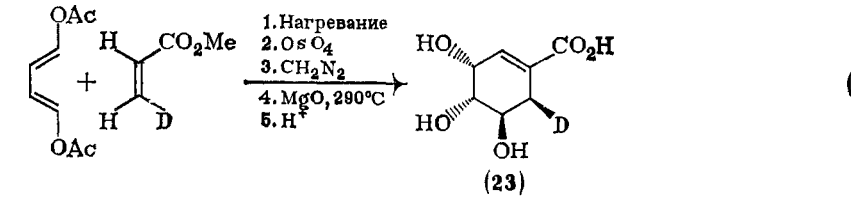
Образование *O*-карбоксивинильной группы соединения (8) из фосфоенолпирувата (2) представляет собой необычный тип биосинтетической реакции. Известен еще только один пример подобной реакции первичного метаболизма, а именно образование уридиндифосфат-*N*-ацетилглюкозаминпирувата в биосинтезе уридиндифосфат-*N*-ацетилмурамовой кислоты. На основании результатов, полученных при проведении реакции в тритированной и дейтерированной водах, Спринсон с сотр. [13] предложили более общий механизм (схема 8; Н—А — донор протонов, связанный с активным центром фермента Е). Кинетические изотопные эффекты наблюдались на стадиях протонирования и депротонирования [14], но для того, чтобы объяснить случайные включения изотопов водорода в метиленовую группу енолпирувильной системы,

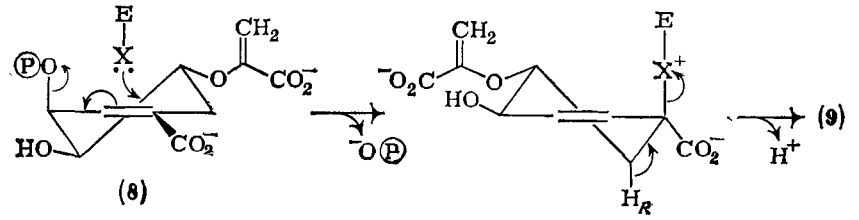
следует предположить практически свободное вращение метильной группы в интермедиате (22).



Хоризматсинтетаза катализирует 1,4-сопряженное элиминирование фосфорной кислоты из фосфата (8) с образованием диенового фрагмента хоризмовой кислоты (9). Изучение стереохимии этого элиминирования показало, что оно происходит при общей *транс*-геометрии обеих элиминируемых групп. Изучено [9] превращение 6(*S*)- и 6(*R*)-[6-^{3}H]-(—)-шикимовых кислот (18) и (19), приготовленных ферментативно из 3(*E*)-[3-^{3}H]- и 3(*Z*)-[3-^{3}H]фосфоенолпируватов (15) и (16), соответственно, в хоризмовую кислоту (9) ферментами из штамма *Aerobacter aerogenes* 62.1. Таким образом удалось показать, что 6-*pro*-(*R*)-водородный атом шикимовой кислоты легко элиминируется в процессе биосинтеза. Были синтезированы [15] два меченых образца (±)-шикимовой кислоты (23) и (24), у которых соответственно 6-*pro*-(*R*)- и 6-*pro*-(*S*)-водородные атомы замещены дейтерием, и использованы вместо изомеров природной (—)-шикимовой кислоты. Для их синтеза применен модифицированный способ получения (±)-шикимовой кислоты, предложенный впервые Рафаэлем [15] (схемы 9, 10). Оба изомера рацемической 6-дейтерошикимовой кислоты легко превращаются в *L*-фенилаланин и *L*-тирозин соответствующим ферментом из *Escherichia coli*, причем масс-спектрометрическим анализом этих аминокислот удалось установить, что только 6-*pro*-(*R*)-водородный атом способен элиминироваться из шикимовой кислоты в процессе ферментативной реакции образования хоризмовой кислоты (9), что находится в полном соответствии с данными Флосса. Для объяснения стереохимии полного *транс*-элиминирования был предложен двухступенчатый «механизм с участием группы X» [15] (схема 11).



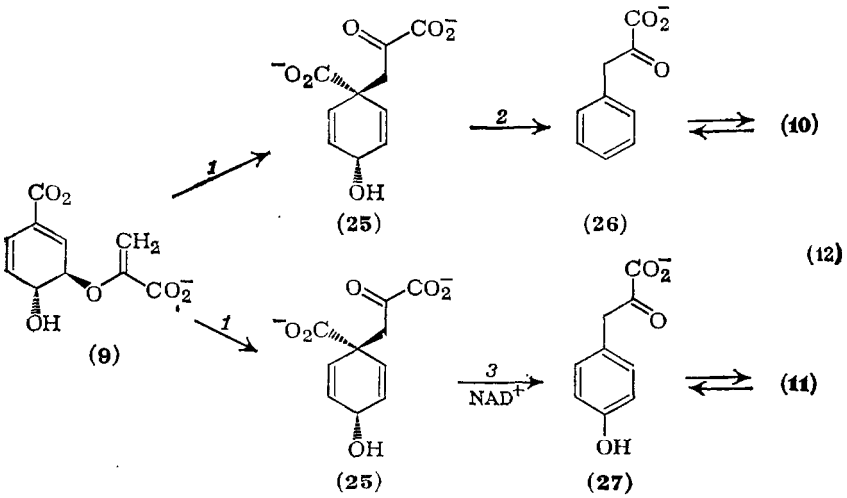




30.3.2. БИОСИНТЕЗ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ

В растениях и микроорганизмах пути метаболизма, приводящие к *L*-фенилаланину и *L*-тирозину, связаны с действием различных ферментативных систем и характеризуются образованием одного и того же промежуточного продукта — префеновой кислоты (**25**) [16, 17] (схема 12). При образовании *L*-фенилаланина (**10**) префеновая кислота сначала трансформируется префенатдегидратазой в фенилпировиноградную кислоту (**26**), которая после трансаминирования превращается в соответствующую аминокислоту. Для образования *L*-тирозина (**11**) префеновая кислота сначала окислительно декарбоксилируется NAD^+-зависимой префенатдегидрогеназой с образованием *n*-гидроксифенилпировиноградной кислоты (**27**), которая затем превращается в *L*-тирозин (**11**). В *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и *Aerobacter aerogenes* превращения префеновой кислоты катализируется двумя ферментными комплексами, обозначаемыми как Р-белок и Т-белок [18, 19]; первый из них содержит хоризматмутазу (которая катализирует

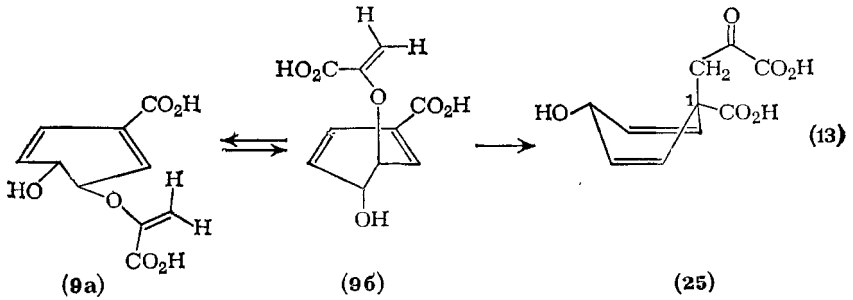
превращение хоризмовой кислоты в префеновую), а второй — префенатдегидратазу и префенатдегидрогеназу. Гибсон показал, что Т-белок обратимо диссоциирует на две субъединицы примерно одинакового размера. Будучи разделенными, индивидуальные субъединицы Т-белка теряют активность. Это доказывает, что активные центры, определяющие оба вида активности ферментов, создаются лишь в результате взаимодействия обеих белковых субъединиц.



1–хоризматмутаза; *2*–префенатдегидратаза; *3*–префенатдегидрогеназа

Перегруппировка хоризмовой кислоты (**9**) в префеновую кислоту (**25**) катализируется хоризматмутазой и формально аналогична *орто*-кляйзеновской перегруппировке [20, 21]. Эта перегруппировка является единственной молекулярной перегруппировкой такого типа в первичном метаболизме. Аналогичная реакция может протекать при нагревании водных растворов хоризмовой кислоты (**9**); показано, что в присутствии фермента из *A. aerogenes* скорость реакции (pH 7,5; 37 °C) увеличивается примерно в 10^7 раз по сравнению со скоростью термически активированной перегруппировки в отсутствие фермента [14]. Если допустить, что для осуществления сигматропной перегруппировки этого типа необходимо нахождение взаимодействующих π-систем в конформации кресла, то путь реакции от хоризмовой кислоты (**9а**) к префеновой кислоте (**25**), вероятно, включает последовательные переходы (**9а**) $\rightleftarrows$ $\rightleftarrows$ (**9б**) $\rightarrow$ (**25**), как показано на схеме (13). Эта схема основана на предположении, что субстрат, хоризмовая кислота (**9а**), сначала претерпевает конформационную инверсию цикла, т. е. превращение диквазиэкваториальной конформации (**9а**) в диквазиаксиальную конформацию (**9б**), и что в последней *О*-карбоксивинильная боковая цепь ориентирована строго определенным образом. В таком

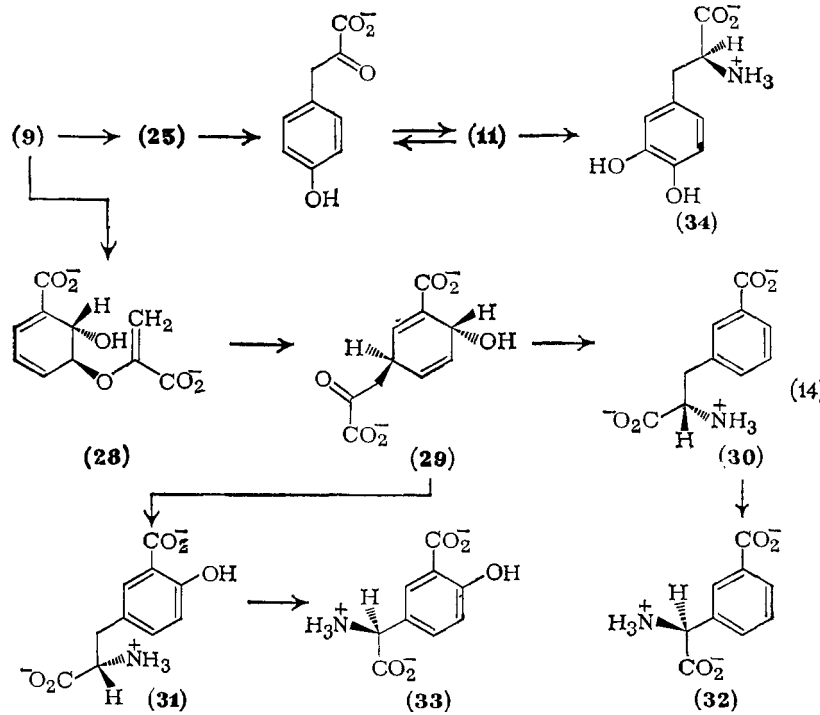
случае роль фермента хоризматмутазы наилучшим образом объясняется с помощью оригинальной концепции Полинга [22]: структура активного центра фермента комплементарна структуре субстрата в энергетически невыгодной конформации, в рассматриваемом случае это конформация (9б), и что образуемое переходное состояние похоже на последнюю, т. е. на (9б); при этом энергия связывания фермента с субстратом расходуется на стабилизацию этого интермедиата, и, таким образом, снижается энергия активации данной реакции [14]. Вопрос о том, как именно происходит связывание субстрата, потребовал выдвижения дополнительных гипотез [14].



(13)

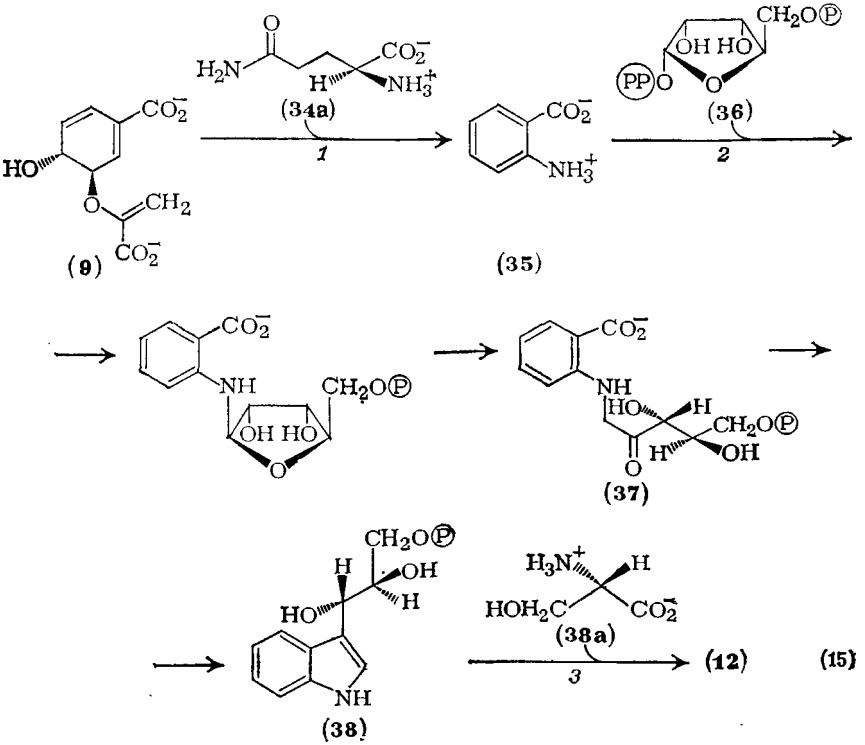
В высших растениях, особенно среди представителей семейств крестоцветных, резедовых, ирисовых и тыквенных, найдены четыре *м*-карбоксизамещенные ароматические аминокислоты (30)—(33) [23—24]. Эти кислоты входят в большую группу аминокислот, обнаруженных в высших растениях, и обычно не встречаются в составе белков. Химические свойства и биогенез этих аминокислот широко изучались, и пути их биосинтеза в общих чертах представлены на схеме (14). Согласно предложенной схеме, изохоризмовая кислота (28), образующаяся из хоризмовой кислоты (9), перегруппировывается в соединение (29) по реакции, которая формально аналогична *орто*-кляйзеновской перегруппировке, катализируемой хоризматмутазой [25]. Аминокислоты (30) и (31) затем образуются из (29) подобно тому, как *L*-фенилаланин (10) и *L*-тирозин (11) образуются из префеновой кислоты (25). Полагают, что производные фенилглицина (32) и (33) образуются путем укорачивания цепи в результате потери С-1-атома соединениями (30) и (31).

3′,4′-Дигидрокси-*L*-фенилаланин (34; *L*-ДОФА) является еще одной важной небелковой аминокислотой растительного происхождения, которая участвует в биосинтезе некоторых типов алкалоидов [26]. Изучение ее биосинтеза показало, что эта аминокислота образуется прямым гидроксилированием *L*-тирозина (11) (см. схему 24). Поврежденные или отмершие ткани растений, содержащие *L*-ДОФА, приобретают характерный черный цвет благодаря образованию из него меланиновых пигментов.

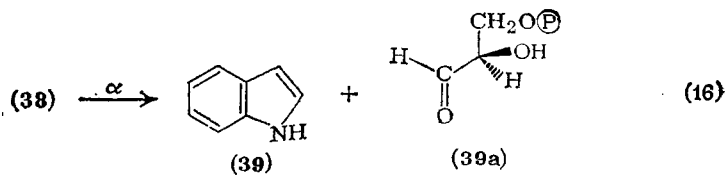


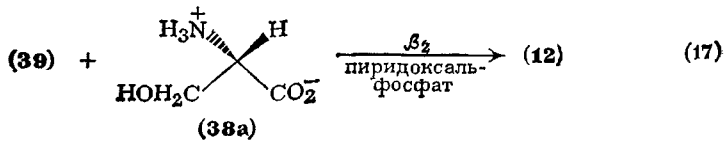
Биогенез *L*-триптофана из хоризмата представлен на схеме (15). Первая стадия, ведущая к антранилату (35), является достаточно сложной, и механизм ее до сих пор полностью не выяснен [27]. Использование меченых соединений позволило установить, что амидная аминогруппа *L*-глутамина (34а) присоединяется к атому С-2 хоризмата (9) (и, следовательно, к С-6-атому шикимата) и что группировка $CH_2{=}C(CO_2H)O$— после протонирования элиминируется в виде пирувата. Реакция антранилата с 5-фосфорибозилпирофосфатом (36) сопровождается перегруппировкой типа перегруппировки Амадори и приводит к дезоксирибулозе (37), из которой образуется (индолил-3)глицерофосфат (38; ИГФ). Несколько интересных наблюдений было сделано при изучении последней стадии биосинтеза *L*-триптофана (12) из ИГФ (38) и *L*-серина (38а). На основании результатов первых исследований биосинтеза *L*-триптофана предположили, что промежуточным соединением при этом является индол (39) [28]. В *E. coli* последняя стадия биосинтеза триптофана катализируется ферментным комплексом, называемым *L*-триптофансинтазой ($\alpha\beta_2\alpha$). Он состоит из двух неодинаковых субъединиц: α-субъединицы с молекулярной массой 29 500 и димерной β_2-субъединицы с молекулярной массой 108 000 [29, 30]. Высокоочищенные препараты разделенных α- и β_2-субъединиц катализируют разные реакции (схемы 16, 17). Если

изолированные α и β_2-субъединицы смешать снова, то они связываются в четырехкомпонентный комплекс $\alpha\beta_2\alpha$, который катализирует как реакцию (16), так и реакцию (17). Продукт первой из них, индол (39), служит субстратом во второй, но пока комплекс $\alpha\beta_2\alpha$ действует как одно целое, обнаружить индол как истинный промежуточный продукт в биосинтезе триптофана невозможно.



1–антранилатсинтетаза; 2–фосфорибозилтрансфераза; *3*–*L*-триптофансинтетаза, пиридоксальфосфат





30.3.3. МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА [4, 6]

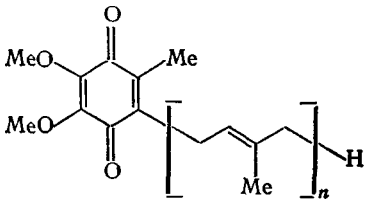
Регулирование шикиматного пути на ферментативном уровне изучалось в различных организмах; оно заключается как в управлении синтезом ферментов, так и в изменении уровня их активности. Были открыты различные регуляторные механизмы шикиматного пути. Контроль за синтезом и регулированием активности ДАГФ-синтетазы (первого фермента этого пути; см. схему 1) является ключевым фактором в общем контроле метаболизма всех трех ароматических α-аминокислот. В различных микроорганизмах этот фермент существует в трех формах (изоферменты), каждая из которых чувствительна к регуляции по типу обратной связи одним из конечных продуктов: *L*-фенилаланином, *L*-тирозином или *L*-триптофаном. Регуляция индивидуальных ферментов, катализирующих первые стадии биосинтеза определенных аминокислот, также осуществляется конечными продуктами реакции по типу обратной связи. В биосинтезе *L*-фенилаланина и *L*-тирозина ингибирующее действие конечного продукта более отчетливо проявляется в отношении ферментов, участвующих в метаболизме префената (см. схему 12); обратный эффект (стимуляция) наблюдается для хоризматмутазы, с которой эти ферменты часто образуют комплексы. Аналогично, антранилатсинтетаза, первый фермент установленного пути биосинтеза *L*-триптофана (см. схему 15), ингибируется по типу обратной связи конечным продуктом — *L*-триптофаном.

30.3.4. БИОСИНТЕЗ ИЗОПРЕНОИДНЫХ ХИНОНОВ

Помимо трех ароматических α-аминокислот шикиматный путь дает возможность синтезировать другие биологически активные метаболиты, например изопреноидные хиноны, которые участвуют в транспорте электронов во многих организмах. Главная функция этих жирорастворимых хинонов, которые, по-видимому, определенным образом ориентированы в мультиферментных комплексах, участвующих в процессах дыхания у некоторых организмов, состоит, вероятно, в «переносе» электронов между различными дыхательными коферментами. Например, убихиноны, скорее всего, являются посредниками между флавопротеинами и цитохромами в дыхательной цепи (см. разд. 24.3.2.3).

Убихиноны (кофермент Q) являются производными 3-метил-5,6-диметокси-2-*транс*-полипренил-1,4-бензохинона (40; $n = 1$—12). Они широко распространены в природе и локализованы в митохондриях клеток растений и животных, а также в клеточных мембранах нефотосинтезирующих бактерий. Большинство организмов обычно синтезирует ряд убихинонов, среди которых преобладают соединения с определенной длиной цепи ($n = 8$—9 или 10). Следует отметить, что существуют также бензохиноны с аминозаместителями в ядре и с восстановленными или эпоксидированными

двойными связями боковой цепи.



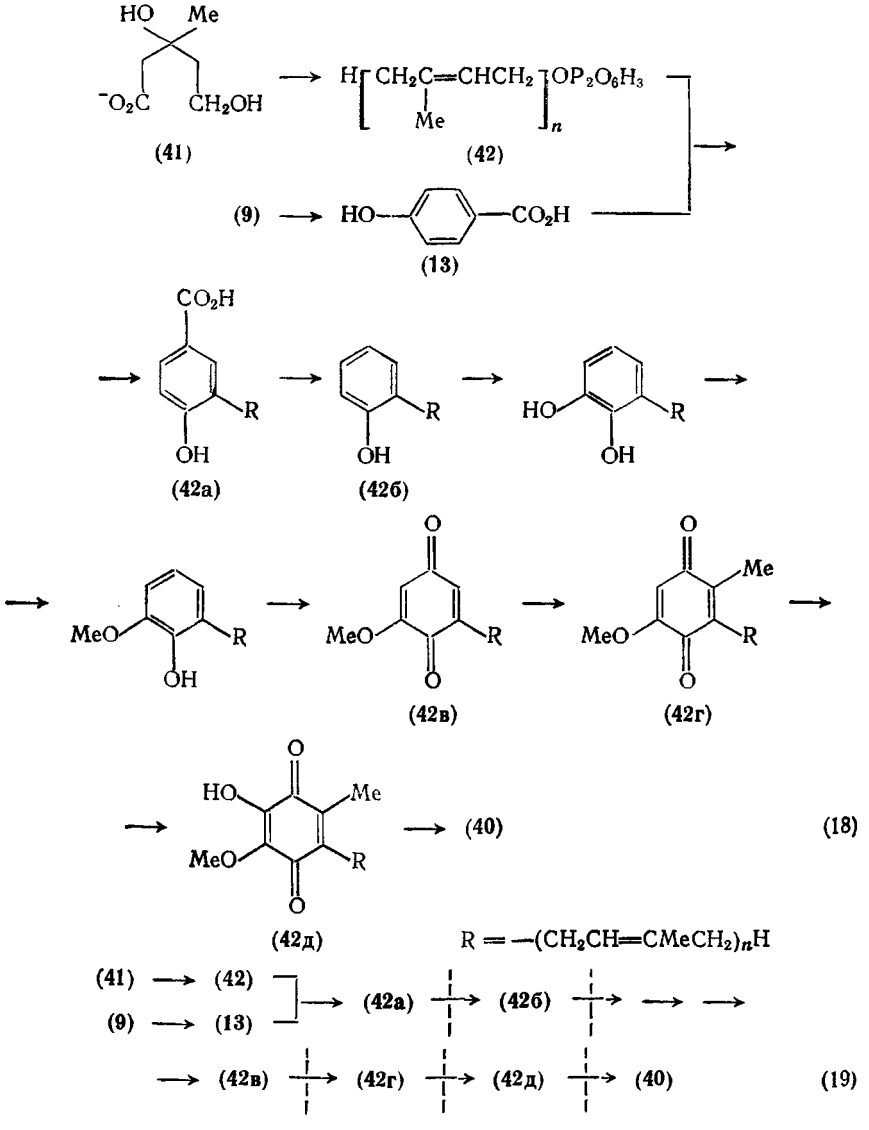
(40)

Установлено, что мевалоновая кислота (41) является предшественником, участвующим в построении полипренильной боковой цепи убихинонов высших растений, млекопитающих и многих микроорганизмов. Предполагают, что полипренилпирофосфаты синтезируются независимо от ароматических ядер и на определенной стадии биосинтеза они соединяются вместе, образуя соответствующие арилполипренильные производные. Это подтверждается частым обнаружением полипренилпирофосфатсинтетаз в живых системах и нахождением убихинонов совместно с полипренильными спиртами [31, 32].

n-Гидроксибензойная кислота (13) является прямым предшественником бензохинонового кольца в целом ряде организмов: от млекопитающих и высших растений до бактерий. В бактериях *n*-гидроксибензойная кислота образуется [33] непосредственно из хоризмовой кислоты (9), а у млекопитающих [34] — из ароматических α-аминокислот (*L*-фенилаланина и *L*-тирозина) окислительной деградацией алифатической боковой цепи. Подобный путь может существовать также в высших растениях, водорослях и грибах [35].

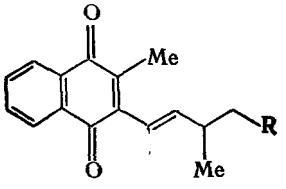
Для установления последовательности биохимических реакций, ведущих от *n*-гидроксибензойной кислоты и полипренилпирофосфатов к убихинонам, могут быть использованы два подхода. Первый подход, впервые примененный Фолькерсом с сотр. [36], состоял в обнаружении и выделении полипренилзамещенных фенолов и хинонов из липидных экстрактов *Rhodospirillum rubrum* и в установлении их строения, после чего, учитывая взаимопревращения различных арилполипренильных систем, на основании общих химических представлений была предложена схема их биосинтеза (схема 18). Эта схема оказалась хорошей основой для дальнейшего развития работ в данной области и несмотря на некоторые поправки, внесенные со временем, она очень близка принятому сейчас пути биосинтеза убихинонов, предложенному Гибсоном с сотр. [37, 38] на основании изучения мутантов *E. coli* (схема 19; для мутантов характерно отсутствие одного из показанных путей) и генетического анализа. Сходство результатов, полученных двумя совершенно различными путями, показывает, что в большинстве организмов имеются очень близкие, если не

одинаковые, пути перехода от *n*-гидроксибензойной кислоты к убихинонам.

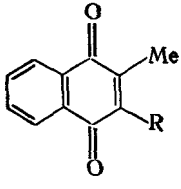


Путь биосинтеза, который приводит к образованию филлохинонов [витамин K_1; (43)] в высших растениях и менахинонов [витамин K_2; (43а)] в бактериях имеет много общего с путем образования убихинонов. Полипренильная боковая цепь образуется из мевалоновой кислоты, а *C*-метильные группы ядра происходят из

L-метионина. Однако точное происхождение нафтохиноновых ядер до сих пор не установлено.



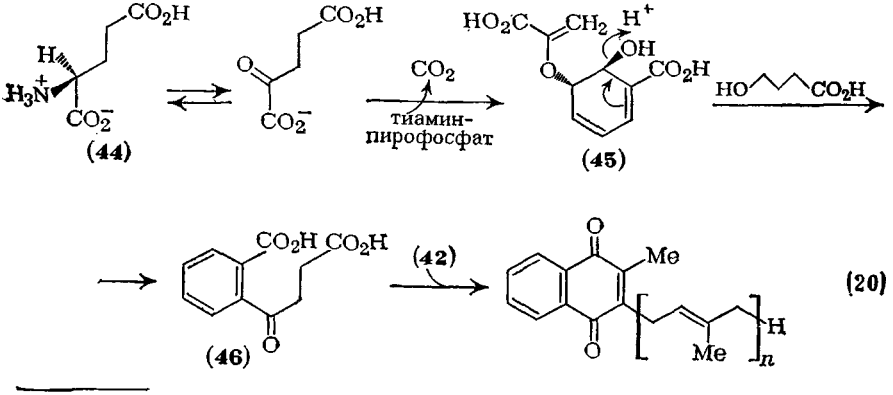
(43)



(43a)

R = —$(CH_2CH_2CHMeCH_2)_nH$ ($n = 6-9$)

Методом меченых атомов установлено, что (—)-шикимовая кислота является непосредственным предшественником нафтохинонового ядра как менахинонов, так и филлохинонов, и что в ходе биосинтеза она «встраивается» в их скелет в виде семиуглеродного фрагмента [39, 40]. Первые попытки доказать тождественность вклада карбоксильной группы шикимовой кислоты в каждую из двух карбонильных групп хинонов привели к противоречивым результатам. Было установлено [41], что в *Mycobacterium phlei* [7-^{14}C]шикимовая кислота включается в менахиноны и что атом С-4 менахинона (**43a**) образуется из карбоксильной группы шикимовой кислоты. Три другие атома хинонового кольца образуются из атомов С-2, С-3 и С-4 *L*-глутаминовой кислоты (**44**) [39]; в соответствии с этим был предложен путь биосинтеза нафтохиноновой системы (схема 20). Предлагаемый путь [6] начинается с образования карбаниона при атоме С-2 аминокислоты через α-оксоглутаровую кислоту и ее аддукт с тиаминпирофосфатом. Последний, как можно себе представить, конденсируется с шикимовой, хоризмовой или изохоризмовой (**45**) кислотами, образуя о-(3-карбоксипропионил)бензойную кислоту* (**46**) в качестве первого ароматического



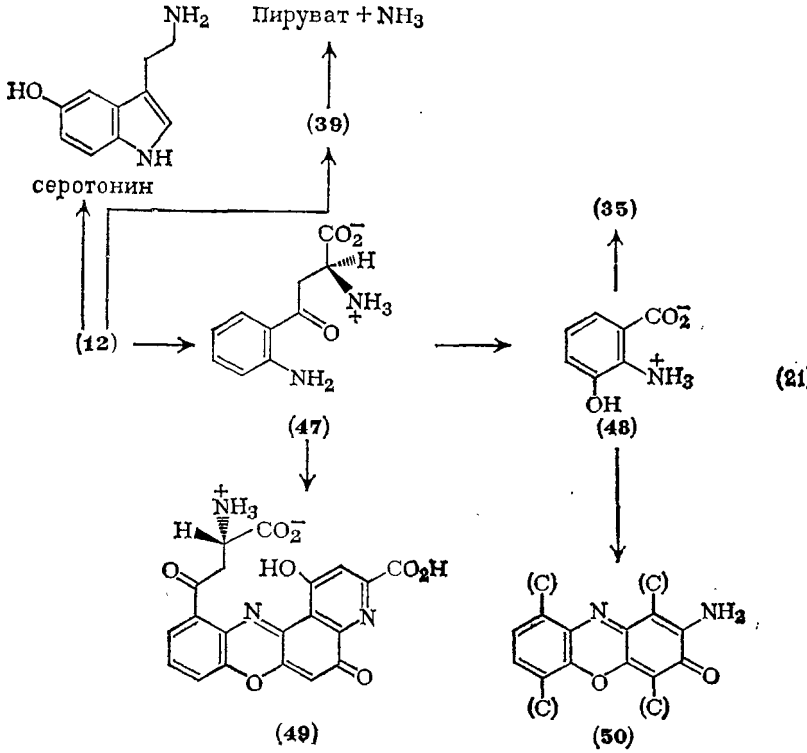
(20)

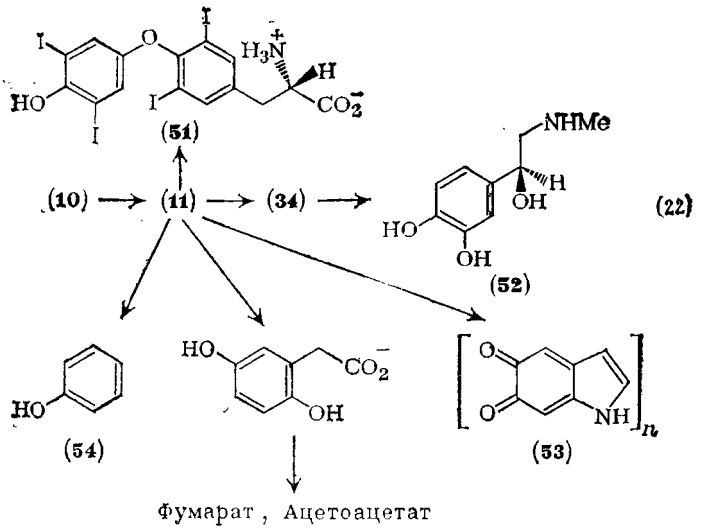
* В биохимической литературе для нее принято неправильное название — сукцинилбензойная кислота. — *Прим. перев.*

предшественника на этом пути биосинтеза [39, 42]. Последующие стадии построения нафтохиноновых ядер нуждаются в детальном выяснении, а предположение о том, что 1,4-нафтохинон и 2-метил-1,4-нафтохинон являются промежуточными продуктами биосинтеза также нуждается в проверке [39]. Аналогичные проблемы возникают и при изучении биосинтеза ряда нафтохинонов высших растений, например лавсона [43] (см. разд. 30.3.6).

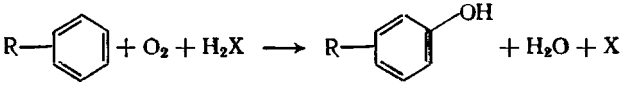
30.3.5. МЕТАБОЛИЗМ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ

Ароматические аминокислоты во многих организмах являются предшественниками различных физиологически активных метаболитов, поэтому в данном разделе рассматриваются соединения, образующиеся при окислении ароматических аминокислот в микроорганизмах и в высших организмах. На схемах (21) и (22) приведены продукты метаболизма *L*-триптофана (12) и *L*-фенилаланина (10), соответственно. В подходящих условиях эти кислоты могут также давать метаболиты, содержащие от двух до четырех атомов углерода, такие, как ацетат, фумарат, ацетоацетат и сукцинат. Многие пути окислительного метаболизма ароматических аминокислот и их ароматических субстратов [44] определяются





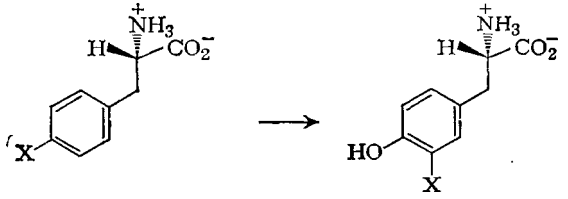
арилгидроксилазами, представляющими собой группу оксидаз со смешанными функциями, которые присутствуют во всех типах организмов. Роль оксидаз состоит во введении гидроксильной группы в ароматическое кольцо, как это в общем виде изображено на схеме (23). Донорами электронов в этой реакции могут служить различные соединения: производные аскорбиновой кислоты, производные птеридина, цитохромы, пиридиновые и флавиновые нуклеотиды, а также ионы металлов (Fe, Cu).



(23)

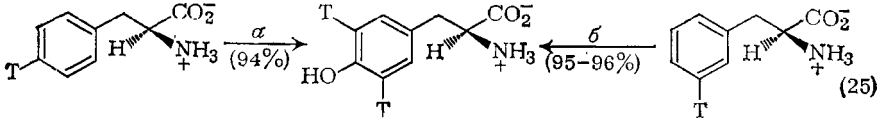
Одним из наиболее широко изученных ферментов этого класса является *L*-фенилаланингидроксилаза, которая способствует превращению *L*-фенилаланина (**10**) в *L*-тирозин (**11**) [45]. Эта реакция играет важную роль не только в катаболизме *L*-фенилаланина, она служит эндогенным источником *L*-тирозина (см. схему 22) во многих организмах, например у млекопитающих. Высказаны различные гипотезы [46] относительно первоначального вида атаки ароматического кольца, учитывающие сведения о ферменте и ряде модельных систем, воспроизводящих его поведение (см. также разд. 24.3.2.2). Имеются серьезные косвенные доказательства того, что ареноксидное промежуточное соединение (оксепин) участвует во многих реакциях арилгидроксилирования, катализируемых этим ферментом. Эти сведения получены преимущественно при изучении так называемого NIH-сдвига (см. разд. 29.1.2.4), которым сопровождается введение гидроксигрупп в ароматическое кольцо [47]. Так, *L*-фенилаланингидроксилаза, взаимодействуя

с 4′-X-замещенным *L*-фенилаланином (X=^{2}H, ^{3}H, Cl, Br), образует производное *L*-тирозина, в котором заместитель, сохраняющийся на 80—90 %, мигрирует в соседнее с возникшей на его месте HO-группой положение (схема 24). Происхождение фермента мало сказывается на степени миграции заместителя X.

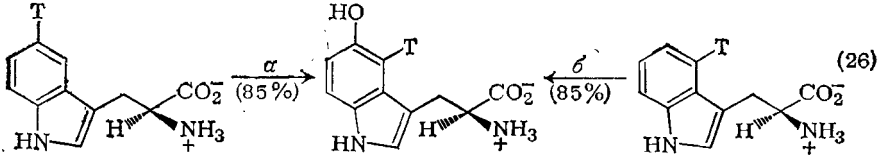


(24)

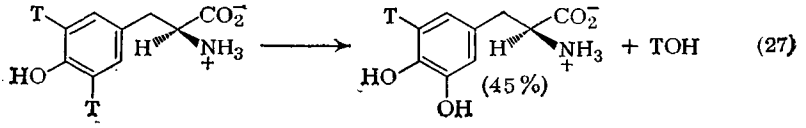
В настоящее время известны многочисленные примеры протекания NIH-сдвигов в процессах биосинтеза ароматических систем; некоторые примеры перегруппировок этого типа представлены на схемах [(25)—(27); цифры в скобках означают количество сохранившихся атомов водорода (в %)]. Уиткоп [47] интерпретировал происходящие при NIH-сдвиге превращения с позиций «оксенового» механизма, согласно которому начальная атака осуществляется частицей, аналогичной кислородному атому, и в качестве первого промежуточного соединения дает ареноксид. Эта гипотеза подтверждается обнаружением нафталиноксида-1,2 в качестве промежуточного продукта метаболизма нафталина в печени [48, 49]. Ареноксид далее может самопроизвольно или под действием кислот перегруппировываться в результате миграции заместителя в соседнее положение кольца с образованием гидроксигруппы на месте мигрировавшего заместителя. Степень сохранения и миграции заместителей в значительной мере определяется наличием



(25)

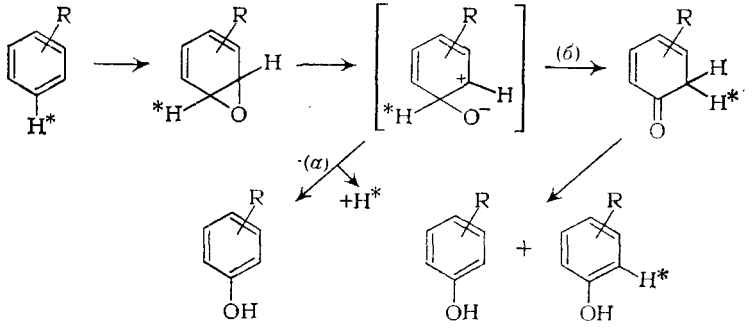


(26)



(27)

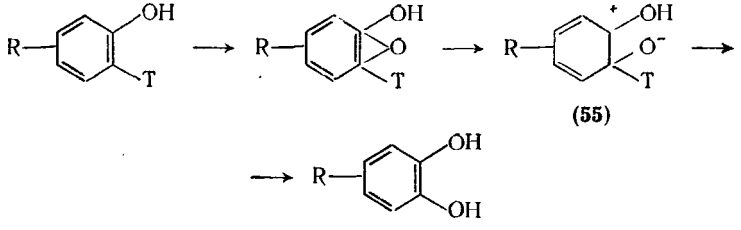
других групп в ароматическом кольце, что наводит на мысль о существовании двух путей распада ареноксида (схема 28).



(28)

Был измерен [50] изотопный эффект, сопровождающий NIH-сдвиг при гидроксилировании *L*-фенилаланина с образованием *L*-тирозина. Образцы [4′-^{3}H]- и [4′-^{3}H,3′,5′-^{3}H$_2$]-*D*,*L*-фенилаланина превращались в *L*-тирозин штаммом *Pseudomonas*. Гидроксилирование 4′-тритийзамещенного предшественника происходит с высокой степенью миграции и сохранения трития (95 %). В случае [4′-^{3}H,3′,5′-^{2}H$_2$]-предшественника наблюдается более низкая степень сохранения трития (74 %). Вычисленное отношение k_H/k_D для этого процесса составляет 10 ± 1 [50].

Потеря ~55 % трития из молекулы *L*-ДОФА, образующейся при введении второй гидроксильной группы в [3′,5′-^{3}H$_2$]-*L*-тирозин с помощью фермента *L*-тирозингидроксилазы (см. схему 27), легко объясняется с позиций ареноксидного механизма [51]. Как в этом, так и в других подобных случаях, стабилизация образующегося из ареноксида интермедиата (**55**) достигается преимущественно путем потери изотопа водорода (схема 29).

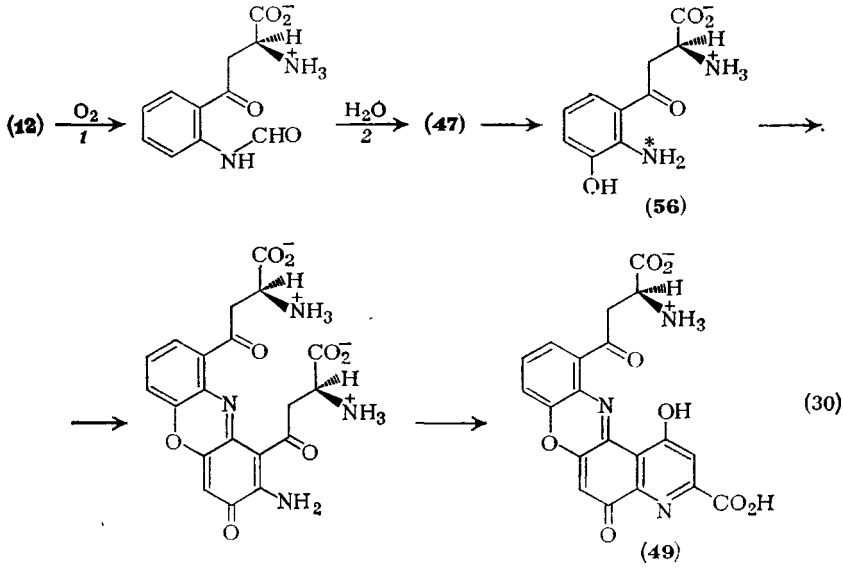


(**55**)

(29)

Первой ступенью окислительного метаболизма *L*-триптофана (**12**) является образование сначала *N*-формилкинуренина, а затем кинуренина (**47**) в результате ферментативного процесса, при котором оба атома молекулы кислорода присоединяются по С-2—С-3-связи пиррольного кольца [52] (схема 30). От кинуренина расходятся различные пути метаболизма; в частности, у млекопитающих качественно важным является путь окисления его до диоксида углерода через 3-гидроксиантранилат (**48**). Сейчас твердо

доказано, что кинуренин (47) и 3-гидроксиантранилат (48) являются промежуточными продуктами в биосинтезе хромофоров феноксазинонов. Так, Бутенандт [53] показал, что оммохромные пигменты глаз некоторых видов дрозофилы, например ксантоматин (49), можно получить при окислении 3-гидроксикинуренина (56) трикалийгексацианоферратом; аналогичный процесс осуществляется в природе. Изучение этой реакции методом меченых атомов [53] позволило предположить, что оммохромы образуются ферментативным путем в результате окислительной конденсации двух молекул 3-гидроксикинуренина (56) (см. схему 30).

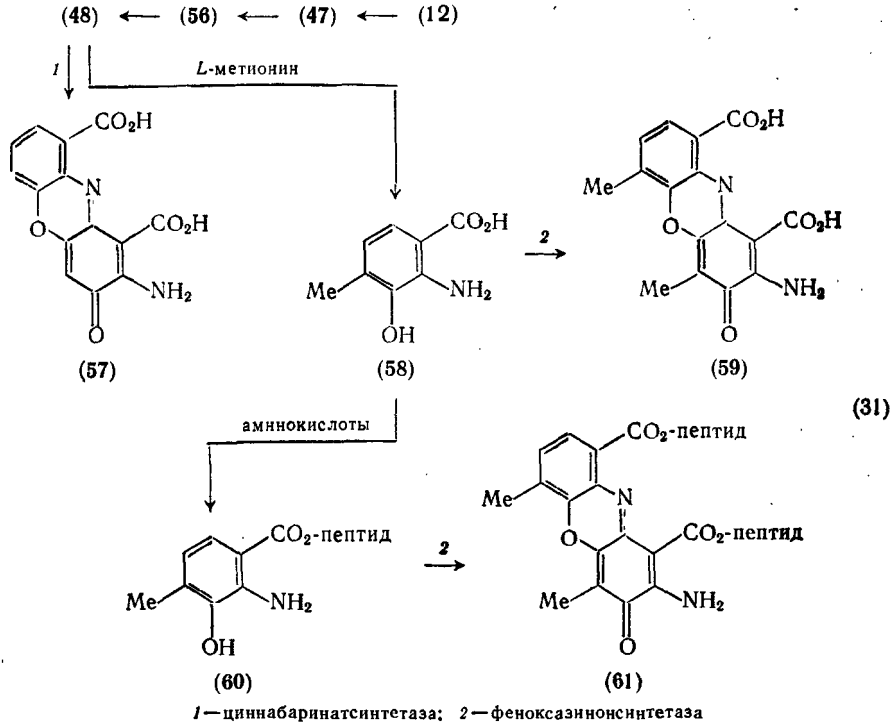


(30)

1 — *L*-триптофаноксигеназа; *2* — кинуренинформилаза

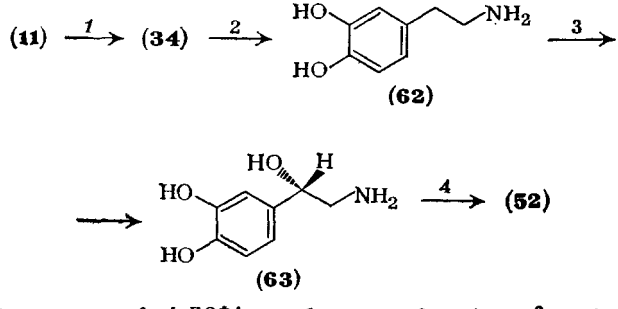
Аналогичным образом актиноцин (59) и его производные — актиномицины (семейство хромопептидных антибиотиков; см. гл. 23.4) могут быть получены химическим окислением 3-гидрокси-4-метилантранилата (58). На основании этого предположили, что аминокислота (58) является прямым предшественником феноксазинового хромофора актиномицинов *in vivo* [54, 55]. Эта гипотеза подтверждена Катцом и Вайсбахом, которые успешно синтезировали актиноцин (59) из соединения (58) во внеклеточной системе из *Streptomyces antibioticus* [56]. Метильные группы актиноцина возникают из *L*-метионина. Это происходит после образования 3-гидроксикинуренина (56), однако точно не установлено, на какой именно стадии осуществляется метилирование [57]. Момент присоединения двух пептидных цепей также не вполне установлен, хотя пептидные производные 3-гидрокси-4-метилантраниловой кислоты (60) легко превращаются в аналоги актиномицина (61) фе-

ноксазинонсинтетазой из *Streptomyces antibioticus* (схема 31) [58]. Пигмент грибов — циннабариновая кислота (57) и ее производные аналогично образуются окислением 3-гидроксиантраниловой кислоты (48) [59].



1 — циннабаринатсинтетаза; *2* — феноксазинонсинтетаза

Окислительный метаболизм *L*-фенилаланина и *L*-тирозина представляет значительный интерес, так как он приводит к ряду таких важных метаболитов, как катехоламины, например адреналин (52), тироксин (51), а также пигмент меланин (53) (см. схему 22).

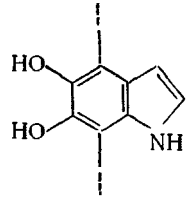


1 — *L*-тирозин-гидроксилаза; *2* — *L*-ДОФА-декарбоксилаза; *3* — дофамин-β-гидроксилаза; *4* — фенилэтаноламин-*N*-метилтрансфераза, *L*-метионин.

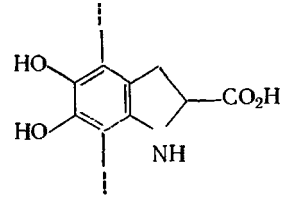
Катехоламины, представляющие собой 3′,4′-дигидроксипроизводные фенетиламина, оказывают регулирующее действие во многих тканях млекопитающих. Биосинтез катехоламинов начинается с *L*-тирозина (**11**) (схема 32), причем каждая ферментативно катализируемая ступень этого биогенетического пути к адреналину (**52**) [через ДОФА (**34**), дофамин (**62**) и норадреналин (**63**)] установлена и детально описана [60—63].

Тироглобулин представляет собой сложный гликопротеин, содержащийся в фолликулах щитовидной железы и являющийся средством хранения (в связанной форме) двух гормонов щитовидной железы: тироксина (**51**) и триодтиронина. На основании имеющихся данных [64] можно предположить, что биосинтез тироксина протекает по механизму окислительного сочетания фенолов из двух определенным образом расположенных остатков дииод-*L*-тирозина в белковой молекуле тироглобулина. Однако возможны и иные механизмы. Истинная роль тироглобулина в окислительном связывании недостаточно выяснена. Известно, что иодирование остатков *L*-тирозина других полипептидов легко происходит *in vitro*, однако образование тироксина (**51**) *in vivo* наблюдается только при иодировании тироглобулина.

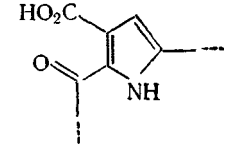
Хотя превращения, происходящие при биосинтезе меланиновых пигментов (характерных для кожного и волосяного покрова и сетчатки глаз у млекопитающих) были в общих чертах установлены и экспериментально подтверждены работами Рейпера [65] и, позднее, Мейсона [66], однако до сих пор нельзя сделать однозначного заключения относительно механизма полимеризации индолхинона (**53**) в меланин. Последующие исследования показали, что биосинтез меланина протекает более сложно. Так, было установлено [67, 68], что в полимерную молекулу меланина встраиваются нециклизованные остатки *L*-ДОФА (**34**) и остатки, соответствующие структурам (**64**)—(**66**). Оказалось, что единственным ферментом, ответственным за превращение *L*-тирозина в полимерный меланин, является тирозиназа, которая катализирует его первоначальное превращение в *L*-ДОФА-хинон; последующие стадии, как полагают, протекают самопроизвольно.



(64)



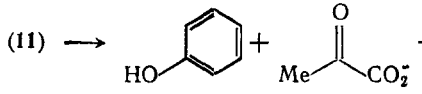
(65)



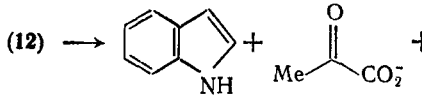
(66)

Как *L*-тирозин (**11**), так и *L*-триптофан (**12**) могут разрушаться бактериями неокислительным путем, связанным с элиминированием боковой алифатической цепи (в виде пирувата и аммиака) и образованием фенола (**54**) или индола (**39**), соответственно (схе-

мы 33, 34). Ферментами, катализирующими эти превращения, являются соответственно *L*-тирозин—фенол-лиаза и триптофаназа. Оба фермента катализируют ряд реакций замещения (в том числе нуклеофильного β-замещения) и α,β-элиминирования, а в случае триптофаназы одна из этих реакций (*L*-серин + индол → *L*-триптофан) идентична реакции, катализируемой β_2-частью *L*-триптофансинтазы (см. разд. 30.3.2). Типичные реакции, катализируемые *L*-тирозин—фенол-лиазой, представлены уравнениями (35)—(41).



(54) (33)



(39) (34)

L-Тирозин + H_2O ⟶ Фенол + Пировиноградная кислота + NH_3 (35)

L-Цистеин + H_2O ⟶ H_2S + Пировиноградная кислота + NH_3 (36)

L-Серин ⟶ Пировиноградная кислота + NH_3 (37)

L-Тирозин + Пирокатехин ⟶ 3′,4′-Дигидроксифенил-*L*-аланин + Фенол (38)

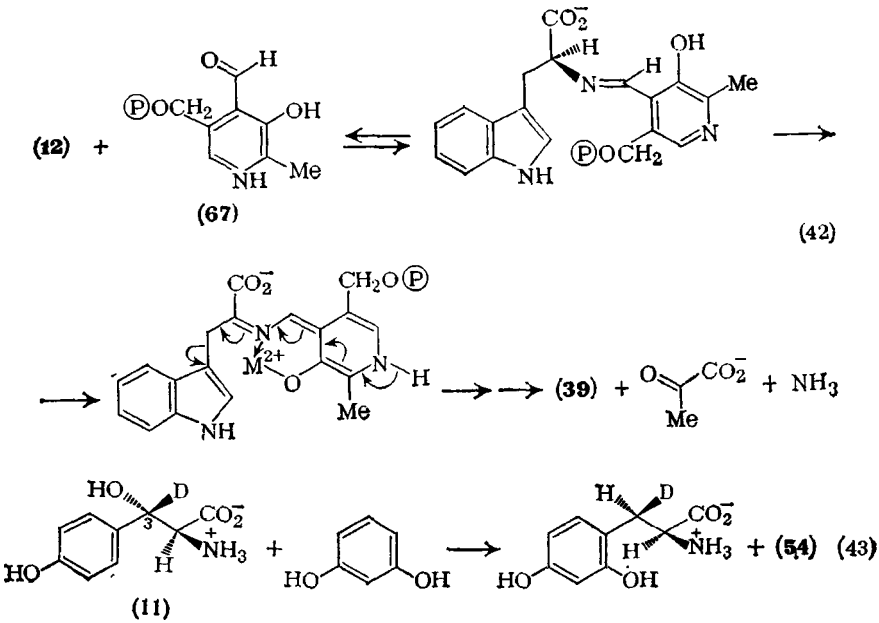
S-Метил-*L*-цистеин + Резорцин ⟶
⟶ 2′,4′-Дигидроксифенил-*L*-аланин + Фенол (39)

Фенол + Пировиноградная кислота + NH_3 ⟶ *L*-Тирозин + H_2O (40)

Пирокатехин + Пировиноградиая кислота + NH_3 ⟶
⟶ 3′,4′-Дигидроксифенил-*L*-аланин (41)

Кофактором обоих ферментов является пиридоксальфосфат; в случае триптофаназы был предложен [69] механизм этой реакции, согласно которому распад молекулы происходит через образование комплекса металла с пиридоксальфосфатом (67) и триптофаном (12) (схема 42). Подобный механизм можно предложить и для *L*-тирозин—фенол-лиазы. Хилл и сотр. [70] изучали стереохимию каталитической реакции β-замещения в присутствии *L*-тирозин—фенол-лиазы (см. уравнение 38). Ими исследована реакция *L*-тирозина (11), стереоспецифически дейтерированного по С-3, с резорцином (схема 43), приводящая к 2′,4′-дигидрокси-*L*-фенилаланину. Методом спектроскопии ЯМР ^1H была определена конфигурация атома дейтерия при С-3 и показано, что реакция обмена протекает с сохранением конфигурации при С-3. Аналогичным образом показано [71], что обратная реакция в присутствии *L*-тирозин—фенол-лиазы также происходит с сохранением конфигурации; Флосс [72] установил, что реакция в присутствии

L-триптофансинтазы (см. разд. 30.3.2) происходит с сохранением конфигурации при С-3 молекулы *L*-серина [72].



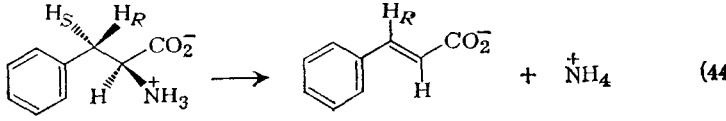
30.3.6. ШИКИМАТНЫЙ ПУТЬ БИОСИНТЕЗА В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ

Органическая химия всегда была тесно связана с изучением соединений, выделяемых из живой материи. Одной из перспективных областей этой науки является изучение химии вторичных метаболитов, таких, как терпены, алкалоиды, хиноны и фенолы, образуемых многими организмами, причем их биологическая роль до сих пор не выяснена.

В растениях содержится большое число соединений, которые образуются из ароматических аминокислот или промежуточных продуктов шикиматного пути биосинтеза. Среди этих метаболитов преобладают алкалоиды (см. гл. 30.1) и различные растительные фенолы. Ниже обсуждаются некоторые основные биогенетические особенности растительных фенолов и других растительных метаболитов шикимовой кислоты.

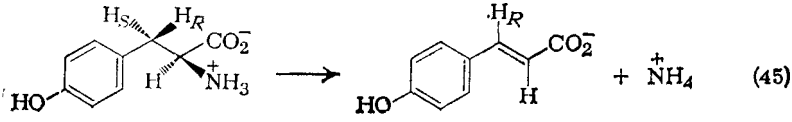
Фенолы растений представлены как полимерными фенолами лигнинов, так и простыми C_6-фенолами. Растительные фенолы классифицируются по принципу строения их скелета, причем для многих из них, например для коричных кислот, лигнанов, лигнинов, стильбенов и флавоноидов характерно наличие звена, имеющего фенилпропановый скелет (C_6—C_3-фрагмент) [6]. Наличие

такого фрагмента согласуется с предположением о том, что *L*-фенилаланин и *L*-тирозин (в некоторых растениях) являются обязательными промежуточными продуктами на пути создания метаболического фонда «фенилпропановых» соединений и, тем самым, на пути образования всего многообразия фенольных соединений растений. Фермент *L*-фенилаланин—аммиак-лиаза [73, 74], катализирующий первую стадию биосинтеза фенилпропановых соединений — элиминирование аммиака с образованием *транс*-циннамата (68) (схема 44), обнаружен в большинстве сосудистых растений, а также в некоторых родах базидиомицетов. Напротив, *L*-тирозин—аммиак-лиаза, катализирующая образование *транс*-4-гидроксициннамата (*п*-кумарата) (69) из *L*-гирозина (схема 45), ограниченно распространена в растениях и обычно встречается в злаковых [74]. Эти ферменты действуют, вероятно, в узловой точке метаболизма ароматических аминокислот, от которой наряду с биосинтезом белков начинается путь, ведущий к фенилпропаноидным соединениям.



(44)

(68)

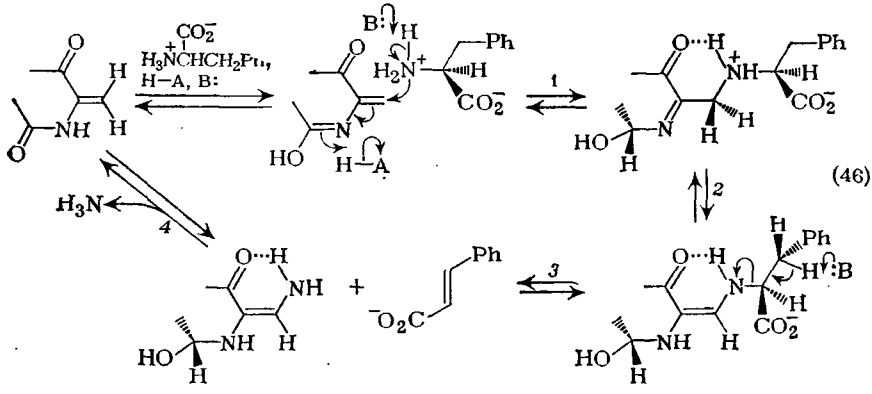


(45)

(69)

L-Фенилаланин—аммиак-лиаза выделена из многих растительных источников [73, 74] в тщательно очищенном виде. Ингибирование ее ферментативной активности достигалось действием химических реагентов, взаимодействующих с карбонильной группой (например, CN^-, $NaBH_4$) [75, 76]. При обработке фермента тритированным борогидридом натрия и последующем гидролизе получается аланин, в молекуле которого основная часть радиоактивной метки сосредоточена в β-метильной группе [75]. Аналогично, реакция с [^{14}C]цианидом калия с последующим гидролизом приводит к [β-^{14}C]аспарагиновой кислоте [76]. На основании этих фактов предположили, что активный центр фермента, подобно активным центрам других аминокислотных аммиак-лиаз, содержит остаток α,β-дегидроаланина [75]. Предложен механизм действия фермента [75] (схема 46), согласно которому аминогруппа аминокислоты первоначально присоединяется к метиленовой группе дегидроаланина. Показано [77, 78], что реакция элиминирования протекает

строго стереоспецифично с потерей 3-*pro*-(*S*)-водородного атома по аналогии с реакциями других аммиак-лиаз [79].

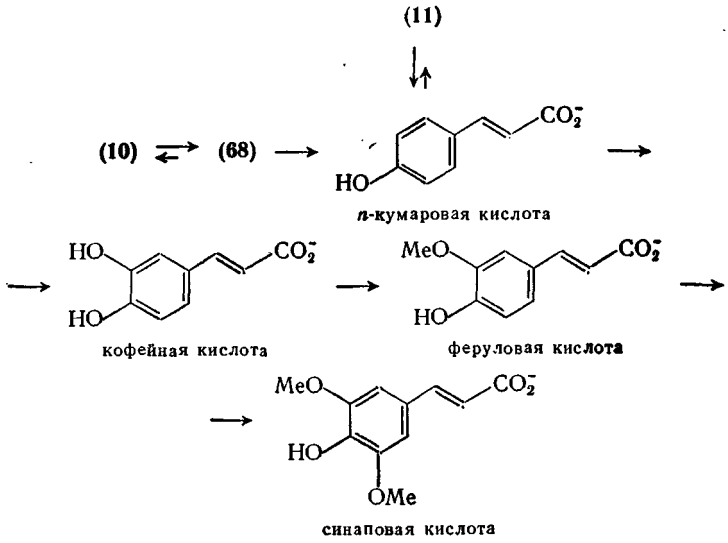


(46)

В растениях *L*-тирозин—аммиак-лиазе обычно сопутствует *L*-фенилаланин—аммиак-лиаза, которая присутствует в значительно меньших количествах [74]. В кукурузе лишь один фермент ответственен за элиминирование аммиака как из *L*-фенилаланина, так и из *L*-тирозина; это означает, что с обоими субстратами взаимодействует один и тот же активный центр фермента [80]. *L*-Тирозин—аммиак-лиаза действует так же стереоспецифично, как и сопутствующий ей фермент, ответственный за превращение *L*-фенилаланина; реакция протекает с удалением 3-*pro*-(*S*)-водородного атома (см. схему 45) [81].

Можно с уверенностью утверждать [82], что присутствующие в большинстве высших растений гидроксикоричные кислоты, которые в свободном состоянии или в виде активированных эфиров составляют основу метаболического фонда фенилпропаноидов, образуются в результате последовательных процессов гидроксилирования арильной группы и метилирования *транс*-циннамата (68) (схема 47). Специфический NIH-сдвиг, сопровождающий реакцию гидроксилирования арильной группы в микроорганизмах и в высших организмах, вызывается действием циннаматгидроксилазы [83]; например, при «скармливании» [4′-^{3}H]-*транс*-коричной кислоты растению *Fagopyrum esculentum* из него выделяют хлорогеновую кислоту, содержащую до 50 % тритиевой метки [84]. Полученные результаты вполне соответствуют основным представлениям о NIH-сдвиге, а именно предположению о том, что введение первой гидроксильной группы в ароматическое кольцо практически не изменяет содержания тритиевой метки, мигрирующей в 3′-положение, тогда как введение второй гидроксигруппы в *орто*-положение относительно первой (вошедшей в 4′-положение) гидроксигруппы ведет к потере атомов трития из места замещения. Аналогичные результаты получаются и при введении гидроксильных групп в фе-

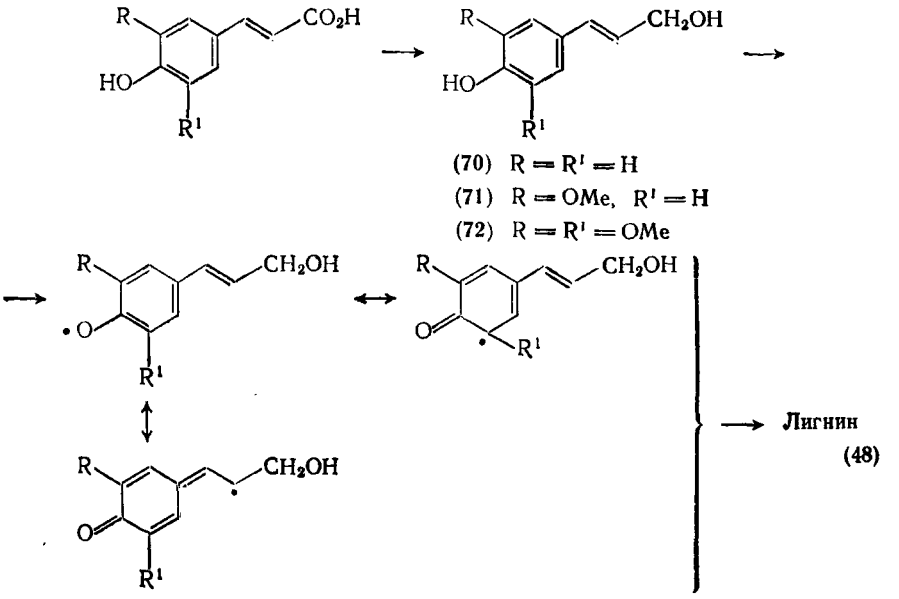
нилпропановые фрагменты, входящие в состав более сложных фенольных структур [6, 85, 86].



(47)

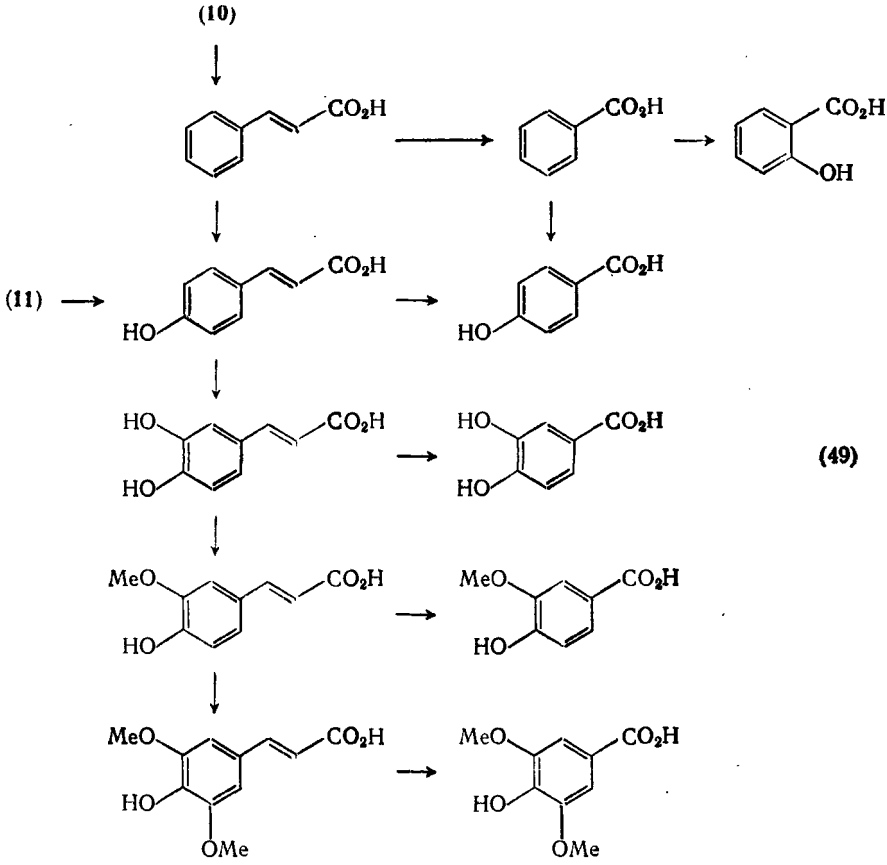
Растительные лигнины являются полимерами, построенными преимущественно, если не целиком, из мономеров с C_6—C_3-скелетом фенилпропилового спирта, при окислении которых образуются различные коричные кислоты (см. схему 47) [87, 88]. Лигнины хвойных и мягких пород деревьев построены исключительно из остатков конифери лового спирта (71), лигнины твердых древесных пород содержат в различных соотношениях остатки конифери лового и синапового (72) спиртов, а лигнины травянистых растений наряду с остатками соединений (71) и (72) содержат остатки *n*-гидроксикоричного спирта (70). Восстановление карбоксильной группы коричных кислот до соответствующих спиртов идет в две стадии с промежуточным образованием сложного эфира кислоты с ферментом А. Этот процесс аналогичен восстановлению β-гидрокси-β-метилглутаровой кислоты в мевалоновую кислоту (см. гл. 29.2). Изучая реакции окисления конифери лового спирта (71) в присутствии фермента лакказы, приводящие к образованию полимерных соединений лигнинового типа, Фрейденберг [87] пришел к выводу, что эти процессы *in vitro* очень напоминают процессы естественной лигнификации. На этом основании он предположил, что процесс лигнификации *in vivo* происходит как ферментативное окисление. При этом первоначально возникающий феноксильный радикал и его мезомерные циклогексадиеноновые формы сочетаются друг с другом, образуя полифенилпропановый скелет (схема 48). Анализ промежуточных продуктов окисления *in vitro* (например,

димерного лигнана пинорезинола) и установление строения ряда природных лигнинов позволили Фрейденбергу сделать заключение о механизме роста полимерных цепей и об основных типах их строения.



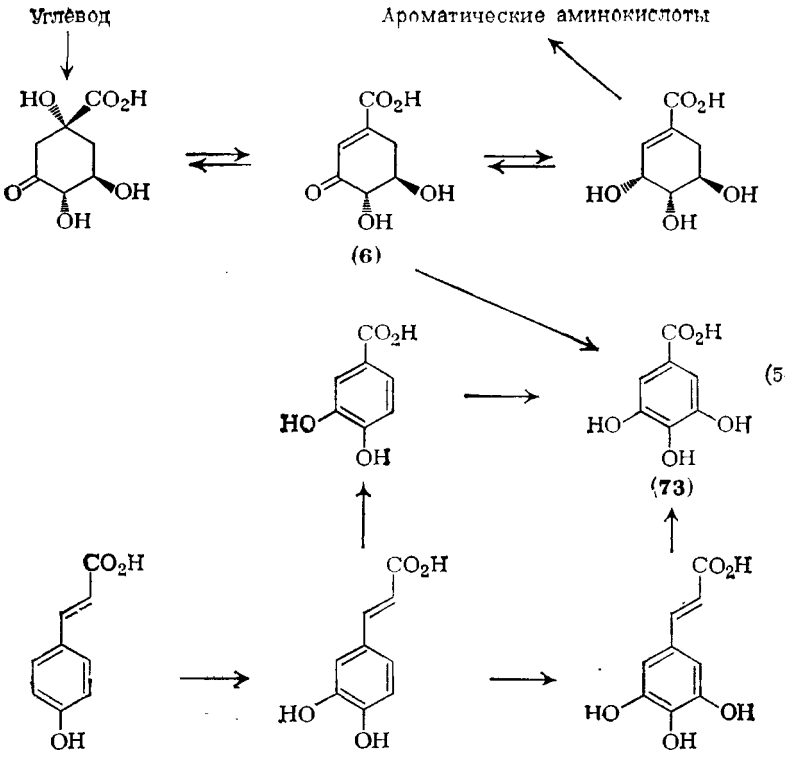
В микроорганизмах некоторые гидроксибензойные кислоты образуются по шикиматному пути из промежуточных соединений неароматического характера, однако в высших растениях подобный путь биосинтеза гидроксибензойных кислот не доказан (за исключением синтеза галловой кислоты). Гейссман и Хинрайнер [89] первыми высказали мысль о биосинтезе замещенных бензойных кислот в результате β-окисления коричных кислот и экспериментально подтвердили свое предположение, используя метод меченых атомов. Основываясь на результатах этой работы, Зенк [90] и другие авторы установили метаболитические пути общей схемы биосинтеза гидроксибензойных кислот в результате деградации соответствующих коричных кислот (схема 49). Подобные предположения оказались полезны и при изучении путей биосинтеза соответствующих альдегидов, спиртов и фенилуксусных кислот [6]. Механизм биосинтеза галловой кислоты (73) в настоящее время еще не выяснен, хотя имеются экспериментальные доказательства существования, по крайней мере, трех путей ее биосинтеза (схема 50) [91—93]. Результаты этих исследований показывают ограничения и слабые стороны метода меченых атомов, обычно используемого для установления путей биосинтеза в высших растениях, так как, по мнению авторов, маловероятно, чтобы все эти

три пути были истинными метаболическими путями, приводящими к галловой кислоте.

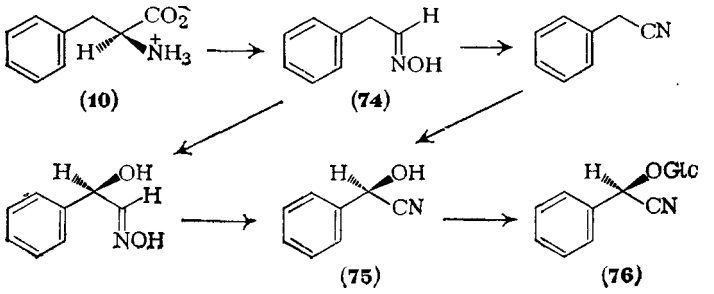


Фенилпропановый C_6—C_3-углеродный скелет встречается также и в сочетании с фрагментами ацетатного происхождения. Соответствующие «строительные блоки» участвуют в биосинтезе многих растительных фенольных соединений. Особое место в ряду этих соединений занимает группа флавоноидов, а также стильбены, биосинтез которых обсуждался в разделе, посвященном ацетатному пути биосинтеза [6] (см. гл. 29.1).

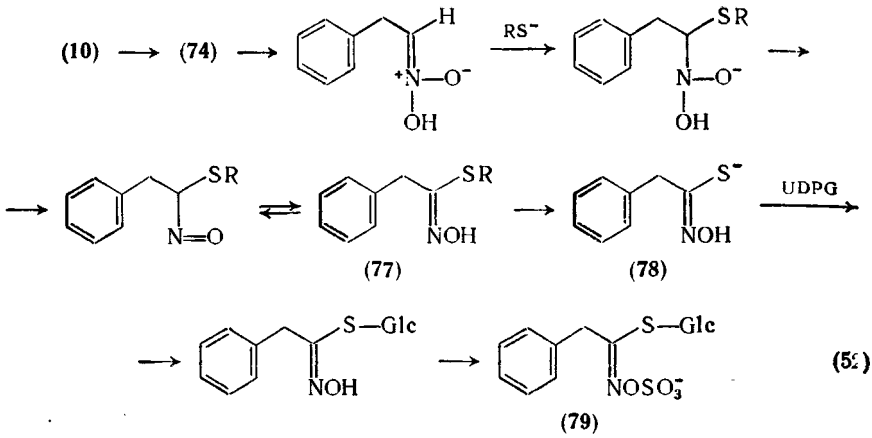
Ароматические аминокислоты, полученные шикиматным путем, могут использоваться растениями для синтеза различных природных веществ, например беталаиновых пигментов у Centrospermae (см. гл. 30.1), индолилуксусной кислоты из *L*-триптофана [94], арилтиоглюкозидов и цианогенных глюкозидов. Агликоны ароматических цианогенных глюкозидов образуются из C_6—C_2-N-фрагмента, возникающего после потери аминокислотой α-карбоксильной



группы. Используя метод меченых атомов, Конн и сотр. [95] установили путь биосинтеза пруназина (**76**) у *Prunus laurocerasus* включающий два альтернативных перехода от оксима (**74**) к цианогидрину (**75**) (схема 51). Этот путь биосинтеза цианогенных глюкозидов тесно связан с путем биосинтеза ароматических тиогликозидов, например глюкотропеолина (**79**) у *Tropaeolum majus* (схема 52) [96, 97]. Происхождение атома серы в ионе тиогидроксимата (78) до сих пор не установлено, хотя было показано, что в него способен активно включаться атом серы *L*-цистеина



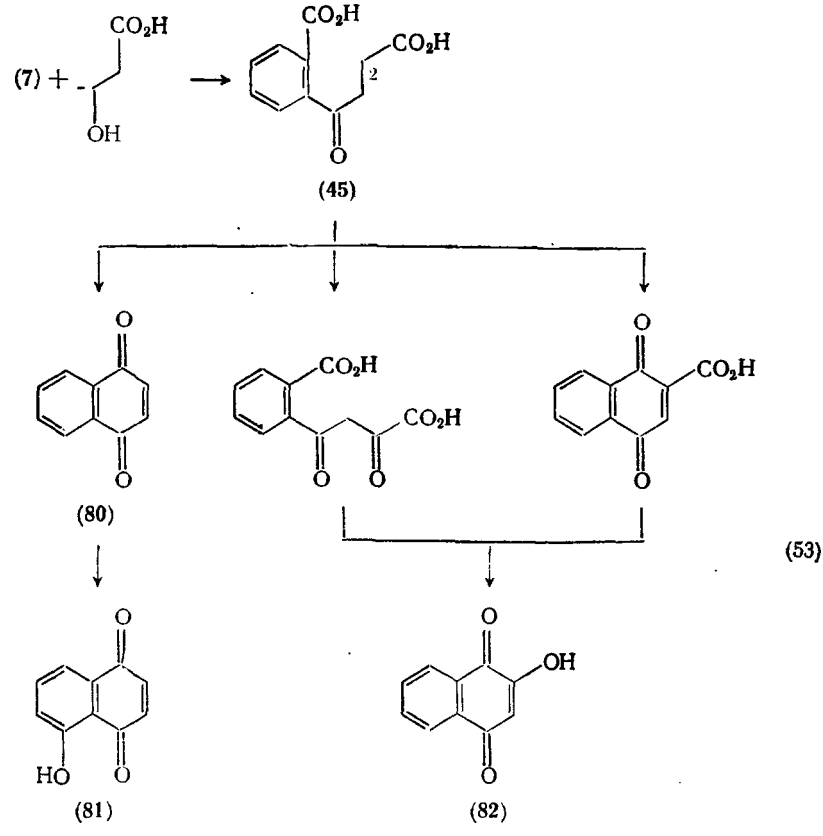
Предполагают [98], что сначала из *L*-цистеина и *аци*-нитросоединения образуется молекула тиогидроксимовой кислоты [(77); $R = CH_2CH_2CH(NH_3^+)CO_2^-$], которая затем превращается в соединение (78) под действием С—S-лиазы или аналогичного фермента.



(5[illegible])

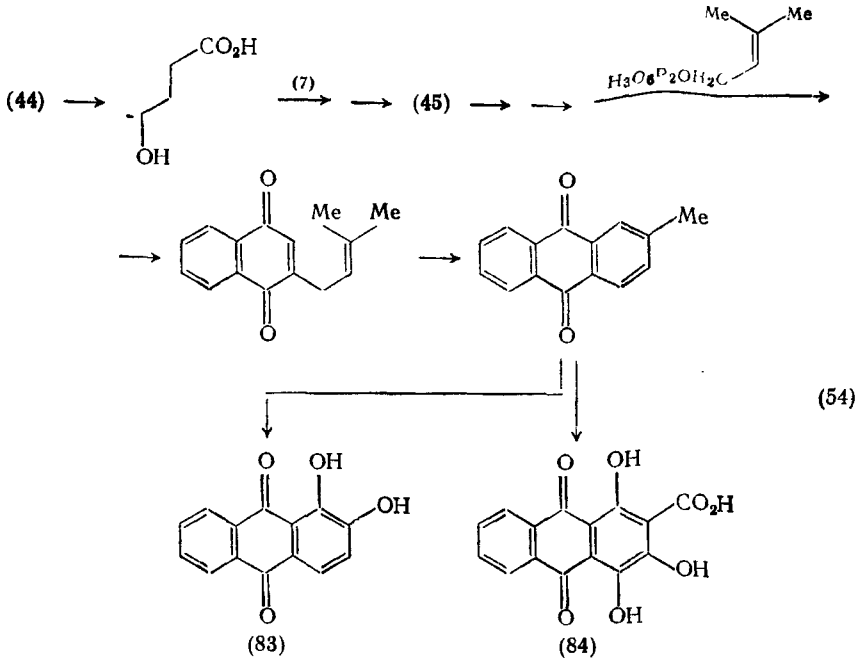
Хиноны образуют один из самых обширных классов красящих веществ растений. Однако биологическая роль этих соединений, за исключением различных изопреноидных хинонов (например, пластохинонов), изучена мало. По химическому строению они подразделяются на три основных типа, содержащих бензо-, нафто- и антрахиноновые ядра. Наиболее интересно возникновение циклической нафтохинонной системы юглона (81) и лавсона (82), ароматические ядра которых образуются из (—)-шикимовой кислоты (7) и трехуглеродного фрагмента, источником которого служит *L*-глутаминовая кислота; процесс их образования напоминает синтез нафтохиноновых ядер менахинонов (см. разд. 30.3.4; схема 20). Несмотря на противоречивость экспериментальных данных, предполагают, что хиноны (81) и (82) образуются из промежуточного соединения (45). Экспериментально показано [99, 100], что 1,4-нафтохинон (80) является промежуточным продуктом биосинтеза юглона (81). В то же время было показано [101], что соединения типа (80) не могут участвовать в биосинтезе лавсона (82). В результате экспериментов с применением [3,4-$^{14}C_2$]-*L*-глутаминовой кислоты и [2-^{14}C]ацетата натрия было установлено, что гидроксильная группа лавсона (82) присоединена к углеродному атому, который первоначально был С-2-атомом промежуточно образующейся кислоты (45). С учетом этих данных были предложены два альтернативных пути перехода от промежуточного соединения (45) к лавсону (схема 53) Хотя структуры юглона и лавсона очень близки, имеющиеся данные позволяют утверждать, что они

образуются из общего промежуточного соединения (45) различными путями.



(53)

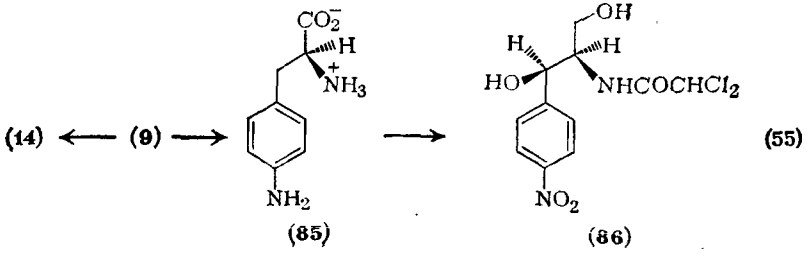
Наибольшее число хинонов обнаружено в растениях семейства мареновых, в том числе антрахиноны — ализарин (**83**) и псевдопурпурин (**84**). Согласно экспериментальным данным, эти антрахиноны образуются из нафтохинонового предшественника, причем третье ароматическое кольцо создается из разветвленной C_5-цепочки (которая образовалась из мевалоната) в результате ее циклизации и окисления [102]. Получены противоречивые данные о природе нафтохинонового промежуточного соединения, которое биосинтетически образуется из кислоты (**45**), и об участии 1,4-нафтохинона (**81**) в качестве промежуточного продукта в биосинтезе ализарина (**83**) у *Rubia tinctora* [103, 104]. Примерный путь биосинтеза этих антрахинонов в семействе Rubiaceae показан на схеме (54).



(54)

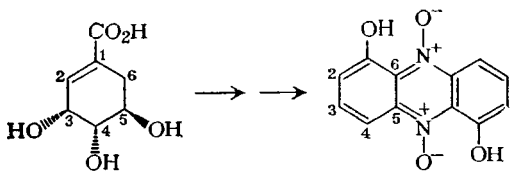
30.3.7. БИОСИНТЕЗ ДРУГИХ МЕТАБОЛИТОВ

Наряду с ароматическими α-аминокислотами и изопреноидными хинонами шикиматным путем образуется также *п*-аминобензойная кислота (**14**), являющаяся основным структурным элементом коферментов ряда фолиевой кислоты (см. разд. 24.3.3.1). Детали биосинтеза этой кислоты до сих пор не выяснены. Показано [105], что амидная группа *L*-глутамина является предшественником аминогруппы *п*-аминобензойной кислоты; на основании этого было высказано предположение, что предшественником *п*-аминобензойной и антраниловой (**35**) кислот во многих системах служит хоризмовая кислота (**9**) [106, 107]. Не выяснено происхождение ариламиногруппы *п*-аминофенилаланина (**85**), который был выделен из *Vigna vexillata* [108]. Аминокислота (**85**) участвует в биосинтезе антибиотика хлорамфеникола (**86**) в культуре *Streptomyces venezuelae* [109] (схема 55).



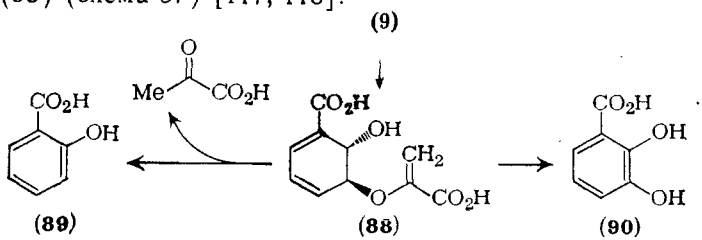
(55)

Интересны попытки выяснения путей построения феназиновой системы микроорганизмами. Несмотря на то, что имеется мало данных, подтверждающих оригинальное предположение Картера и Ричардса [110] о том, что феназиновое ядро образуется в результате соединения двух молекул антраниловой кислоты, многие исследователи [111, 112] считают, что промежуточное соединение типа $C_6—C_1—N$, образующееся из хоризмовой кислоты (**9**), является прямым предшественником феназинов в микробных системах. Деградацией пигмента иодинина (**87**), полученного из различным образом меченных шикимовых кислот (**7**), было установлено, что предшественник включается в состав метаболита в соответствии со схемой (56). Дальнейшие работы в данной области были посвящены выяснению деталей образования различных феназинов из первоначального феназинового предшественника [113, 114].



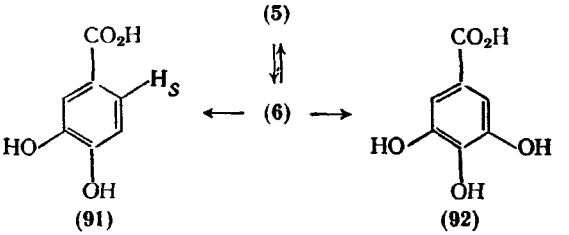
(**7**) (**87**) (56)

В заключение следует упомянуть некоторые фенолкарбоновые кислоты: салициловую (**89**), 2,3-дигидроксибензойную (**90**), протокатеховую (**91**) и галловую (**92**), которые являются продуктами метаболизма различных микроорганизмов. Салициловая и 2,3-дигидроксибензойная кислоты участвуют, по-видимому, в процессах усвоения железа микроорганизмами: салициловая кислота является структурным компонентом микобактинов (ряда производных гидроксамовых кислот [115]), а кислота (**90**)— структурной единицей энтерохелина (железосвязывающего метаболита [116]). Показано, что обе эти кислоты образуются из изохоризмовой кислоты (**88**) (схема 57) [117, 118].



(**89**) (**88**) (**90**) (57)

Давно известно, что алициклические предшественники, например (—)-хинная кислота (**4**), могут легко ароматизироваться в низших грибах, дрожжах и бактериях с образованием фенольных соединений. Это достигается катаболизмом субстрата до протокатеховой кислоты (**91**), разлагающейся далее обычно по β-кетоадипинатному пути. Метаболизм хиниой кислоты начинается с ее пре-



(91) (92) (58)

вращения в 3-дегидрохинную (**5**) и 3-дегидрошикимовую (**6**) кислоты. Под действием фермента 3-дегидрошикиматдегидратазы далее 3-дегидрошикимовая кислота превращается в протокатеховую кислоту путем элиминирования протона и гидроксильной группы при С-5 [119]. Эта реакция элиминирования связана с потерей 6-*pro*-(*R*)-водородного атома и поэтому имеет общую *син*-стереохимию [120]. С помощью меченых соединений [121] были получены данные, которые косвенным образом подтвердили предположение о том, что галловая кислота (**92**), являющаяся метаболитом *Phycomyces blakesleeanus*, образуется дегидрированием 3-дегидрошикимовой кислоты и что дегидратация этого же субстрата в культуре *P. blakesleeanus* приводит к протокатеховой кислоте (**91**) [121] (схема 58). Интересно отметить, что наряду с общепринятым механизмом биогенеза фенолов в высших растениях, состоящем в гидроксилировании предварительно образовавшегося ароматического субстрата, возможно прямое образование фенольной гидроксильной группы за счет кислородных атомов алифатического субстрата (см. схемы 57 и 58).

ЛИТЕРАТУРА

1. *H. O. L. Fischer and G. Dangschat*, Helv. Chim. Acta, **1935**, **18**, **1206**.
2. *B. D. Davis*, Adv. Enzymol., 1955, **16**, 287.
3. *D. B. Sprinson*, Adv. Carbohydrate Chem., 1960, **15**, 235.
4. *F. Gibson and J. Pittard*, Bact. Rev., 1968, **32**, 468.
5. *B. A. Bohm*, Chem. Rev., 1965, **65**, 435.
6. *E. Haslam*, 'The Shikimate Pathway', Butterworths, London, 1974.
7. *A. B. DeLeo and D. B. Sprinson*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1968, **32**, 873.
8. *D. K. Onderka and H. G. Floss*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 5894.
9. *D. K. Onderka, H. G. Floss, and M. Carroll.*, Biol. Chem., 1972, **247**, 736.
10. *K. R. Hanson and I. A. Rose*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 1963, **50**, 981.
11. *M. J. Turner, B. W. Smith, and E. Haslam*, J. C. S. Perkin I, 1975, 52.
12. *J. R. Butler, W. L. Alworth, and M. J. Nugent*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 1617.
13. *W. E. Bondinell, J. Vnek, P. F. Knowles, M. Sprecher, and D. B. Sprinson*, J. Biol. Chem., 1971, **246**, 6191.
14. *R. Ife, L. F. Ball, P. Lowe, and E. Haslam*, J. C. S. Perkin I, 1976, 1776.
15. *R. K. Hill and G. R. Newkome*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 5893; *R. McGrindle, K. H. Overton, and R. A. Raphael*, J. Chem. Soc., 1960, 1560.
16. *U. Weiss, C. Gilvarg, E. S. Mingioli, and B. D. Davis*, Science, 1954, **119**, 774.

17. *J. Dayan and D. E. Sprinson*, in 'Methods in Enzymology', ed. H. and C. W. Tabor, Academic Press, New York, 1970, vol. 17A, p. 559 [*Дж. Даян, Д. Е. Спринсон* — В кн.: Методы энзимологии. Пер. с англ. М.: Мир, 1973].
18. *G. L. E. Koch, D. C. Shaw, and F. Gibson*, Biochim. Biophys. Acta, 1970, **212**, 375, 387.
19. *J. Dayan and D. B. Sprinson*, Fed. Proc., 1968, **27**, 290.
20. *J. G. Levin and D. B. Sprinson*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1960, **3**, 157.
21. *L. M. Jackman and J. M. Edwards*, Austral. J. Chem., 1965, **18**, 1227.
22. *L. Pauling*, Nature, 1948, **161**, 706.
23. *P. O. Larsen*, Biochim. Biophys. Acta, 1964, **93**, 200; 1966, **115**, 529; 1967, **141**, 27.
24. *C. J. Morris, J. F. Thompson, S. Asen, and F. Irreverre*, J. Amer. Chem. Soc., 1959, **81**, 6069.
25. *P. O. Larsen, D. K. Onderka, and H. G. Floss*, Biochim. Biophys. Acta, 1975, **381**, 397, 409.
26. *J. B. Pridham*, Ann. Rev. Plant Physiol., 1965, **16**, 13
27. *F. Lingens, B. Sprössler, and W. Goebel*, Biochim. Biophys. Acta, 1966, **121**, 164.
28. *E. L. Tatum and D. Bonner*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1944, **30**, 30.
29. *C. Yanofsky*, Bacteriol. Rev., 1960, **24**, 221.
30. *D. A. Jackson and C. Yanofsky*, J. Biol. Chem., 1969, **244**, 4526, 4539.
31. *F. W. Hemming, R. A. Morton, and J. F. Pennock*, Proc. Roy. Soc., 1963, **158B**, 291.
32. *C. M. Allen, W. Alworth, A. MacRae, and K. Bloch*, J. Biol. Chem., 1967, **242**, 1895.
33. *F. Gibson and M. I. Gibson*, Biochim. Biophys. Acta, 1962, **65**, 160.
34. *R. E. Olson*, Vitamins and Hormones, 1966, 24, 551.
35. *G. R Whistance, D. R. Threlfall, and T. W. Goodwin*, Biochem. J., 1967, **105**, 145.
36. *P. Friis, G. D. Daves, and K. Folkers*, J. Amer. Chem. Soc., 1966, **88**, 4754.
37. *F. Gibson, I. G. Young, and P. Stroobant*, J. Bacteriol, 1972, **109**, 134.
38. *F. Gibson, I. G. Young, R. A. Leppik, and J. A. Hamilton*, J. Bacteriol., 1972, **110**, 18.
39. *I. M. Campbell, D. J. Robins, N. Kelsey, and R. Bentley*, Biochemistry, 1971, **10**, 3069; *R. Bentley*, Pure Appl. Chem., 1975, **41**, 47.
40. *K. H. Scharf, M. H. Zenk, H. G. Floss, K. D. Onderka, and M. Carroll*, Chem. Comm., 1971, 576.
41. *R. M. Baldwin, C. D. Snyder, and H. Rapoport*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 276.
42. *M. M. Leduc, M. P. Dansette, and R. G. Azerad*, European J. Biochem., 1970, **15**, 428.
43. *E. Grotzinger and I. M. Campbell*, Phytochemistry, 1972, **11**, 675.
44. *H. S. Mason*, Science, 1957, **125**, 1185; Adv. Enzymol., 1957, **19**, 79.
45. *S. Kaufman*, Adv. Enzymol., 1971, **35**, 245.
46. *G. A. Hamilton*, Adv. Enzymol., 1969, **32**, 55
47. *J. W. Daly, D. M. Jerina, and B. Witkop*, Experentia, 1972, **28**, 1129.
48. *D. M. Jerina, J. W. Daly, B. Witkop, P. Zaltman-Nirenberg, and S. Udenfriend*, Biochemistry, 1970, **9**, 147.
49. *D. R. Boyd, J. W. Daly, and D. M. Jerina*, Biochemistry, 1972, **11**, 1961.
50. *G. W. Kirby, W. R. Bowman, and W. R. Gretton*, J. C. S. Perkin I, 1973, 218.
51. *T. Nagatsu, M. Levitt, and S. Udenfriend*, J. Biol. Chem., 1964, **239**, 2910.
52. *Y. Ishimura, M. Nozaki, O. Hayaishi, Y. Nakamura, M. Tamura, and I. Yamazaki*, J. Biol. Chem., 1970, **245**, 3593.
53. *A. Butenandt*, Angew. Chem., 1957, **69**, 16.
54. *H. Brockmann and H. Lackner*, Chem. Ber., 1967, **100**, 353.
55. *H. Weissbach, G. B. Redfield, V. Beaven, and E. Katz*, J. Biol. Chem., 1965, **240**, 4377.
56. *E. Katz and H. Weissbach*, J. Biol Chem., 1963, 238, 666.
57. *A. J. Birch, D. W. Cameron, P. W. Holloway, and R. W. Rickards*, Tetrahedron Letters, 1960, 26; *R. B. Herbert*, ibid., 1974, 4525.

58. *L. Salzman, H. Weissbach, and E. Katz*, Arch. Biochem Biophys., 1969, **130**, 536.
59. *N. N. Gerber*, Canad. J. Chem., 1968, **46**, 790.
60. *H. Blaschko, J. Physiol.*, 1939, **96**, 50P.
61. *T. Nagatsu, M. Levitt, and S. Udenfriend*, Analyt. Biochem., 1964, **9**, 122.
62. *E. Y. Levin and S. Kaufman*, J. Biol. Chem., 1961, **236**, 2043.
63. *S. Kaufman and S Friedman*, J. Biol. Chem., 1965, **240**, PC 552.
64. *R. V. Pitt-Rivers and R. R. Cavalieri*, in 'The Thyroid Gland', ed. R. V. Pitt-Rivers and W. R. Trotter, Butterworths, London, 1964, vol. 1.
65. *H. S. Raper*, Biochem. J., 1927, **21**, 89; J. Chem. Soc., 1938, 125.
66. *H. S. Mason*, J. Biol. Chem., 1948, **172**, 83.
67. *G. A. Swan and A. Waggott*, J. Chem. Soc. (C), 1970, 1409.
68. *G. A. Swan, J. A. G. King, A. Percival, and N. C. Robson*, J. Chem. Soc. (C), 1970, 1419.
69. *W. A. Newton, Y. Morino, and E. E. Snell*, J. Biol. Chem., 1965, **240**, 1211.
70. *S. Sawada, H. Kumagi, H. Yamada, and R. K. Hill*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 4334.
71. *C. Fuganti, D. Ghiringhelli, D. Giangrasso, and P. Grasselli*, J. C. S. Chem. Comm., 1974, 726.
72. *G. E. Syke, R. Potts, and H. G. Floss*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 1593.
73. *E. A. Havir and K. R. Hanson*, Biochemistry, 1968, **7**, 1896, 1904.
74. *M. R. Young, G. H. N. Towers, and A. C. Neish*, Canad. J. Bot., 1966, **44**, 341.
75. *E. A. Havir and K. R. Hanson*, Arch. Biochem. Biophys., 1970, **141**, 1.
76. *D. S. Hodgins*, Arch. Biochem. Biophys., 1972, **149**, 91.
77. *K. R. Hanson, R. H. Wightman, J. Staunton, and A. R. Battersby*, J. C. S. Perkin I, 1972, 2355.
78. *R. Ife and E. Haslam*, J. Chem. Soc. (C), 1971, 2818.
79. *I. L. Givot, T. A. Smith, and R. H. Abeles*, J. Biol. Chem. 1969, **244**, 6341.
80. *E. A. Havir, P. D. Reid, and H. V. Marsh*, Plant Physiol., 1971, **48**, 130; 1972, **50**, 480.
81. *P. G. Strange, J. Staunton, R. H. Wiltshire, A. R. Battersby, K. R. Hanson, and E. A. Havir*, J. C. S. Perkin I, 1972, 2364.
82. *A. C. Neish*, in 'Biochemistry of Phenolic Compounds', ed. J. B. Harborne, Academic Press, New York, 1964, p. 294 [*А. Нейш.* — В кн.: Биохимия фенольных соединений. — Пер. с англ. М.: Мир, 1968].
83. *D. W. Russell, E. E. Conn, A. Sutter, and H. Grisebach*, Biochim. Biophys. Acta, 1968, **170**, 210.
84. *M. H. Zenk and N. Amrhein*, Phytochemistry, 1969, **8**, 107.
85. *A. Sutter and H. Grisebach*, Phytochemistry, 1969, **8**, 101.
86. *E. Haslam, L. J. Porter, D. Jacques, and C. T. Opie*, J. C. S. Perkin I, 1977, 1637.
87. *K. Freudenberg*, Pure Appl. Chem., 1962, **5**, 9.
88. *T. Higuchi*, Adv. Enzymol., 1971, **34**, 207.
89. *T. A. Geissman and E. Hinreiner*, Bot. Rev., 1952, **18**, 165.
90. *M. H. Zenk*, in 'Biosynthesis of Aromatic Compounds', ed. G. Billek, Pergamon, Oxford, 1965, p. 45. [М. Н. Зенк. — В кн.: Биосинтез ароматических соединений. — Пер. с англ. М.: Мир, 1968].
91. *S. Z. El-Basyouni, D. Chen, R. K. Ibrahim, A. C. Neish, and G H. N. Towers*, Phytochemistry, 1964, 3, 485.
92. *M. H. Zenk*, Z. Naturforsch., 1964, 19b, 83.
93. *P. M. Dewick and E. Haslam*, Biochem. J., 1969, 113, 537.
94. *K. V. Thimann*, J. Biol Chem., 1935, 109, 279.
95. *B. A. Tapper, H. Zilg, and E. E. Conn*, Phytochemistry, 1972, 11, 1047.
96. *W. E. Underhill, M. D. Chisholm, and L. R. Wetter*, Canad. J Biochem., 1962, **40**, 1505.
97 *M. Matsuo, D. F. Kirkland, and W. E Underhill*, Phytochemistry, 1972, **11**, 697.
98. *L. R. Wetter and W. E. Underhill*, Plant Physiol., 1969, **44**, 584.

99. *M. M. Leduc, P. M. Dansette, and R. G. Azerad,* European J. Biochem., 1970, **15,** 428.
100. *K.-H. Scharf, M. H. Zenk, D. K. Onderka, M. Carroll, and H. G. Floss,* Chem. Comm., 1971, 576.
101. *E. Grotzinger and I. M. Campbell,* Phytochemistry, 1972, **11,** 675.
102. *R. H. Thompson and A. R. Burnett,* J. Chem. Soc. (C), 1967, 2100; 1968, 850, 854, 2437.
103. *M. H. Zenk and E. Leistner,* Tetrahedron Letters, 1968, 861, 1395.
104. *E. Leistner,* Phytochemistry, 1973, **12,** 337.
105. *P. R. Srinivasan and B Weiss,* Biochim. Biophys. Acta, 1961, **51,** 597.
106. *K. H. Altendorf, A. Bacher, and F. Lingens,* Z. Naturforsch., 1969, **24b,** 1602.
107. *R. A. Jensen, W. H. Holmes, and J. F. Kane,* J. Biol. Chem., 1972, **247,** 1587.
108. *G. A. Dardenne, P. O. Larsen, and E. Wieczorkowska,* Biochim. Biophys. Acta, 1975, **381,** 416.
109. *L. C. Vining, V. S. Malik, and D. W. S. Westlake,* Lloydia, 1968, **31,** 355.
110. *R. E. Carter and J. H. Richards,* J. Amer. Chem. Soc., 1961, **83,** 495.
111. *U. Hollstein and D. A. McCamey,* J. Org. Chem., 1973, **38,** 3415.
112. *F. G. Holliman, R. B. Herbert, and J. B. Sheridan,* Tetrahedron Letters, 1974, 4201.
113. *M. E. Flood, R. B. Herbert, and F. G. Holliman,* J. C. S. Perkin I, 1972, 622.
114. *G. S. Hansford, E. G. Holliman, and R. B. Herbert,* J. C. S. Perkin I, 1972, 103.
115. *G. A. Snow,* Bacteriol. Rev., 1970, **34,** 99.
116. *I. G. O'Brien and F. Gibson,* Biochim. Biophys. Acta, 1970, **215,** 393.
117. *I. G. Young and F. Gibson,* Biochim. Biophys. Acta, 1969, **177,** 348, 401.
118. *B. J. Marshall and C. Ratledge,* Biochim. Biophys. Acta, 1972, **264,** 106.
119. *S. R. Gross,* J. Biol. Chem., 1958, **233,** 1146.
120. *K. H. Scharf, M. H. Zenk, D. K. Onderka, M. Carroll, and H. G. Floss,* Chem. Comm., 1971, 765.
121. *P. F. Knowles, E. Haslam, and R. D. Haworth,* J. Chem. Soc.,1961, 1854.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абеквоза 254
Абсцизовая кислота 513
Аверуфин 376, 449
Авоцеттин 513
Агар 250, 296
Агароза 214, 250, 275, **286, 318**
Агглютинины 264
Агроклавин 353, 355
Аденокарпин 562 сл.
Адреналин 707 сл.
Азелаиновая кислота 55
Аймалицин 609, 612
Актинидин 621
Актиномицеты 362
Актиномицины 706
Актиноцин 706
Актиноэритрин 536
Акуаммицин 609, 613
Аланин 554, 711
Алеуритовая кислота 21
Ализарин 382, 718
Алкалоиды 540—625
Аллит 178
Аллоза 129, 132, 180, 186
Аллоксантин 532
Аллопиранозиды 143, 176, 182, 184, 187, 190
Аллоседеридин 558
Альгиновые кислоты 214, 249, 253
Альдаровые кислоты 150
Альдиты 128, 218, 225
Альдозулозы 150
Альдозы 128, 130, 155, 254
Альдоновые кислоты 148 сл.
Альдуроновые кислоты 149 сл.
Альпинигенин 586
Альтенуевые кислоты 373 сл., 387
Альтенузин 360, 370 сл., 373 сл., 384, 386 сл., 389
Альтернариол 359, 361, 365, 370, 384, 422, 444
Альтернуен 386
Альтроза 129, 132 сл., 144, 175
Альтрозиды 134, 143 сл., 153, 170
Амарантин 623
Амилоза 211, 213, 219, 236 сл., 248, 283
Амилоиды 248
Амилопектин 213, 228, 235 сл., 248, 288
Аминокислоты 127, 321, 343, 351 сл., 405 сл., 693 сл., 702 сл.
Аминосахара 179—185, 226
Амирин 503
Амфотерицин В 460
Анабазин 543, 555 сл., 562 сл., 568
Анатабин 543, 561 сл., 568
Анаферин 559
Ангаламин 570
Ангалонидин 570, 607
Ангеликовая кислота 551
Ангидросахара 164, 166 сл.
Ангидротетрациклин 350
Андростадиендион 497
Андростендион 497
Андроцимбин 590
Аннулолин 623 сл.
Анонаин 580
Ансамицины 378
Антибиотики 206, 462, 464
Антоцианидины 440
Антраноиласпарагиновая **кислота 605**
Антранол(ы) 369, 376
Апиоза 193 сл.
Апопротеины 123
Апорфин 575 сл.
Аппарицин 615
Арабиковая кислота 241
Арабинаны 213, 244
Арабинаровая кислота 150
Арабинит 178
Арабино-*D*-галактан(ы) 242, **245,** 247
D-Арабиноза 128 сл., 132, 150, 159, 209
L-Арабиноза 175, 214, 241, 243, 245 сл., 265
Арабинозиды 176, 191
Арабиноксиланы 214, 219, 243, 296
Арабинофурананы 245
Арахидоннловый спирт 57
Арахидоновая кислота 17, 32, 36
Арборин 604
Аргинин 548, 550
Артемизиа-кетон 508
Артемизиловый спирт 508
Аспарагин 265, 403
Аспарагиновая кислота 406, 550, **568,** 711
Аспергнлловая кислота 351 сл.
Асперлин 410
Астаксантин 536
Атровенетин 367 сл.
Атроментин 352
Ауроглауцин 444, 454
Ауроны 438
Аутумналин 590 сл.
Аутумнариол 384
Афлатоксины 352, 374 сл., 449, **452,** 454
N-Ацетилнейраминовая кислота 78
O-Ацетилсерин 405
Ацетогенины 407

Бактериородопсин 122 сл.
Бактериоруберин 530
Бактериохлорофилл(ы) 663, 666 сл.
Барнон 362
Бассианин 456, 477
Батиловый спирт 76
Бензилизохинолины 573 сл., 577, 580 сл.
Берберин 582 сл.
Беталаины 622
Беталамовая кислота 622
Бетаиндин 623
Бетанин 622 сл.
Билан(ы) 646, 650 сл.
Бислои липидные 110 сл., 115 сл.
Болдин 576 сл.
Брадикинин 332
Брефальдин А 457
Бромелаин 264
Бруцин 366
Бульбокапнин 575 сл.

Вазицин 605
Вакценовая кислота 13, 16, 42
Валериановая кислота 548
Валин 373, 379, 390, 436, 507, 624 сл.
Ванилинамин 624
Ванилин 572
Веразин 620
Вератрамин 618, 621
Верзиколорин(ы) 375 сл., 449
Виланда — Гумлиха альдегид 613
Вильфордовая кислота 568
Виндолин 609, 613 сл.
Винкамин 615
Винкозид 610 сл., 615 сл.
L-Винная кислота 130
Виолаксантин 531
Виолацен 355
Виридикатин 352
Виридин 502
Витамины
A 521, 537 сл.
B_{12} 670 сл., 673 сл., 680 сл.
D_3 499
K_1 и K_2 700
L_2 190
Виттатин 598
Воска 70, 72, 102

Галактаны 213, 227, 244 сл., 250
Галактаровая кислота 131, 150
Галактит 178
D-Галакто-*L*-арабиноза 241
D-Галакто-*D*-глюко-*D*-маннаны 247
D-Галактоза 73, 132, 140, 150, 160, 175, 179, 189, 204, 209, 214 сл., 227, 244, 265
L-Галактоза 214
D-Галактозамин 210
Галактозид(ы) 169, 176
Галактозилгалактоза 73
Галактокаролоза 213, 256
D-Галакто-*D*-маннан(ы) 212, 243
D-Галактоновая кислота 140
Галактопиранозиды 164, 189
Галактопиранозилбромид 206
D-Галактопиранозил-*D*-глюкоза 202
D-Галактопиранозил-*D*-фруктофуранозид 205
D-Галактопирануроновая кислота 210
«Галакто»-сахароза 205
D-Галактуронан(ы) 213, 244 сл.
Галактуроновая кислота 131, 149
Галантамин 593
Галантин 593, 595, 597
Галловая кислота 385, 685, 714, 720 сл.
D-Галоза 129
Гамамелоза 193
Ганглиозиды 78
Гаптоглобулин 264
Гардеропорфириноген 654 сл.
Гармалан 607
Гарман 607 сл.
Гейсошизаль 613
Гейсошизин 612
Гексозы 128, 158, 179, 207, 209, 254
Гексулозы 152, 158
Гелеобразования точка 310
Гелиобазидин 511
Гелиосупин 551
Гельдамицин 377 сл., 464
Гем 634 сл., 644, 655, 658 сл.
Гемантамин 593 сл., 598 сл.
Гемантидин 598
Гематиновая кислота 636, 653
Гемицеллюлоза 239, 245—247
Гемокорин 366, 383
Гемопротеины 659
Гентизиловый спирт 432
Гепарин 259 сл.
Геранилгераниллирофосфат 353, 492, 514, 518, 521 сл.
Геранилгераниол 313, 483, 667
Геранилпирофосфат 485, 491, 505 сл.
Гераниол 313, 483, 506 сл., 609, 615, 617, 621
Герксинон(ы) 348, 367 сл., 444
Гетерогликаны 209, 211 сл., 214, 244
Гиалуронат 286
Гиалуроновая кислота 214, 234, 258, 283
Гиббановый альдегид 517
Гиббереллиновая кислота 514, 516, 518 сл.
Гиббериллины 516
Гигрин 540, 544 сл., 551
Гигриновая кислота 545
Гидрастин 584
Гидроксикаротиноиды 531
Гиосциамин 543 сл.

Гистамин 625
Гистидин 625
Глауцин 577 сл.
Гликали 196
Гликаны 209
Гликаровые кислоты 128
Гликоген(ы) 208, 213, 228, 257, 288
Гликозаминогликаны 214, 216 сл., 258—263, 283
Гликозиды 128 сл., 159—164, 196, 206, 218, 343, 358
Гликозилдиглицериды 81
Гликозилцерамиды 78
Гликолипиды 70, 73, 107, 110, 118 251
Гликопептиды 251
Гликопиранозиды 163
Гликопротеины 108, 121, 214, 228, 251, 263—273, 283
Гликосфинголипиды 78, 100 сл., 105
Глицеральдегид-3-фосфат 398, 405
Глицериды 38, 64, 67, 71, 83 сл., 89 сл., 93 сл., 104, 118
Глицерин(ы) 70 сл., 73 сл., 76, 85, 87, 90 сл., 93, 96 сл., 102, 104, 118, 220 сл., 550
D-Глицеро-*D*-галакто-2-нонулозоновая кислота 210, 215 сл., 254
Глицеролипиды 102
Глицерофосфат(ы) 70, 74 сл.
Глицерофосфатидилхолин 94
Глицерофосфорилхолин 76
Глицерофосфосерин 96
Глицерофосфохолин 96 сл.
Глицерофосфоэтаноламин 96
Глицидол 94
Глиции 467, 636 сл., 695
Глутамин 403 сл., 696
Глутаминовая кислота 403, 406, 547, 701, 717
Глутаровая кислота 713
Глюкан(ы) 209, 213, 222, 248
Глюкоза(ы) 127 сл., 130 сл., 147 сл., 155, 159, 164, 179, 186, 204, 208 сл., 215, 236 сл., 239, 246, 248, 252 сл., 257 сл., 265, 343, 358
Глюкозамин 179, 210, 378
α-Глюкозил-β-фруктофуранозид 205
Глюкозофосфат 236, 406
Глюкоманнаны 243, 246 сл.
Глюкоманнозид 176
Глюконовые кислоты 139, 204
Глюкопираноза(ы) 136, 148, 161, 167, 174, 179, 206, 210, 286
Глюкопиранозид(ы) 131, 134, 142 сл., 149, 152 сл., 159, 161, 163 сл., 176, 182, 186 сл., 188 сл., 204 сл.
Глюкопиранозилгалогениды 135, 146, 161, 196
α-*D*-Глюкопиранозил-α-*D*-глюкопиранозид 202
α-*D*-Глюкопиранозил-β-*D*-фруктофуранозид 127, 202
Глюкопирануроновая кислота 210, 241
Глюкотропеолин 716
Глюкоуроноксиланы 214
Глюкофураноза 141, 145, 149, 170, 174, 179
Глюкуроновая кислота 149, 214, 216, 224, 241, 244, 247
Глюцит(ы) 128, 138, 147 сл., 177 сл.
Голафилламин 618
Голафиллин 618
Гомоапорфины 591 сл.
Гомогликаны 209, 211, 246
Гомомевалоновая кислота 490
Гомоцистеин 405
Гонадотропины 264 сл.
Горденин 568
Госсипол 387
Гравеолин 601, 604
Грамин 605 сл.
Гризеофенон А 389
Гризеофульвин 389, 445, 447, 472 сл.
Грифолин 429
Групповые вещества крови 272 сл.
Гулит 128, 147
Гулоза 128 сл., 132, 147, 176
Гулофуранозид 146, 176
Гулуроновая кислота 149, 210, 214, 249 сл.
Гуммиарабик 128, 241, 291
Гумулоны 436 сл.
Гуттаперча 313 сл.

Дамасценин 601
Дафнилактон В 622
Дафнифиллин 621
Дезозамин 179, 363
Дезокси-*D*-арабиногептулозонат-7-фосфат 686
Дезоксисахара 189 сл., 196
Дейтеропорфирин 658
Декапреноксантин 527 сл.
Декарбоксиуропорфириноген III 675
Декодин 563 сл.
Декстран(ы) 213, 253, 273, 275, 291
Демеколцин 590
Деметилстеригматоцистин 375
Деметилтетрациклин 361
Дендробин 513, 621
Дерматан 208
Дерматансульфат 214, 260, 263, 286
Десмостерин 496
Децинин 564
Диаболин 613
Дигалактозилцерамид 78
Дигидрокси-3-метилвалериановая кислота 484

Диглицериды 67, 71, 83, 89, 91, 103 сл.
Дигликозилцерамиды 78
Диктамнин 602 сл.
Дилаурилфосфатидилэтаноламин 112
Диметилаллилпирофосфат 313, 353, 506
Димиристоил-*DL*-фосфатидилэтаноламин 112
Диморфеколовая кислота 21
Диоскорин 559
Дипальмитоилфосфатидилхолин 111, 125
Дисиалоганглиозид 78
Дитерпеноиды 483, 492, 514 сл.
Дифенилпикрилгидразил 304
Дифосфоинозитид 80
Дицентрин 577 сл.
Дицианокобаламин 671, 676
Дицианокобиамид 675
Дицианоиокобинамид 676 сл.
Диэпоксисквален 503
Долихотенин 625
Дотистромин 376
ДОФА 572, 574, 589, 705, 708
L-ДОФА-хинон 708
Дофамин 572 сл., 580, 583 сл., 589, 708
Дрименол 510

5-Енолпирувилшикимат-3-фосфат 686

Желатина 291
Железопорфирины 658
Желчные кислоты 499

β-Зеакаротин 525
Зеаксантин 528, 531 сл., 536
Зеараленон 457

D-Идит 178
Идоза(ы) 129, 132 сл., 141, 146, 191
Идозид(ы) 134, 169, 181
L-Идуроновая кислота 149, 210, 214, 216
Иервин 618, 620 сл.
Изоболдин 576 сл.
Изовалериановая кислота 625
Изованилин 572
Изовиикозид 610 сл., 616
Изогардеропорфириноген 655, 658
Изококлаурин 579
Изокорипальмин 585
Изокумарины 441
Изолейцин 436, 547, 551
Изолихенан 213, 247
Изоментол 508
Изоментон 508
Изопентенилпирофосфат 313 сл., 353, 485, 488 сл., 506
«Изопреновое правило» Ружички 483
Изопреноиды 353, 483, 490, 506, 698 сл.
Изосахариновые кислоты 156, 223
Изотебаин 577, 581
Изофлавоноиды 363, 379
Изофлавоны 439, 441
Изохоризмовая кислота 695, 701, 720
Иллюдины 513
2,3-Иминосквален 495
Иммуноглобулин(ы) 264, 269—272
Индикаксантин 622
Индол 606 сл., 696 сл., 709
(Индолил-3)глицерофосфат 696
Индолхинон 708
Интерферон 264
Инулин(ы) 213, 248
Иодинин 720
Иодопсин 538
Иохимбин 352, 355, 357
Ипекозид 617
Ипомеамарон 353
Иридодиаль 355
Иридоиды 356, 507
Исмин 599

5-*О*-(1-Карбоксивинил)шикимат-3-фосфат 686
Кадаверин 555 сл., 560 сл., 564 сл.
Казеин 264
Каликантин 608
Каллоза 213
Кальвина цикл 398
Камеди 240 сл.
Камптотецин 616 сл.
Камфора 506
Канадин 583 сл.
Канамицин В 179
Каннабиол 384
Кантаксантин 536
Капсаицин 624 сл.
Капсантин 532
Капсорубин 532
Каранин 597
о-(3-Карбоксипропионил)бензойная кислота 701
Кардиолипин 74, 81, 104, 110
Кареи-3 507
Карнегин 570
Карнитин 75
Каротиноиды 343, 397, 492, 521—538
Каррагинан 213, 250, 286, 295 сл.
Каталповая кислота 13, 26 сл.
Катарантин 609, 613 сл.
Катехины 440
Катехоламины 707
Кауровая кислота 517
Каурен 516
Кауренолиды 517
Каучук 313 сл.
Кверцетин 363
Квестин 448
Кератансульфат 214, 228, 258 261 сл., 283, 286

Кефалин 75
Кнуреннн 705 сл.
Клавулановая кислота 380
Клериантин 584
Клиндамицнн 188
Коацервация 291
Кобинамнд 672
Кобириновая кнслота 672, 674 сл., 677 сл., 680 сл.
Кобировая кнслота 672
Кодеин 580 сл.
Кодеинон 582
Койевая кислота 343, 358
Кокаии 544 сл.
Коклаурин 575, 579 сл.
Коллаген 264
Коломиновая кнслота 254
Колхицин 590, 598, 624
Кометаболиты 413, 442
Кометоза 254
Коннин 543 сл., 553 сл., 605
Конифериловый спирт 713
Коницеин 554
Конканавалин А 224
Копалилпирофосфат 517
Копропорфнрниоген III 635, 651, 654—658
Коптизин 584
Корндалин 583, 586
Коридин 577
Корннантеин 352, 356 сл., 612
Корнномиколовые кислоты 20
Корнолины 513
Коричная кислота и ее пронзводные 343, 416, 546, 556, 560 сл., 563, 572, 590, 710, 713
Корриины 406, 624, 664, 670—681
Кортизон 497
Кортнзалнн 455
Кофейная кислота 624, 713
Крахмал(ы) 127, 208, 234—238, 275, 297
Крейснгнн 591
Крейсигинон 591
Крепеииновая кислота 13, 18, 26
Кринин 600
Криогеиин 563
Криптоплеврин 553
Криптостилин-I 572
Кротонозни 579 сл.
Кротспарин 580
Ксантан 293 сл.
Ксантоксиновая кислота 513
Ксантомматин 706
Ксантоны 447
Ксиланы 213 сл., 246, 249
D-Ксило-*L*-арабиианы 243
Ксилоза(ы) 129, 132, 159, 191, 209 сл., 214, 242 сл., 246, 265
Ксилопиранозиды 143
Ксилотнапираноза 191
Ксимениновая кислота 19
Кулморин 513
Кумарнновая кислота 624
Кумаровая кислота 713
Курвуларин 457
Кускогигрин 544 сл.
Кутины 72 сл.

Лабдадиенилпнрофосфат 515, 517
Лабдадиенол 514
Лавадулол 508
Лавсон 717
Лактоза 202, 297
Лактозилцерамид 78
Ламннаран 213, 248, 256
Лаиостерин 355, 372, 484 сл., 494 сл., 501, 618
Лауданосолнн 583
Лаурнновая кислота 13 сл., 29
Леваны 213, 248, 253
Левулнновые кислоты 158, 635, 641 сл., 672
Лейцин 354, 382, 483, 488, 507, 571 сл., 625
Лектин 224
Лесквероловая кислота 21
Лецитин 75
Лигнаны 710
Лигнины 239, 710, 713
Лнзнн 265, 382, 543 сл., 554 сл., 563 сл., 568
Лизофосфатиднловые эфиры 76
Лизофосфатидилфенол 83
Лизофосфатндилхолин 81
Лизофосфатнднлэтаноламин 81
Лизоцим 230
Лнкоподин 564
Лнкоперсин 522 сл.
Ликопии 523 сл., 527 сл., 535, 538, 564 сл.
Ликореннн 597
Ликорнн 558, 593, 596 сл.
D-Ликсоза 129, 132, 150
Ликсознды 176, 187
Лнмоиен 360, 505, 507
Лнналилпнрофосфат 505
Линалоол 490, 507
Линкомицнн 188
Линолеат 43, 50, 63
Линолевая кислота 13 сл., 26, 31, 41, 46, 49, 52, 55, 61
Линоленовая кислота 13, 16 сл., 31 сл., 41 сл., 55, 61
Линэлаидиновая кислота 13, 34, 52, 55
Липиды 70—105
Липопротеины 107—125, 537
Литторин 546
Лихенан 213, 247, 249

Лобеланин 560
Лобелнн 556, 560
Лобиналин 560
Логанин 356, 372, 509, 609 сл., 615, 617, 621
Логановая кислота 621
Лонгифолен 510, 513
Лофоцерин 571
Лунарин 542
Лупанин 566
Лупеол 503
Лупинин 565, 567
Лупулоны 436 сл.
Люмиродопсин 538
Лютеин 531
Лютеоза 256
Люцензомицин 460

Магнофлорин 576
Макролиды 343, 459—464
Макромерин 572
Малоновая кислота 415
Мальваловая кнслота 13, 20
Мальтоза 203 сл., 219
Маннаны 209, 246, 249
Маннит 147 сл., 178
D-Манно-*D*-галактан 212
Маннноза 128 сл., 132, 136, 147, 155, 179, 189, 209 сл., 214 сл., 246, 286
Маннноновая кислота 139
Маннопиранозид 143, 164, 187, 190 сл., 195
Маннопирануроновая кислота 210
Маннуроновая кислота 149, 214, 249 сл.
Маноилоксид 353
Мантин 598
Матрин 567
Мевалдиновая кислота 489
Мевалоновая кислота 343, 353—355, 485—488, 571, 602, 699
Мезембренол 600
Мезембрин 543, 593—601
Мезопорфирин 636, 658
Мекамбрин 580
Меланин 707 сл.
Меликопицин 604
Мембраны биологнческие 107—125, 349
Менахиноны 701, 717
Ментол 508
Ментон 508
Мескалин 569 сл.
Метародопсин(ы) 538
Метасахариновые кислоты 156, 223
Метелоидин 545, 547
24-Метиленциклоартанол 501
Метилмасляная кислота 547, 571
5′-Метилтиоаденозин 190
Метимицин 179, 461
Метионин 405, 467, 469, 543, 568 сл., 573, 583 сл., 701, 707
Меченые соединения, применение 465—470
Миелин 107, 109, 112, 121, 123
Миколовые кислоты 20
Микомицин 19
Микоренин 597
Микофеноловая кислота 429, 433
Мимозин 568
Миоинозит 96
Мнристиновая кислота 13 сл., 29
Миристолеиновая кислота 16
Митомицин В 378
Моногликозилцерамиды 78
Монокроталин 551
Монокроталовая кислота 551
Монорден 457
Монотерпеноиды 492, 505—509
Монотерпены 355, 372, 609
Монтанин 598
Морфин 574, 580—582
Муконовая кислота 372 сл., 387
Мукополисахариды 216, 258 сл.
Мультифлорамин 591
Мурамовая кислота 253, 691
Муреины 252 сл.,
Муцнны 214, 264

Нандинин 584
Нарбомицин 461
Нарведин 595
Нарингенин 425 сл.
Наркотин 583 сл.
Нарциклассин 598 сл.
Нарциссидин 597
Нейроспорин 523, 525, 529
Неоксантин 531
Неомицин 358, 377
Неопинон 582
Нерилпирофосфат 505, 507
Нерол 507, 609
Неролидилпирофосфат 510
Неролидол 510
Нециевые кислоты 550
Нибомицин 377
Нигеран 213, 248
Никотин 529, 544, 547—550, 555 сл., 568
Никотинамидадениндинуклеотид 487
Никотиновая кислота 549 сл., 556, 562, 568
Нитросахара 179—185
Нитрофенилглюкуроннды 163
Нистатин 371, 459
Нойримицин 179
Нокардовые кислоты 20
Норадреналин 708
Норбелладнн 593 сл., 596 сл., 600
Норгеркеннон 361, 367 сл.

Норлауданосолин 573, 577, 580 сл.
Норплювиин 559, 593, 596, 598
Норпротосиномении 576, 578, 588
Норретикулин 575, 583
Нукленовые кислоты 343, 351
Нуклеотиды 343
Нуклеоцидин 185

Овальбумин 264
Овомуконд 264
Окенон 534
Оксепин 703
Оксоглутаровая кислота 641, 701
Оксокринин 598 сл.
Октадеценилпирролидины 38
Олеиновая кислота 13 сл., 31 сл., 42, 49, 52, 55, 60
Оливановые кислоты 380
Олигосахариды 107, 161 сл., 202—207, 225 сл., 325, 343
Оноцерин 503
Оммохромы 706
Опсин 538
Ориенталин 576 сл., 581
Орнитин 540, 543 сл., 547 сл., 550 сл., 605
Орозомукоид 268
Орселлиновые кислоты 349, 359, 373, 391 сл., 409 сл., 412, 417, 423 сл., 427, 433
Орицинол 424, 429
Офиоболины 518
Охотензимин 586

Палитантин 361
Пальматин 586
Пальмитиновая кислота 14, 28 сл.
Папаверин 574 сл.
Паратоза 254
Партрезин 448
Патулин 410, 432, 441
Пахиман 256
Пеганин 605
Пектины 244 сл.
Пектовая кислота 213
Пеллотин 570
Пельтьерин 543, 553, 555 сл., 558 сл., 564, 605
Пеницилловые кислоты 367, 380
Пенициллины 328, 343, 352, 366 сл., 380
Пеницилловая кислота 343, 348, 373, 391, 429, 441
Пентозы 128, 189
Пептидогликаны 252 сл.
Пептиды 321, 331, 343
Петрозелаидиновая кислота 16
Петрозелиновая кислота 16
Пигменты зрительные 538 сл.
Пилоцереин 572
Пимарадиены 514, 517
Пимарицин 460
Пинидин 555
Пиперезинол 714
Пипеколиновая кислота 558
Δ^1-Пиперидеин 556 сл., 559, 561, 563 сл., 567
Пиперитенон 508
Пиперитон 508
Пиранен-1-озы 196
Пиридоксальфосфат 404, 638, 709
Пировиноградная кислота 373, 406, 709
Пластохиноны 717
Платеномицин 461
Платидесмин 602 сл.
Плевромутилин 514, 516
Плювиин 597
Полнакрилаты 318
Полнамиды 308, 315 сл., 336
Полиацетилены 343, 411
Поливинилимидазол 336
Полнвинилацеталн 311
Поливиниловый спирт 311
Полигалактуронат 296
Поли(2-гидроксиэтилметакрилат) 336
Поли-1,4-α-*D*-глюкопираноза 286
Полиглюкуронат 295
Полигулуронат 295
Полиизопрен 308, 313, 315 сл.
Полиизопреноиды 343, 368
Поликарбамид 309
Поликарбонат 309
Полнкетиды 343, 358—364, 407—479
Поли-1,3-β-*D*-ксилопираноза 286
Полимер(ы) 300 сл.
Полиметакрилаты 315 сл., 318
Полипептиды 324 сл., 351
Полипренилпирофосфаты 699
Полисахариды 207—275, 282—298, 343, 351
Полистирол 309, 311, 315, 318, 320 сл., 325
Полиуретаны 309
Полифосфоинозитиды 85
Полиэфиры 308, 312, 315 сл.
Перифераетерин 502
Порфиран 214
Порфириногены 656 сл.
Порфирины 406, 634—659
Порфобилиноген 635, 640 сл., 672
Преакуаммицин 613
Прелюмиродопсин 538
Пресквален пирофосфат 494, 523
Прететрамид(ы) 350, 361, 452
Префеновая кислота 693 сл.
Префитоинпирофосфат 522 сл.
Проантоцианидины 440, 443
Прогестерон 497, 618
Пролин 265, 545

Простагландины 12, 17 сл., 26 сл., 32 сл., 127
Протеогликаны 215, 258, 261
Протокатехальдегид 572, 593, 597 сл., 624
Протокатеховая кислота 720 сл.
Протоланостерин 495
Протопин 584
Протопорфирин(ы) 635, 649, 654, 657 сл., 660—664, 668
Протопорфириноген 635
Протостефанин 589
Протострептоварицин 463
«Протохлорофиллид-голохром» 664
Протохлорофиллиды 661, 664
Процианидин B_2 387
Пруназин 716
Псевдопельтьерин 556, 558 сл.
Псевдопурпурин 718
Псевдоуропорфирин 652
Псилоцибин 606
Псилоцин 606
Птеридин 703
Пуберулоновая кислота 435
Пулегон 506, 508
Пуллулан 213
Пурины 406
Пустулан 213
Путресцин 543 сл., 547 сл., 605

Равенин 604
Равенолин 604
Радицинин 410
L-Рамноза 189, 241, 244 сл.
Раффиноза 202, 205
Реакции
биомиметические 341
биосинтетические 395
метатезиса 59
на полимерных носителях 323 сл
ферментативные 275
Реверсия 158, 217, 219
Резацетофенон 434
Резолы 316
Резорцин 709
Ретикулин 573, 576 сл., 580 сл., 585
Ретиналь 537 сл.
Ретинол 527
Ретронецин 550
Рибиттейхоевые кислоты 251 сл.
Рибоза 129, 132 сл., 189
Рибозиды 154, 176
Рибофлавин 45
Рибулоза 696
D-Рибулозо-5-фосфат 405
Рифамицины 378, 464
Рицин 264
Рицинин 568
Рицинолевая кислота 13, 21, 52
Родименан 213
Родопин 529
Родопсин 123, 538
Роемерин 580
Розан 515
Розенонолактон 514 сл.
Ромбифолин 567
Ротеноиды 440
Ротенон 441
Рубиервин 620
Руброфузарин 444
Ругулозин 445
Рутекарпин 606

Сальсолидин 570
Сальсолин 570
Салютаридин 581
Салютаридинолы 581
Сангинарин 584
Санталбовая кислота 19
Сантиагуин 562 сл.
Саппанин 384
Сарцинаксантин 527
Сативен 513
Сахариновые кислоты 155 сл.
Сахароза 127, 188, 202, 205, 334
Свертеамарин 356 сл.
Седамин 551, 555 сл., 560 сл.
Секалоновые кислоты 447
Секодафнифиллин 622
Секодин 614 сл.
Секоиридоиды 356, 372
Секологанин 356 сл., 372, 610, 617
Секуренин 561
Селахиловый спирт 77
Сенециевая кислота 483, 550 сл.
Сенеционин 550
Сепедонин 435
Септицин 553
Серин 94, 105, 265, 467, 696, 709
Сесквитерпеноиды 483, 492, 509—514
Сестертерпеноиды 492, 518 сл.
Сефадекс 273, 275, 318
Сефароза 275
Сиаловая кислота 78
Синаповая кислота 713
Синигрин 190
Сирингарезинол 387
Сироген 678
Сирогидрохлорин 677, 679
Ситостерин 73, 501
Сквален(ы) 355, 483 сл., 489, 492—494, 522 сл.
Скваленоксид 355, 372
Скиммианин 602 сл.
Скирин 387, 445
Скитантин 621
Скополамин 545 сл.
Скулерин 584 сл.
Слизи 242—244
Слизневая кислота 131, 150

Смолы 309 сл., 312, 317 сл., 321 сл., 331
Соламагрин 620
Соланидин 618, 621
Соланокапсин 618
Соласодин 618
Соласонин 620
Сорбит 148
Соясапогенол 503
Спарсифлорин 580
Спартат 379
Спартеин 566 сл.
«Спейсер» 323
Спермидин 542
Спириллоксантин 534
Стахидрин 544
Стеариновая кислота 29, 42, 52, 55, 58, 60
Стевиол 517
Стеммаденин 613 сл.
Стеригматоцистин 375 сл., 449, 451 сл.
Стерины 73, 118 сл., 351, 353, 483 сл., 489, 496, 501 сл.
Стеркуловая кислота 20
Стероиды 72, 343, 482, 618 сл.
Стигмастерин 73, 118
Стилопин 583 сл.
Стипитатоновая кислота 410, 435, 590
Стрептамин 377
Стрептидин 377
Стрептоварицины 462 сл.
Стрептоза 193 сл., 358, 379
Стрептозотицин 179
Стрептомицин 193, 343, 358, 377, 459
Стрептонигрин 376
Стрихнин 341 сл., 356, 613
Суберины 72 сл.
Сулохрин 448
Сульфолипиды 70, 74
Сульфохиновоза 73
Сульфохиновозилдиглицерид 74
Сфероидинон 534
Сфинганин(ы) 77, 98 сл., 105
Сфингенины 77, 98 сл., 105
Сфингозин 77
Сфинголипиды 70, 77 сл., 87, 89, 98 сл., 105
Сфингомиелины 79, 81, 89, 110

Таберсонин 613 сл.
Талоза 132 сл., 140, 167, 179
D-Талоновая кислота 140
Тебаин 577, 580 сл.
Тейхоевые кислоты 251 сл.
Тенеллин 477, 546
Термопсин 566
Термосеты 315
Терпеноиды 482—519
Терпены 314, 343, 351, 353, 355, 372, 390, 609
α-Терпинеол 505, 507
Терреин 441
Тестостерон 497
Тетракетиды 409, 411, 430—437
Тетрапирролметан 646
Тетратиманол 503
Тетрациклины 350, 361, 365, 415, 422, 432—454
Тетриты 221
Тиаминпирофосфат 701
Тивелоза 254
Тиглиновая кислота 546 сл., 551
Тиенамицин 380, 382
Тираны 57 сл.
Тиломицин 461
Тилофоринин 551, 553
Тиогидроксамовая кислота 717
Тиосахара 190—193
Тирамин 568 сл., 572, 584, 589, 600
Тироглобулин 264, 708
Тирозин 553, 559, 561, 569, 572 сл., 584 сл., 589, 600, 622, 689, 692 сл., 698, 705, 708
Тироксин 707
Тиронин 708
n-Толуолсульфонаты 68
n-Толуолсульфоностеариновый ангидрид 67
Томатидин 618
Трагакантовая кислота 245
Трансферрин 264, 268
Трегалоза 202, 205 сл.
Треонин 129, 265, 377, 551
Три-*о*-метилксиларовая кислота 130
Триозофосфаты 405
Триптамин(ы) 606, 610, 615
Триптофан 349, 355 сл., 372, 376, 467, 543, 546, 550, 601, 606, 608 сл., 615, 686, 698, 702
Тритерпены 501, 503 сл.
Трифосфоинозитиды 81
Триходермин 513
Триходиен 510, 513
Трихотецин 511, 513
Тромбоксаны 17, 32 сл.
Тропин 540, 544 сл.
Тропинон 543, 545
Троповая кислота 379, 386, 546
Трополоны 410, 435, 441, 590
Труксилловая кислота 563
Тубакурарин 387
Туберкулостеариновая кислота 19
Туйон 505 сл.

Убихиноны 698 сл.
Улеин 615
Умбеллиферилгликозиды 163
Уридиндифосфат-*N*-ацетилглюкозаминпируват 691
Уридинфосфат 102

Уропорфириногены 635, 643—654, 668, 672, 679
Уропорфирины 654
Усниновая кислота 387 сл., 442

Фазеевая кислота 514
Фарнезилгеранилпирофосфат 492
Фарнезилпирофосфат 353, 433, 485, 490 сл., 509, 521
Фарнезол 313, 483, 621, 667
Феналеноны 365, 368
Фенацилпирролидины 551, 553, 561
Фенетиламин(ы) 570, 572. 708
Фенилаланин 357, 379, 386, 456, 542 сл., 546, 553, 556, 560 сл., 563, 572, 688, 590, 599, 686, 692 сл., 695, 698, 702, 705, 709
Фенилглюкурониды 163
8-Фениллобелол-I 560
Фенханы 505
Ферменты 228, 264, 274 сл., 321, 336
Фернен 503
Ферредоксин 401
Феруловая кислота 713
Фетуин 264, 268 сл.
Фибриноген 264
Фикобилины 397
Филлохиноны 700 сл.
Фисцион 367, 369
Фитогемагглютинин 224
Фитоин 521 сл., 535
Фитол 19, 661, 665
Фитостерин 668
Фитосфингозин 77
Фитотоксины 264
Фитофлуин 524, 528
Фитоэкдизоны 499 сл.
Фицин 264
Флавандиолы 440
Флаваноиды 343
Флаванолы 439 сл.
Флаванон(ы) 409, 425, 437, 439
Флавенолы 440
Флавин 681
Флавипин 423
Флавоглауцин 444
Флавоноиды 363 сл., 425 сл., 437—441, 710, 715
Флавоны 439
Флавопротеины 698
Флеиновая кислота 17
Флорамультин 591
Флороглюцин 436
Фолиевая кислота 686, 719
Фоликантин 608
Фомин 458
N-Формилкинуренин 705
Формоноиетин 363, 379
Фосфатидилглицерин 74, 81, 104, 110, 115
Фосфатидилинозит(ы) 75, 80, 96, 104, 115
3-(*sn*-Фосфатидил-1′)миоинозит 75
Фосфатидиловые эфиры 75
Фосфатидилсерин(ы) 75, 80, 96 сл., 104, 110, 115, 120
Фосфатидилфенолы 83
Фосфатидилхолин(ы) 75, 81, 86, 96 сл., 104, 110 сл., 115 сл., 120
Фосфатидилэтаноламин(ы) 75, 81, 88, 96 сл., 104, 110, 112, 115, 120
Фосфатидные кислоты 74 сл., 81, 85, 89, 94 сл., 103, 115
Фосфоглицериды 70, 74 сл., 85 сл., 104
Фосфоглицериновая кислота 398, 405 сл.
Фосфоенолпируват 405 сл., 686 сл., 689, 691 сл.
Фосфолипиды 70, 80, 110—118, 120
Фосфонолипиды 75
Фосфорибозилпирофосфат 696
Фосфосфинголипиды 79, 100 сл., 105
Фотосинтез 395 сл.
Фриапорфирин 652
Фруктаны 213, 248
D-Фруктоза 147, 150, 155, 157, 194
D-Фруктозо-6-фосфат 405
β-*D*-Фруктофуранозиды 204, 210, 248, 264
Фузарубин 444
Фузидиевая кислота 502
Фузикокцины 518
L-Фуканы 213
L-Фукоза 150, 189, 213, 215, 242
Фуранозы 159 сл.
Фурокумарины 603

Хакомори метод 204, 218
Халконы 438
Хасубанонин 589
Халидонин 583, 585
Химиловый спирт 76
Хинин 615
Хинная кислота 490, 685 сл., 689 сл., 721
Хинолиновая кислота 549, 568
Хитин 208, 213, 257 сл.
Хлидантин 595
Хлорамфеникол 719
Хлоробактин 534
Хлорогеновая кислота 712
Хлорорселлиновая кислота 392
Хлорофиллы 396 сл., 624, 635, 644, 659—670
Хлортетрациклин 452.
Хоизинн 603
Холевая кислота 499
Холестерин 70, 87, 110, 355, 483 сл., 494 сл., 499, 618
Хондроитин 214, 259

Хондроитинсульфат 214, 259, 263, 283, 286
Хоризмат 686, 692, 694 сл., 699, 701, 719
Хризантемовая кислота 508
«Хуплан» 327

Целлобиоза 203, 205, 239, 247, 297
Целлюлоза 127, 208, 211, 213, 238 сл., 253, 273, 275, 282 сл., 297
Церамидгексозид 81
Церамидфосфохолин 101
Церамиды 77, 81, 89, 105
Цереброзиды 78, 81, 105
Цернуин 564 сл.
Церотиновая кислота 15
Церулоплазмин 264
Цефалоспорановая кислота 380
Цефалоспорины 328, 352, 367, 380
Цефалотаксин 592
Цефелин 617 сл.
Цианолипиды 72
Цианопсин 538
Цибакрон голубой 274
Цикл серы 404 сл.
Циклоартенол 501, 618
Циклогексамилоза 297
Циклонеродиол 510
Циклоэукаленол 502
Цинеол 507
Циннабариновая кислота 707
Цинхонидин 615
Цинхонидинон 616
Цистеин 367, 390, 405, 709, 716 сл.
Цистеинилвалин 380
Цитидиндифосфатхолин 104
Цитидинмонофосфатфосфатидная кислота 104
Цитидинфосфаты 102, 104
Цитизин 567
Цитолипин H 78
Цитохалазин 458
Цитронелол 507

Шардингера декстрины 237
Шельхаммеридин 592
Шикимовая кислота 20, 364, 377, 573, 625, 685—721
Шихунин 625

Эводиамин 606
Эвоксин 603
Эдулинин 603
Эйкозасфинганин 77
Экдизон 499
Экдистерон 499
Экстензин 264
Элаидиновая кислота 34, 55, 120
Элеагнин 607
Элеостеариновая кислота 18, 63
Элеутеринол 369, 413
Эллаговая кислота 384 сл.
Эметин 356 сл., 617 сл.
Эмодин 367, 382, 445, 448
Эндокрин 445
Энтерохелин 720
Эпикатехины 440
Эпистефанин 575
Эпитиостеариновая кислота 52
Эпиэритрамин 589
Эпоксикониконин 529
Эпоксиолеиновая кислота 52
Эпоксисахара 191
Эпоксисквален 494, 501, 529
Эпоксистеариновая кислота 50
Эргостерин 73, 118, 447, 497, 502, 668
Эризодиенон 588
Эриталин 587 сл.
Эритратин 588
Эритрит 220 сл.
Эритроза 129
D-Эритрозо-4-фосфат 405, 686 сл., 689
Эритроидин 587 сл.
Эритромицин 362, 461
Эритроскирин 455
Эритроцентаурин 356 сл.
Эруковая кислота 14, 16
Эстрон 497
Этилиден-*D*-маннит 152
Эфедрин 572
Эхимидиновая кислота 551
Эхинорин 601 сл.
Эхинулин 353, 355
Эшольцксантин 532

Юглон 717

Научное издание

ОБЩАЯ ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 11

ЛИПИДЫ, УГЛЕВОДЫ, МАКРОМОЛЕКУЛЫ, БИОСИНТЕЗ

Редактор
М. Н. ПАСТУШЕНКО

Художник
Н. В. НОСОВ

Технический редактор
О. В. ТЮРИНА

Корректор
П. Б. ИВАНИЦКАЯ

ИБ № 1598

Сдано в набор 15.01.86. Подп. в печ. 05.06.86. Формат бумаги 60×90¹/₁₆. Бумага тип. № 1. Гарн. литературная Печать высокая. Усл. печ. л. 46,0. Усл. кр.-отт. 46,0. Уч.-изд. л. 51,99. Тираж 15 000. Заказ № 22. Цена 4 р. 20 к. Изд. № 2062.

Ордена «Знак Почета» издательство «Химия». 107076, Москва, Стромынка, 21, корп. 2.

Ленинградская типография № 2 головное предприятие ордена Трудового Красного Знамени Ленинградского объединения «Техническая книга» им. Евгении Соколовой Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 198052, г. Ленинград, Л-52, Измайловский проспект, 29.

Отсканировал Семенюченко Владимир
chem_vova@mail.univ.kiev.ua
vova2002@mail.ru