ХИМИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ ХИМИИ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Н. К. КОЧЕТКОВ, И. В. ТОРГОВ, М. М. БОТВИНИК

ХИМИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

(углеводы, нуклеотиды, стероиды, белки)

512422

Київський Університет НАУК-БІБ-КА

ПРЕДИСЛОВИЕ

Стремительное развитие естествознания, свидетелями которого мы являемся в последние десятилетия, в полной мере коснулось и органической химии Современная органическая химия представляет собой сложную комплексную дисциплину, располагающую теоретическим фундаментом и огромным фактическим материалом, использующую представления и методы физической химии и физики, биологической химии и биологии, промышленной химии и технологии Вполне естественным процессом является поэтому разделение органической химии на несколько ветвей, близких и тесно переплетающихся, однако достаточно отличающихся одна от другой по своему характеру.

Одной из таких дисциплин является химия природных биологически важных соединений или, как ее все чаще называют, биоорганическая химия. Развиваясь в недрах органической химии с самого начала ее зарождения как науки, она не только питалась и питается всеми представлениями органической химии, но и сама непрерывно обогащает последнюю новыми идеями, новым фактическим материалом принципиальной важности, новыми методами. В настоящее время химия природных соединений представляет собой самый крупный раздел органической химии. Больше половины всех исследований в области органической химии посвящается сейчас природным соединениям. Именно в этой области плодотворно работают крупнейшие химики-органики нашего времени, создавшие обширные школы и направления

Значение химии природных соединений для решения многих коренных проблем естествознания трудно переоценить. Находясь на границе с биологическими дисциплинами и тесно переплетаясь с биохимией, химия природных соединений играет определённую роль в решении таких вопросов, как механизм действия ферментов и химическая сущность биологических процессов, включая проблемы передачи наследственных признаков, сущность процессов старения, проблемы нервной передачи и другие не менее важные вопросы.

В связи с этим химия природных соединений оказывает сильное влияние на развитие всех основных дисциплин медико-биологического цикла, а также на решение многих важных практических вопросов здравоохранения, сельского хозяйства, ряда отраслей промышленности. Для борьбы с наиболее опасными заболеваниями (лучевая болезнь, рак, гипертония, некоторые нервные и психические заболевания), для полной ликвидации ряда инфекционных болезней человека, животных и растений необходимо глубокое изучение стероидных гормонов, антибиотиков и других лекарственных веществ. Стимулирование роста животных и растений, подавление вредной флоры, регулирование процессов развития растений — все это требует изыскания в природе и синтеза высокоэффективных гормонов, фитогормонов, ростовых веществ, антибиотиков, инсектицидов и других типов веществ Развитие промыш-

ленности полимерных материалов, особенно целлюлозы, искусственного волокна и меха, кожевенной и искусственных заменителей кожи вызывает необходимость интенсивного изучения важнейших природных полимеров — полисахаридов и белков.

В связи со всем этим понятен интерес к исследованиям в области химии природных соединений, который проявляется ныне во всем мире. Огромный объем фактического материала, возрастающий в геометрической прогрессии, делает невозможным первоначальное знакомство с этой областью знания не только по оригинальной литературе, но часто даже по обзорным и монографическим изданиям. Авторами настоящей книги руководило желание дать возможность исследователю, впервые начинающему работу в этой области, познакомиться с основами химии природных соединений на современном этапе ее развития. Книга не является исчерпывающей монографией, так как иначе ее объем превзошел бы все допустимые размеры, однако приведенная в конце разделов обзорная литература дает возможность читателю в случае необходимости более детально познакомиться с тем или иным интересующим его вопросом.

В настоящей книге рассматривается несколько основных типов природных соединений, играющих решающую роль в нормальной жизнедеятельности организмов — белки, углеводы, нуклеотиды и стероиды. Выбор именно этих разделов определился не только их значимостью, но и отсутствием современной общей обзорной литературы по этим вопросам в СССР, а в некоторых случаях (например нуклеотиды) и за рубежом. Белки являются основным субстратом животных организмов, катализаторами важнейших жизненных процессов, а обмен белка лежит в основе всех процессов жизнедеятельности Углеводы — главный энергетический ресурс всех живых организмов и основной субстрат растительных организмов, а в виде своих многочисленных производных углеводы входят в сложные комплексные соединения с белками и липидами, имеющие большое биологическое значение. Исключительная роль нуклеотидов вскрыта исследованиями последних лет, когда удалось показать, что именно они являются тем химическим материалом, который обеспечивает передачу первичного биологического кода, определяющим далее в сложной цепи превращений весь комплекс наследственных признаков. Биологическая роль стероидов весьма разнообразна; к этому типу природных соединений относятся важнейшие гормоны, желчные кислоты, холестерин мозговой ткани и т. д. Существенно, что не только биологическая значимость, но и химия рассматриваемых в этой книге соединений весьма разнообразна и может служить яркой иллюстрацией решения многих интереснейших и сложнейших проблем органической химии, в особенности стереохимических вопросов.

Разделы «Химия углеводов» и «Химия нуклеотидов» написаны чл.-корр. АН СССР Н. К. Кочетковым, раздел «Химия стероидов» доктором химических наук И. В. Торговым и раздел «Химия белка» — доктором химических наук М. М. Ботвиник. При составлении этой книги оригинальная литература использована по 1959 г. включительно.

Настоящая книга несомненно окажется весьма полезной для тех молодых научных работников, аспирантов и студентов, которые решили посвятить свою деятельность химии природных соединений — биоорганической химии. Она поможет привлечь внимание научной молодежи к этой области знаний, являющейся одной из важнейших проблем современной науки.

Академик М. М Шемякин

Раздел первый

УГЛЕВОДЫ

ВВЕДЕНИЕ

Углеводы представляют большой класс сложных органических соединений, состоящих, как правило, из углерода, водорода и кислорода. Название углеводы было дано им потому, что большинство из них отвечает составу $C_n(H_2O)_n$, и в то время, когда были выделены первые представители этого класса, они рассматривались как соединения углерода и воды, так как структурной теории тогда еще не существовало. Это историческое название сохранилось и до наших дней. Углеводы как химически индивидуальные вещества известны с глубокой древности. Один из важнейших углеводов — тростниковый сахар (сахароза) хорошо знали в древней Индии, Китае и Египте. Тростниковый сахар является, по-видимому, первым органическим веществом, полученным человеком в чистом виде. Выращивание сахарного тростника и выделение из него сахара относятся к числу самых древних сельскохозяйственных процессов. Значительно позднее были выделены другие представители углеводов. Так, фруктоза была получена из меда Ловицем в 1792 г., глюкоза — Пру в 1802 г. В 1811 г. Кирхгоф впервые осуществил гидролиз крахмала, открыв тем самым класс полисахаридов. Это открытие позднее послужило основой важнейшего процесса, ставшего краеугольным камнем современной гидролизной промышленности.

Однако подлинное развитие химии углеводов, естественно, стало возможным только после создания структурной теории и возникновения стереохимических представлений, которые для химии углеводов имели и имеют решающее значение. Начало современной химии углеводов было заложено работами Килиани и блестящими исследованиями Э. Фишера, начатыми в 80-х годах прошлого столетия. С тех пор развитие химии углеводов продолжается в нарастающем темпе, и в настоящее время она составляет значительную часть одного из главных разделов органической химии — химии природных соединений.

Развитие химии углеводов оказало и продолжает оказывать огромное влияние на развитие органической химии в целом, в том числе и ее теоретических разделов.

Химия углеводов была первым пробным камнем для проверки стереохимических представлений Лебеля — Вант Гоффа; она дала богатейший материал для расширения и уточнения тетраэдрической теории. Наряду с этим такие вопросы принципиального значения как кольчато-цепная таутомерия, конформационный анализ и т. п. разрешались и разрешаются в значительной мере на основе фактического материала черпаемого из химии углеводов.

Исключительные экспериментальные трудности, с которыми связаны исследования в области углеводов, являются стимулом для разработки новых методов и методических приемов, имеющих значение для

развития органической химии в целом. Такие важнейшие методы как бумажная хроматография, препаративная распределительная хроматография развивались и развиваются в значительной мере трудами исследователей, работающих в области углеводов.

Исключительно велико также значение химии углеводов в развитии биологии и особенно биохимии. Углеводы, вслед за белками и пептидами, являются важнейшими составными частями живого организма. Для животного организма углеводы представляют главный источник энергии, его топливо. Пища млекопитающих состоит прежде всего из углеводов, которые далее подвергаются сложным процессам гликолиза, в результате чего выделяется необходимая для организма энергия. Однако этим далеко не исчерпывается роль углеводов в жизнедеятельности животного. Многие вещества, регулирующие ответственные жизненные процессы, являются производными углеводов. Это, как правило, весьма сложные высокомолекулярные соединения, содержащие наряду с углеводами пептидную и липоидную составляющую, природа которых еще в большинстве случаев не определена. Однако уже сегодня можно уверенно назвать несколько важнейших классов углеводосодержащих веществ, значение которых в процессах жизнедеятельности первостепенно. Это специфические полисахариды, определяющие группы крови, специфические полисахариды, регулирующие иммунитет, гликолипиды (например, цереброзиды и ганглиозиды), входящие в состав нервной ткани, наконец, гликопептиды — сложные комплексы белков и углеводов, имеющие исключительное, хотя еще и далеко не полностью выясненное значение в процессах жизнедеятельности.

Едва ли нужно говорить о том, что процесс жизнедеятельности растительного организма — это прежде всего процесс возникновения и превращения углеводов, которые составляют основу скелета растения и всех его питательных соков. Фотосинтез углеводов из углекислоты воздуха, осуществляемый растениями, представляет собой источник углеводов для всех живых организмов. Интересно отметить, что многие растения способны синтезировать и специфические производные углеводов — растительные физиологически активные вещества, среди которых достаточно назвать такие важные лекарственные средства, как сердечные гликозиды.

Сказанного более чем достаточно для того, чтобы оценить то значение, которое имеет развитие химии углеводов для понимания многих жизненных процессов, для проникновения в самые сокровенные тайны природы. Нельзя, наконец, не упомянуть и об общеизвестном техническом значении углеводов. На процессах обработки и превращения углеводов базируются такие отрасли промышленности, как лесохимическая, бродильная, гидролизная, производство искусственного волокна и многие другие. Такие важные в развитии цивилизации предметы, как бумага и хлопок, представляют собой почти чистые углеводы, и промышленные процессы, связанные с их обработкой, в той или иной мере основаны на данных химии углеводов.

В настоящее время техническое значение углеводов возрастает с каждым днем, особенно в связи с развитием химии и промышленности полимеров.

КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА УГЛЕВОДОВ

В настоящее время нет строгих границ, позволяющих четко отделить углеводы от других классов органических соединений. В более узком смысле слова под углеводами понимают алифатические соединения, содержащие альдегидную или кетонную группу и несколько спиртовых

гидроксилов; таким образом, углеводы являются полиоксикарбонильными соединениями. Однако весьма часто ближайшие к углеводам в генетическом отношении классы, как, например, многоатомные спирты с числом гидроксильных групп более четырех, полиоксикислоты и даже циклические многоатомные спирты (циклиты) также рассматриваются как особые подгруппы в классе углеводов. Однако в настоящем изложении, посвященном химии углеводов в более узком смысле, мы будем касаться отдельных представителей этих подгрупп лишь в тех случаях, когда они методически связаны с основным содержанием этого раздела книги.

Углеводы (в том числе и полиоксикислоты) делятся прежде всего на две большие подгруппы — моносахариды и полисахариды.

Моносахариды — углеводы, содержащие непрерывную цепь углеродных атомов, которая может состоять из 4—9 звеньев, причем наиболее важными являются моносахариды, содержащие 5 и особенно 6 углеродных атомов. Моносахариды, называемые также монозами, в зависимости от длины цепи носят название — тетроз, пентоз, гексоз и т. д. и имеют суммарную формулу $C_n H_{2n} O_n$. В зависимости от того, является ли карбонильная группа моносахарида альдегидной или кетонной, различают альдозы и кетозы. Таким образом, с учетом обоих классификационных признаков монозы подразделяют на альдопентозы, кетопентозы, альдогексозы, кетогексозы и т. д.

Особую и весьма важную группу моносахаридов, значение которой быстро возрастает в последние годы, составляют соединения, чрезвычайно близкие по структуре и химическому поведению к обычным альдозам и кетозам, состав которых, однако, отличается от $C_n H_{2n} O_n$. Сюда относятся так называемые дезоксисахара, т. е. моносахариды, которые отличаются от обычных представителей этого класса только отсутствием одной или двух гидроксильных групп. Не меньшее значение имеют азотсодержащие моносахариды, так называемые аминосахара — соединения, отличающиеся от обычных моносахаридов тем, что вместо части гидроксильных групп (чаще всего вместо одной из них) содержат аминогруппу или какую-либо замещенную аминогруппу. В последнее время выделены многочисленные представители моносахаридов, которые являются одновременно дезокси- и аминосахарами. Особенно часто они встречаются в антибиотиках. Все эти, а также и некоторые другие моносахариды специфической структуры, по химическому облику соответствуют в общем моносахаридам; однако они вместе с тем проявляют и ряд специфических свойств, что заставляет рассматривать их отдельно от «нормальных» моносахаридов.

Полисахариды составляют обширный класс соединений, который, несмотря на огромное количество посвященных ему работ, остается еще относительно мало изученным. Полисахариды являются полимерами или, точнее, продуктами поликонденсации моносахаридов и содержат гетерополимерную цепь, где углерод-углеродные связи закономерно прерываются атомами кислорода. Не касаясь биологической классификации полисахаридов (где они могут быть подразделены на полисахариды растительного и животного происхождения, бактериальные полисахариды и т. д.), с чисто химической точки зрения они должны быть прежде всего разделены на гомополисахариды, состоящие из единственного мономера — моносахарида, и гетерополисахариды, полимерная цепь которых построена из регулярного или нерегулярного чередования двух или более моносахаридов. Гомополисахариды в свою очередь могут быть разделены по классам входящих в них моносахаридов на пентозаны, состоящие из пентоз, гексозаны — из гексоз и т. д., или более узко — на глюканы, маннаны и т. д.

Что касается гетерополисахаридов — сложнейшего раздела химии углеводов, исследования которого еще только начинаются, то для них еще нет общепринятой классификации, хотя она, очевидно, может быть построена на общих логических предпосылках, учитывающих качественный состав мономерных единиц — моносахаридов, входящих в полимер. Иногда из полисахаридов выделяют группу менее высокополимерных соединений, содержащих от двух до 8—10 остатков моносахаридов Эти соединения объединяют под именем олигосахаридов, выделяя из них дисахариды, трисахариды и т д. Такое разделение имеет безусловный смысл, поскольку, например, ди- и трисахариды по своим некоторым, и прежде всего физическим, свойствам мало похожи на полисахариды и, несомненно, ближе стоят к моносахаридам

Как в любом разделе, посвященном химии высокомолекулярных соединений, основой для выяснения свойств полимера является прежде всего изучение химии соответствующего мономера, многие химические свойства которого проявляются и в полимерной структуре. Это положение особенно справедливо в химии углеводов, где сведения из химии моносахаридов являются исключительно важными для правильного представления о более сложных полисахаридах. Поэтому в настоящей книге основное внимание будет уделено химии моносахаридов, составляющей основу для понимания всей химии углеводов

ЛИТЕРАТУРА

Э Хэрст Сб Перспективы развития органической химии М , ИЛ, 1959, стр. 155
A Micheel. Chemie der Zucker und Polysaccharide Leipzig, 1956
W Pigman. The carbohydrates Chemistry, biochemistry, physiology New York, 1958.

Часть I.

МОНОСАХАРИДЫ

Глава 1

СТРОЕНИЕ И СТЕРЕОХИМИЯ МОНОСАХАРИДОВ

СТРОЕНИЕ МОНОСАХАРИДОВ

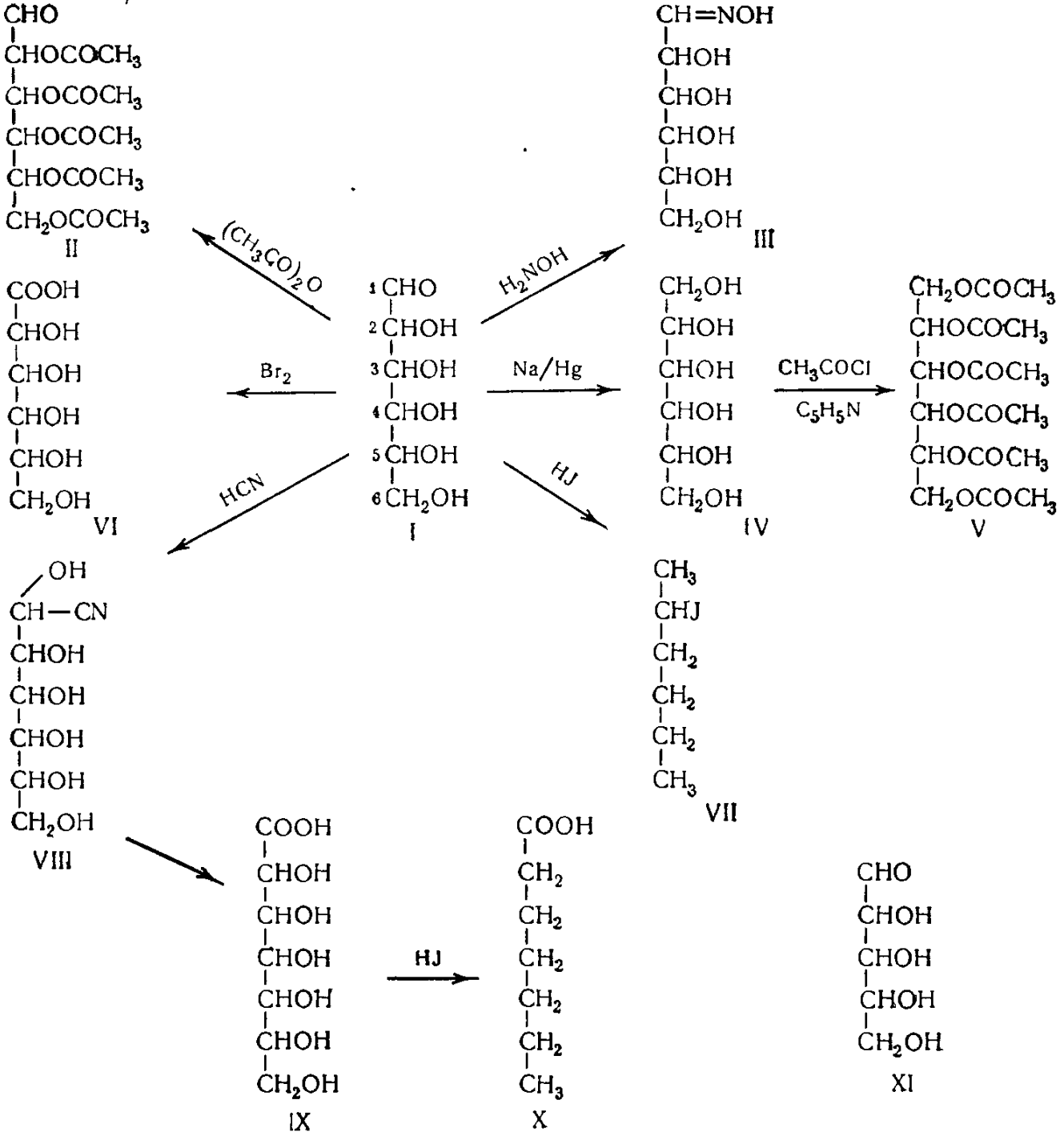
Строение моносахаридов, их взаимные отношения и переходы были исследованы и установлены в конце XIX в в трудах Э. Фишера, Килиани и др.

Если не рассматривать пространственное строение моносахаридов, ответственное за все их разнообразие, то для наиболее распространенных моносахаридов — пентоз и гектоз имеется в сущности лишь четыре возможных типа соединений: альдопентозы, кетопентозы, альдогексозы и кетогексозы. Поскольку все эти вещества по структуре весьма близки, то принципы установления строения моносахаридов лучше всего рассмотреть на одном из конкретных примеров Наиболее четко и однозначно это установлено на важнейшем из моносахаридов — глюкозе (виноградном сахаре), который и реально был первым и главным объектом исследований.

Превращения, которые послужили основным фактическим материалом для установления строения глюкозы, представлены нижеследующей схемой (см. стр. 12).

Глюкоза при ацетилировании уксусным ангидридом образует пентаацетат, которому в свое время приписывалась структурная формула (II), позднее исправленная. Тем не менее образование пентаацетата доказывало наличие в глюкозе пяти гидроксильных групп. Глюкоза давала многие реакции, характерные для альдегидной группы (восстановление фелингова раствора, реакцию серебряного зеркала и др.), образовывала при действии гидроксиламина оксим (III), при действии фенилгидразина — фенилгидразон и т. д. При восстановлении глюкозы амальгамой натрия или каталитически образовывался многоатомный спирт — сорбит (IV), содержащий шесть гидроксильных групп, поскольку он образовывал гексаацетат (V). При окислении глюкозы бромом получалась глюконовая кислота (VI) с тем же числом углеродных атомов и теми же пятью гидроксильными группами, что и у глюкозы. Все эти данные указывают на наличие в глюкозе альдегидной группы. Наконец, при жестком восстановлении глюкозы нагреванием с иодистоводородной кислотой был получен 2-иодгексан (VII), что доказывает наличие в глюкозе неразветвленной цепи из шести углеродных атомов.

Очень важную роль в структурной и синтетической химии углеводов играла реакция циангидринового синтеза, впервые примененная в этом классе веществ Килиани При реакции глюкозы с синильной кислотой образуется циангидрин (VIII), омыление которого дает так называемую



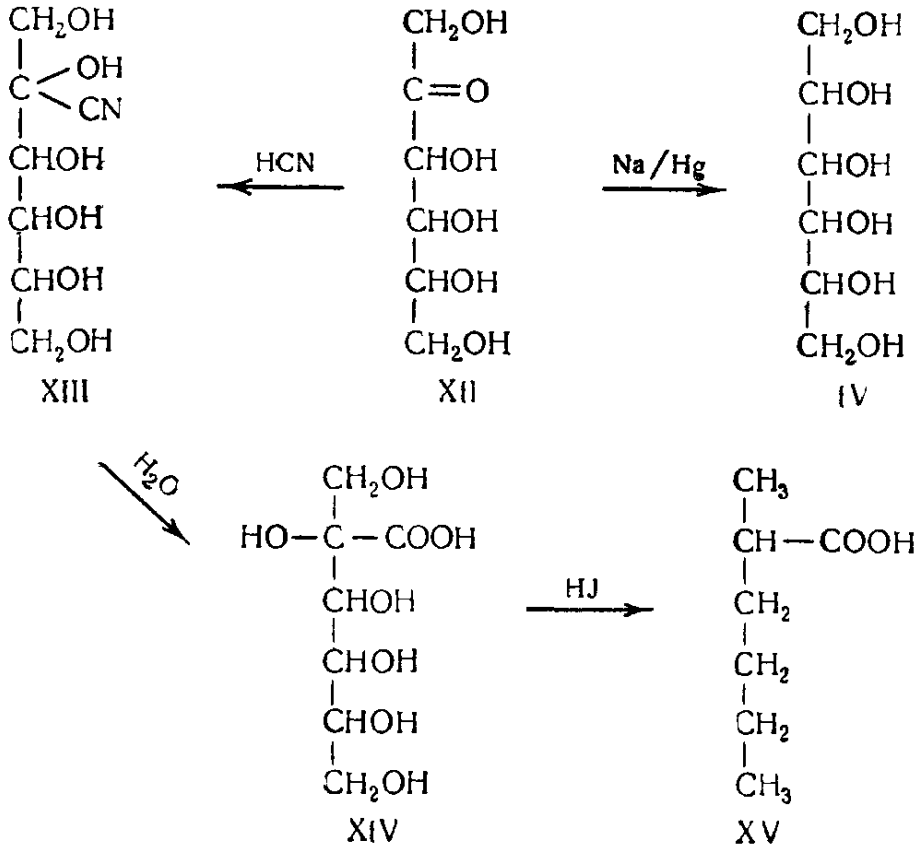
глюкогептиловую кислоту (IX). Восстановление последней иодистоводородной кислотой дает энантовую кислоту (X). Эти превращения еще раз подтверждают наличие в глюкозе альдегидной группы и неразветвленной углерод-углеродной цепи.

Все эти данные позволили Фишеру принять для глюкозы строение (I), т. е. строение 1, 2, 3, 4, 5-пентаоксигексаналя. Действительно, альдегидная группа может располагаться лишь в конце цепи, а пять гидроксильных групп, учитывая неразветвленность цепи и правило Эльтекова, должны, очевидно, располагаться по одной у каждого из последующих углеродных атомов.

Такое расположение гидроксильных групп при соседних атомах углерода было позднее подтверждено результатами окисления глюкозы иодной кислотой (см. стр. 35).

Совершенно аналогичным образом может быть доказано строение других альдогексоз, которые имеют ту же структуру и отличаются лишь конфигурацией. Точно так же было доказано строение альдопентоз (XI), которые имеют меньше на один углеродный атом и на одну гидроксильную группу, чем гексозы.

На тех же принципах было построено и доказательство строения кетоз. Так, например, строение важнейшего представителя этого класса — фруктозы (плодового сахара) (XII) ясно из следующих превращений:



XIII XII IV

XIV XV

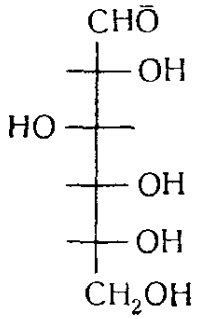
Наличие во фруктозе пяти гидроксильных групп и одной карбонильной демонстрировалось образованием пентацетата и соответствующих производных, характерных для карбонильных соединений. Восстановление фруктозы амальгамой натрия приводило к образованию двух стереоизомерных спиртов — сорбита и маннита; из них первый был идентичен сорбиту (IV), полученному восстановлением глюкозы, чем устанавливалось ближайшее родство обоих важнейших моносахаридов и доказывалось наличие в них прямой цепи углеродных атомов. Поскольку фруктоза не давала альдегидных реакций, было ясно, что она содержит кетонную группу. Место последней в цепи устанавливалось методом Килиани: воздействие синильной кислоты давало цианогидрин (XIII), при омылении которого получали кислоту (XIV); восстановление последней давало 2-метилкапроновую кислоту (XV), поэтому кетонная группа могла занимать только положение 2, а строение фруктозы может быть представлено формулой (XII).

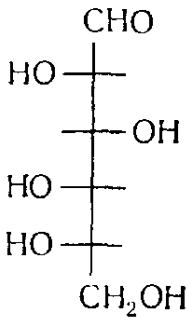
Строение других кетопентоз и кетогексоз было установлено аналогичным образом.

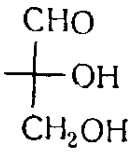
СТЕРЕОХИМИЯ МОНОСАХАРИДОВ

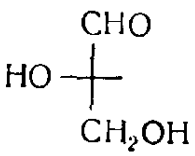
Поскольку всем альдогексозам соответствует только одна структурная формула, то различие отдельных соединений этого типа следует искать в их стереохимии. Сказанное справедливо также и для групп кетогексоз, кетопентоз, альдопентоз и т. д. Так как число диастереомеров для соединения с n асимметрическими атомами равно 2^n, то количество диастереомеров для альдотетроз составляет $2^2=4$, для альдопентоз $2^3=8$, для альдогексоз $2^4=16$ и соответственно для кетотетроз, кетопентоз и кетогексоз 2, 4 и 8. Действительно, все указанные диастереомеры были найдены в природе или получены синтетически.

Выяснение конфигурации моносахаридов и установление взаимосвязи между ними выполнено Э. Фишером и представляет собою первый пример использования стереохимической теории в структурной органической химии. Фишер построил свои доказательства на установлении конфигурации глюкозы, сведя к ней все известные тогда альдогексозы и альдопентозы. Таким образом, этими исследованиями была установлена так называемая относительная конфигурация моносахаридов, причем для обычной D-глюкозы Фишер условно принял стереохимическую формулу (XVI). Однако из данных Фишера вовсе не следовало, что природной D-глюкозе соответствует именно конфигурация (XVI), а не антиподная ей конфигурация (XVII). В даином случае речь идет уже об абсолютной конфигурации глюкозы и логически связанных с нею работами Фишера конфигурациях всех остальных моносахаридов. В то время не существовало средств для экспериментального решения этого вопроса. В связи с этим в 1906 г. Розановым было предложено обозначение абсолютной конфигурации сахаров, которое исходило из условного постулирования абсолютной конфигурации двух антиподов глицеринового альдегида, который формально может считаться первым членом ряда моносахаридов — триозой.

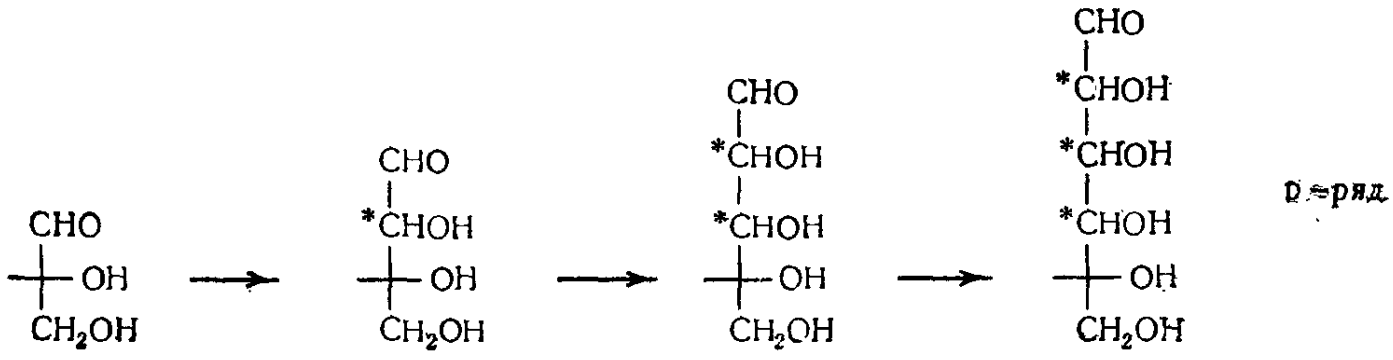

XVI

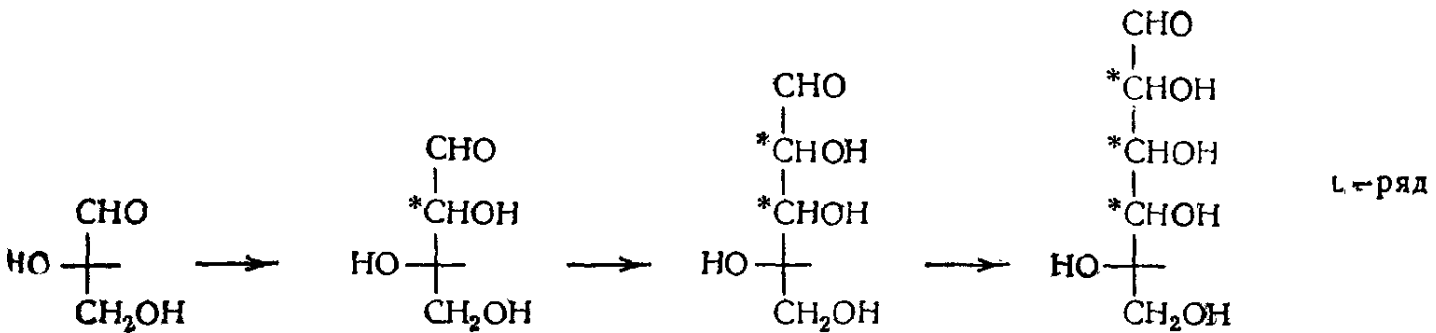

XVII


XVIII


XIX

Розановым было предложено считать антипод (XVIII) D-глицериновым альдегидом, а антипод (XIX) — L-глицериновым альдегидом. Если далее проводить наращивание цепи углевода с переходом от глицери-


D-ряд


L-ряд

нового альдегида (триозы) к тетрозе, пентозе, гексозе и т. д. по схеме, то, независимо от конфигурации у вновь образующихся асимметрических атомов (помеченных звездочками *) и, что особенно важно, независимо от знака вращения образующегося нового моносахарида, все моносахариды, ведущие свое происхождение от D-глицеринового альдегида, будут относиться к D-ряду; напротив, все моносахариды, полученные наращиванием цепи L-глицеринового альдегида, составят L-ряд моносахаридов.

Таким образом, в соответствии с условием Розанова, принадлежность моносахарида к D- или L-ряду определяется для гексоз конфигурацией у пятого углеродного атома (см. формулу I), соответственно для пентоз — конфигурацией у четвертого атома. Другими словами, принадлежность моносахарида к D- или L-ряду определяется конфигурацией у асимметрического углеродного атома, соседнего с первичной спиртовой группой, наиболее удаленной от карбонильной группы. Это условие делает стереохимические отношения в ряду моносахаридов совершенно четкими.

Нужно иметь в виду, что переходы от низших сахаров к высшим (триоза — тетроза — пентоза — гексоза), действительно могут быть осуществлены с помощью, например, реакции Килиани и экспериментально (см. стр. 21). В свое время Розанов принял чисто условно антипод (XVIII) за D-глицериновый альдегид и антипод (XIX) за L-изомер, хотя в действительности могло быть как раз наоборот. Проведенные недавно рентгеноструктурные исследования показали, что предположения Розанова счастливым образом совпали с истинной абсолютной пространственной конфигурацией.

Таким образом, конфигурация, принятая нами ранее вслед за Розановым, отражает реальную абсолютную конфигурацию природных моносахаридов.

Таким образом, с учетом условия Розанова, весь стереохимический ряд моносахаридов до гексоз включительно может быть представлен (для D-ряда) схемой (см. стр. 16).

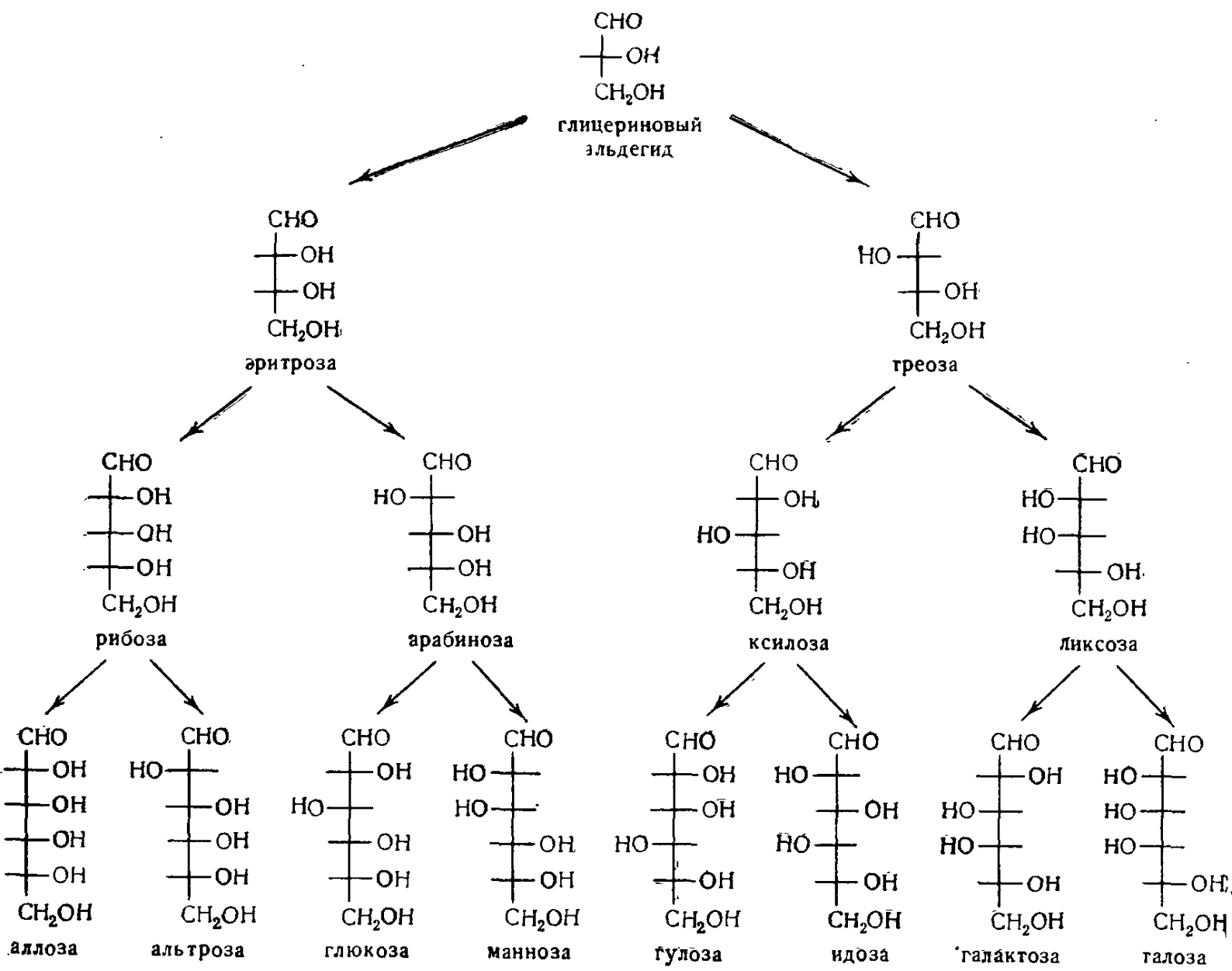
Антиподы (зеркальные изображения) каждого из представленных в схеме моносахаридов являются соответствующими моносахаридами L-ряда, поскольку во всех них конфигурация углеродного атома, соседнего с первичной спиртовой группой, соответствует конфигурации L-глицеринового альдегида.

Конфигурация каждого из приведенных моносахаридов, число которых точно соответствует предсказанному на основании стереохимической гипотезы, была установлена Фишером путем взаимных превращений одного моносахарида в другой.

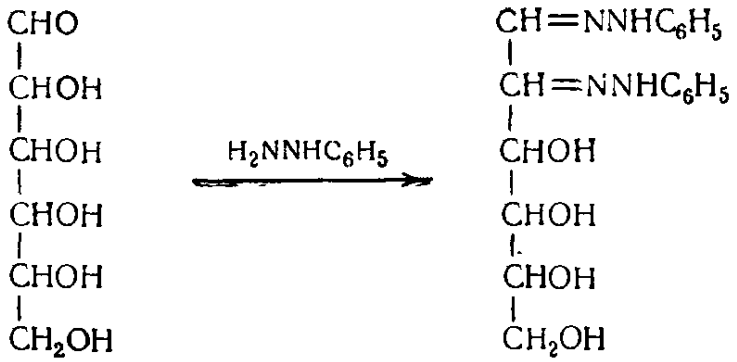
При выполнении сложнейшей задачи — установлении конфигурации всех пентоз и гексоз — использовалось несколько приемов. Главным принципом, на котором основаны доказательства Фишера, был переход к таким производным моносахаридов, которые были оптически недеятельными, благодаря внутренней компенсации. Наращивая цепь моносахарида и переходя от низшего члена к высшему (например, от пентозы к гексозе) или путем частичной деструкции и переходом от высшего члена к низшему (например, от гексозы к пентозе), Фишер получил недеятельные формы и смог сделать заключение о конфигурации некоторых моносахаридов.

Указанные методы взаимных переходов будут рассмотрены подробнее в следующем разделе.

Другой химический прием, оказавший также неоценимую услугу при установлении конфигурации моносахаридов, был основан на сравнении их озазонов (XX), т. е. производных, получающихся конденсацией



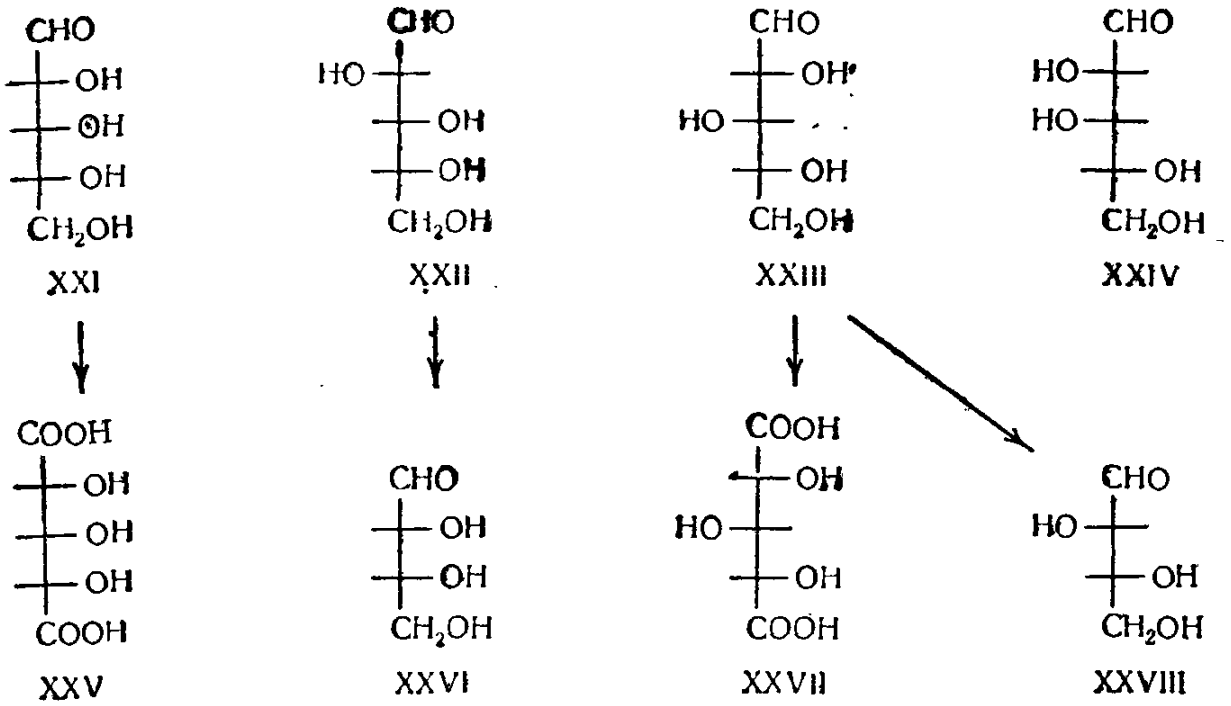
моносахаридов с избытком фенилгидразина (подробнее об озазонах смотри стр. 56). Поскольку при этом углеродный атом $C_{(2)}$ становится неасимметрическим, два моносахарида, отличающиеся конфигурацией только этого углеродного атома, дают один и тот же озазон. Это позволило в ряде случаев решить вопрос о конфигурации моносахаридов.



Для иллюстрации методов и логики, которые применялись Э. Фишером, рассмотрим далее, как была установлена конфигурация пентоз и гексоз.

Установление конфигурации пентоз

Каждая из четырех известных альдопентоз — арабиноза, ксилоза, рибоза и ликсоза — может иметь одну из следующих четырех конфигураций (XXI—XXIV).

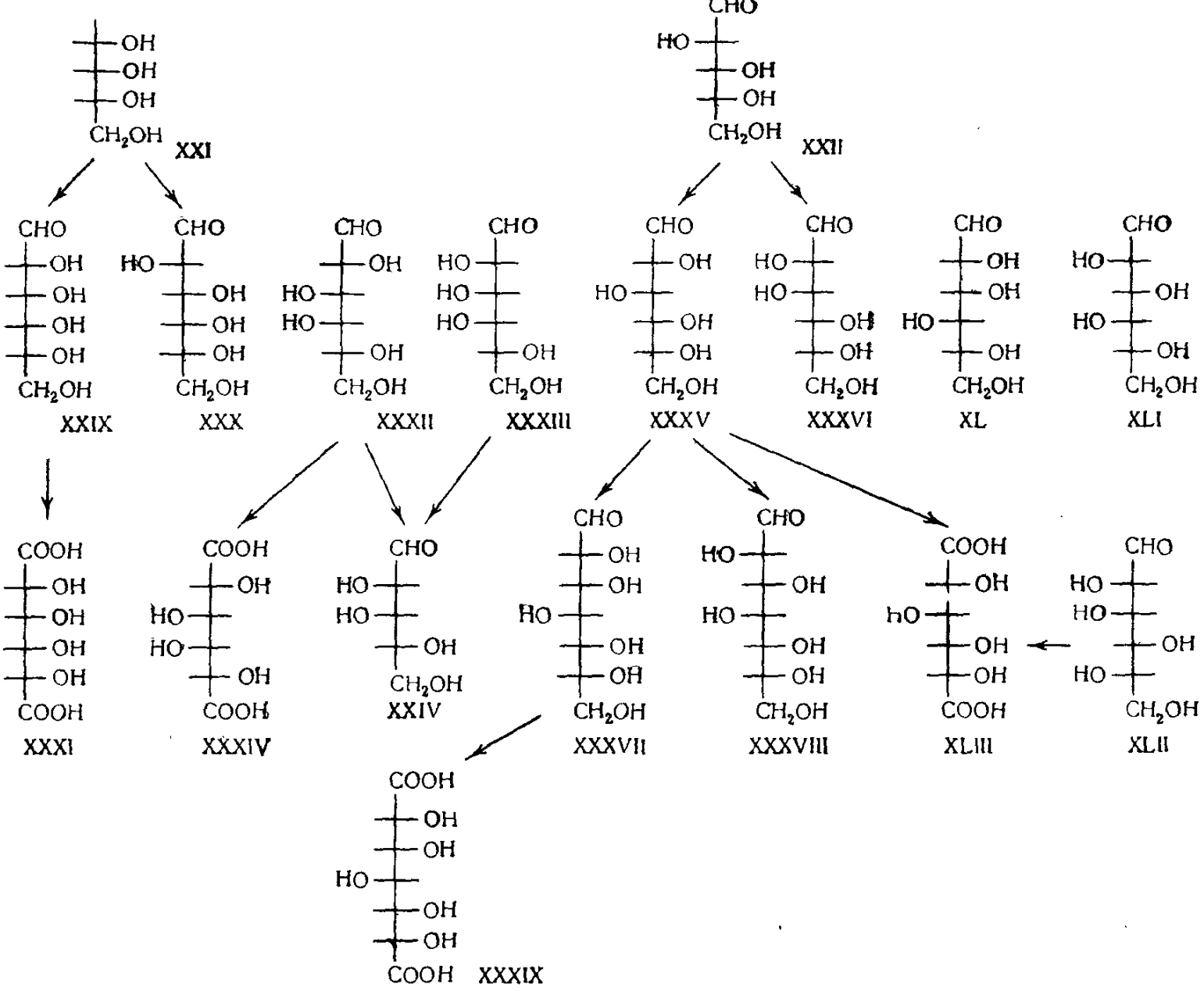


Основой для определения конфигурации каждой альдопентозы послужили следующие факты. Известно, что рибоза и арабиноза дают один и тот же озазон, а ксилоза и ликсоза другой, но также одинаковый озазон.

Таким образом, отличие между пентозами, составляющими такую пару, состоит только в различной конфигурации у $C_{(2)}$. Из формул (XXI—XXIV) ясно, что одна пара может быть представлена структурами (XXI) и (XXII), а вторая — структурами (XXIII) и (XXIV).

Рибоза при окислении азотной кислотой дает оптически недеятельную двухосновную кислоту (XXV). Из веществ, изображаемых формулами (XXI) — (XXIV), недеятельная благодаря внутренней компенсации кислота может получиться либо из XXI, либо из XXIII (кислота (XXVII)). В то же время арабиноза (XXII) при деструкции по Руффу (см. ниже) превращается в низший сахар (тетрозу), а именно эритрозу (XXVI), конфигурация которой была определена аналогичным образом ранее. Деструкция ксилозы тем же методом, напротив, дает диастереомерную тетрозу — треозу (XXVIII).

Из этих фактов ясна конфигурация всех четырех альдопентоз. В самом деле, арабиноза и рибоза имеют конфигурацию, соответствующую эритрозе, т. е. (XXI) и (XXII); далее, поскольку из рибозы при окислении получается кислота оптически недеятельная благодаря внутренней компенсации (т. е. полной симметрии молекулы), то из этих двух конфигураций рибозе должна соответствовать конфигурация (XXI) и, следовательно, арабинозе конфигурация (XXII). На тех же основаниях ксилозе и ликсозе должны соответствовать конфигурации (XXIII) и (XXIV) и поскольку оптически недеятельная кислота, получаемая из ксилозы, может быть получена только при конфигурации (XXIII), то ксилозе соответствует именно эта формула и, следовательно, конфигурация ликсозы изображается формулой (XXIV).



Установление конфигурации гексоз

Конфигурация всех восьми гексоз была установлена, исходя из принятой выше конфигурации пентоз, следующим образом. При наращивании по методу Килиани одного углеродного звена из рибозы (XXI) были получены две природные альдогексозы — аллоза и альтроза, которым могут соответствовать конфигурации (XXIX) и (XXX). Из этих моносахаридов только аллоза дает оптически недеятельную двухосновную кислоту (XXXI). Так как такая кислота может получиться только из (XXIX), то аллозе соответствует именно эта конфигурация и, соответственно, альтрозе — (XXX).

Далее, галактоза и талоза дают один и тот же озазон, а при распаде по Руффу обе образуют ликсозу (XXIV); из этого следует, что конфигурация их $C_{(3)}$, $C_{(4)}$ и $C_{(5)}$ одинакова (соответствует $C_{(2)}$, $C_{(3)}$ и $C_{(4)}$ ликсозы), а отличие сводится к антиподной конфигурации у $C_{(2)}$. При окислении азотной кислотой галактоза дает оптически недеятельную кислоту (XXXIV), а талоза — оптически деятельную. Из этого следует, что из двух возможных конфигураций (XXXII) и (XXXIII) галактозе соответствует (XXXII), а талозе — (XXXIII).

При синтезе Килиани арабиноза (XXII) дает две природные альдогексозы — глюкозу и маннозу, которым, таким образом, должны соот-

ветствовать конфигурации (XXXV) и (XXXVI). Выбор между ними сделан на том основании, что глюкоза при наращивании одного углеродного атома по Килиани дает смесь двух гептоз (XXVII) и (XXVIII), одна из которых при окислении дает оптически недеятельную кислоту (XXXIX); манноза при такой же последовательности операций дает смесь двух оптически деятельных кислот. Из рассмотрения формул (XXXV) и (XXXVI) ясно, что только соединение с конфигурацией (XXXV) может образовать оптически недеятельную кислоту и, следовательно, именно эта конфигурация должна быть придана глюкозе, маннозе же соответствует конфигурация (XXXVI).

Двум последним природным альдогексозам — гулозе и идозе соответствуют конфигурации (XL) и (XLI). Выбор между ними сделан на основании того, что при окислении L-гулозы (XLII) азотной кислотой образуется двухосновная кислота (XLIII), идентичная той, которая получается при окислении D-глюкозы, в то время как L-идоза дает другую кислоту. Отсюда ясно, что D-гулозе соответствует конфигурация (XL), а D-идозе — (XLI).

Совершенно аналогичные методы могут быть применены для определения конфигурации высших моносахаридов, в частности гептоз, а также для установления конфигурации дезоксисахаров и других менее обычных моносахаридов.

ЛИТЕРАТУРА

W. Haworth. The constitution of sugars. London, 1929.
C. Hudson. Historical aspects of E. Fischer fundamental conventions for writing stereoformulas in a plane. Adv. carbohydrate chemistry, 1948, **3**, 1.

Глава 2

СИНТЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ХИМИИ МОНОСАХАРИДОВ

Синтетические методы составляют основу развития всех разделов органической химии. Синтез дает возможность как полностью подтвердить определенную аналитическими приемами структуру, так и получить трудно доступные из природных источников индивидуальные представители данного класса. В ряде случаев осуществлены полные синтезы даже очень сложных природных соединений из более простых и доступных исходных веществ.

Нужно отметить, что синтетическая химия углеводов, даже простых моносахаридов, не развита в такой степени, как синтетическая химия многих других классов природных соединений, например, стероидов, пептидов, алкалоидов и т. д. Это вызвано, несомненно, крайней сложностью такого рода работы. Несмотря на кажущуюся простоту и однообразие построения моносахаридов, синтез их очень сложен. Это объясняется не только чисто экспериментальными трудностями и большой лабильностью углеводов, но прежде всего необходимостью разрешения стереохимических проблем, так как синтез даже простейших моносахаридов связан со стереохимически направленным введением в молекулу трех (для пентоз) и четырех (для гексоз) асимметрических углеродных атомов. Следствием этого является крайне незначительное число работ, посвященных полному синтезу моносахаридов. Кроме нескольких случайных примеров, не имеющих существенного значения, серьезных попыток полного синтеза моносахаридов не делалось, и каких-либо более или менее общих путей синтеза моносахаридов из соединений других классов не разработано.

Вместе с тем, благодаря большой доступности многих моносахаридов, таких как глюкоза, манноза, галактоза, арабиноза, ксилоза, очень большое значение имеют методы, позволяющие переходить от одного моносахарида к другому. Эти методы сыграли важную роль при установлении конфигурации моносахаридов (см. предыдущий раздел) и имеют большое препаративное значение при получении ряда труднодоступных сахаров.

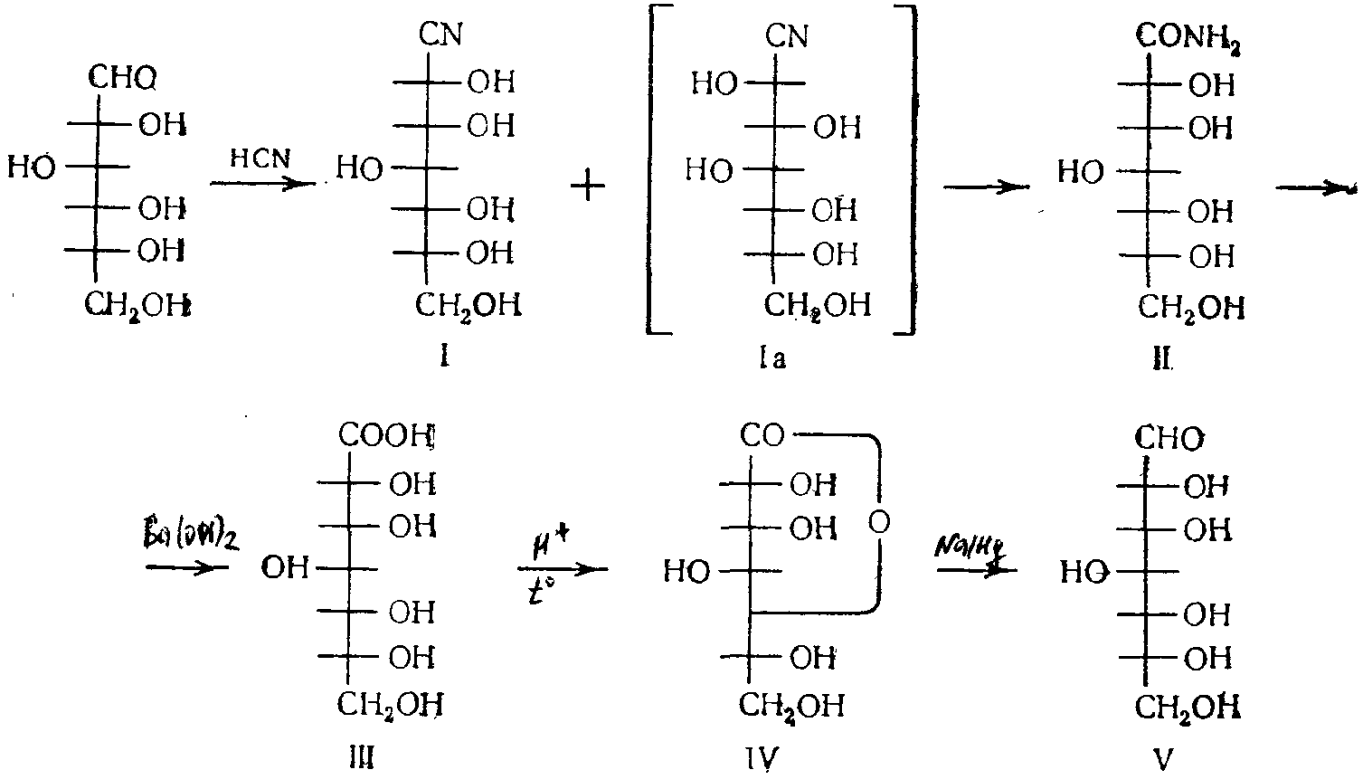
В настоящем разделе мы рассмотрим лишь методы, позволяющие переходить от низших сахаров к высшим и обратные им методы, делающие доступными получение низших сахаров из высших.

Другие синтетические методы, с помощью которых получают кетозы из альдоз, альдозы из кетоз, а также осуществляют синтез дезоксисахаров, аминосахаров и т. п. будут рассмотрены в соответствующих разделах.

МЕТОДЫ ПЕРЕХОДА ОТ НИЗШИХ МОНОСАХАРИДОВ К ВЫСШИМ

С помощью этих методов не только получают пентозы из тетроз и особенно гексозы из пентоз, но также и высшие моносахариды, из которых только несколько были найдены в природе. В настоящее время удалось получить аналоги природных моносахаридов, содержащих до 10 атомов углерода (декозы).

1. Метод Килиани. Этот метод, разработанный в момент возникновения структурной химии углеводов в 80-х годах прошлого столетия, несмотря на многостадийность, до сих пор остается важнейшим и наиболее универсальным методом наращивания цепи моносахаридов. Для примера может быть представлена схема получения этим методом гептоз из глюкозы.



Первая стадия синтеза — получение циангидрина — проводилась обычно действием синильной кислоты в присутствии небольшого количества цианистого аммония. Более удобной, и в настоящее время наиболее распространенной, является модификация Хэдсона, который для получения циангидрина использовал смесь цианистого калия с хлористым кальцием. Эта реакция, связанная с возникновением нового асимметрического углеродного атома, приводит к двум диастереомерным циангидринам (I и I*a*), соотношение которых колеблется в зависимости от условий реакции. По наблюдениям обычно получается несколько большее количество диастереомера, в котором новая гидроксильная группа находится в *трео*-положении к гидроксильной группе у четвертого углеродного атома.

Прямое омыление смеси циангидринов в кислоты (III) обычно неудобно, поэтому часто их сначала переводят в амиды (II). Смесь амидов омыляют далее гидроокисью бария или кальция и обработкой получающихся солей серной кислотой выделяют смесь кислот (III). Разделение двух диастереомеров проводят обычно на этой стадии методом дробной кристаллизации солей.

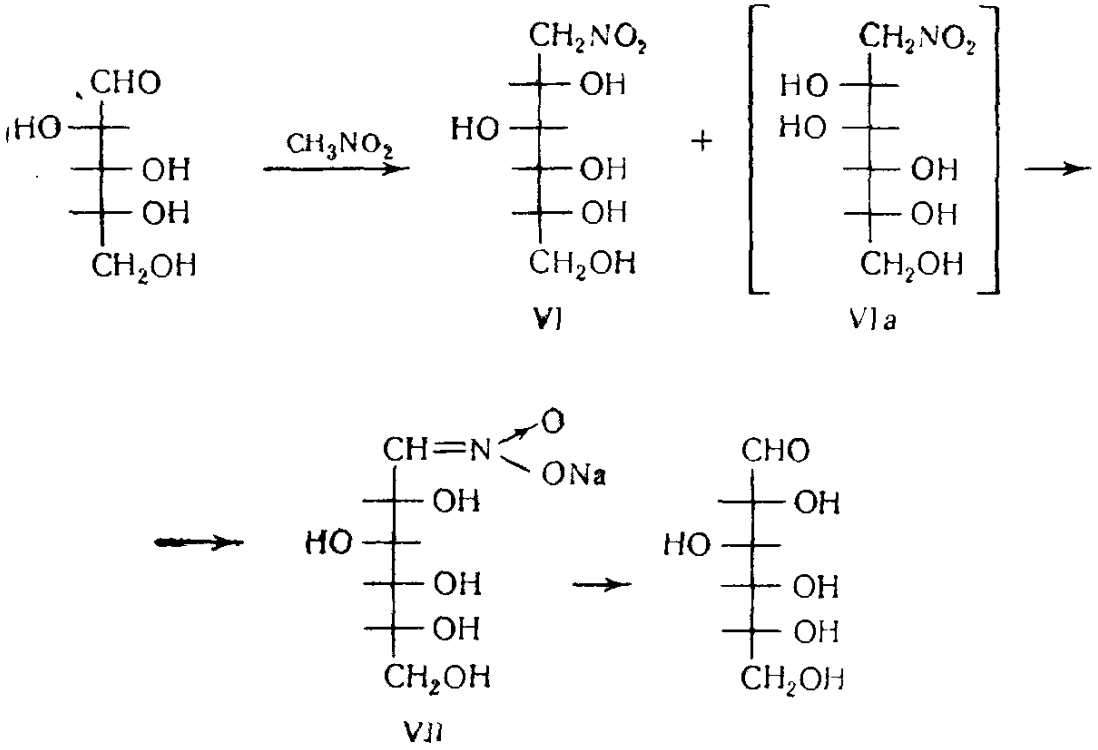
Очевидно, для этих целей пригодны и хроматографические методы.

Заключительной стадией синтеза Килиани является переход от кислоты к моносахариду. Поскольку восстановление самой карбоксильной группы в альдегидную затруднительно, то обычно кислоту (III) нагреванием с разбавленной минеральной кислотой переводят в лактон (IV), который к тому же удобнее в работе, и последний подвергают восстановлению.

Наиболее обычным восстановителем является амальгама натрия в слабокислой среде. При восстановлении амальгамой в щелочной среде вместо моносахарида (V) образуется многоатомный спирт. В последнее время находит применение и другой метод перехода (III) — (V): кислоту (III) сначала переводят в хлорангидрид, который восстанавливают каталитически в моносахарид (V).

Несмотря на многостадийность, метод Килиани дает удовлетворительные результаты благодаря хорошим выходам на всех стадиях. Он особенно широко применялся Фишером при установлении конфигурации моносахаридов.

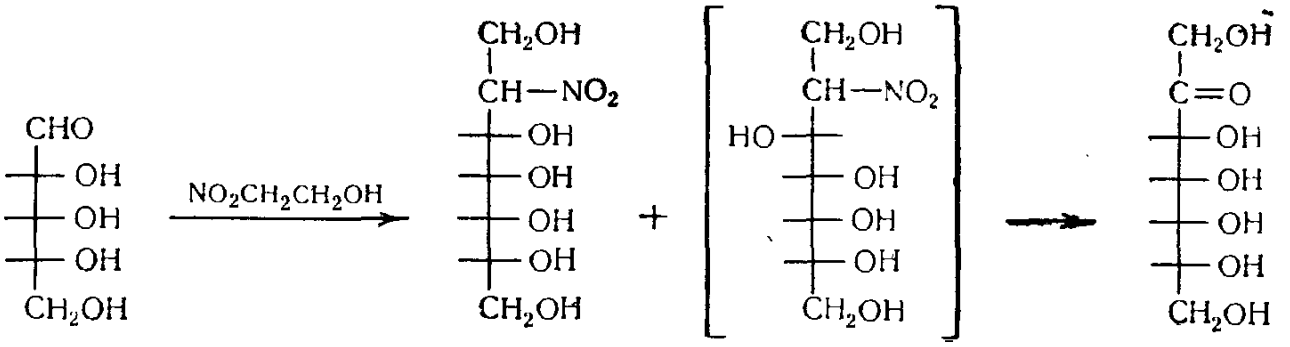
2. Метод Саудена — Фишера. Этот сравнительно новый метод наращивания цепи в моносахаридах основан на известном синтезе карбонильных соединений из нитросоединений (реакция Нефа). Он может быть представлен следующей схемой синтеза гексоз из арабинозы.



Конденсацией арабинозы с нитрометаном в присутствии метилата натрия получают полиоксинитросоединение (VI) как смесь двух диастереомеров (VI и VI*a*). Последнее в виде соли ациформы (VII) обрабатывают серной кислотой, причем происходит характерный распад (реакция Нефа), в результате чего образуется моносахарид, имеющий на один углеродный атом больше, чем исходная арабиноза. Полученную смесь двух эпимеров разделяют обычными в препаративной химии углеводов методами.

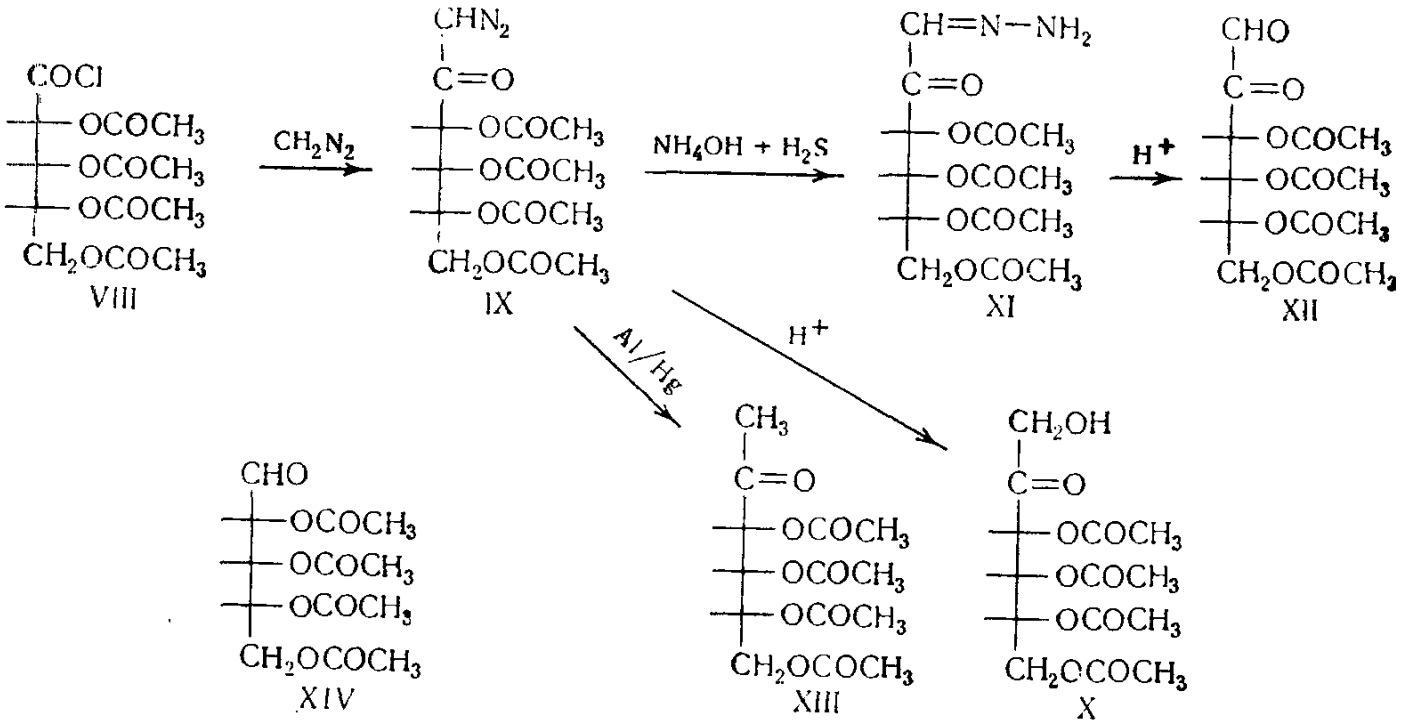
Этот новый метод, хотя и не испытанный еще достаточно хорошо, кажется довольно перспективным ввиду малого количества стадий и высоких выходов, в том числе и на последней стадии синтеза.

Он имеет, очевидно, более широкие возможности и пригоден, в частности, для наращивания углеродной цепи сахара сразу на два звена, как это видно из следующего примера:



Вместе с тем детали метода еще недостаточно исследованы и, в частности, неясен наиболее важный вопрос о стереохимии основной стадии конденсации, определяющей соотношение образующихся диастереомеров.

3. Метод Вольфрома. Этот метод может быть применен лишь в некоторых случаях, но привлекает своей простотой. Он основан на введении нового углеродного звена в молекулу моносахарида с помощью диазометана и пригоден для превращения альдоз в кетозы, дезоксикетозы и озоны. Он может быть проиллюстрирован следующей схемой:



При взаимодействии ацетилированного хлорангидрида кислоты (VIII), полученной из соответствующего моносахарида, с диазометаном образуется диазокетон (IX), который далее может быть использован в нескольких направлениях. Обработка его кислотой дает кетозу (X) с лишним углеродным атомом по сравнению с исходным производным (VIII).

При восстановлении сернистым аммонием моногидразон озона (XI), из которого легко может быть получен сам озон (XII) (об озонах см. стр. 58). Наконец, восстановление диазокетона амальгамой алюминия дает 1-дезоксикетозу (XIII), число углеродных атомов которой также больше, чем в исходном производном (VIII). Дезоксикетоза (XIII) может быть получена также из ацетилированного производного моносахарида (XIV) при действии диазометана в условиях реакции

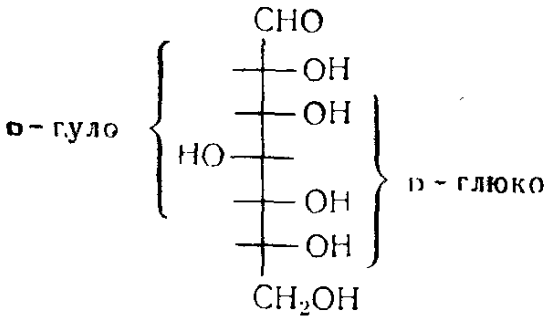
Шлоттербека. Впрочем последний вариант синтеза не представляет большого препаративного интереса, так как ацетаты типа (XIV) относительно труднодоступны (см. стр. 59).

Метод Вольфрома в настоящее время еще находится в стадии разработки. Этот изящный метод уступает, как указывалось, в универсальности двум предыдущим методам; однако он представляет серьезный интерес ввиду своей простоты.

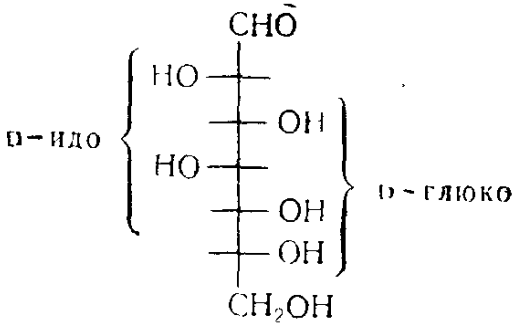
О НОМЕНКЛАТУРЕ ВЫСШИХ МОНОСАХАРИДОВ

Приведенные методы, как указывалось, могут служить для синтеза моносахаридов, имеющих более шести углеродных атомов, которые почти не встречаются в природе. В этой связи целесообразно вкратце остановиться на номенклатуре соединений этого типа. Применявшаяся до недавнего прошлого и отчасти применяющаяся сейчас тривиальная номенклатура, естественно, не может обеспечить достаточно рациональные названия всех высших моносахаридов.

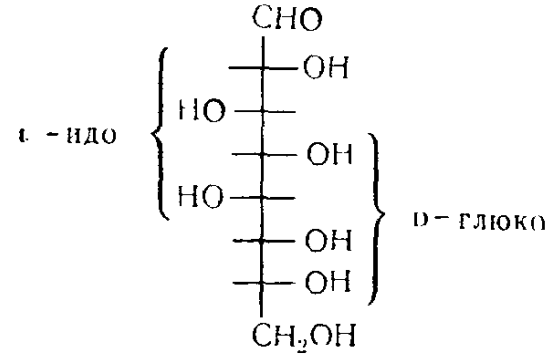
По предложенной недавно рациональной номенклатуре, моносахарид, имеющий более шести углеродных атомов, получает двойное название, которое составляется следующим образом. Сначала моносахарид рассматривают, начиная с первично-спиртовой группы (с C_ω), и выясняют, какой гексозе соответствует конфигурация ближайших к C_ω четырех асимметрических атомов; берется корень от названия этой гексозы, который составляет начало названия высшего сахара (например, D-глюкоза — D-глюко). Затем тот же высший моносахарид рассматривают, начиная с альдегидной группы (с C_1) и по конфигурации ближайших к альдегидной группе четырех асимметрических атомов дается вторая половина названия (например, D-гулоза — D-гуло). Наконец, окончание слова составляет название моносахарида по общему числу в нем углеродных атомов (например, гептоза, октоза и т. д.). Сказанное можно пояснить примерами:



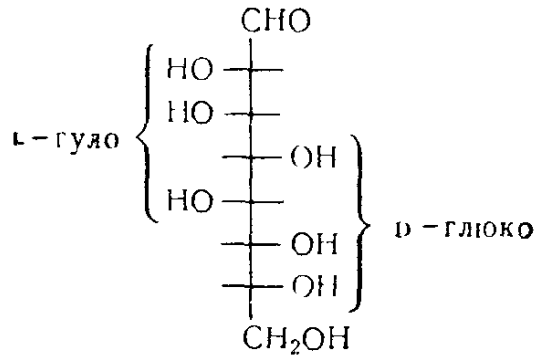
D-глюко-D-гулогептоза



D-глюко-D-идогептоза



D-глюко-L-идооктоза

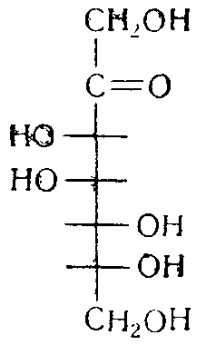


D-глюко-L-гулооктоза

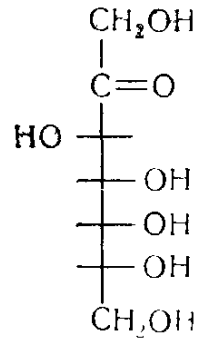
Эта номенклатура позволяет однозначно назвать любой моносахарид, имеющий до 10 углеродных атомов.

Для кетогептоз, кроме того, существует другая номенклатура. Она основана на том, что число асимметричных атомов углерода в кетогептозе равно их числу в альдогексозе. Таким образом, каждая кетогептоза должна по своей конфигурации соответствовать одной из альдогексоз. Это делает излишним применение двойного названия, так как в данном случае достаточно взять корень названия лишь одной альдогексозы, чтобы однозначно определить конфигурацию любой кетогептозы.

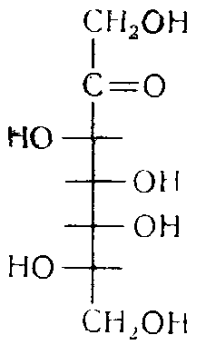
Исходя из этого строится и само название: к корню названия альдогексозы прибавляется слово «гептулоза» (суффикс «ул» означает принадлежность моносахарида к подклассу кетоз). Например:



D-манногептулоза



D-альтрогептулоза (седогептулоза)



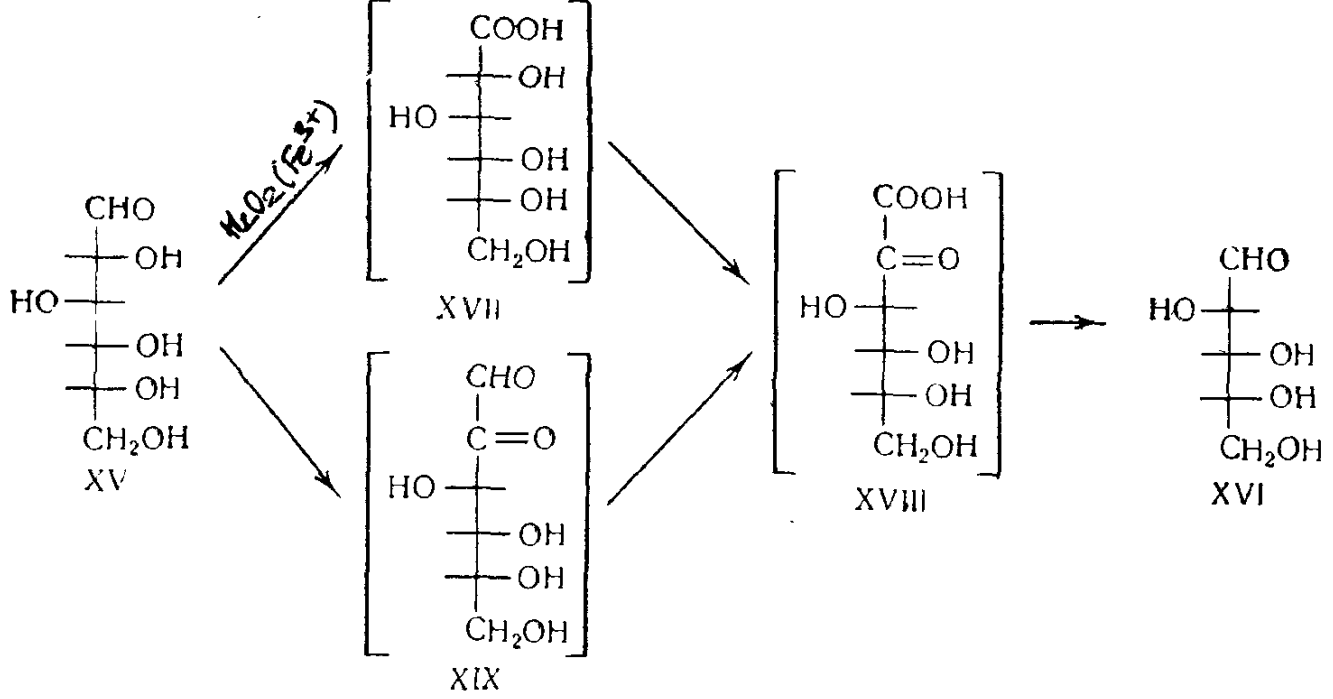
L-галагептулоза (L-персеулоза)

ПЕРЕХОД ОТ ВЫСШИХ МОНОСАХАРИДОВ К НИЗШИМ

Широко применяемые методы частичной деструкции моносахаридов, связанные обычно с отщеплением карбонильной группы сахара, имели и имеют прежде всего большое значение для установления строения и конфигурации моносахаридов. Наряду с этим в ряде случаев они используются до сих пор в препаративной практике для получения некоторых малодоступных моносахаридов.

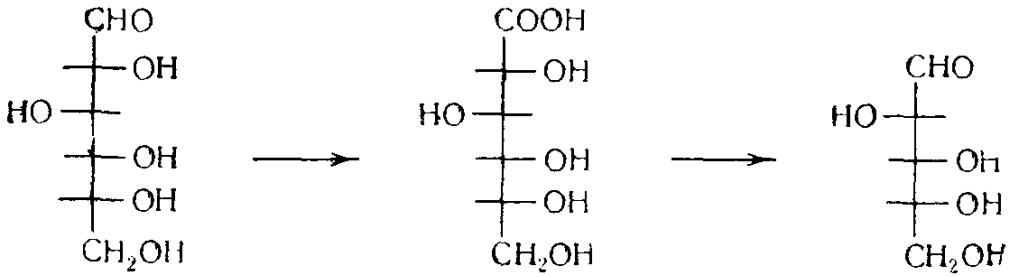
1. Распад по Руффу. Этот наиболее старый метод не является строго избирательным, однако в силу своей простоты он до сих пор широко применяется. Метод основан на окислении альдозы перекисью водорода в присутствии солей трехвалентного железа, обычно в присутствии ацетата. Несколько худшие результаты дает применение солей двухвалентного железа. В результате окисления углеродный атом карбонильной группы моносахарида (XV) отщепляется в виде углекислоты, а атом, следующий за ним в цепи, окисляется до альдегидной группы, в результате чего образуется низший моносахарид (XVI). Механизм реакции Руффа остался невыясненным. Принято считать, что вначале происходит окисление альдегидной группы моносахарида до карбоксильной группы (формула XVII), затем окисляется α-углеродный атом, в результате чего образуется α-кетокислота (XVIII), которая распадается обычным для α-кетокислот путем с отщеплением CO_2 и образованием нового карбонильного соединения.

Другой, не менее вероятной альтернативой является первоначальное окисление моносахарида в озон (XIX), последующее его окисление в ту же α-кетокислоту (XVIII) и ее распад. На примере распада глюкозы до арабинозы сказанное можно представить уравнением:



Аналогичный распад происходит при окислении альдоз, не только перекисью водорода, но и окисью ртути или электролитическим методом. Выходы при окислении по Руффу недостаточно высоки (в лучших случаях 40—45%), и сам метод не является строго избирательным, так как в условиях реакции происходит более глубокая деструкция, приводящая к получению низших моносахаридов. Последнее не является неожиданным и может быть объяснено как дальнейшим окислением получившейся пентозы, так и окислением ее на промежуточной стадии с образованием поликетокислот, распадающихся далее по нескольким направлениям.

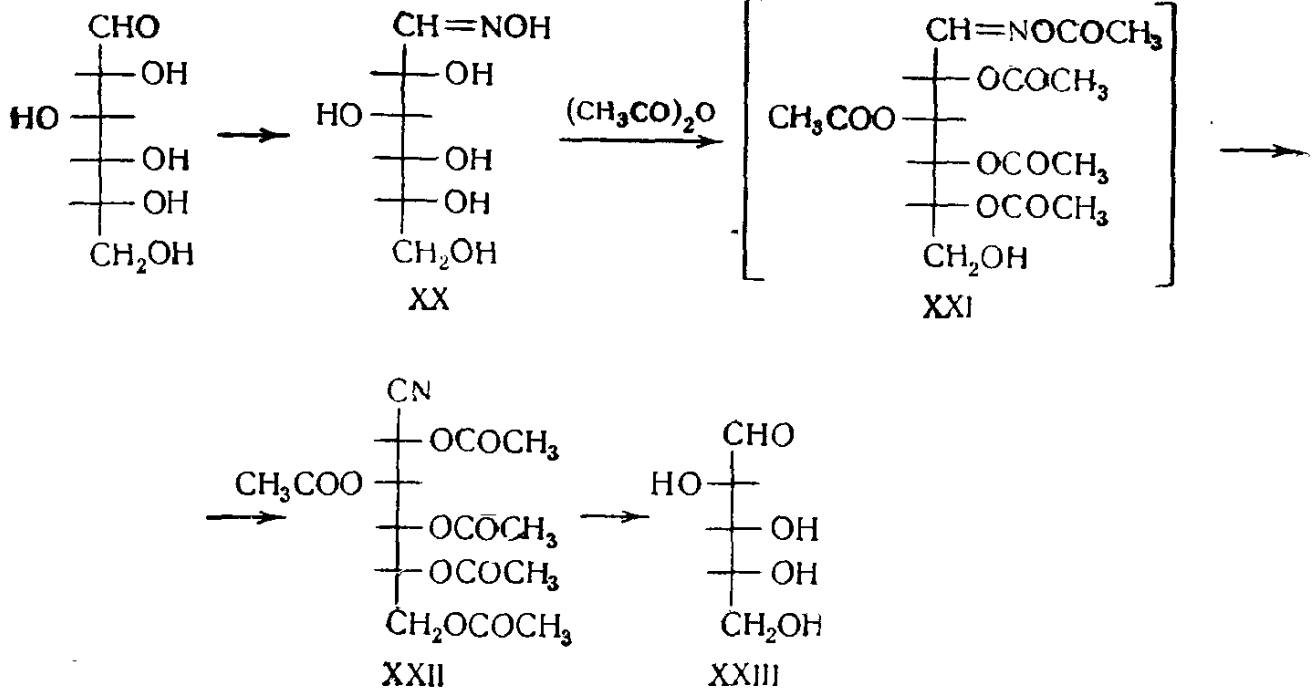
В последнее время находит широкое применение видоизмененный метод Руффа: альдозу окисляют вначале в кислоту (например, действием брома), а последнюю подвергают действию перекиси водорода по Руффу.



В этом случае путем более точной дозировки окислителя достигается более строгая избирательность и подавляется дальнейшая более глубокая деструкция.

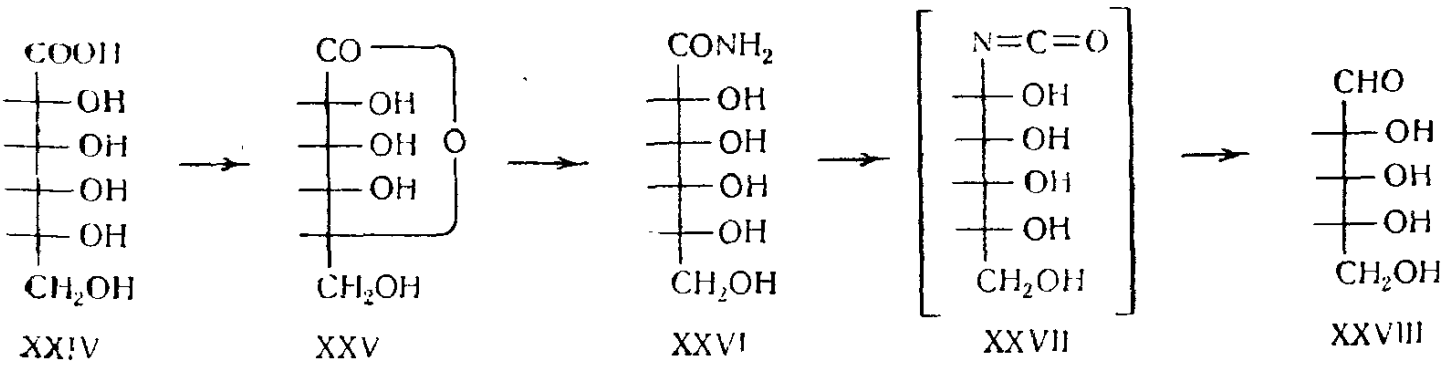
2. Распад по Волю. В отличие от метода Руффа эта реакция дает возможность провести строго избирательное отщепление лишь одного углеродного атома в цепи моносахарида; однако из-за многостадийности использование этого метода в препаративных целях затруднено, и он применяется почти исключительно для анализа. Общая схема распада по Волю ясна из примера на стр. 27.

Моносахарид переводят в оксим (XX), который при нагревании с уксусным ангидридом, вероятно, через образование промежуточного ацетильного производного оксима (XXI) превращается в нитрил (XXII), при этом свободные гидроксильные группы сахара ацетилируются. Последующий распад нитрила, который является ацетильным производным цианогидрина, представляет собою реакцию, обратную реакции



Килиани. Этот распад, приводящий к отщеплению нитрильной группы в виде синильной кислоты, происходит под действием агентов основного характера и дает моносахарид (XXIII) с меньшим числом углеродных атомов. Первоначальный вариант реакции, предложенный Волем, состоял в обработке нитрила (XXII) окисью серебра. Более удобным является расщепление действием метилата натрия по Земплену или действием аммиака по Хоккету. Естественно, что в условиях распада прежде всего происходит омыление сложно-эфирных группировок, поэтому в результате реакции образуется неацетилированный моносахарид (XXIII).

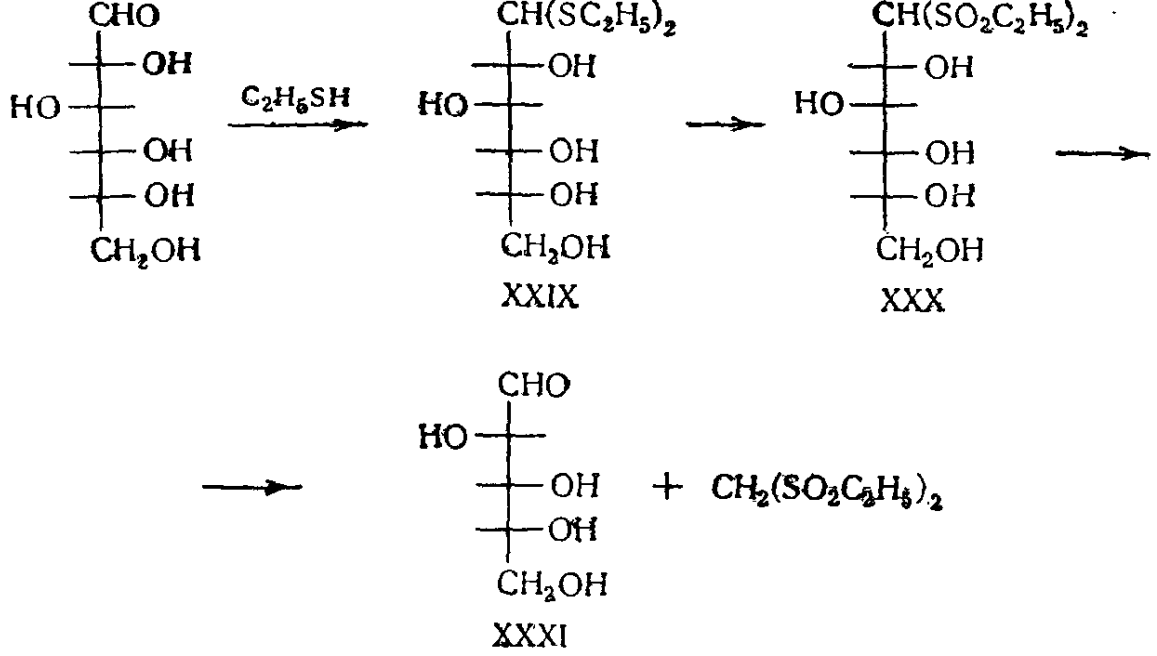
3. Распад по Веерману. Этот метод, основанный на Гофмановской перегруппировке, близок по идее к реакции Воля и также применяется почти исключительно в аналитических целях. Он может быть представлен следующим примером:



Исходную альдоновую кислоту (XXIV) через лактон (XXV) переводят действием аммиака в амид (XXVI). При обработке амида гипохлоритом натрия в условиях реакции Гофмана происходит гладкое отщепление одного углеродного атома в виде углекислоты, и образуется низшая альдоза (XXVIII). Естественно предположение, что последняя стадия протекает через промежуточное образование изоцианата (XXVII), обычного промежуточного продукта гофмановской перегруппировки.

4. Распад по Г. Фишеру. Этот новый оригинальный метод еще не изучен достаточно широко, но имеет, по-видимому, большие перспективы.

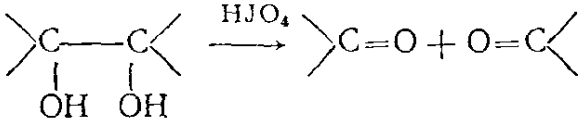
Существо метода видно из следующего примера.



При взаимодействии альдозы с меркаптаном в кислой среде образуется меркапталь сахара (XXXIX) (подробно эта специфическая реакция моносахаридов обсуждается позже). При окислении (XXIX) надкислотой (чаще всего используют надпропионовую кислоту) меркапталь переходит в дисульфон (XXX). Дисульфон, содержащий характерную группировку типа метионовой кислоты, при действии оснований распадается по реакции, обратной альдольной конденсации (так называемый обратный альдольный распад) с образованием низшей альдозы (XXXI) и дисульфонилметана. Наличие двух сульфонильных групп настолько ослабляет соседнюю углерод-углеродную связь, что разрыв ее идет уже под действием аммиака. Мягкие условия реакции делают особенно интересным использование этого метода.

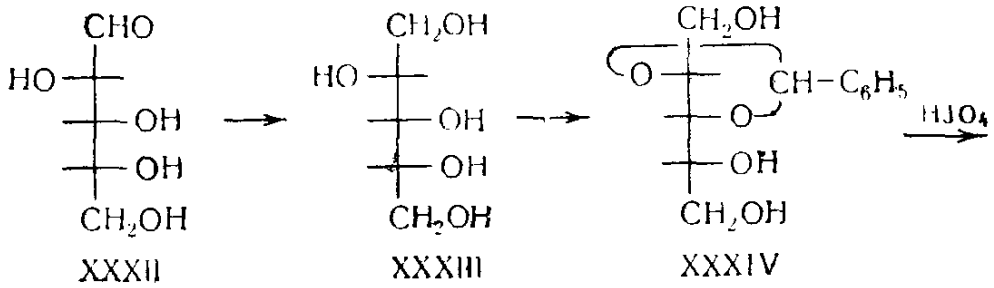
5. Окисление иодной кислотой. Все перечисленные методы перехода от высших моносахаридов к низшим сводились к отщеплению тем или иным методом альдегидной группы моносахарида и укорачиванию его углеродной цепи на один углеродный атом. Главным недостатком этих методов с препаративной точки зрения является то, что в конечном продукте синтеза сохраняется стереохимия всего углеродного скелета исходного моносахарида; таким образом, отсутствует должная гибкость, позволяющая переходить к более редким в стереохимическом отношении моносахаридам. С этой точки зрения наиболее интересным явился бы метод, позволяющий разрывать углерод-углеродную цепь сахара там, где это желательно для химика-синтетика, не затрагивая при этом конфигурацию других углеродных атомов.

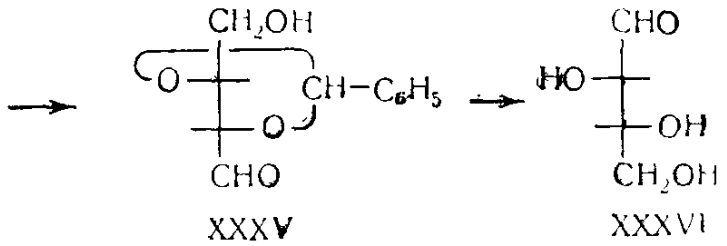
Этого можно достигнуть окислением углеводов иодной кислотой, которая избирательно расщепляет углерод-углеродную связь α-гликольной группировки с образованием двух карбонильных групп.



Этот фундаментальный в химии углеводов метод имеет исключительное значение при установлении строения моно- и полисахаридов и используется сейчас почти в каждой работе, посвященной структурной химии углеводов. Его аналитическое применение будет рассмотрено позже, здесь же остановимся только на его синтетических возможностях, которые пока используются еще довольно ограниченно.

Поскольку иодная кислота расщепляет любую связь между углеродными атомами, несущими гидроксильные группы, то моносахарид под действием HJO_4 полностью распадается, что и используется в аналитических целях (см. стр. 36). Поэтому для частичной деструкции молекулы моносахарида, т. е. для избирательного разрыва нужной углерод-углеродной связи в молекуле исходного моносахарида должна быть оставлена только пара свободных соседних гидроксилов, между которыми находится связь, подлежащая расщеплению, для чего некоторые гидроксильные группы должны быть защищены. В последующих разделах вопрос о получении производных моносахаридов по гидроксильным группам будет подробно рассмотрен, сейчас же можно только отметить, что в качестве такой защиты может быть использовано образование простых и сложных эфиров и особенно ацетальной защиты. Нужно сказать, что именно сложность введения избирательной защиты в молекулу моносахарида является главным ограничением при применении рассматриваемого метода. Однако, если защитить нужные гидроксильные группы удалось, дальнейшее окисление иодной кислотой идет весьма гладко, строго избирательно и с высоким выходом. В качестве примера можно привести синтез треозы из арабинозы.





Арабинозу (XXXII) восстанавливают в арабит (XXXIII), последний при обработке бензальдегидом в присутствии кислых агентов дает бензилиденовое производное (XXXIV), в котором имеется лишь одна гликольная группировка у $C_{(1)}$—$C_{(2)}$.

Окисление HJO_4 дает производное (XXXV), из которого гидролизом получается сама треоза (XXXVI).

Приведенный пример демонстрирует расщепление связи, соответствующей связи $C_{(4)}$—$C_{(5)}$ в исходном моносахариде, которого принципиально невозможно достичь применением других, описанных выше методов. Комбинируя защиту нужных гидроксильных групп в выбранном специально моносахариде, этим методом можно по существу получить моносахарид с любой заданной конфигурацией.

Однако, как уже было сказано, применение этого общего метода весьма ограничивается трудностями, возникающими при получении избирательно защищенных производных моносахаридов.

ЛИТЕРАТУРА

C. Hudson. The Fischer cyanhydrin synthesis and the configuration of higher-carbon sugars and alcohols. Adv. carbohydrate chemistry, 1946, **1**, 1.

J. Sowden. The nitromethane and 2-nitroethanol synthesis. Adv. carbohydrate chemistry, 1951, **6**, 291.

Глава 3

МОНОСАХАРИДЫ КАК ЦИКЛИЧЕСКИЕ ПОЛУАЦЕТАЛИ

ТАУТОМЕРИЯ МОНОСАХАРИДОВ

Недостаточность формул Фишера

Весь изложенный выше материал по химии моносахаридов основывался на предложенных Э. Фишером оксикарбонильных формулах моносахаридов с открытой цепью углеродных атомов. Несмотря на то, что значительное число реакций моносахаридов удовлетворительно объясняется этими формулами, имелись противоречащие им факты, которые уже в период работ Фишера ждали объяснения, и поэтому одновременно с оксикарбонильными формулами для моносахаридов были предложены другие формулы (Колли, Толленс). Следующие экспериментальные данные не согласовывались с фишеровскими формулами углеводов.

1. Отсутствие некоторых альдегидных реакций. Несмотря на то, что альдозы дают многие реакции, характерные для альдегидов (образование азотистых производных, цианогидринов, восстановление солей серебра и меди и др.), некоторые весьма характерные реакции на альдегидную группу у моносахаридов отсутствуют. Так, альдозы с фуксинсернистой кислотой не дают окраски, характерной для всех жирных альдегидов. Они не образуют также бисульфитных производных при действии бисульфита натрия. Отсутствуют и некоторые другие реакции.

2. Мутаротация. Не находило объяснения и явление так называемой мутаротации, т. е. постепенного изменения угла вращения плоскости поляризации, которое наблюдается для свежеприготовленных водных растворов кристаллических моносахаридов. Обычно для таких растворов угол вращения довольно быстро изменяется, доходя до определенной строго постоянной величины; так, для глюкозы это изменение происходит от +106 до +52,5°. Предполагалось, что это явление связано с переходом моносахарида из одной модификации в другую, но сущность этой изомеризации, исходя из формул Фишера, понять было невозможно.

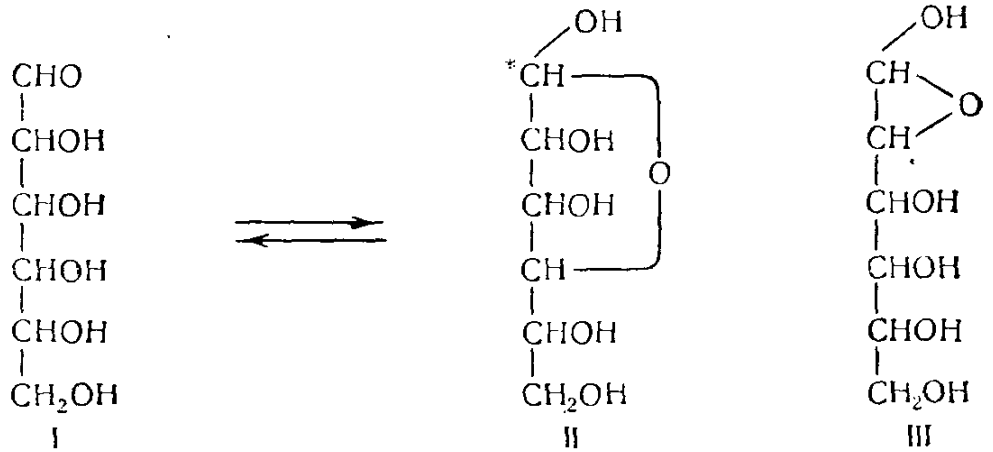
3. Количество диастереомерных моносахаридов. Если исходить из формул Фишера, то в соответствии со стереохимическими правилами должно существовать 8 диастереомерных альдопентоз и 16 диастереомерных альдогексоз. Действительно, это количество альдоз было найдено в природе или синтетически получено Фишером. Однако дальнейшее исследование их показало, что каждый из этих

моносахаридов способен существовать в двух совершенно индивидуальных кристаллических формах с различными константами, в том числе с резко различными углами вращения; так, например, были получены две D-глюкозы с углами вращения +106 и +22,5°. Характерно, что при растворении обеих форм моносахарида получался раствор, угол вращения которого менялся вследствие мутаротации и постепенно достигал для обеих форм одной и той же всегда строго постоянной величины, которая для глюкозы, например, составляла +52,5°. Таким образом, число реально существующих альдоз ровно вдвое превышало число предсказанных на основе законов стереохимии. Поскольку число диастереомеров совершенно строго регламентируется количеством асимметрических углеродных атомов в молекуле, это противоречие формулам Фишера было особенно серьезным и указывало на их несостоятельность. Удвоение количества диастереомеров говорило о наличии в молекуле моносахаридов еще одного дополнительного асимметрического углеродного атома. Таким образом, количество асимметрических атомов в альдопентозах должно равняться четырем, а в альдогексозах — пяти.

4. Особые свойства одной из гидроксильных групп. Последнее серьезное противоречие оксикарбонильным формулам Фишера состояло в том, что одна из гидроксильных групп моносахаридов резко отличалась по своим свойствам от других гидроксилов. Так, например, при действии на моносахариды спирта в присутствии следов кислот легко образуются моно-О-алкильные производные, так называемые гликозиды, причем эта реакция обратима, и гликозиды в кислой среде сравнительно легко распадаются с регенерацией исходного моносахарида; для каждого из 16 моносахаридов было получено по два таких производных. Такое обратимое образование О-алкильных производных скорее напоминает поведение гидроксильной группы полуацеталей и совершенно не характерно для спиртовых гидроксилов, какими являлись, если принять формулы Фишера, все гидроксильные группы в молекуле моносахаридов.

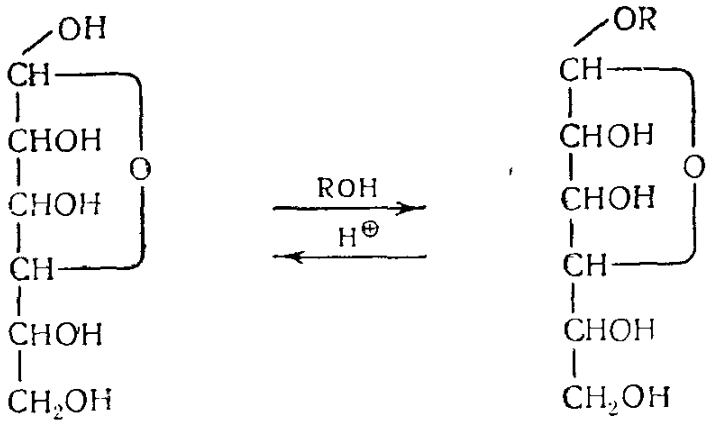
Циклические формулы Толленса

Для объяснения всех этих противоречий Толленсом было высказано предположение, что моносахариды в действительности являются не оксикарбонильными соединениями (I), а представляют собою циклические полуацетали последних, у которых альдегидная группа сахара взаимодействует с одной из гидроксильных групп. Толленс считал, что цикл образуется с участием гидроксила, находящегося у четвертого углеродного атома, и предложил для моносахаридов формулу (II) с γ-окисным кольцом. Еще ранее этого Колли высказал аналогичную мысль, предположив, что моносахариды имеют строение полуацеталей с α-окисным кольцом (III).

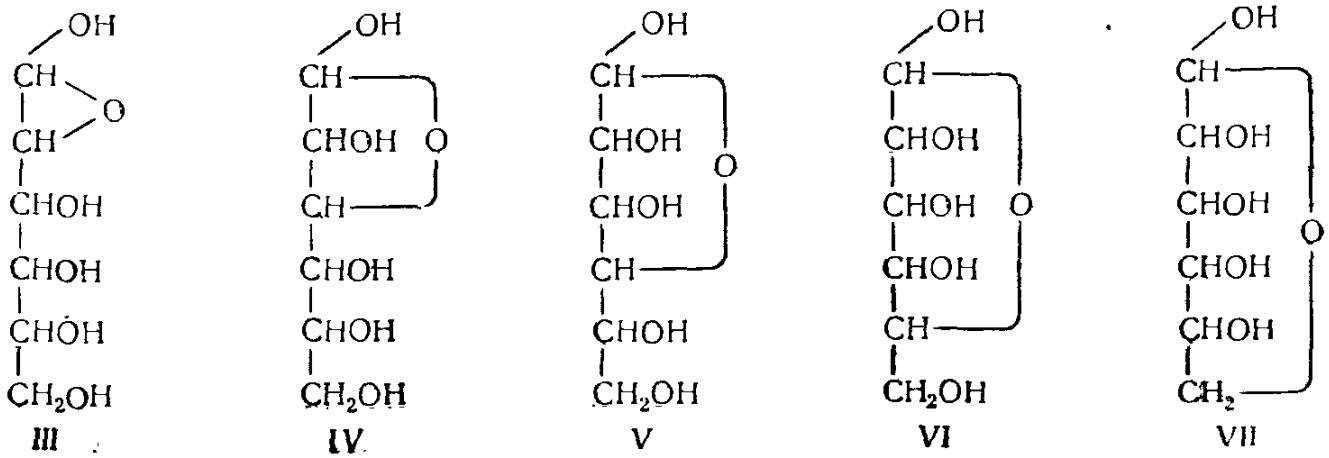


I II III

Для объяснения многих альдегидных реакций, свойственных моносахаридам, Толленс предположил, что в то время, как структура твердого моносахарида соответствует циклической форме (II), в растворах его имеет место таутомерное равновесие структур открытой (I) и циклической формы (II). Это предположение устраняет все указанные выше противоречия. В самом деле, отсутствие некоторых альдегидных реакций можно вполне допустить, если принять, что таутомерное равновесие в растворе сильно сдвинуто в сторону (II) и количество альдегидной формы (I) недостаточно для проявления некоторых цветных реакций. Далее, поскольку за счет образования полуацеталя возникает новый центр асимметрии у $C_{(1)}$ происходит удвоение количества диастереомеров в согласии с экспериментальными данными. Явление мутаротации также легко находит свое объяснение в том, что два диастереомерных моносахарида, отличающиеся только конфигурациями $C_{(1)}$ в растворе дают равновесную смесь за счет эпимеризации у $C_{(1)}$, которая происходит через образование открытой альдегидной формы. Наконец, становятся понятными и особые свойства одного из гидроксилов. Естественно, что возникающая дополнительно гидроксильная группа, так называемый гликозидный гидроксил, является не спиртовой гидроксильной группой, а гидроксилом полуацеталя. Получающееся О-алкильное производное является не простым эфиром, а полным ацеталем, образующимся из полуацеталя; отсюда понятна и обратимость этой реакции:



Предположения о циклической полуацетальной формуле моносахаридов и о таутомерии между открытой и циклической формами удовлетворительно объяснили все факты химии углеводов и были вскоре приняты. Однако совершенно невыясненным оставался вопрос о размере окисного кольца, которое Толленс из общих соображений об устойчивости пятичленных циклов принял за γ-окисное. В действительности альдегидная группа моносахарида может реагировать с любой из имеющихся пяти гидроксильных групп с образованием полуацеталя. В этом случае структура моносахарида на примере альдогексоз изображается одной из формул (III—VII).



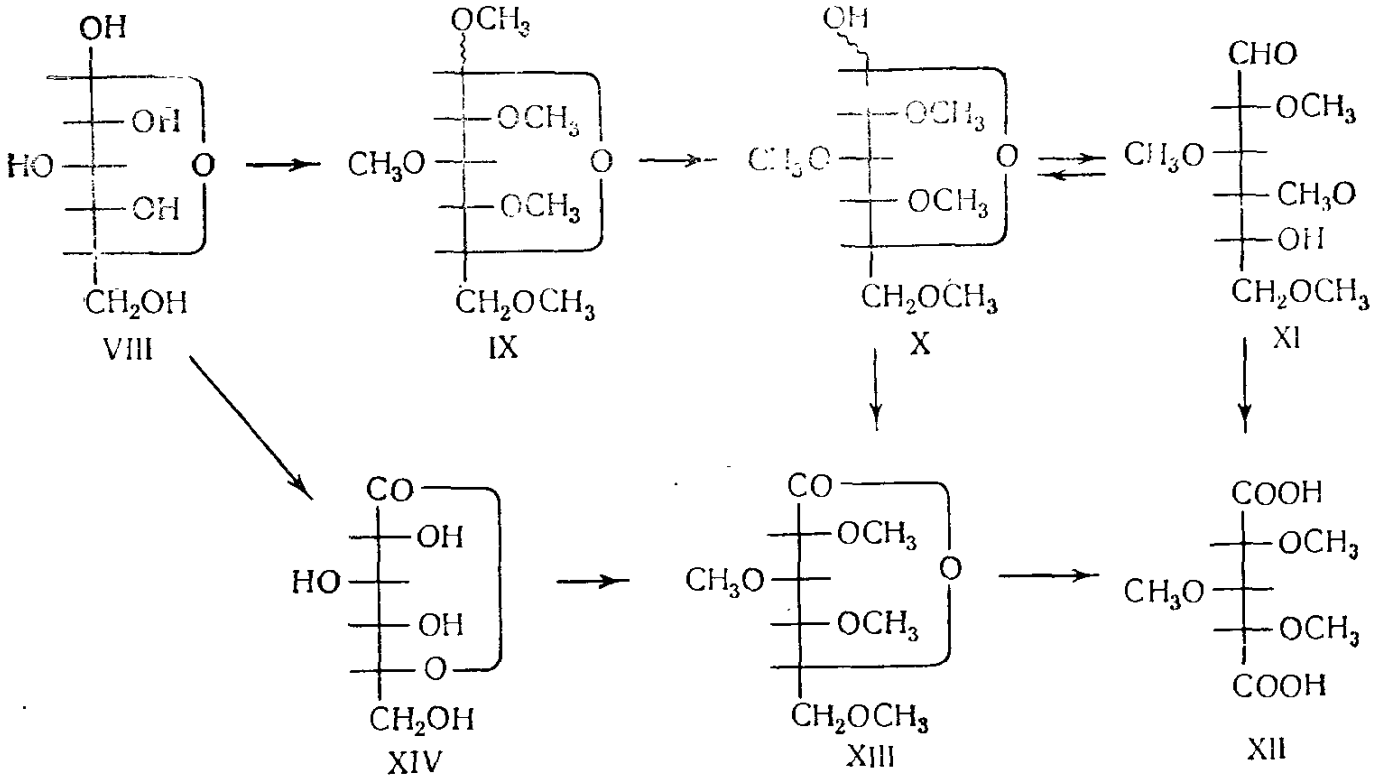
Все эти формулы могут обсуждаться с равным правом, однако, учитывая относительно малую устойчивость α-, β- и ε-окисных колец, наиболее вероятными казались предположения, что моносахариды имеют структуру (V) с γ-окисным кольцом, предложенную Толленсом, или структуру (VI) с δ-окисным кольцом.

Экспериментальное решение этого вопроса в свое время представляло значительные трудности и было осуществлено Хеуорзсом лишь в 20-х годах этого столетия. В настоящее время в химии моносахаридов вопрос о размере окисного кольца занимает одно из центральных мест, поскольку его приходится экспериментально решать всякий раз, когда речь идет об установлении строения нового моносахарида или какого-либо вновь полученного производного моносахарида, так как для последнего размеры окисного кольца (как это будет видно из дальнейшего изложения) вовсе не обязательно должны соответствовать размеру кольца в исходном моносахариде.

Методы определения размеров окисного кольца

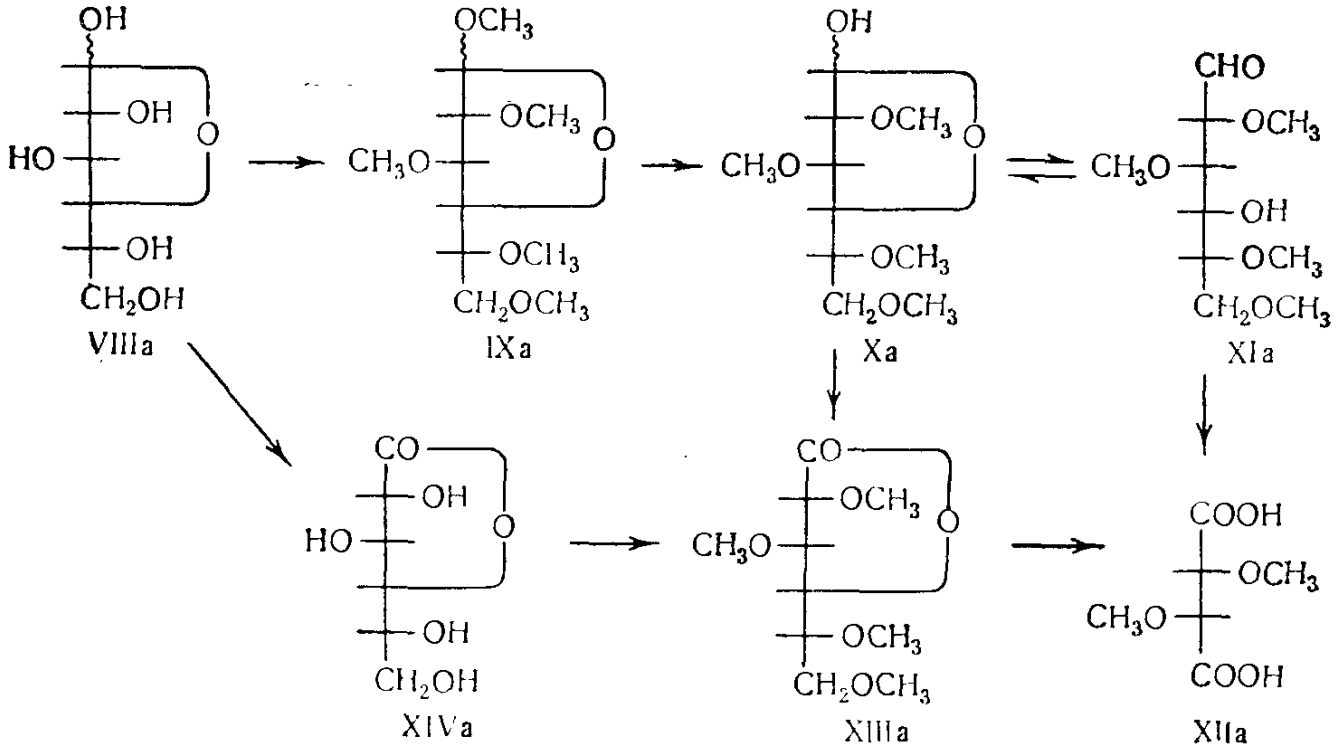
В настоящее время существуют два основных метода определения размеров окисного кольца моносахарида, причем эти методы столь же широко применяются и для решения вопросов строения других углеводов, особенно полисахаридов.

1. Метод метилирования (метод Хеуорзса). Этот универсальный и важнейший до настоящего времени метод, позволяющий решать различные вопросы, касающиеся структуры углеводов, был широко развит работами английских химиков (Хеуорзс, Джонс, Херст и др.). Основная идея его состоит в полном метилировании моносахарида, т. е. превращении всех свободных гидроксильных групп в метоксильные, с последующим окислением продукта метилирования. Последовательность операций легче всего видеть на одном из первых примеров применения этого метода для определения строения глюкозы.



Глюкоза (VIII) вначале подвергается полному метилированию, которое достигается либо действием диметилсульфата в присутствии щелочи (метод Хеуорзса), либо действием иодистого метила в присутствии

окиси серебра (метод Пурди). Метилирование идет достаточно хорошо, так как гидроксильные группы сахаров обладают более отчетливо выраженными кислыми свойствами, чем обычные спиртовые гидроксилы, однако для достижения полного метилирования иногда применяют оба метода последовательно, метилируя сначала диметилсульфатом, а затем иодистым метилом. Полученная таким образом полностью метилированная глюкоза (IX) содержит 4 метоксильные группы. Последние являются простыми эфирными группировками, которые устойчивы к действию как щелочных, так и кислых агентов. Гликозидный гидроксил $C_{(1)}$ также метилируется, однако как это указывалось выше, в данном случае метильная группа при обработке кислотами легко омыляется, что дает тетраметилглюкозу (X), которая, обладая свободным гликозидным гидроксилом, существует в виде таутомерной смеси со своей открытой формой (XI). Если тетраметильное производное подвергнуть обработке азотной кислотой, то окислению подвергаются углеродные атомы, содержащие карбонильную группу и свободный гидроксил, в результате чего образуется двухосновная кислота. Как видно из приведенной выше схемы, в том случае, если бы глюкоза имела δ-окисное кольцо, конечным продуктом окисления была бы триметоксиглутаровая кислота (XII), а при окислении бромом — δ-лактон (XIII). Напротив, если кольцо является γ-окисным, как предполагал Толленс, в результате окисления должна получаться соответственно диметоксиянтарная кислота (XII*a*), что видно из следующей схемы:



В действительности при проведении всех этих реакций Хеуорзом в конечном счете была получена только триметоксиглутаровая кислота, что совершенно однозначно доказывало наличие δ-окисного кольца в глюкозе, которой таким образом соответствовало не строение (VIII*a*), предложенное Толленсом, а структура (VIII).

При обсуждении этого метода естественно возникает вопрос о том, насколько соответствует структура подвергаемого окислению метилированного сахара структуре самой глюкозы. Другими словами, нельзя ли предположить, учитывая таутомерные отношения открытых и циклических форм сахаров и, следовательно, весьма легкий их взаимный переход, что в процессе метилирования произошли изменения структуры и δ-окисное кольцо соответствует не исходному моносахариду, а лишь его

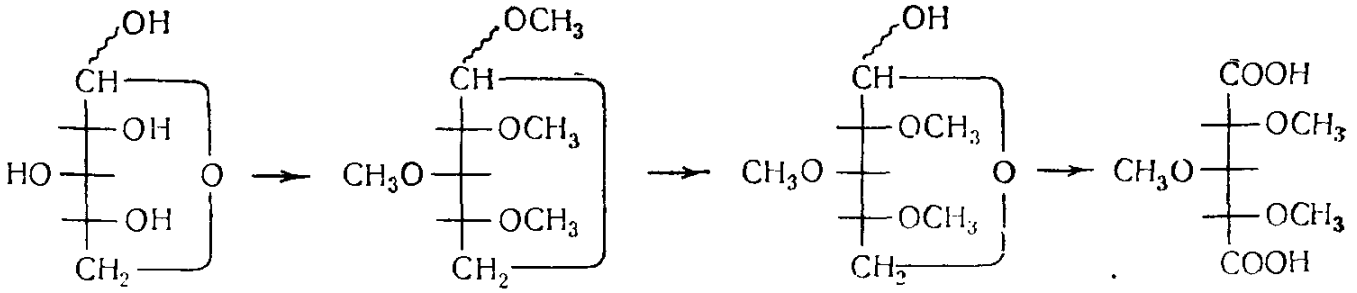
метильному производному. Это предположение было отвергнуто следующим образом: при осторожном окислении полученной тетраметилглюкозы (X или X*a*) бромом образуется лактон метилированной альдоновой кислоты (XIII или XIII*a*), окисление которого HNO_3 также дает двухосновную кислоту, идентичную полученной при прямом окислении (XII или XII*a*). Окисление бромом идет в весьма мягких условиях и является по существу реакцией дегидрирования, поэтому указанной операции можно подвергнуть и неметилированный моносахарид (VIII) без риска вызвать в нем какие-либо структурные изменения. Полученный при этом лактон альдоновой кислоты (XIV или XIV*a*) при метилировании дает лактон (XIII или XIII*a*). Проведение в этой последовательности реакций для глюкозы и для многих других моносахаридов показало, что лактон (XIV) имеет структуру, аналогичную структуре метилированного лактона (XIII), так как при метилировании (XIV) образуется (XIII). Это доказывает, что размер кольца метилированного сахара (из которого получен (XII)) и исходного моносахарида (из которого получали (XIV)) одинаков и, таким образом, в процессе метилирования изомеризация не имела места.

Таким образом, результаты, полученные при использовании метода Хеуорзса, дают возможность однозначно судить о размере окисного кольца в исходном моносахариде. В настоящее время при выяснении вопроса о структуре моносахаридов обычно используют оба пути, т. е. окисляют метилированный сахар до двухосновной кислоты и до лактоиа метилированной одноосновной кислоты и сличают результаты обеих операций, на основании чего делается вывод о размере кольца.

Существенное обстоятельство, которое делает особенно ценным метод Хеуорзса, состоит в том, что при переходе от моносахарида к соответствующей метилированной двухосновной кислоте сохраняется конфигурация центральных углеродных атомов. Следовательно, определение конфигурации полученной кислоты (которая обычно идентифицируется в виде своего диамида) одновременно дает и конфигурацию двух или трех асимметрических углеродных атомов, входящих в цепь моиосахарида.

Метод Хеуорзса имеет универсальное значение и применяется для решения самых различных проблем, касающихся структуры углеводов. В дальнейшем изложении он будет упоминаться очень часто.

С помощью этого метода, в частности, были определены размеры окисных колец (и, следовательно, окончательно установлены структуры) всех пентоз и гексоз. В качестве второго примера можно привести доказательство строения ксилозы, которое ясно из следующей схемы:

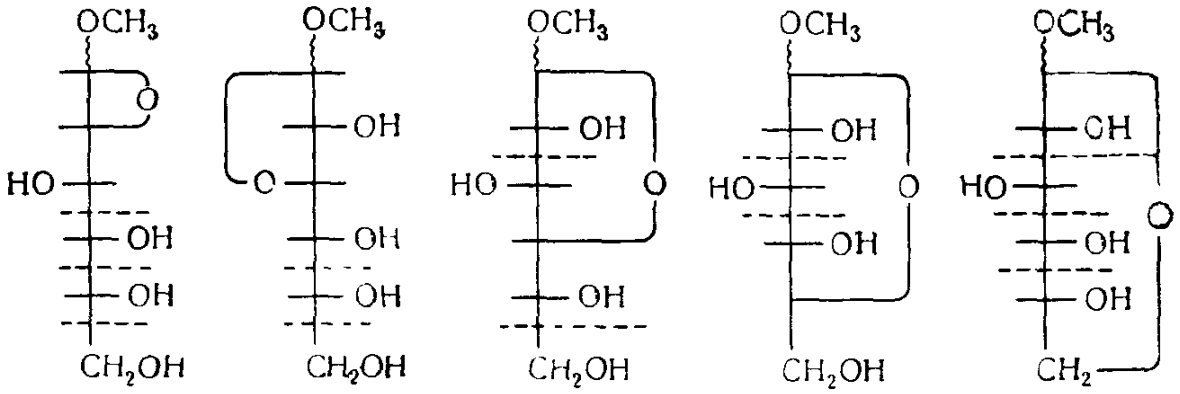


В результате окисления образуется триметоксиглутаровая кислота, идентичная кислоте, полученной из глюкозы. Это доказывает наличие в ксилозе шестичленного δ-окисного кольца и одновременно показывает, что конфигурация углеродных атомов $C_{(2)}$, $C_{(3)}$ и $C_{(4)}$ в глюкозе и ксилозе одинакова, поскольку получается одна и та же кислота.

2. Метод Хэдсона-Джексона. Этот метод, в основе которого лежит окисление моносахаридов иодной кислотой, применяется, как и

метод метилирования, не только для выяснения вопроса о размере окисного кольца, но и для решения многих других структурных проблем в химии углеводов. Как уже упоминалось, при окислении иодной кислотой разрываются связи между атомами углерода, несущими гидроксильные или карбонильные функции. Таким образом, при окислении моносахарида со свободными гидроксильными группами происходит полный его распад. Однако, если окислению подвергать производное сахара с закрепленным кольцом, например, гликозид, то характер и количество полученных продуктов окисления будут соответствовать окисному кольцу, имевшемуся во взятом производном *.

При окислении HJO_4 любое центральное звено, содержащее группу >CHOH, окисляется до муравьиной кислоты, в то время как конечная первичноспиртовая группа — CH_2OH при разрыве связи $C_{(6)}$—$C_{(5)}$ в гексозе дает формальдегид. В зависимости от того, какое окисное кольцо имелось в гликозиде, образуется различное количество молей муравьиной кислоты и формальдегида, и затрачивается различное число молей HJO_4. Сказанное видно из следующей схемы, где рассматриваются результаты окисления метилглюкозида в зависимости от возможных размеров его окисного кольца (пунктиром обозначаются места разрыва углерод-углеродных связей):



	α-окись	β-окись	γ-окись	δ-окись	ε-окись
Число затраченных молей HJO_4	3	2	2	2	3
Число молей HCHO	1	1	1	0	0
Число молей HCOOH	2	1	0	1	2

Из схемы видно, что во всех случаях количество молей израсходованной иодной кислоты и полученных молей формальдегида и муравьиной кислоты различно. Экспериментальные данные соответствовали затрате двух молей HJO_4 и выделению одного моля муравьиной кислоты, что отвечает структуре с δ-окисным кольцом.

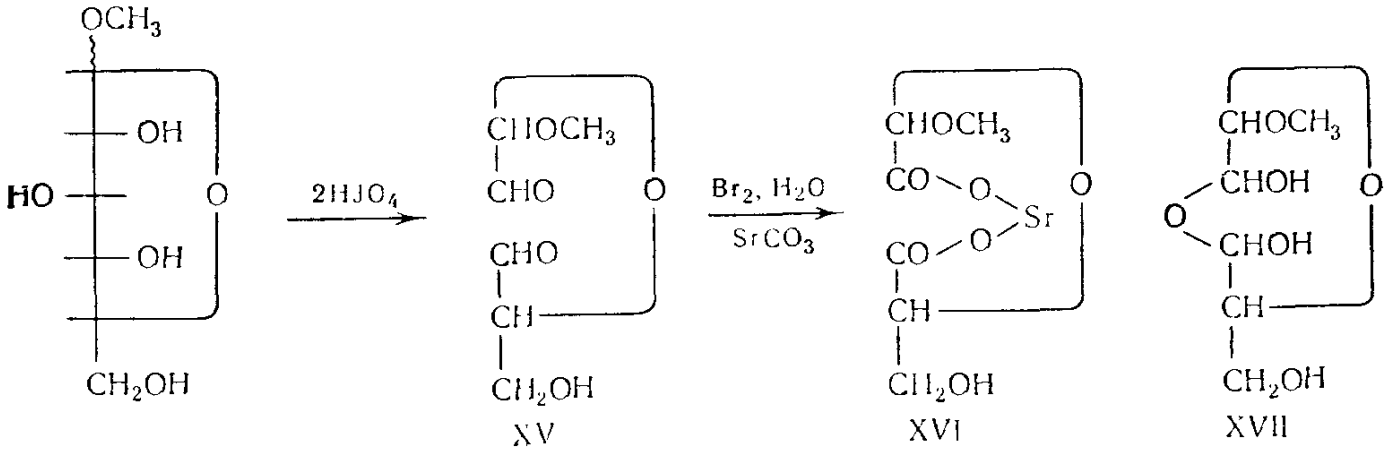
Совершенно аналогичным образом можно определить размер окисного кольца в любом гликозиде. В настоящее время методика окисления сахаров иодной кислотой разработана очень тщательно; реакция проводится обычно в водных растворах, и количество затраченной HJO_4 определяется титрованием иода, выделившегося при добавлении KJ,

* Если при этом учесть, что структура гликозида обычно соответствует структуре моносахарида (что может быть дополнительно проверено окислением моносахарида в лактон, подобно тому, как указывалось выше), то можно вывести заключение и о строении самого сахара.

раствором арсенита натрия, а образующиеся формальдегид и муравьиная кислота определяются обычными методами количественного анализа.

Интересно отметить, что в отдельных случаях вследствие пространственных затруднений окисление α-гликольной группировки действием иодной кислоты затруднено или становится вовсе невозможным. Так, например, в фенилглюкозиде наличие бензольного ядра сильно затрудняет разрыв углерод-углеродной связи $C_{(2)}$—$C_{(3)}$. Еще сильнее влияние тритильной (трифенилметильной) группировки, в присутствии которой соседняя углерод-углеродная связь теряет способность к окислению. Это обстоятельство следует иметь в виду при использовании метода окисления иодной кислотой для установления строения некоторых производных сахаров. Вместе с тем это может быть применено для частичного расщепления моносахарида в синтетических целях, хотя до настоящего времени эта возможность, по-видимому, не использовалась.

Как указывалось, окисление гликозидов иодной кислотой можно провести таким образом, что окисный мостик сахара сохраняется. Вследствие этого продуктом реакции являются диальдегиды своеобразной структуры (XV). Так, например, окисление метилглюкозида изображается уравнением

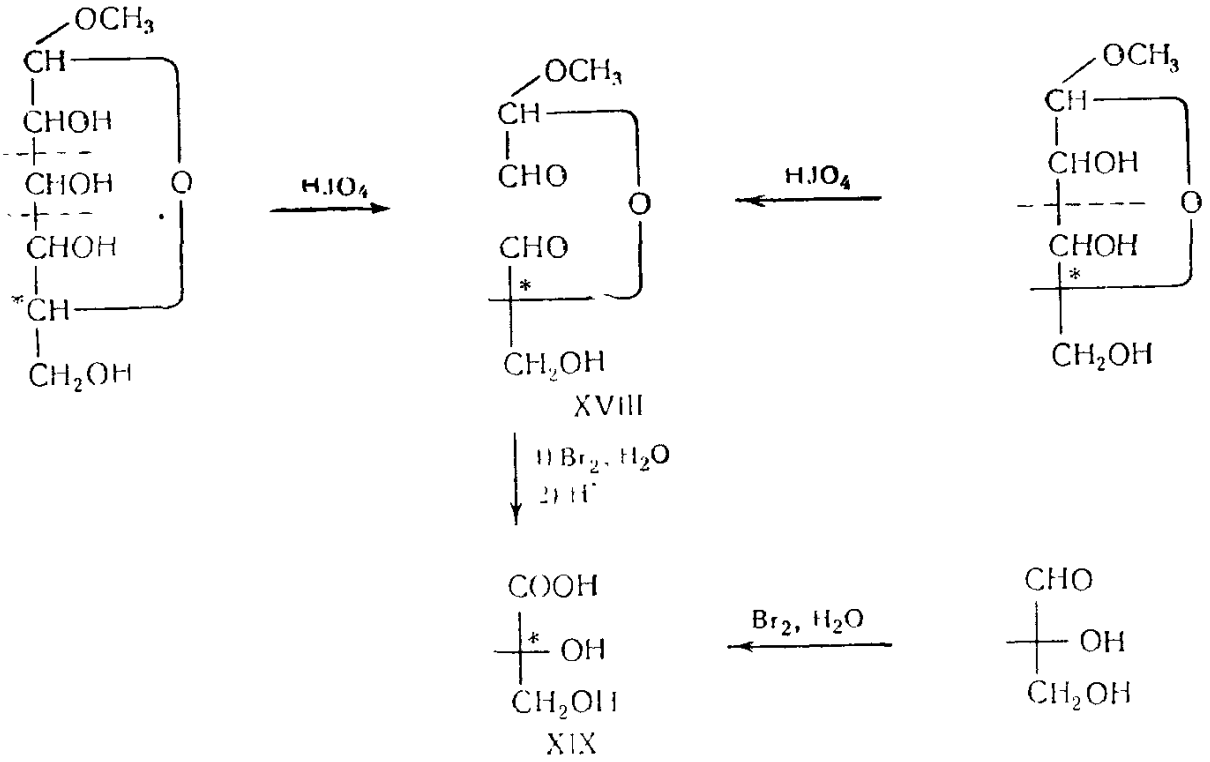


Эти диальдегиды были выделены но, по новейшим данным, в действительности не содержат свободных альдегидных групп, а представляют собою циклические *бис*-полуацетали типа (XVII). Однако при выяснении стереохимических вопросов (см. ниже) для идентификации продукта окисления гораздо удобнее методика, по которой диальдегиды осторожным окислением бромной водой превращают в соответствующие двухосновные кислоты (XVI), которые идентифицируют в виде стронциевых или барневых солей.

Определение абсолютной конфигурации моносахаридов

Окисление иодной кислотой во многих случаях дает возможность, помимо выяснения размеров окисного кольца, экспериментально устанавливать абсолютную конфигурацию моносахарида (см. схему на стр. 38).

Как это видно из схемы, при окислении производных гексоз, имеющих δ-окисное кольцо, или пентоз, имеющих γ-окисное кольцо, углеродный атом $C_{(5)}$ в гексозе или $C_{(4)}$ в пентозе не затрагивается и сохраняет свою конфигурацию. Вместе с тем именно конфигурация этого атома определяет принадлежность моносахарида к D- или L-ряду, т. е. его абсолютную конфигурацию. Естественно, что для гексоз, имеющих γ-окисное кольцо, или пентоз, содержащих δ-окисное кольцо, это не имеет



места, так как $C_{(5)}$ и $C_{(4)}$-атомы затрагиваются при окислении. Если диальдегид, полученный при окислении, подвергнуть далее окислению бромом, и в кислой среде провести гидролиз полученной двухосновной кислоты, то в результате образуется щавелевая кислота и оптически активная глицериновая кислота (XIX), конфигурация которой соответствует конфигурации $C_{(5)}$ (или $C_{(4)}$ для пентоз) исходного моносахарида. Таким образом, при деструкции иодной кислотой с последующим гидролизом в моносахариде разрушаются все стереохимические центры, кроме центра при асимметрическом атоме, определяющем абсолютную конфигурацию, и все моносахариды D-ряда, независимо от их относительной конфигурации, дают D-глицериновую кислоту, а моносахариды L-ряда — L-глицериновую кислоту.

Сравнение полученной глицериновой кислоты с глицериновой кислотой из D- или L-глицеринового альдегида (конфигурация которого является исходным пунктом для отнесения сахара к D- или L-ряду) позволяет определять конфигурацию глицериновой кислоты, полученной окислением сахара, и следовательно, отнести исходный моносахарид к D- или L-ряду.

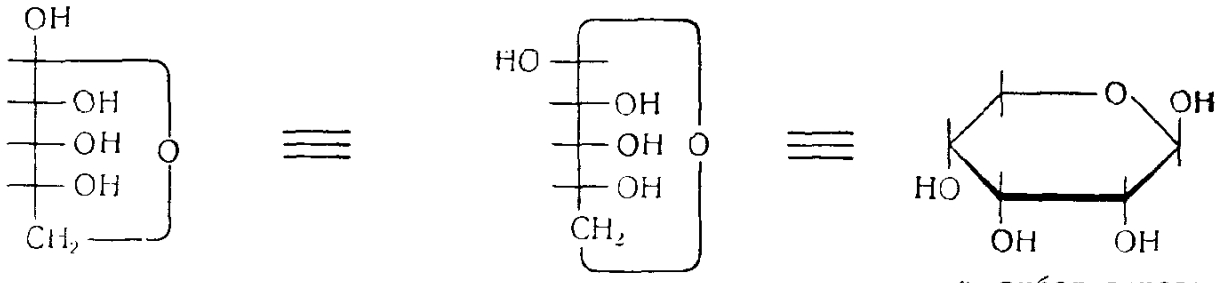
Номенклатура циклических форм моносахаридов

С помощью метода метилирования и окисления иодной кислотой было установлено, что в моносахаридах (пентозах и гексозах) чаще всего имеется δ-окисное шестичленное кольцо, но в ряде случаев встречаются моносахариды с γ-окисным пятичленным кольцом. Для других возможных окисных форм моносахаридов данных почти нет, хотя имеются некоторые указания, что в отдельных очень редких случаях моносахариды обладают ε-окисным кольцом.

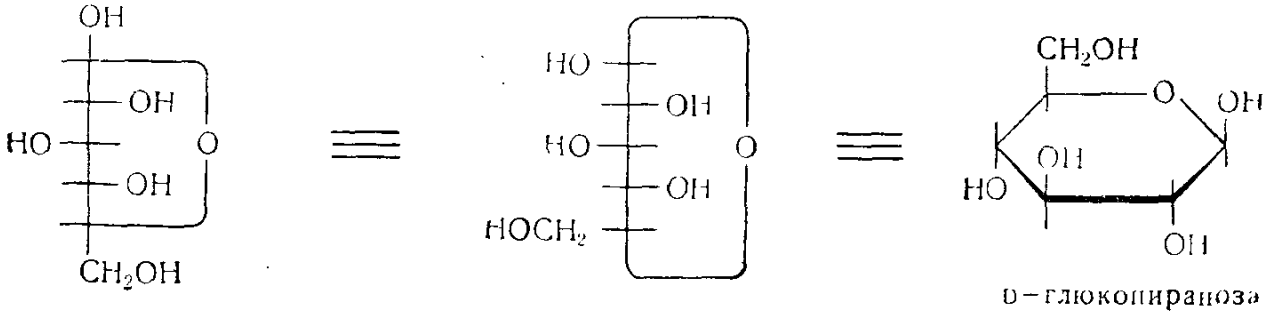
Таким образом, по размерам окисного кольца все моносахариды могут быть разбиты на два класса. Соединения, имеющие шестичленное δ-окисное кольцо, являются производными шестичленного кислородсодержащего гетероциклического соединения пирана и носят название пираноз. Пятичленные γ-окисные моносахариды являются производными фурана и называются фуранозами. Далее, различают по названиям соответствующего моносахарида глюкопиранозу, глюкофуранозу, рибо-

фуранозу, фруктофуранозу и т. д. В более сложных сахарах, в частности в ди- и полисахаридах, часто принято обозначать пиранозную форму как <1,5>, а фуранозную <1,4>. Так, например, глюкопираноза обозначается как глюкоза <1,5>, рибофураноза как рибоза <1,4> и т. д.

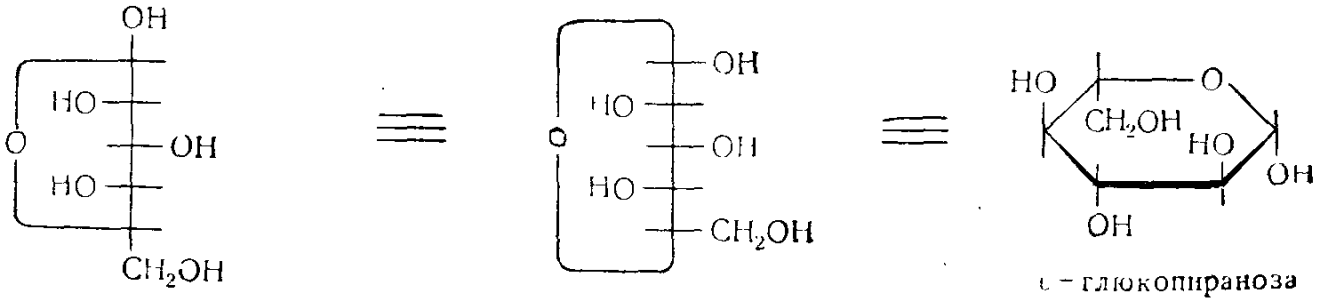
Необходимо кратко остановиться на изображении циклических формул сахаров. В настоящее время в литературе циклические формы сахаров чаще всего изображают в виде равностороннего шести- или пятиугольника, один из углов которого занимает окисный атом кислорода, а атомы водорода, гидроксильные группы и другие заместители располагаются над и под плоскостью кольца в зависимости от стереохимии сахара. Не всегда само собою разумеющимся является переход от написания циклической формулы сахара, произведенной из фишеровской формулы, к формуле с правильным шестиугольником. Обычно для правильного написания последней следует сделать поворот заместителя на формуле у $C_{(5)}$ в гексозе (или $C_{(4)}$ в пентозе) и у гликозидного гидроксила так, чтобы связи окисного кислорода находились на одной прямой с основной цепью С—С связей сахара, после чего переписать формулу в виде правильного пяти- или шестиугольника. Приведем несколько примеров.



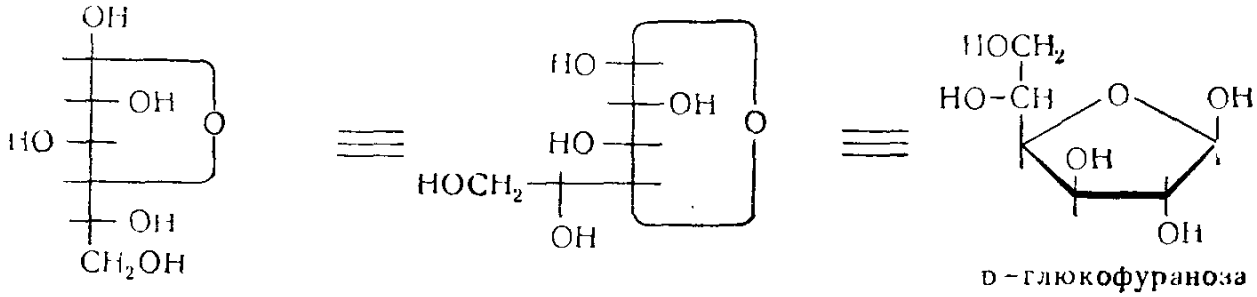
D-рибопираноза



D-глюкопираноза



L-глюкопираноза

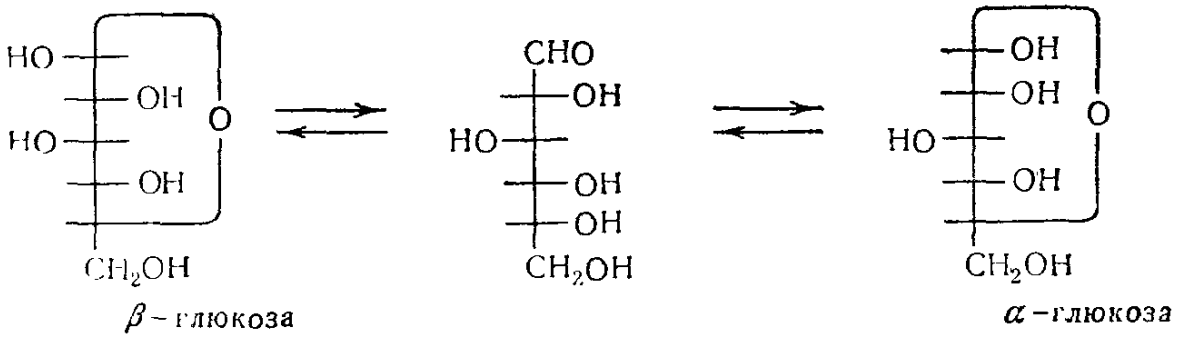


D-глюкофураноза

Естественно, что формулы, написанные по обычным правилам плоскостного изображения объемных формул, могут быть повернуты, перевернуты и т. д. Однако, если принять за правило писать всегда окисный кислород в правом верхнем углу шестиугольника или в верхнем углу пятиугольника, то абсолютная конфигурация гексозы, т. е. отнесение ее к D- или L-ряду, обычно легко вытекает из пространственного расположения CH_2OH-группы в пиранозе или $CHOHCH_2OH$ в фуранозе, так как для D-ряда эти группы всегда расположены над плоскостью, а для L-ряда — под плоскостью цикла.

Стереохимия гликозидного центра

При переходе от открытой альдегидной формы моносахарида к циклической окисной форме возникает новый асимметрический, так называемый гликозидный, углеродный атом на месте углеродного атома бывшей карбонильной группы, и тем самым каждому моносахариду в его открытой форме должны соответствовать два циклических диастереомера (обычно обозначаемых как α- и β-формы), которые отличаются только конфигурацией нового гликозидного центра, например, для глюкозы:



β-глюкоза *α*-глюкоза

Эти диастереомеры называют обычно аномерами. Аномеры в ряде случаев (но не всегда) удается выделить в индивидуальном кристаллическом виде. Так, например, при перекристаллизации глюкозы из воды выделяется α-D-глюкоза с углом вращения +111°, если же кристаллизацию проводить из воды при температуре свыше 90°, можно выделить аномерную β-D-глюкозу с углом вращения +19°.

Аномеры устойчивы в кристаллическом состоянии, но в растворах быстро испытывают взаимное превращение, т. е. имеет место упомянутое выше явление мутаротации.

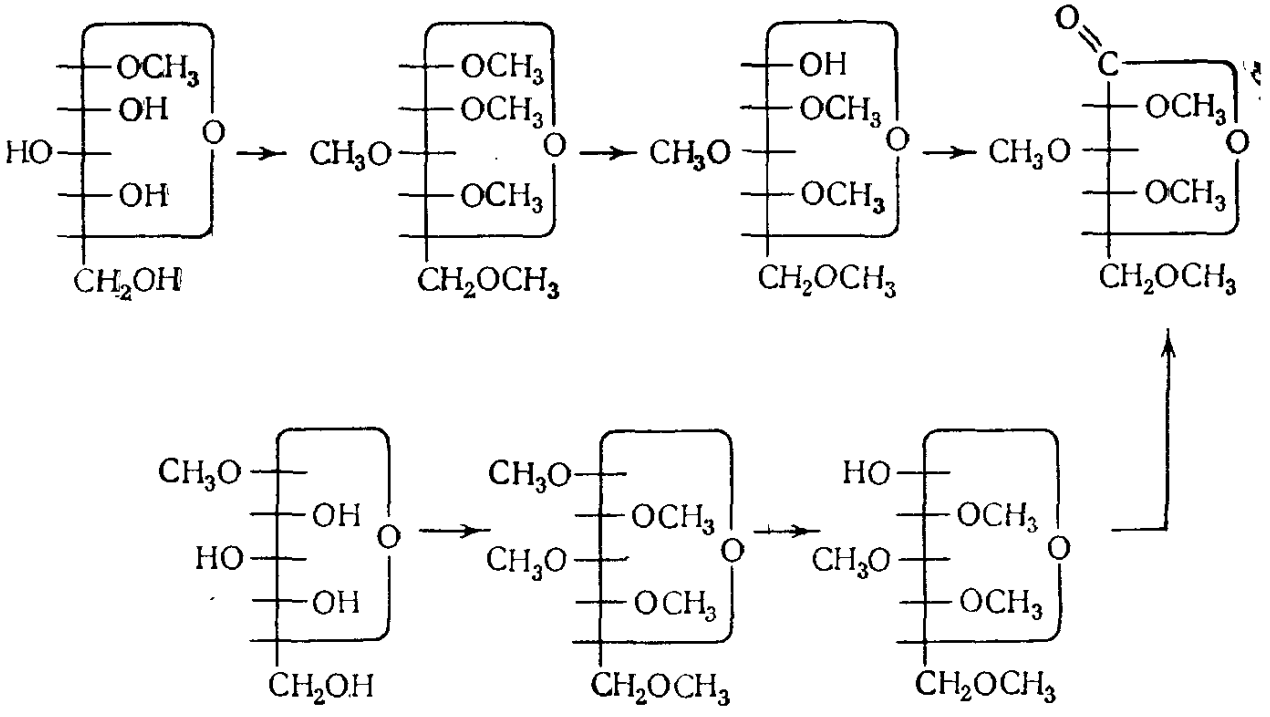
Мутаротация, которая внешне проявляется в изменении угла вращения свежеприготовленного раствора аномера до определенной равновесной величины, сводится к взаимопревращению аномеров через таутомерную открытую форму, что будет подробно рассматриваться ниже. При растворении индивидуального аномера он частично переходит в открытую альдегидную форму, которая находится в динамическом равновесии с циклическими аномерами, причем при замыкании окисного кольца вновь образуются уже оба аномера в равных количествах. Благодаря этому индивидуальный вначале аномер через циклическую форму в конечном счете переходит в смесь обоих аномеров, относительные количества которых определяются факторами устойчивости того и другого аномера.

Аномеры одного и того же моносахарида, отличающиеся только стереохимией гликозидного гидроксила, обычно называют α- и β-изомерами, сохраняя для них исходные названия моносахарида, например, α-D-глюкоза, β-L-арабиноза и т. д.

В D-ряде альдогексоз α-аномером считается изомер, в котором CH_2OH-группа и гликозидный гидроксил находятся в транс-положении один к другому; в этом изомере гликозидный углеродный атом обладает правым удельным вращением и, следовательно, из двух рассматриваемых аномеров α-аномер имеет максимальное вращение вправо; для β-аномера D-ряда, напротив, CH_2OH-группа и гликозидный гидроксил находятся в *цис*-положении, гликозидный центр имеет левое удельное вращение, а β-аномер минимальное правое вращение вправо (или, иными словами, маскимальное левое вращение). Для L-ряда аномер, в котором CH_2OH-группа и гликозидный гидроксил находятся в транс-положении один к другому, также считается α-аномером; его гликозидный центр имеет левое удельное вращение и, следовательно, из двух аномеров α-L-аномер вращает максимально влево (или, иными словами, минимально вправо), а β-L-аномер, имеющий цис-группировку CH_2OH-гликозидный гидроксил, вращает минимально влево.

Для всех других типов моносахаридов: пентоз, кетогексоз и т. д., названия α- и β-аномеров могут быть выведены из определения, приведенного для альдогексоз.

Каждой паре аномеров моносахарида должны соответствовать два ряда производных по гликозидному гидроксилу. Наиболее обстоятельно этот вопрос выяснен на примере гликозидов. Уже давно было известно, что каждый моносахарид дает два изомерных гликозида, которые, как правило, могут быть получены в индивидуальном состоянии и также называются α- и β-гликозидами. Изомерия этих гликозидов определяется только различием конфигурации гликозидного атома углерода, что четко доказывается, например, следующим превращением двух изомерных метилглюкозидов:



Как видно из схемы, после метилирования, гидролиза гликозида и окисления получившихся тетраметилглюкоз из обоих изомерных гликозидов образуется один и тот же лактон тетраметилглюконовой кислоты. Из этого ясно, что изомерия исходных глюкозидов зависела только от различия конфигураций гликозидного углеродного атома.

Вопрос о том, совпадает ли конфигурация изомерных гликозидов с конфигурацией соответствующих аномеров моносахарида нуждался в специальном решении, так как в процессе образования гликозида могло произойти обращение конфигурации гликозидного центра. Опытные дан-

ые показывают, что действительно α-аномеру соответствует α-гликозид β-аномеру — β-гликозид. Это было установлено на примере глюкозы ледующим простым и изящным опытом Армстронга.

Оба изомерных глюкозида (α- и β-метилглюкозиды) подвергались ерментативному гидролизу специфическими ферментами: α-глюкозид ействием мальтазы, β-гликозид — эмульсином (вопросы синтеза и химических превращений гликозидов будут подробно рассмотрены в следующей главе), после чего гидролиз приостанавливался добавлением одного аммиака, и наблюдалось изменение угла вращения получившегося раствора моносахарида.

При гидролизе α-глюкозида был получен раствор с высоким углом вращения, который после прекращения гидролиза постепенно падал, доходя до равновесного значения +52°. Из этого ясно, что получающийся при гидролизе аномер глюкозы имел более высокое вращение, чем аномер, в который в результате мутаротации он превращался. Так как α-глюкоза имеет более высокое вращение, то из этого видно, что α-глюкозид при гидролизе дал α-глюкозу. Точно так же β-глюкозид при гидролизе дал раствор с низким углом вращения, который после прекращения гидролиза повышался до равновесного значения +52°. Отсюда следует, что первоначально при гидролизе β-глюкозида образуется β-глюкоза.



Этот опыт показывает, что гидролиз глюкозида дает аномер глюкозы, полностью соответствующий по конфигурации исходному глюкозиду, и таким образом конфигурация аномерных моносахаридов и соответствующих гликозидов совпадает. Этот результат, как будет видно из дальнейшего, имеет значение для установления конфигурации аномерных моносахаридов.

Установление конфигурации аномеров

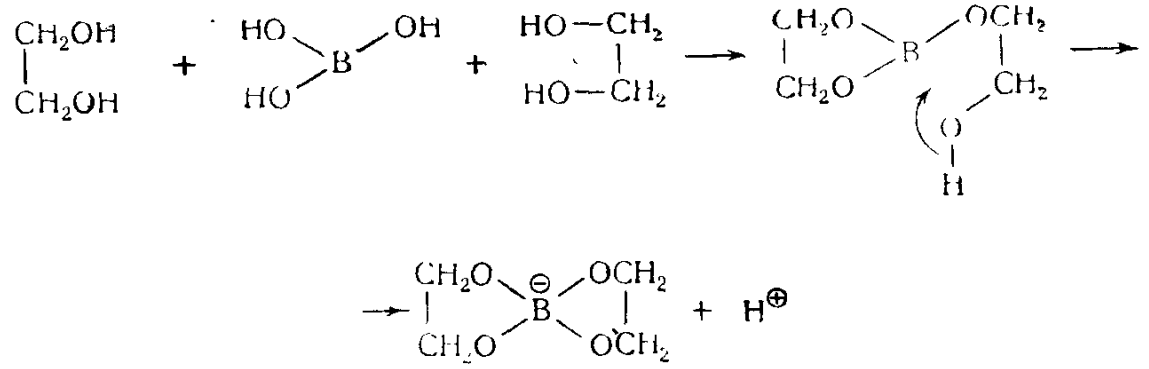
Вопрос об установлении конфигурации гликозидного центра является последним вопросом стереохимии моносахаридов, поскольку с его выяснением устанавливается полная конфигурация моносахарида. Выяснение конфигурации гликозидного атома принципиально и методически отличается от установления конфигурации остальной части молекулы углевода и представляет гораздо более трудную задачу, так как конфигурация гликозидного центра весьма лабильна в отличие от совершенно стабильной стереохимии остальной части молекулы.

Для доказательства конфигурации гликозидного центра используются как чисто химические, так и физико-химические методы.

1. Метод Безекена. Методом, которым впервые была определена конфигурация аномеров, является метод, развитый Безекеном и основанный на способности моносахарида, содержащего α-гликольную группировку, образовывать циклические эфиры с борной кислотой.

Как хорошо известно, при взаимодействии соединения, содержащего α-гликольную группировку (например, этиленгликоля), с борной кислотой, одна молекула борной кислоты реагирует с двумя молекулами гликоля, заполняя октет у атома бора с освобождением протона, отщепляющегося от одной из гидроксильных групп, в результате чего образуется сильная

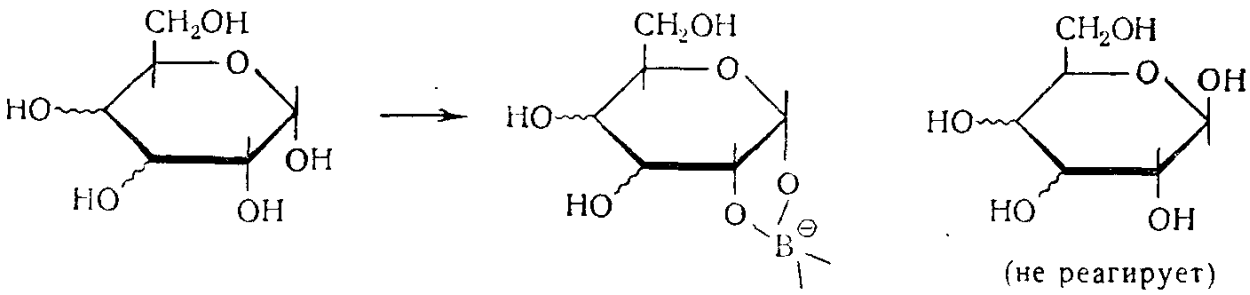
кислота



Образовавшийся комплекс непрочен, однако, получившаяся кислота обнаруживается достаточно легко. Наиболее точный метод состоит в измерении электропроводности раствора, которая резко возрастает при образовании комплекса, так как вместо слабой борной кислоты образуется сильная, полностью диссоциированная кислота. Поскольку в получающемся комплексе имеются пятичленные циклы, существуют стереохимические условия его образования, а именно, подобный комплекс может образоваться только в том случае, когда обе гидроксильные группы α-гликольной группировки находятся в пространственно близком положении.

Для циклического гликоля, что имеет место и в сахарах, оба гидроксила должны находиться в цис-положении, транс-гликоли комплекса с борной кислотой не образуют.

Из двух аномеров моносахарида лишь у одного гликозидный гидроксил находится в цис-положении к соседней гидроксильной группе у $C_{(2)}$, другой аномер у $C_{(1)}$—$C_{(2)}$ имеет транс-расположение. Таким образом, только один из двух аномеров способен давать комплекс с борной кислотой.



При добавлении моносахарида к водному раствору борной кислоты комплексная кислота возникает лишь у аномера, имеющего цис-расположение гидроксилов у $C_{(1)}$—$C_{(2)}$. Так как конфигурация $C_{(2)}$ известна из стереохимии взятого моносахарида, то это дает возможность сделать заключение о конфигурации гликозидного атома данного моносахарида.

Комплексы углеводов с борной кислотой непрочны и существуют, вероятно, в виде равновесной смеси с исходными компонентами, поэтому комплексообразование не закрепляет конфигурацию гликозидного центра (как это имеет место, например, при образовании гликозида) и не подавляет мутаротации. Поэтому кислотность раствора, содержащего моносахарид и борную кислоту, постепенно изменяется, сдвигаясь к величине, характерной для равновесной смеси обоих аномеров. Если, следовательно, измерять электропроводность такого раствора, то она будет падать в том случае, когда исходный аномер имеет цис-группировку, и повышаться, когда в исходном аномере имеется транс-группировка. Для двух аномеров моносахарида картина изменения электропроводности в

водном растворе борной кислоты будет иметь общий вид, представленный на рис. 1.

Обычно используется именно измерение электропроводности, как метод, позволяющий более точно установить наличие комплекса в растворе. Ясно также, что наличие других цис-гликольных группировок в молекуле моносахарида (у $C_{(3)}$—$C_{(6)}$-атомов), которые дают комплексную кислоту с другой молекулой H_3BO_3, не мешает сделать заключение о стереохимии гликозидного центра, так как это влияет лишь на величину электропроводности равновесной смеси аномеров, но не сказывается на характере изменения электропроводности.

Следует отметить, что метод Безекена далеко не во всех случаях дает четкие результаты. Дело в том, что шестичленное пиранозное кольцо сахара может принимать ту или другую конформацию (конформация моносахаридов будет подробнее рассмотрена ниже), в зависимости от чего гидроксильные группы меняют взаимно свое положение в пространстве. Это может привести к некоторому сближению транс-гидроксилов и, напротив, к некоторому отдалению цис-гидроксилов, и, таким образом, в чисто геометрическом смысле различие между цис-гликольной и транс-гликольной группировками сглаживается. Это приводит, в свою очередь, к уменьшению различия в способностях к комплексообразованию с H_3BO_3 и делает менее определенной картину изменения электропроводности, что часто затрудняет четкую интерпретацию результатов и делает заключение о конфигурации аномеров менее строгим.

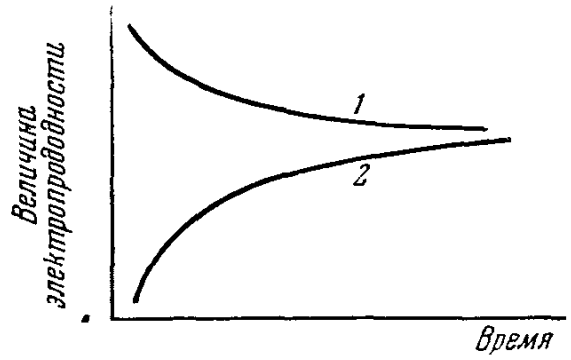
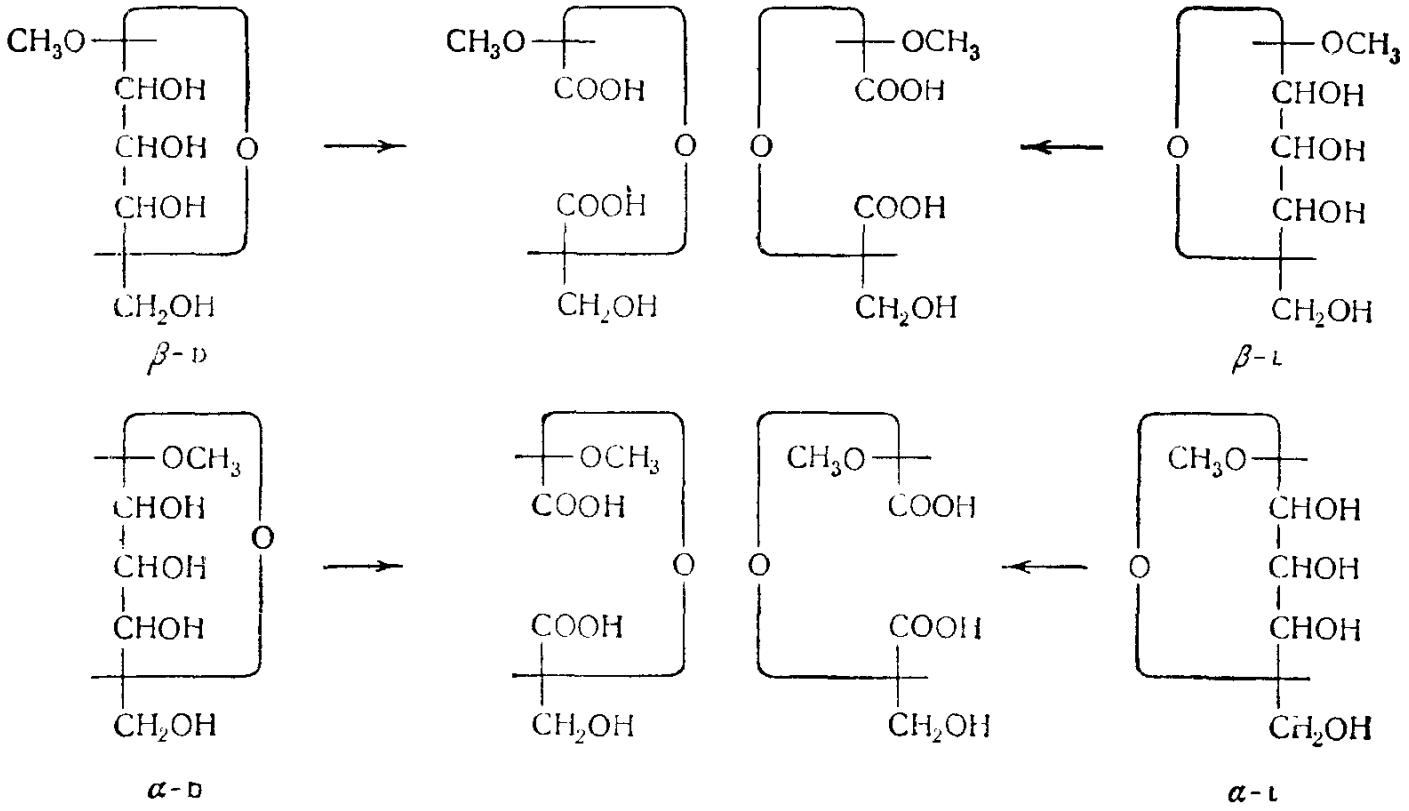


Рис. 1. Изменение электропроводности аномерных моносахаридов в водном растворе борной кислоты.
1 — α-аномер (цис); *2* — β-аномер (транс)

Напротив, если рассматриваемый моносахарид имеет фуранозную структуру, то метод Безекена дает совершенно однозначный ответ, в силу того, что в жестком пятичленном кольце у всех углеродных атомов, в него входящих, имеется закрепленная конфигурация, поэтому в данном случае оба аномера резко различаются по способности к комплексообразованию, и измерение электропроводности растворов с H_3BO_3 дает весьма четкий результат.

2. Метод Хэдсона—Джексона. Этот простой и изящный метод определения конфигурации гликозидного центра в гликозиде, а следовательно и в соответствующем ему аномере моносахарида, основан на выделении продукта окисления гликозида иодной кислотой и определении величины вращения. При окислении иодной кислотой метилгликозида и последующего окисления получающегося диальдегида бромной водой образуется двухосновная кислота, которая идентифицируется в виде бариевой или стронциевой соли. При окислении любого моносахарида (за исключением дезоксисахаров) может образоваться одна из четырех стереоизомерных кислот, конфигурация которых зависит только от конфигурации у $C_{(1)}$ и $C_{(5)}$ (или $C_{(4)}$ у пентоз) и не зависит от конфигурации других С-атомов ($C_{(2)}$, $C_{(3)}$ и $C_{(4)}$). α-D-гликозид и α-L-гликозид дают одну пару антиподов, β-D- и β-L-гликозиды — другую пару антиподов, диастереомерную первой. Эти пары диастереомеров отличаются одна от другой физическими свойствами, в частности для α-D- и α-L-пары характерны бариевые соли, β-D- и β-L-пара дает характерные стронциевые соли. На основании этого исходный гликозид можно отнести либо к тому, либо к другому типу (см. схему на стр. 45).



Далее, поскольку обычно известно, к какому ряду (D или L относится исходный моносахарид, или это было определено заранее (см. выше), то можно выбрать и конфигурацию гликозида. Более того, измеряя вращение полученной двухосновной кислоты и зная по физическим свойствам, к какой паре она относится (т. е. α-D и α-L- или β-D-и β-L-), можно сделать выбор внутри каждой пары и сразу отнести полученную кислоту, а следовательно, и исходные глюкозиды к α-D-, β-D, α-L- или β-L-ряду. Таким образом, можно определить в один прием конфигурацию у $C_{(1)}$ и $C_{(5)}$ (или $C_{(4)}$ у пентоз), т. е. конфигурацию гликозидного центра и абсолютную конфигурацию сахара. В настоящее время все четыре типа кислот, которые могут получаться в результате окисления, хорошо известны, и это позволяет сразу, получив продукты окисления и сравнив их с известными образцами, сделать вывод о конфигурации у $C_{(1)}$ и $C_{(5)}$ (или соответственно у $C_{(4)}$).

3. Ферментативный гидролиз гликозидов. Этот наиболее старый метод определения конфигурации гликозидов, использованный впервые Э. Фишером, основан на том, что природные ферменты, выделяемые часто, как и соответствующие гликозиды, из растительных объектов, обладают строгой стереоспецифичностью. В частности, ферменты, расщепляющие гликозидные связи (гликозидазы), разделяются на α-гликозидазы, расщепляющие только α-гликозиды, и β-гликозидазы, расщепляющие β-гликозиды. Наиболее употребительными среди первых является α-мальтаза, среди вторых — эмульсин. Для установления конфигурации у гликозидного атома исследуемый гликозид подвергают гидролизу тем или иным ферментом и, в зависимости от того, α- или β-гликозидаза вызовет гидролиз, относят гликозид к тому или иному типу.

Этот простой метод и в настоящее время является наиболее употребительным. Особенно часто он используется для определения конфигурации гликозидного центра в полисахаридах. Хотя и до настоящего времени вопрос о природе специфичности и, в частности, стереоспецифичности ферментов остался, из-за отсутствия данных о химии ферментов, совершенно неясным, тем не менее с чисто практической точки зрения этот

метод установления конфигурации гликозидов имеет большие преимущества благодаря своей простоте и четкости получаемых результатов.

4. Физико-химические методы. За последние годы начинают приобретать значение физико-химические методы определения конфигурации гликозидного центра, хотя приходится признать, что внедрение физико-химических методов в химию углеводов происходит несравненно медленнее, чем в области изучения других сложных природных соединений. Несмотря на близость большинства физико-химических констант аномерных гликозидов, в некоторых случаях можно сделать достаточно определенные заключения. Так, например, молекулярная рефракция (MR_D) β-аномера выражается, как правило, большей величиной, однако методические трудности, связанные с ее измерением, и недостаточная точность этой константы затрудняют использование этого приема для определения конфигурации гликозидного центра.

Из обширных кинетических исследований, посвященных гидролизу гликозидов, сделано заключение, что гликозиды, имеющие транс-конфигурацию у $C_{(1)}$—$C_{(2)}$, гидролизуются быстрее, чем соответствующие цис-изомеры. Эта закономерность в настоящее время может быть объяснена теоретически, однако практически этот метод используется редко, так как требует довольно значительного времени.

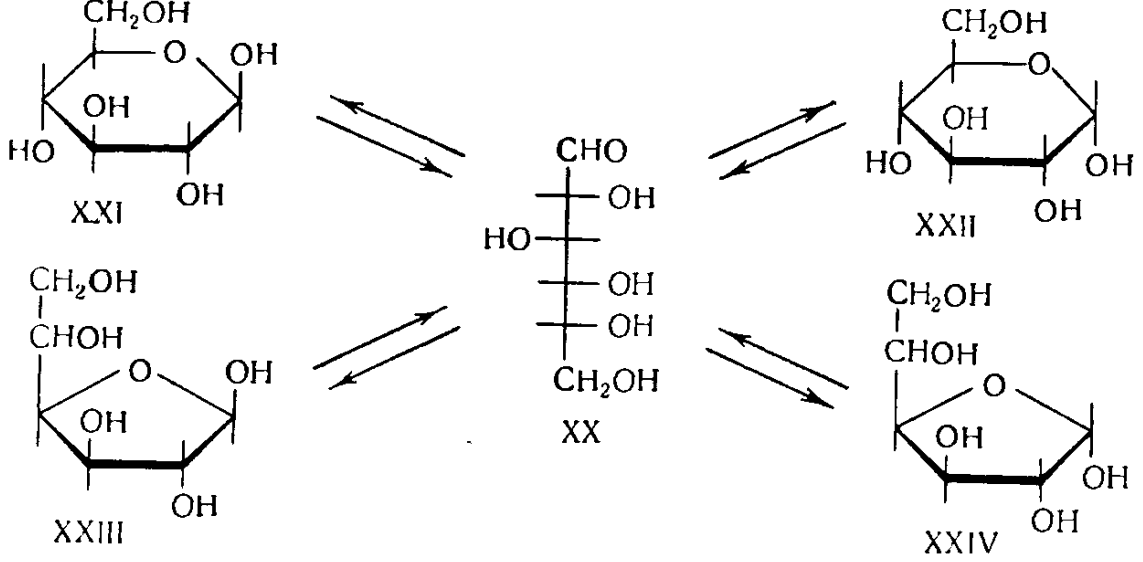
Перспективным методом является, по-видимому, инфракрасная спектроскопия. Хотя конфигурацию моносахарида в целом при точности метода, достигнутой в настоящее время, нельзя вывести из данных инфракрасных спектров, тем не менее отдельные частные закономерности могут быть установлены; так, по данным Стейси и Уиффена, инфракрасные спектры дают возможность различить α- и β-аномеры моносахаридов и их производных, поскольку для α-конфигурации связи $C_{(1)}$ — O характерна полоса 844 $см^{-1}$, а для β-конфигурации полоса около 890 $см^{-1}$. Инфракрасная спектроскопия применима и для структурного анализа полисахаридов, где имеется, например, возможность различить глюкозаны 1,3 и 1,6-типа.

Имеются и другие данные о приложении ИК-спектроскопии в области химии углеводов, показывающие полную возможность использования этого метода для решения отдельных частных вопросов.

По-видимому, еще более перспективным для решения стереохимических вопросов химии углеводов является метод ядерного магнитного резонанса. Однако в настоящее время этот метод только начинает находить свое применение в химии сахаров, и недостаток материала не позволяет еще вывести общие закономерности.

Таутомерия моносахаридов в растворах

Как указывалось, моносахариды в кристаллическом состоянии существуют в циклической форме и являются устойчивыми соединениями; во многих случаях они могут быть выделены в виде двух аномеров, отличающихся конфигурацией у гликозидного атома. Однако при растворении индивидуального аномера в воде или другом подходящем растворителе быстро наступает таутомерное превращение, приводящее к образованию равновесной смеси нескольких форм моносахарида. Внешне это проявляется в изменении угла вращения сахара (мутаротация). Априори каждый моносахарид может существовать в виде одной альдегидной формы (XX), двух аномерных пиранозных форм (XXI и XXII) и двух аномерных фуранозных форм (XXIII и XXIV). Таким образом, в общем виде в растворе моносахарида (например, глюкозы) должно существовать равновесие следующего типа:

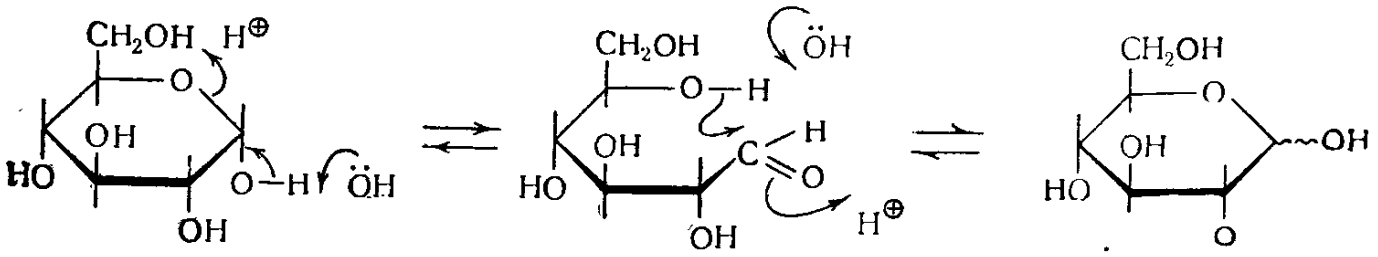


Сложные таутомерные отношения сахаров, представляющие собою пример кольчато-цепной таутомерии, позднее нашли свою аналогию в кольчато-цепной таутомерии простейших γ- и δ-оксиальдегидов и кетонов и послужили предметом обширных исследований. Однако и до настоящего времени некоторые детали этого вопроса остались невыясненными.

Достаточно очевидно, что взаимные переходы между циклическими таутомерами (XXI—XXIV) могут проходить только через образование альдегидной формы (XX), поэтому одним из основных вопросов при изучении этого процесса является вопрос о механизме взаимного перехода циклических и альдегидных форм.

Взаимные превращения аномеров, наблюдаемые по изменению скорости мутаротации, ускоряются под действием кислотных и основных агентов. Чрезвычайно любопытно, что это ускорение наблюдается чаще всего при одновременном действии кислотного и основного агента, которые в отдельности слабее влияют на скорость мутаротации. Так, например, пиридин и крезол в отдельности не проявляют ускоряющего действия, однако их одновременное действие вызывает быструю мутаротацию. Особенно любопытно, что 2-оксипиридин (пиридон-2), сочетающий в себе свойства кислоты и основания, обладает сильным каталитическим действием на процесс мутаротации.

Это дает возможность предположить, что взаимный переход циклических и открытых форм имеет следующий, так называемый пушпульный механизм:



Естественно, что электрофильная атака со стороны гидроксила у $C_{(5)}$ на карбонильный углерод открытой формы не идет стереоспецифично, в результате чего и образуется смесь аномеров у $C_{(1)}$. Равным образом, альдегидная группа может подвергнуться нуклеофильной атаке со стороны гидроксила у C в результате чего образуется фуранозная форма.

В ряде случаев в равновесной смеси моносахарида в растворе представлены все пять таутомеров, и в этом случае анализ ее весьма труден,

а картина мутаротации весьма осложнена. Однако часто в растворе находятся лишь аномеры пиранозных форм в равновесии с альдегидной формой, и имеющиеся данные указывают на то, что подавляющее большинство моносахаридов в растворе имеет пиранозную структуру.

Что касается открытых альдегидных форм, то они присутствуют в растворах в крайне малых количествах, и в свободном индивидуальном состоянии до сих пор не были выделены, хотя их производные были специально синтезированы.

Однако их присутствие в растворах было строго доказано полярографическим методом. Оно составляет для глюкозы 0,024%, для маннозы 0,068%, для галактозы 0,082%, для ксилозы 0,17%, для арабинозы 0,40% и только для рибозы достигает 8,5%. Очевидно такое малое содержание альдегидных форм следует объяснять их высокой реакционной способностью, т. е. высоким запасом энергии, вследствие чего их доля в равновесной смеси, естественно, должна быть очень малой. В том случае, когда в равновесии находятся лишь пиранозные аномеры, а доля альдегидной формы очень незначительна, процентное содержание аномеров в равновесной смеси может быть рассчитано по углу вращения равновесного раствора, в том случае, если известны углы вращения чистых аномеров. Подобный расчет показал, например, что в равновесном растворе глюкозы содержится 36% α- и 64% β-аномера, в растворе маннозы 68% α-аномера и 31% β-аномера, в растворе ликсозы 76% α- и 28% β-аномера.

Интересно отметить, что во всех случаях преобладающий в равновесии аномер (β-глюкоза, α-манноза и α-ликсоза) имеет у $C_{(1)} — C_{(2}$ транс-гликольную группировку.

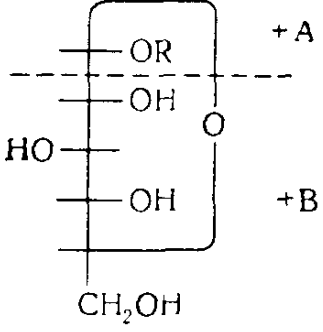
В заключение следует отметить, что ни в одном случае не удалось выделить в индивидуальном кристаллическом виде все возможные таутомерные формы какого-либо моносахарида. Вместе с тем обычно удается, применяя подходящие методы, получать производные различных таутомерных форм данного моносахарида. Этот весьма важный вопрос будет рассмотрен в разделе, посвященном производным моносахаридов.

О связи строения углеводов с вращением плоскости поляризации

Среди приемов, очень часто используемых для решения вопросов структурной химии углеводов, необходимо особо отметить стоящий несколько особняком, очень важный метод, связанный с определением вращения плоскости поляризации. Этот метод основан на идее об аддитивности оптического вращения, высказанной впервые Вант-Гоффом под названием принципа оптической суперпозиции и примененной для углеводов Хэдсоном, сформулировавшим так называемые правила изоротации. Принцип оптической суперпозиции утверждает, что оптическое вращение молекулы аддитивно слагается из оптического вращения асимметрических углеродных атомов, входящих в эту молекулу. Хотя мнение о том, что это правило универсально и не подтвердилось, тем не менее его применение при изучении углеводов и их производных принесло успех.

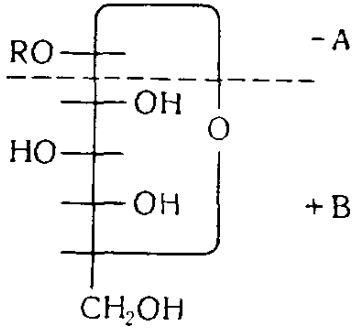
Хэдсон, впервые исследовавший этот вопрос, показал, что величина молекулярного оптического вращения [M] моносахарида может быть представлена как аддитивно слагающаяся из величины угла вращения гликозидного центра (A) и величины угла вращения всей остальной части молекулы (B).

Например, для глюкозы:



a

$[M]_\alpha = +A + B$



β

$[M]_\beta = -A + B$

Величины A и B могут быть легко вычислены, если известны величины вращения двух аномеров какого-либо производного сахара (обычно гликозидов) из уравнений

$$M_\alpha - M_\beta = A + B + A - B = 2A;\ M_\alpha + M_\beta = A + B - A + B = 2B$$

Определение величины молекулярного угла вращения аномерных пар различных производных моносахаридов позволило вывести следующие два правила:

1. Парциальное вращение $C_{(1)}$ для большинства углеводов лишь в очень малой степени меняется в зависимости от строения и конфигурации всей остальной части молекулы (т. е. вращения у $C_{(2)}$, $C_{(3)}$, $C_{(4)}$, $C_{(5)}$)

2. Изменения в структуре углевода у $C_{(1)}$ лишь в очень незначительной степени влияют на величину удельного вращения всей остальной части молекулы (т. е. суммарного вращения у $C_{(2)}$, $C_{(3)}$, $C_{(4)}$, $C_{(5)}$).

Эти два правила, сформулированные Хэдсоном, несмотря на серьезные исключения, которые имеют место для некоторых производных, играют важную роль при установлении конфигурации гликозидного центра, а также и строения всей остальной части моносахаридов. Действительно, поскольку парциальное вращение углеродного атома $C_{(1)}$ практически не зависит от вращения всей остальной части молекулы, то, вычисляя это вращение (величину A) из экспериментальных данных, полученных для любого неизвестного ранее производного сахара, и сравнивая его с вращением самого сахара или какого-либо известного его производного, мы можем сделать заключение о конфигурации гликозидного центра у этого производного, если конфигурация гликозидного центра самого сахара известна. Наиболее серьезные отклонения, иногда делающие вовсе невозможными подобного рода определения, связаны с влиянием заместителей у $C_{(2)}$ и конфигурации у этого углеродного атома; в этом случае парциальное вращение у $C_{(1)}$ зависит от конфигурации у $C_{(2)}$; так, например, оно различно для глюкозы и углеводов с той же конфигурацией у $C_{(2)}$, с одной стороны, и маннозы и ее аналогов, с другой. Наряду с этим, поскольку парциальное вращение всей остальной части моносахарида не зависит в первом приближении от вращения гликозидного атома, то, сравнивая величины B, полученные из экспериментальных данных для какого-либо производного сахара (в том числе для дисахаридов олигосахаридов), с известной величиной B определенного моносахарида, можно сделать заключение о строении и конфигурации исследуемого производного.

Этот прием, несмотря на значительные отклонения в соблюдении правил Хэдсона, широко используется до настоящего времени при установлении строения самых различных соединений, относящихся к углеводам.

КОНФОРМАЦИЯ МОНОСАХАРИДОВ

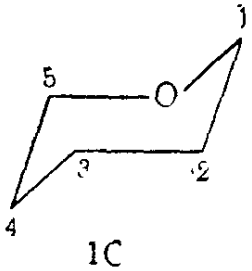
В самое последнее время для определения конфигурации и реакционной способности моносахаридов все чаще привлекаются конформационные представления, связанные с рассмотрением тех геометрически различных форм, которые может принимать молекула, сохраняя нормальными длины ковалентных связей и размеры углов между ними.

Предполагая, что читатель знаком с основами конформационного анализа карбоциклических систем, остановимся лишь на использовании его основных положений в химии моносахаридов.

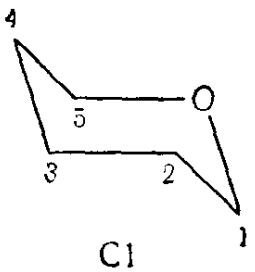
Конформационные изомеры, которые могут быть приняты в расчет при рассмотрении структуры углеводов, относятся, очевидно, только к пиранозам. Для фуранозных структур, имеющих жесткий пятичленный цикл, существование заметно отличающихся конформаций невозможно. С другой стороны, открытые альдегидные формы моносахаридов могут существовать в виде большого числа конформационных изомеров, мало отличающихся один от другого энергетически, и анализ реакционной способности отдельных связей теряет в этом случае смысл.

Напротив, пиранозный цикл, подобно циклогексановому кольцу, способен существовать лишь в виде нескольких конформационных изомеров с различной устойчивостью, анализ которых может дать, так же как и анализ алициклических производных, ценные сведения о реакционной способности отдельных атомов и групп, а также о сравнительной устойчивости той или другой конфигурации. Поскольку пиранозная форма является той формой, в которой преимущественно находятся все моносахариды как в твердом состоянии, так и в растворе (стр. 48), то конформационный анализ этих форм моносахаридов представляет как раз наибольший интерес.

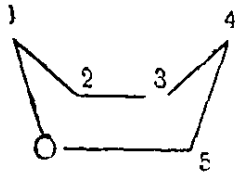
Основным отличием пиранозного кольца от циклогексанового является его несимметричность, вызываемая присутствием в цикле кислородного атома, что значительно увеличивает число возможных конформационных изомеров. В то время как для циклогексанового кольца возможны два конформационных изомера: креслообразный и ваннообразный, пиранозное кольцо мыслимо в виде 8 ненапряженных конформаций, две из которых являются креслообразными и шесть — ваннообразными.



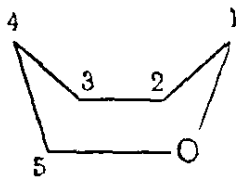
1C



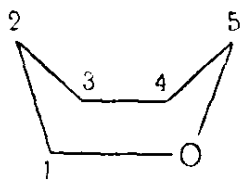
C1



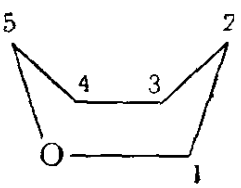
B1



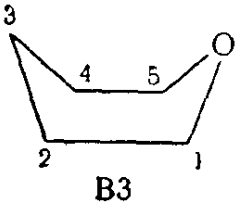
1B



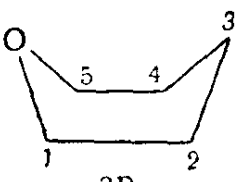
B2



2B



B3



3B

Каждой из этих конформаций соответствует общепринятый в настоящее время индекс (С — от chair — кресло, В — от boat — лодка). Как и в циклогексановых производных, из этих восьми конформаций 6 ваннообразных энергетически менее выгодны и при невозбужденном состоянии моносахаридов и их простейших производных (особенно тех, которые не содержат дополнительных конденсированных циклов), с ними можно не считаться. Это не значит, впрочем, что исключается возможность присутствия одного из ваннообразных изомеров в реакционной среде в определенных условиях реакции, где именно такой изомер может выступать как реакционноспособная форма молекулы.

Две креслообразные конформации более устойчивы. В незамещенном или симметрично замещенном циклогексановом кольце они соответствуют вполне идентичным конформациям, полученным при конверсии этого кольца, наоборот, в замещенном пиранозном цикле креслообразные конформации обычно достаточно четко различаются по запасу внутренней энергии; следовательно, моносахарид обычно существует в одной из двух креслообразных форм. Эти две конформации (1С или С1) являются изомерами, получающимися при конверсии пиранозного цикла, в результате которой все аксиальные заместители становятся экваториальными и наоборот. Отсюда достаточно ясно, что предпочтительность той или иной конформации (1С или С1) определяется имеющимися в пиранозном кольце заместителями и их пространственным расположением, т. е. другими словами, строением и конфигурацией моносахарида. В то же время, выяснив конформацию того или иного производного моносахарида, мы можем, наоборот, используя законы конформационного анализа, сделать заключение о его стереохимии.

Таким образом, первой задачей конформационного анализа моносахаридов, решение которой позволяет использовать этот метод для выяснения ряда вопросов структурной химии углеводов, является рассмотрение факторов, неблагоприятствующих той или иной конформации (и соответственно благоприятствующих другой).

В настоящее время обычно принимают во внимание три таких неблагоприятствующих фактора, полуколичественно оценивая значение каждого из них в условных единицах.

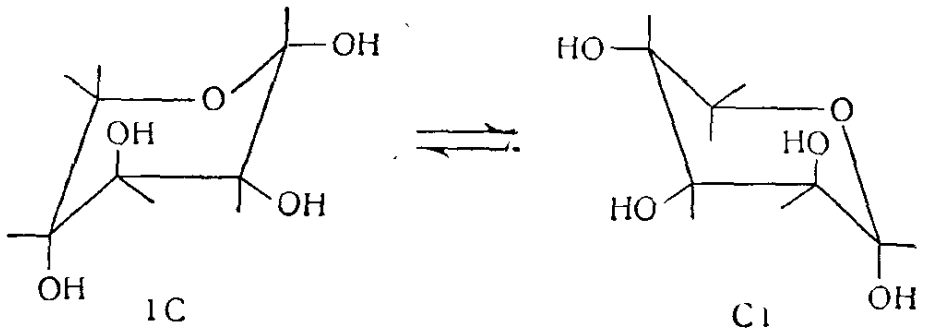
1. Максимальное количество заместителей в аксиальном положении (1 условная единица). Это условие не требует особых пояснений, поскольку является общим условием неустойчивости конформации шестичленных циклов.

2. Нахождение CH_2OH-группы в аксиальном положении наряду с другими аксиальными заместителями (0,5 условной единицы). Это условие, называемое эффектом Хасселла-Оттара, является частным от первого и также вытекает из общих положений конформационного анализа, согласно которым отрицательное влияние аксиального заместителя на устойчивость конформации возрастает с ростом величины заместителя.

3. Такое расположение связи С—О у второго углеродного атома, когда она находится по одну сторону с двумя С—О связями у $C_{(1)}$ и в проекции попадает в острый угол между ними (2,5 условных единицы). Эта специфическая для моносахаридов возможность (иногда называемая Δ2-эффектом) становится понятной из следующих соображений. В том случае, когда С—О связь у $C_{(2)}$ и две С—О связи у $C_{(1)}$ направлены в одну сторону, вблизи $C_{(1)}$ — $C_{(}$: углеродных атомов создается скопление атомов кислорода, которые испытывают сильное отталкивание в связи с пространственными и электростатическими факторами. Благодаря этому конформация, где проявляется этот эффект, является, естественно, особенно неблагоприятной. Значение этого условия столь велико, что оно часто превалирует над всеми остальными.

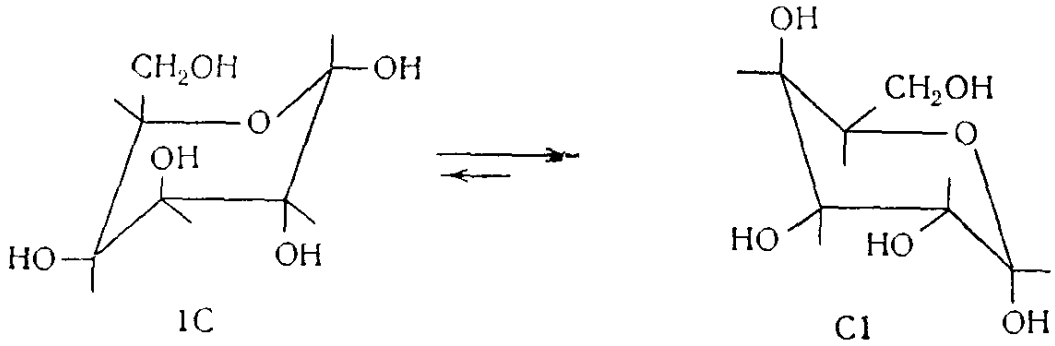
Имея в виду эти три фактора неустойчивости пиранозных циклов, можно предсказать, в виде какого из конформационных изомеров будет существовать данный моносахарид. Ниже приводятся несколько примеров анализа возможных конформаций моносахарида.

1) β-D-Глюкоза.



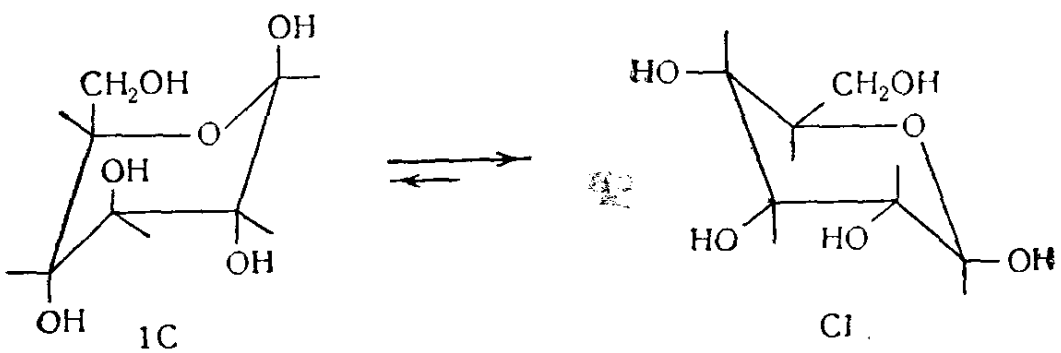
Как видно, в этом случае при 1С-конформации заместители у $C_{(1)}$, $C_{(2)}$, $C_{(3)}$, $C_{(4)}$ и $C_{(5)}$ находятся в аксиальном положении, в том числе и CH_2OH-группа (эффект Хасселла-Оттара). При С1-конформации, напротив, факторы неустойчивости полностью отсутствуют. Таким образом ясно, что для β-D-глюкозы конформация С1 более выгодна и глюкоза существует только в виде этого конформационного изомера.

2) α-D-Галактоза.



В этом случае, в 1С-конформации налицо аксиальные заместители у $C_{(2)}$, $C_{(3)}$ и $C_{(5)}$, в том числе и CH_2OH-группа и, что самое главное, С—О связь у $C_{(2)}$ попадает в проекции между С—О-связями у $C_{(1)}$ (Δ2-эффект). В C_1 конформации, напротив, из факторов неустойчивости имеются только аксиальные заместители у $C_{(1)}$ и $C_{(4)}$, и эта конформация значительно благоприятнее, чем 1С.

3) α-D-Ликсоза.



В этом случае в обеих конформациях имеется равное число факторов неустойчивости: в 1С-конформации — аксиальные заместители у $C_{(3)}$ и $C_{(4)}$, в С1-конформации — аксиальные заместители у $C_{(1)}$ и $C_{(2)}$. Отсюда можно сделать заключение о том, что α-D-ликсоза будет существовать как равновесная смесь обоих конформационных изомеров.

Конформационный анализ других моносахаридов показал, что большинство моносахаридов должно существовать в виде C1-изомера, реже встречается равновесие $C1 \rightleftarrows C1$ и еще реже 1C-конформация.

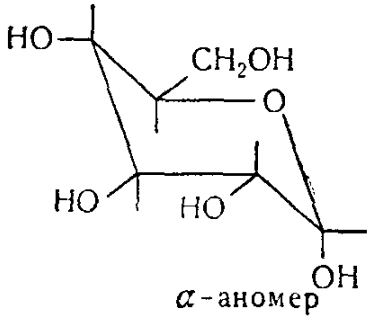
В настоящее время имеется несколько методов частичного определения конформации, косвенно подтверждающих правильность предсказанной конформации моносахаридов. Один из них основан на способности моносахаридов к образованию внутрикомплексных соединений с солями меди. Эти соединения только при определенном взаимном положении обеих гидроксильных групп, образуют внутрикомплексный цикл. Другой метод основан на различном поведении аксиальных и экваториальных гидроксильных групп при окислении тетраацетатом свинца. Эти методы еще не являются достаточно общепринятыми, а полученные с их помощью результаты — бесспорными. Тем не менее, проверка, проведенная этими методами, подтвердила те предсказания, которые были сделаны на основании приведенных выше правил.

Естественно, что условия устойчивости того или иного конформационного изомера данного моносахарида существенно меняются для его производных, у которых имеется ряд дополнительных структурных особенностей; наиболее существенно в этом отношении влияние дополнительных конденсированных циклов, которые имеются в ангидросахарах и α-окисях, в изопропилиденовых и бензилиденовых производных, в циклических карбонатах и т. д. Конформационные соотношения в таких производных еще в значительной мере остаются непроанализированными из-за очевидной сложности вопроса.

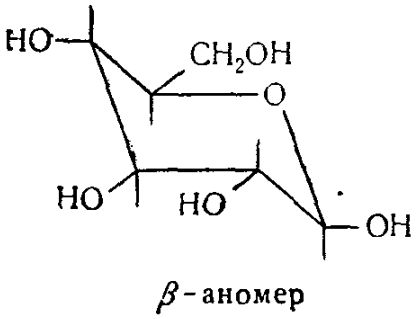
Конформационный анализ стал известен совсем недавно, но уже позволил сделать весьма важные выводы и предсказания в химии алициклических соединений, и применением этого метода в значительной мере объясняется бурное развитие таких сложных областей химии, как исследования полициклических терпенов, стероидов и т. п. Приложение конформационного анализа в химии углеводов дало более скромные результаты, так как только в самые последние годы конформационные представления начинают обретать свои права в этой области органической химии. Тем не менее и здесь в некоторых случаях достигнуты известные успехи. Так, устойчивость некоторых изомерных структур и их реакционная способность были объяснены или предсказаны на основании законов конформационного анализа.

В качестве примера можно привести данные, позволяющие сделать предсказания о сравнительной устойчивости аномерных моносахаридов.

Если обычным путем установить соотношение факторов неустойчивости для α- и β-аномеров моносахарида, то, очевидно, более выгодным окажется более устойчивый аномер, который будет в большем количестве содержаться в равновесной смеси.



α-аномер

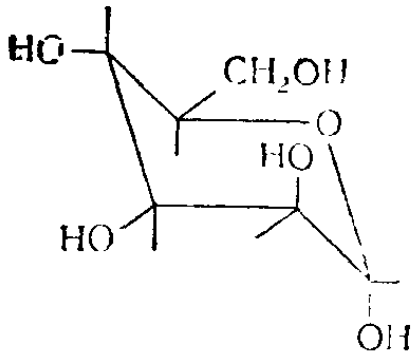


β-аномер

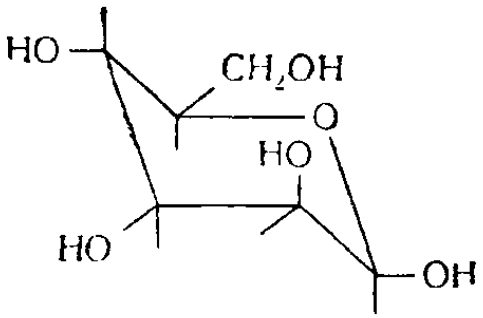
В самом деле, для глюкозы, которая, как уже было установлено, существует в виде C1-конформации, конформации α- и β-аномеров будут иметь вид.

Все факторы, кроме разницы в конфигурации у $C_{(1)}$, одинаковы, и так как α-аномер имеет у $C_{(1)}$ аксиальный заместитель, а β-аномер — экваториальный, то β-изомер окажется несколько устойчивее. Действительно, согласно экспериментальным данным, в равновесной смеси D-глюкозы содержится 64% β-аномера и 36% α-аномера.

Несколько сложнее обстоит дело с аномерными *D*-маннозами, для которых конформации обоих аномеров будут иметь следующий вид (это относится и к конформации Cl, которая, как показывает анализ, является более устойчивой и в этом случае):



α-аномер



β-аномер

В данном случае, несмотря на то, что α-аномер имеет один лишний аксиальный заместитель у $C_{(1)}$, этот аномер все же более выгоден, так как в β-аномере налицо Δ2-эффект (т. е. расположение гидроксила у $C_{(2)}$ между двумя C — O связями у $C_{(1)}$, который оказывается значительно более сильным неблагоприятствующим фактором (см. стр. 51). Действительно, в равновесной смеси *D*-маннозы содержится 68% α-аномера и лишь 32% β-аномера.

Этими примерами, разумеется, не исчерпывается приложение конформационного анализа к химии моносахаридов. В настоящее время этот вопрос только начинает разрабатываться теоретически и экспериментально, однако уже сейчас ясно, что это направление принесет успех.

ЛИТЕРАТУРА

J. Bobbit. Periodate oxidation of carbohydrates. Adv. carbohydrate chemistry, 1956, **11**, 1.

J. Boeseken. The use of boric acid for the determination of the configuration of carbohydrates. Adv. carbohydrate chemistry, 1949, **4**, 189.

R. Ferrier, W. Overend. New aspects of sugar stereo-chemistry. Quart. Rev., 1959, XIII, 265.

R. Lemiex. Configurational effects on the proton resonance spectra of six-membered ring system. J. Amer. Chem. Soc., 1958, **80**, 6098.

R. Reeves. Cuprammonium-glycoside complexes. Adv. carbohydrate chemistry, 1951, **6**, 135.

J. Sugihara. Relative reactivities of hydroxyl groups of carbohydrates. Adv. carbohydrate chemistry, 1953, **8**, 1.

Глава 4

ПРОИЗВОДНЫЕ МОНОСАХАРИДОВ

Моносахариды как сложные полифункциональные соединения дают большое количество самых различных производных. Эти производные занимают важное место в химии углеводов; некоторые из них получаются с целью идентификации моносахаридов, особенно таких, которые с трудом поддаются очистке. Многие производные, особенно производные полисахаридов, имеют выдающееся практическое значение, такие как многочисленные производные целлюлозы (ацетат, ксантогенат и др.). Однако наибольший интерес производные моносахаридов представляют для синтетической химии углеводов, так как ряд таких производных имеет важное значение как промежуточные продукты многочисленных синтетических переходов в ряду сахаров.

Все производные моносахаридов могут быть разбиты на следующие классы:

1) производные по карбонильной группе;
2) производные по спиртовым гидроксилам;
3) производные по гликозидному гидроксилу.

Кроме того, существует большое количество смешанных производных, в образовании которых принимают участие два или все три типа функциональных групп моносахарида.

ПРОИЗВОДНЫЕ ПО КАРБОНИЛЬНОЙ ГРУППЕ

Хотя, как было выше показано, количество открытой альдегидной или кетонной формы сахара в равновесной смеси обычно очень незначительно, все моносахариды дают производные по карбонильной группе, когда моносахарид реагирует как альдегид (или кетон). Это не значит, однако, что полученные таким образом производные обязательно имеют открытую углерод-углеродную цепь. Напротив, для многих из них можно предполагать циклическую структуру, однако сама реакция, при которой образуются эти производные, соответствует типичной реакции альдегида (или соответственно кетона).

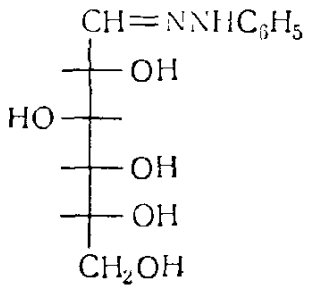
Производные по карбонильной группе имеют как аналитическое значение (поскольку многие из них служат для идентификации), так и широкое применение в синтезе.

Арилгидразоны

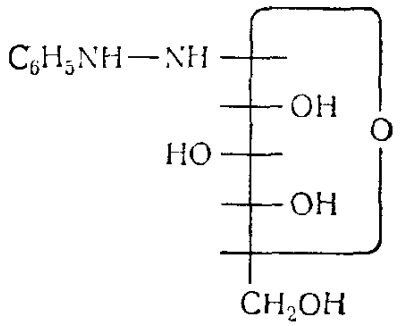
Моносахариды легко реагируют с арилгидразинами, из которых чаще всего применяется фенилгидразин. Если эту реакцию не контролировать, то образуются озазоны (см. ниже); если же взаимодействуют строго экви-

молекулярные количества моносахарида и фенилгидразина в спирте или слабоуксусной среде, то может быть выделен фенилгидразон моносахарида.

Вопрос об истинном строении получающегося соединения еще не разрешен, так как для него можно предполагать по крайней мере четыре структуры: истинного фенилгидразона (I), который может существовать в виде син- и анти-изомера, и циклического N-β-замещенного фенилгидразона (II), который также может существовать в виде двух диастереомеров, соответствующих α- и β-конфигурации гликозидного атома.



I



II

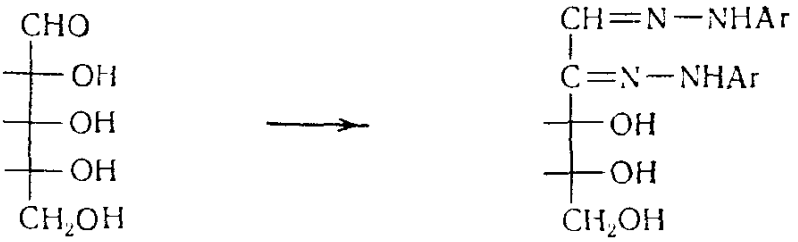
При получении фенилгидразонов удалось выделить два изомерных соединения, однако вопрос об их истинной структуре и причинах их изомерии до настоящего времени не решен окончательно.

Фенилгидразоны не имеют особенно серьезного значения. Они мало пригодны для идентификации, так как обычно хорошо растворимы и с трудом выделяются. Несколько более удобны фенилгидразоны, замещенные в ароматическом ядре, однако и эти производные не находят широкого применения. Незамещенный гидразин обычно дает с моносахаридами азины.

Озазоны

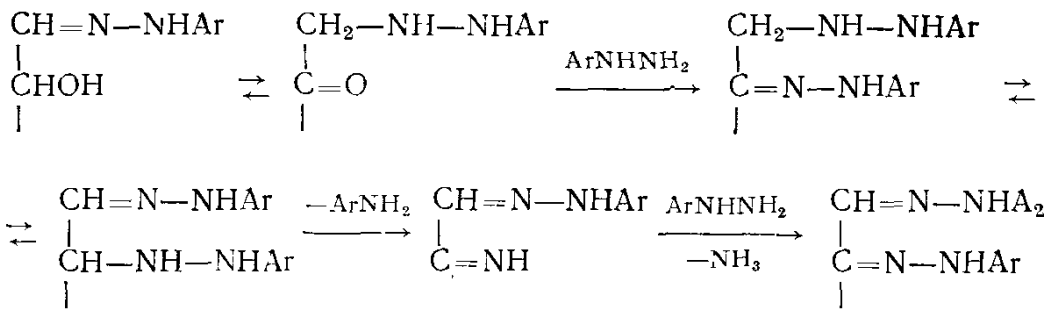
Гораздо более важное значение в химии моносахаридов имеют продукты реакции углевода с избытком арилгидразина, так называемые озазоны, которые особенно широко применяются для идентификации.

При взаимодействии моносахарида с избытком арилгидразина (обычно фенилгидразина) в более жестких условиях, например, при нагревании в уксусной кислоте, происходит сложная реакция, в результате чего образуется продукт конденсации одного моля моносахарида с двумя молями арилгидразина, например,



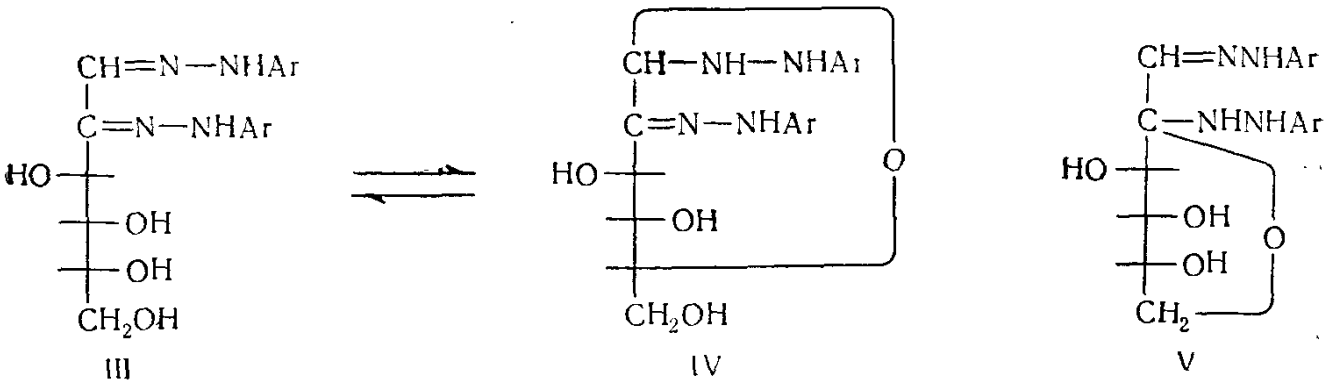
Ранее считалось, что при этой реакции первоначально образуется арилгидразон, а затем происходит окисление соседней вторичноспиртовой группы в карбонильную и ее конденсация с третьей молекулой арилгидразина. Однако более новые данные показали, что реакция образования озазона идет гораздо более сложным путем. Окончательно этот

вопрос был выяснен М. М. Шемякиным с сотрудниками, которые применив меченый по азоту фенилгидразин, предложили следующий механизм образования озазона:



Озазоны — характерные хорошо кристаллизующиеся тела с достаточно четкими температурами плавления, и поэтому они наиболее часто применяются для идентификации сахаров. Вместе с тем, поскольку при образовании озазона исчезает асимметрический атом у $C_{(2)}$, моносахариды, различающиеся только конфигурацией у $C_{(2)}$ (например, глюкоза и манноза), дают один и тот же озазон. Это обстоятельство ограничивает использование озазонов для идентификации и в то же время играет очень важную роль при установлении конфигурации моносахаридов. Оно было широко использовано Э. Фишером при выяснении стереохимических соотношений в ряду моносахаридов. Естественно, что озазоны одного и того же моносахарида - и L-ряда имеют одинаковые физические константы, так как являются антиподами, однако их можно было различить по знаку вращения.

Вопрос об истинной структуре озазонов неясен в той же мере, в какой неясен вопрос о структуре фенилгидразонов. Очевидно озазоны, как и исходные моносахариды, могут существовать как в открытой (III), так и циклической (IV) форме, которые способны находиться в равновесии, как, например



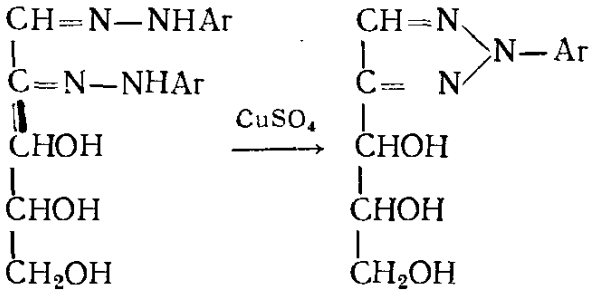
III IV V

При этом нужно иметь в виду, что возможно также образование циклической формы с участием второго углеродного атома, например, (V) и форм с пятичленным окисным кольцом; если к этому добавить, что для каждой из форм — открытой и циклической — можно допустить еще и стереоизомерию, то число возможных изомеров для одного озазона становится весьма значительным. В настоящее время этот вопрос остается достаточно неясным, и имеются факты, говорящие как в пользу открытой, так и в пользу циклической структуры. Нужно, однако, отметить, что озазоны, в отличие от фенилгидразонов, всегда выделяются в виде одного единственного изомера.

Несмотря на указанные неясности строения озазонов (а также и арилгидразонов), обычно их представляют как открытые формы, так как все их превращения и свойства укладываются в рамки этой структуры. Последнее легко понять, если допустить вполне возможную тау-

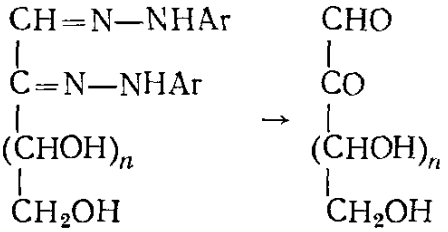
томерию озазонов, подобную той, которая хорошо изучена на моносахаридах.

Часто для получения еще более характерных и удобных для идентификации производных озазоны подвергают окислению действием сульфата меди и переводят в так называемые озотриазолы, которые являются производными вицинального триазола (триазола-1,2,3):



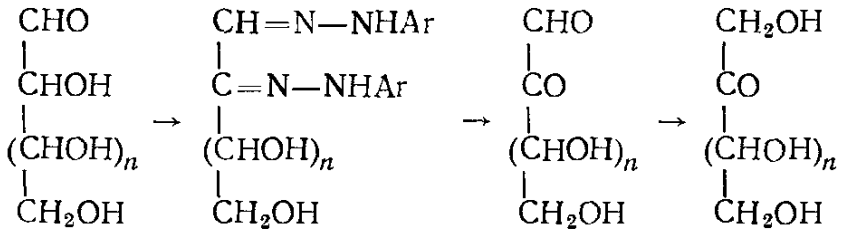
Эта реакция используется иногда для синтеза некоторых производных триазола, труднодоступных для получения иным путем.

Значение озазонов в синтетической химии углеводов состоит в переходе от них гидролитическим отщеплением гидразинных групп к соответствующим α-кетоальдегидам, так называемым озонам.



Отщепление гидразина может быть проведено действием кислот (например, соляной), однако при этом довольно жестком воздействии углевод может претерпевать изменения. Поэтому чаще используют реакцию «переидразонирования» и вытесняют озон из озазона действием какого-либо активного карбонильного соединения, например, бензальдегида или, лучше всего, пировиноградной кислоты.

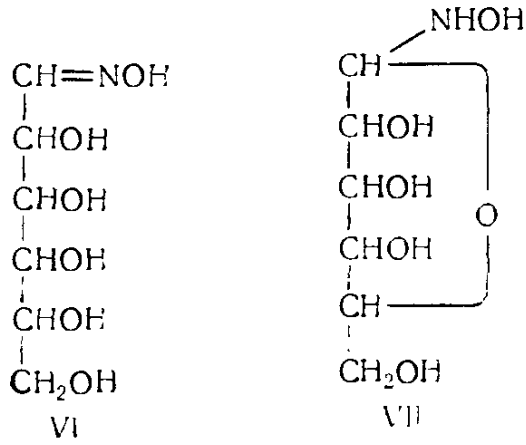
Озоны могут быть использованы для синтеза новых углеводов. Наиболее важной реакцией является восстановление в них амальгамой натрия более активной альдегидной группы. При этом менее активная кетогруппа остается незатронутой, что приводит к получению кетоз. Эта реакция, вместе с синтезом озазона, представляет важный путь перехода от альдозы к изомерной ей кетозе.



Оксимы

Как уже упоминалось ранее, моносахариды при взаимодействии с гидроксиламином легко образуют оксимы, которые сравнительно редко применяются для идентификации, так как часто плохо кристаллизуются и с трудом поддаются очистке. В синтетической химии сахаров они применяются для укорочения цепи моносахарида по Волю. Вопрос об истинной структуре оксимов моносахаридов в той же мере неясен, как и во-

прос о структуре других азотистых производных, упомянутых ранее (арилгидразоны, озазоны). В самом деле, оксим может быть представлен как в истинной открытой форме (VI), так и в виде циклического изомера (VII).



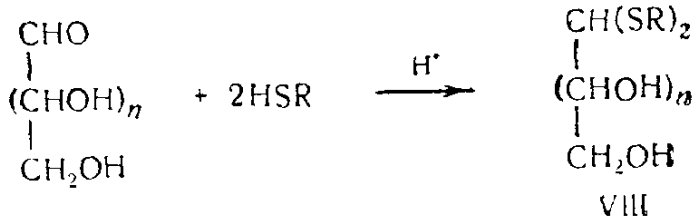
VI VII

причем и в этом случае можно ожидать образования соответствующих стереоизомеров.

ТИОАЦЕТАЛИ И ДРУГИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АЛЬДЕГИДНЫХ ФОРМ МОНОСАХАРИДОВ

Тиоацетали (меркаптали) являются почти единственными производными моносахаридов, которые несомненно имеют нециклическую структуру, хотя они получаются непосредственно из растворов, содержащих таутомерную смесь различных форм.

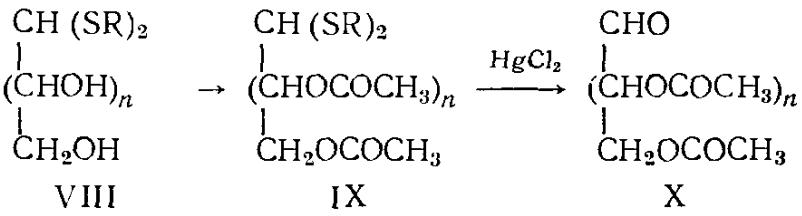
При обработке раствора моносахарида меркаптаном в присутствии сильной кислоты сахар реагирует как альдегид, образуя соответствующий меркапталь (VIII).



VIII

Меркаптали являются очень интересным исходным материалом, позволяющим получить другие нециклические производные моносахаридов.

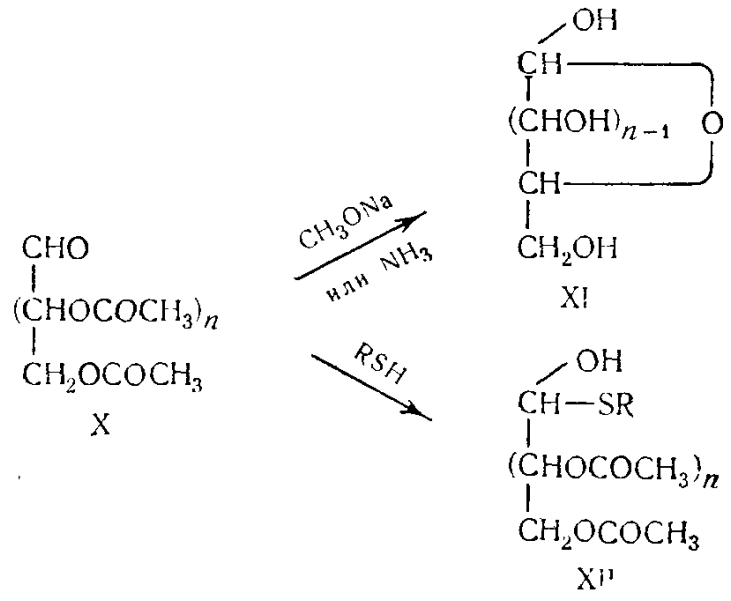
При ацетилировании меркапталей в обычных условиях образуются их полные ацетаты (IX). Последние при обработке сулемой или муравьиной кислотой гидролизуются, регенерируя альдегидную группу, и образуют полные ацетаты карбонильной формы моносахарида (X). Соединения типа (X) весьма реакционноспособны. При обработке метилатом

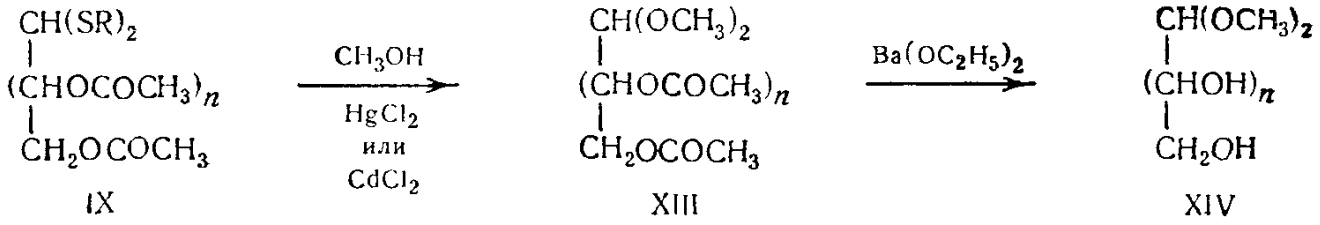


VIII IX X

натрия или аммиаком ацетильные группы отщепляются и немедленно происходит таутомерное превращение сахара в его окисную форму (XI), а при действии меркаптанов образуются полутиоацетали (XII).

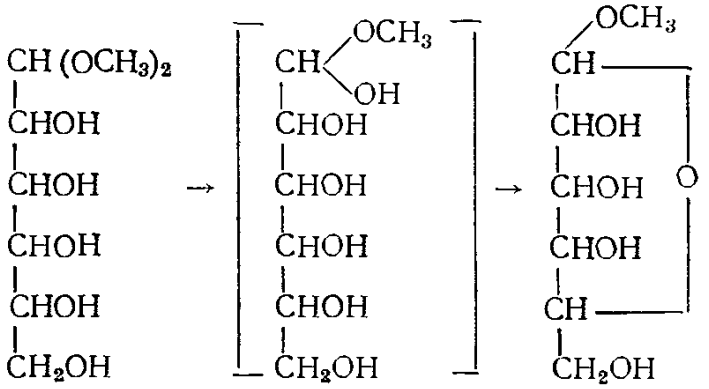
Обработка ацетатов меркапталей спиртовым раствором сулемы или хлористого кадмия приводит к обмену тиоацетальной группировки на ацетальную и образуется ацетильное производное ацеталя моносахарида (XIII). Последнее при обработке алкоголятом бария отщепляет ацетильные группы и дает ацеталь альдегидной формы сахара (XIV); этот путь является единственным общим путем получения таких ацеталей,





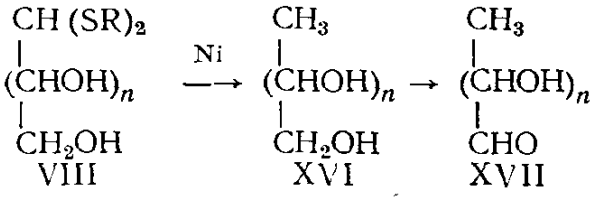
так как при попытках ацетализации свободного моносахарида обычно образуются гликозиды.

Известно, однако, несколько весьма редких случаев, когда непосредственной обработкой моносахарида спиртом в присутствии хлористого водорода удается получить ацетали альдегидной формы (например, для фруктозы). При обработке (XIV) хлористым водородом образуется гликозид, причем процесс происходит, по-видимому, через промежуточное образование полуацеталя (XV) или путем непосредственной переацетализации с участием свободной гидроксильной группы сахара:



Меркаптали моносахаридов могут быть использованы также и для синтеза дезоксисахаров с терминальной метильной группой. Для этого меркаптали (VIII) подвергают обессериванию действием скелетного никеля;

полученный таким образом полиол (XVI) может быть далее окислен в дезоксиальдозу (XVII).



VIII XVI XVII

ПРОСТЫЕ ЭФИРЫ МОНОСАХАРИДОВ

Моносахариды как многоатомные спирты могут образовывать простые эфиры, которые являются прочными соединениями и широко используются в аналитической и синтетической химии углеводов. Гексозы, имея четыре спиртовых гидроксила, дают тетрапроизводные, пентозы — тризамещенные. Алкилирование гликозидного гидроксила дает гликозиды, поведение которых соответствует поведению ацеталей, которыми они и являются, что ниже будет рассмотрено подробнее.

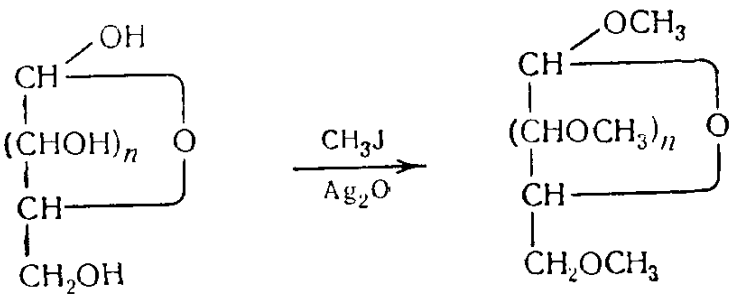
Спиртовые гидроксилы моносахаридов являются более кислыми, чем гидроксильные группы одноатомных спиртов, благодаря влиянию соседних гидроксильных групп. Это проявляется в том, что моносахариды дают алкоголяты (так называемые сахараты) не только со щелочами, но и с гидроокисями некоторых щелочноземельных металлов. Это же находит свое отражение в более легком алкилировании моносахаридов сравнительно со спиртами.

Изо всего многообразия простых эфиров сахаров наиболее важное значение с различных точек зрения имеют метиловые, бензиловые и тритильные (трифенилметильные) эфиры.

Метиловые эфиры

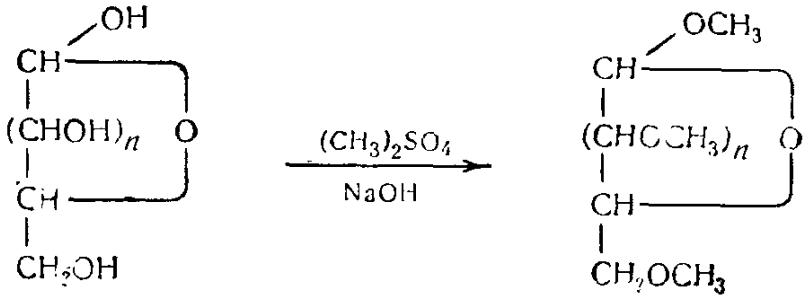
Метиловые эфиры сахаров имеют исключительно важное значение при решении самых различных вопросов структуры углеводов и были широко использованы, в частности, для решения вопроса о размерах окисного кольца (см. выше). В настоящее время получено большое количество полностью или частично метилированных производных различных моносахаридов. Сами по себе частично метилированные сахара иногда, хотя и очень редко, встречаются в природе, например, в некоторых сердечных гликозидах и полисахаридах.

Метилирование свободных гидроксильных групп сахара обычно осуществляется одним из двух методов. Первый метод, предложенный Пурди в начале этого столетия, состоит в обработке углевода иодистым метилом в присутствии окиси серебра.



Этот метод обычно приводит к исчерпывающему метилированию всех свободных гидроксильных групп, но он не всегда удобен из-за затрат большого количества серебряных солей и окисляющего действия их на моносахарид.

Хеуорзс предложил метилировать углеводы диметилсульфатом в присутствии концентрированного (обычно 30%-ного) раствора едкого натра. Этот метод отличается простотой и удобством, но иногда, особенно в случае полисахаридов, не позволяет достигнуть полного метилирования.



Часто, особенно для полисахаридов, метилирование производят в два приема. Сначала метилируют полисахарид диметилсульфатом и затем, для достижения полного метилирования, дополнительно подвергают продукт реакции обработке иодистым метилом в присутствии окиси серебра. Иногда, в тех случаях, когда исходный углевод трудно растворяется в подходящем растворителе, его сначала ацетилируют, и метилированию подвергают уже ацетильное производное, причем вначале происходит гидролиз сложноэфирных группировок, а освобождающиеся гидроксильные группы немедленно метилируются.

Недавно Стейси был предложен новый метод метилирования углеводов. Он состоит в получении натриевого производного моносахарида действием металлического натрия в инертном растворителе или жидком аммиаке, которое затем обрабатывается иодистым метилом. Этот метод еще не нашел широкого применения, и трудно оценить его препаративное значение.

При применении методов Пурди или Хеуорзса обычно (при наличии достаточного избытка метилирующего агента) происходит практически полное метилирование углевода. Избирательное метилирование не удается осуществить, даже применяя рассчитанное количество метилирующего средства, так как различие в реакционной способности гидроксильных групп моносахаридов недостаточно сильно проявляется в жестких условиях реакции.

Довольно четко отличается своей повышенной реакционной способностью лишь гликозидный гидроксил, который метилируется первым, и при употреблении одного моля метилирующего средства в условиях метилирования могут быть получены соответствующие метилгликозиды. Имеются указания на то, что ранее других в гексозах метилируются также гидроксильные группы у $C_{(2)}$ и $C_{(6)}$, однако такое поведение не является правилом и в сильной степени зависит от деталей структуры, конфигурации и конформации моносахарида. Отличие же реакционной способности указанных гидроксильных групп от реакционной способности других гидроксилов в молекуле столь невелико, что его не удалось еще использовать для разработки методов избирательного метилирования.

Как уже упоминалось, метиловые эфиры углеводов по своему поведению соответствуют обычным простым эфирам и с большим трудом подвергаются расщеплению. Деметилирование может быть достигнуто обработкой иодистоводородной кислотой при повышенной температуре или смесью уксусного ангидрида с бромистоводородной кислотой. В этих условиях, естественно, можно ожидать необратимых изменений в молекуле углевода. По этой причине метилирование сахаров нельзя

рассматривать как временную защиту гидроксильных групп в углеводе, и этот метод не находит использования в синтетической практике. Однако для установления строения сахаров, особенно полисахаридов, он имеет исключительное значение и в течение многих лет очень широко используется.

Бензиловые эфиры

Бензиловые эфиры углеводов в отличие от метиловых имеют значение в синтетической химии, так как связь бензильной группы с кислородом, будучи весьма прочной в обычных условиях, достаточно легко рвется при гидрогенолизе. Благодаря этому качеству бензиловых эфиров их удобно использовать для временной защиты гидроксильных групп сахара.

Бензиловые эфиры получаются обычно действием на моносахарид хлористого бензила в инертном растворителе в присутствии твердой щелочи. Так же, как и при получении метиловых эфиров, в реакцию вступают все свободные гидроксилы углеводов, и методы избирательного бензилирования в настоящее время отсутствуют. Для частичного бензилирования моносахарида необходимо временно защитить часть гидроксилов группировками, устойчивыми к действию щелочных агентов, лучше всего ацетальной группой (см. ниже).

Бензиловые эфиры достаточно устойчивы к щелочам и слабым кислотам и лишь при действии сильных минеральных кислот постепенно гидролизуются.

Для снятия бензильной защиты применяется каталитическое гидрирование над платиной (или иногда над палладием), в результате которого происходит гидрогенолиз связи $O—CH_2C_6H_5$, и с отщеплением толуола регенерируется свободная гидроксильная группа.

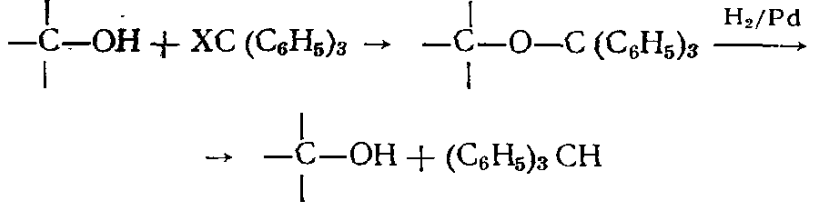
$$\begin{array}{l} | \\ CH—OCH_2C_6H_5 \\ | \end{array} \xrightarrow{H_2/Pt} \begin{array}{l} | \\ CHOH \\ | \end{array} + C_6H_5CH_3$$

Поскольку каталитическое гидрирование может проводиться в нейтральной среде, бензильную группировку удается снять, не трогая других функциональных групп в молекуле. Этот метод применяется для получения частично ацетилированных, частично метилированных и тому подобных производных углеводов.

Тритильные эфиры

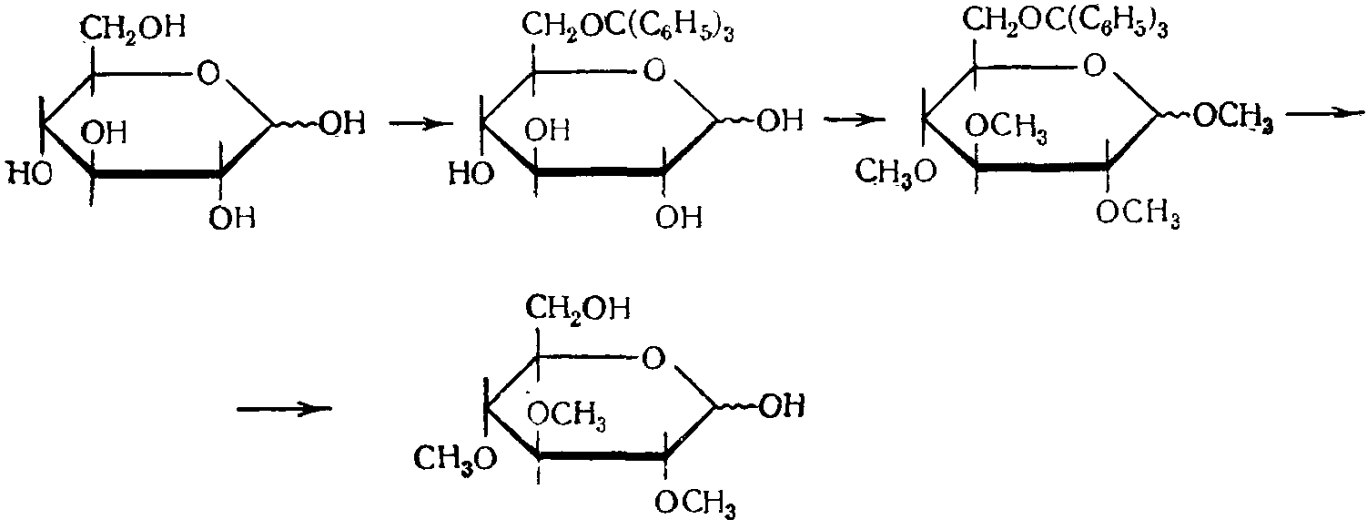
Конденсация моносахаридов с трифенилхлорметаном или трифенилбромметаном, в результате которой образуются тритильные (трифенилметильные) эфиры моносахаридов, имеет важное синтетическое значение. Это связано не только с легкостью регенерации исходного углевода из его тритильного производного, но и с избирательностью реакции тритилирования.

Тритилирование достигается обработкой моносахарида трифенилхлорметаном (реже трифенилбромметаном) в среде пиридина при комнатной температуре или при слабом нагревании. Отщепление тритильной группы и регенерация гидроксильной группы легко достигаются обработкой тритильного эфира уксусной кислотой при нагревании или, если нежелательно подвергать углевод действию уксусной кислоты, каталитическим гидрированием над платиной или над палладием, которое вызывает гидрогенолиз связи кислород — углерод с отщеплением трифенилметана.



В отличие от метилирования и бензилирования, реакция тритилирования, протекающая в мягких условиях, избирательна. Как правило, в упомянутых условиях тритилированию практически подвергаются лишь первичные гидроксильные группы моносахаридов. Тритилирование вторичных гидроксилов протекает лишь при значительно более длительном воздействии в более жестких условиях, так как скорости реакции первичноспиртовых групп и вторичноспиртовых групп резко различаются. Так, например, скорость тритилирования первичной группы галактозы в 226 раз превышает скорость тритилирования ее вторичных гидроксилов, для глюкозы это соотношение составляет 34 : 1. В связи с этим достаточно чистыми получаются лишь монотритильные производные для углеводов, содержащих CH_2OH-группировку. Известно всего несколько отклонений от этого правила. Так, например, при тритилировании рибозы получается смесь моно- и дитритильных производных, а при проведении реакции при 100° образуются и тритритильные производные. Далее, некоторые 6-дезоксигексозы, несмотря на отсутствие первичного гидроксила, дают тритильные производные. Несмотря на эти редкие исключения, тритилирование, как правило, может служить избирательной временной защитой первичного гидроксила в молекуле сахара, и именно с этой целью широко используется.

В качестве примера применения этого метода можно привести получение 2,3,4-триметилглюкозы, важного для структурной и синтетической химии углеводов частично метилированного сахара, которое ясно из следующей схемы:



СЛОЖНЫЕ ЭФИРЫ МОНОСАХАРИДОВ

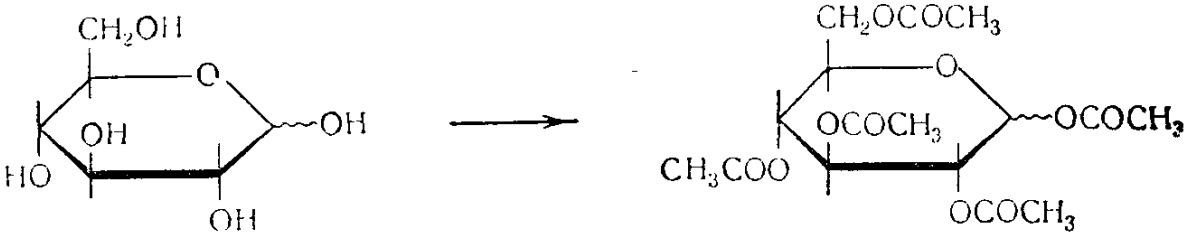
Углеводы, будучи многоатомными спиртами, легко этерифицируются в обычных условиях, образуя сложные эфиры. Сложные эфиры, в отличие от простых, используются главным образом в синтетической химии углеводов и в первую очередь для временной защиты спиртовых гидроксильных групп сахара. Некоторые сложные эфиры полисахаридов имеют очень важное практическое значение, в особенности такие эфиры целлюлозы, как ацетат, ксантогенат и т. д.

Ацетаты

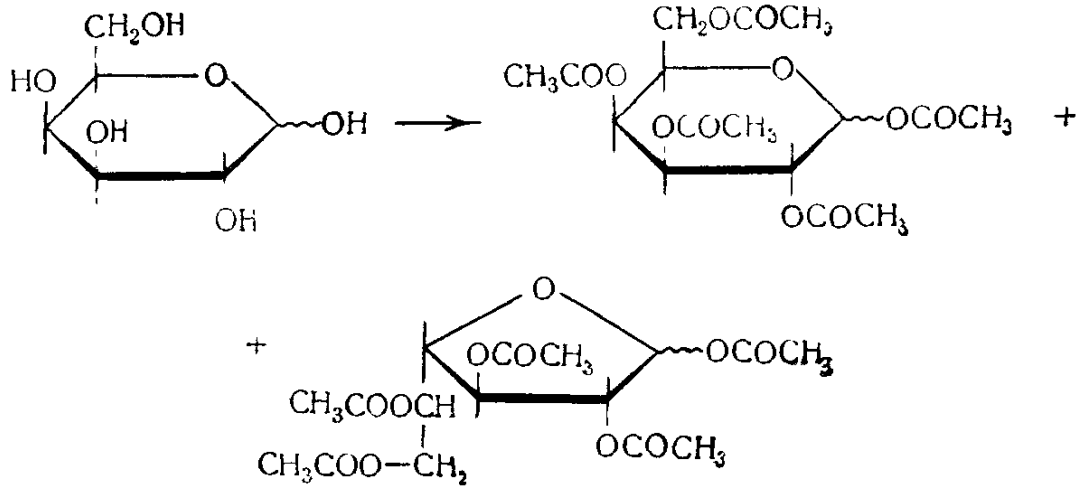
Наибольшее распространение и значение из сложных эфиров углеводов, как моно-, так и полисахаридов, имеют ацетаты. Ацетаты простейших моносахаридов и их некоторые производные являются излюбленными промежуточными продуктами в синтетической химии углеводов.

Ацетаты могут быть получены при действии на моносахариды различных ацетилирующих средств, наиболее удобным из которых является уксусный ангидрид. Ацетилирование уксусным ангидридом ведут обычно в присутствии катализаторов кислого и основного характера. Из кислых катализаторов чаще всего применяется хлористый цинк, фосфорная кислота или, для более трудных случаев, хлорная кислота. Очень часто используется также добавка основных агентов, таких, как ацетат натрия и особенно пиридин, который одновременно может служить растворителем.

При подобной обработке обычно получаются полные ацетаты пиранозидов, так как гликозидный гидроксил также ацетилируется. В качестве примера можно привести ацетилирование глюкозы.



Однако известны случаи, когда образуется смесь ацетатов с пиранозным и фуранозным кольцом, что имеет место, например, при ацетилировании галактозы.



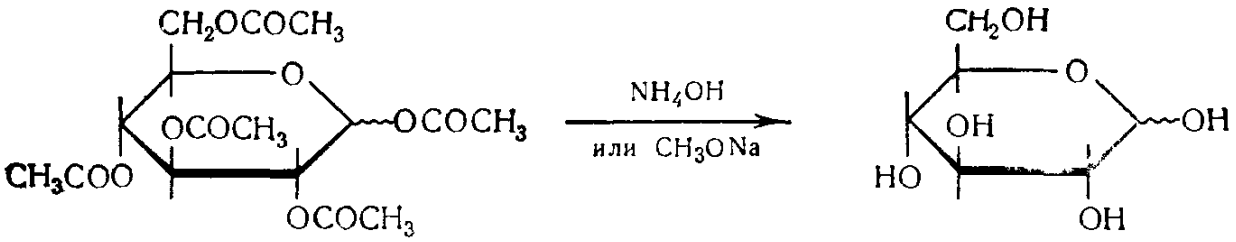
Поскольку конфигурация гликозидного гидроксила, в отличие от других гидроксильных групп, не закреплена, то при его ацетилировании может образоваться тот или иной аномерный ацетат. Практически обычно получается смесь обоих аномеров (α- и β-ацетаты). Последние могут быть разделены часто лишь с большим трудом.

Соотношение образующихся аномерных ацетатов зависит от взятого в реакцию аномера моносахарида и в сильной степени определяется условиями реакции. Так, при низкой температуре (около 0°) в пиридине обычно образуется ацетат, соответствующий конфигурации аномерного моносахарида, взятого в реакцию, т. е. из α-аномера образуется α-ацетат, из β-аномера — β-ацетат. С повышением температуры реакция сопровождается эпимеризацией у $C_{(1)}$, в результате чего образуется в большем количестве более устойчивый эпимер, которым в большинстве

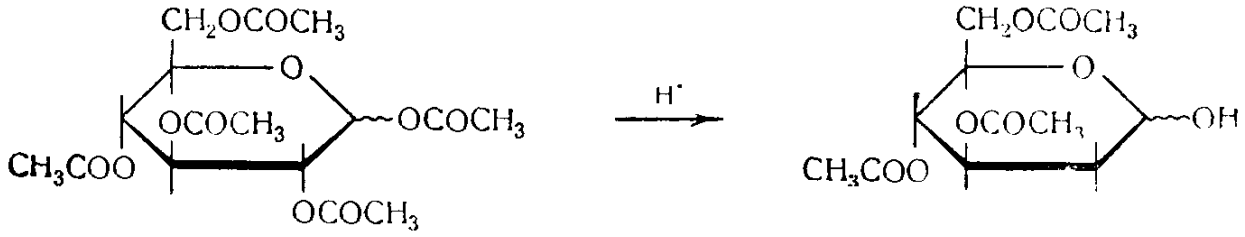
случаев является α-ацетат. При ацетилировании уксусным ангидридом в присутствии хлористого цинка при температурах от 20 до 100° образуется обычно α-ацетат независимо от того, исходят ли из α- или β-аномера моносахарида. Напротив, при ацетилировании в присутствии ацетата натрия обычно получают β-ацетаты, так как гликозидный гидроксил в β-аномере занимает в большинстве случаев экваториальное положение (поскольку большинство моносахаридов существует в конформации С1) и отличается большей реакционной способностью при этерификации, а равновесие между образующимися ацетатами в этих условиях устанавливается очень медленно.

Так же, как и при получении простых эфиров, методы частичного ацетилирования мало разработаны, и для получения частично ацетилированных моносахаридов необходимо предварительно защищать соответствующие гидроксильные группы в исходном углеводе. Известно, правда, что гидроксильные группы моносахарида несколько отличаются по реакционной способности, и легкость ацетилирования для большинства альдогексоз падает в ряду $C_{(1)} > C_{(2)} > C_{(6)} > C_{(3,4,5)}$. Однако это различие не настолько велико, чтобы сказаться в довольно жестких условиях, которые применяются в настоящее время при ацетилировании.

В отличие от простых эфиров, ацетаты сахаров в условиях гидролиза легко омыляются с регенерацией исходного моносахарида. Это обстоятельство имеет большое значение, так как позволяет использовать реакцию ацетилирования для временной защиты гидроксильных групп. Снятие ацетильных групп может быть достигнуто как кислым, так и щелочным гидролизом, однако чаще используют второй вариант. Наиболее часто применяется гидролиз водным аммиаком или метанольным раствором метилата натрия.

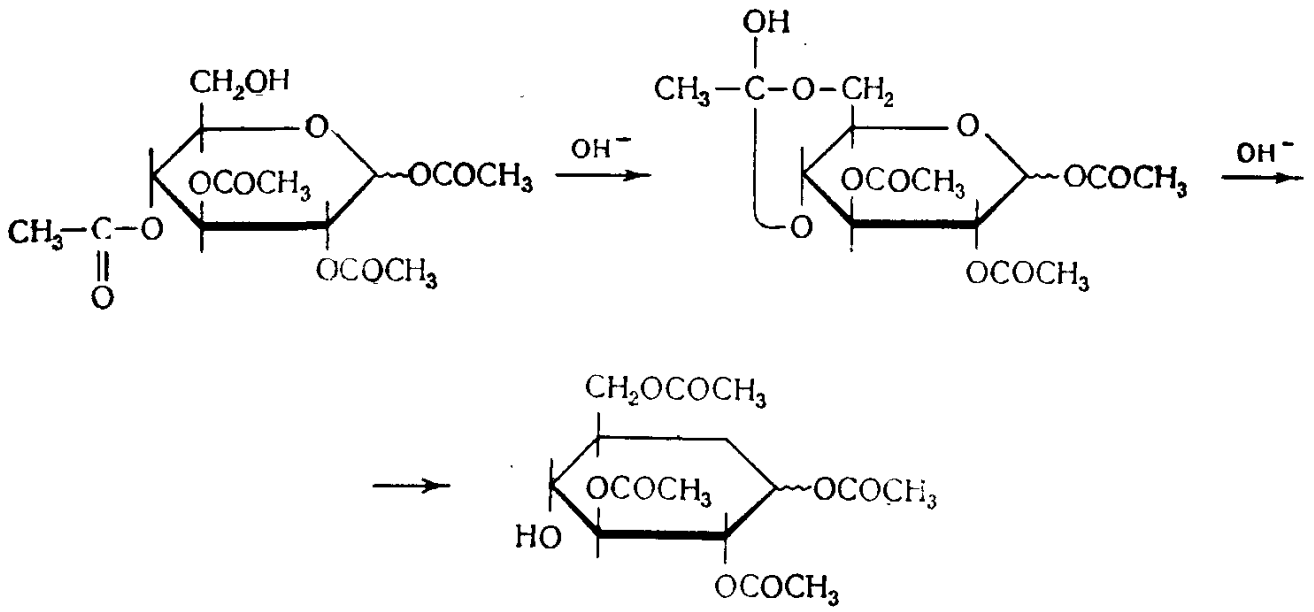


Особенно легко снимается ацетильная группа с гликозидного гидроксила, что достигается уже действием разбавленных кислот. Этим путем можно получить тетраацетаты гексоз или триацетаты пентоз со свободным гликозидным гидроксилом.



Существенным обстоятельством, с которым необходимо считаться при работе с ацетатами, является способность ацетильных групп к миграции в молекуле моносахарида, имеющего свободные гидроксильные группы, т. е. в неполных ацетатах. Эта миграция легко проходит в щелочной среде. Вопрос о порядке миграции ацетильных групп в тех случаях, когда есть несколько возможностей для таких переходов, достаточно сложен. Обычно, однако, ацетильная группа перемещается на гидроксил, который пространственно близок к сложно-эфирной группировке. Это обстоятельство связано с тем, что такая миграция проходит,

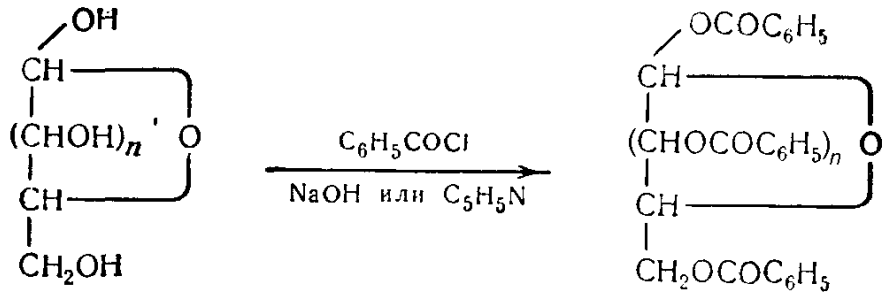
как это теперь доказано, через промежуточное образование неполного ортоэфира (называемого обычно просто ортоэфиром), как например:



Возможность миграции ацетильных групп в частично ацетилированных моносахаридах необходимо особенно учитывать, когда ацетаты употребляются в синтетических целях. В этих случаях нужно постоянно соблюдать осторожность в заключениях о строении продукта синтеза, получающегося из неполного ацетата.

Бензоаты

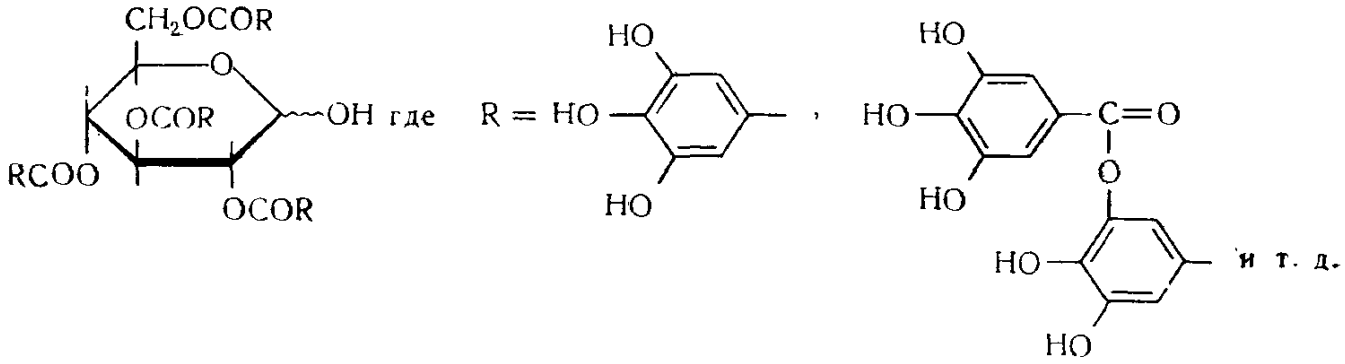
В последние годы в качестве исходных веществ в синтетической химии углеводов все большее значение приобретают бензоаты моносахаридов. Они употребляются для тех же целей, что и ацетаты, т. е. для временной защиты гидроксильных групп моносахаридов, но имеют то преимущество, что обычно легче получаются в кристаллическом виде и потому удобнее для работы. Бензоаты получаются при обработке моносахарида в условиях реакции Шоттен-Баумана, т. е. хлористым бензоилом в водной едкой щелочи. Более удобным методом, который в настоящее время обычно и применяется, является обработка моносахарида хлористым бензоилом в пиридине или хинолине.



Гидролиз бензоатов осуществляется также в присутствии оснований, причем в этом случае обычно применяется метилат натрия в метаноле. Бензоаты устойчивы к действию аммиака, и это позволяет из смешанных сложных эфиров моносахарида избирательно удалить ацетильные группы, не затрагивая бензоильных.

В отличие от ацетатов, углеводы, этерифицированные ароматическими кислотами, встречаются в природе. Наиболее важными представителями этого типа являются таннины, составляющие основу одного из классов природных дубильных веществ. Природные таннины представ-

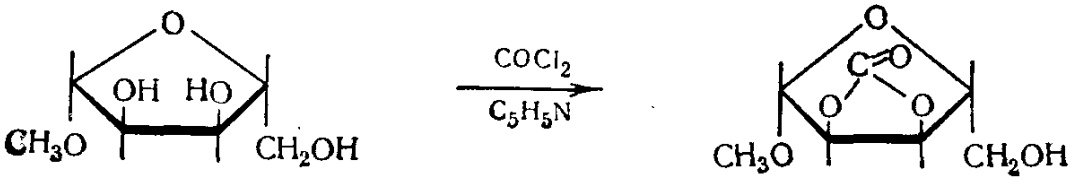
ляют собой смеси сложных эфиров глюкозы, которая ацилирована галловой, дигалловой и полигалловой кислотами.



Вопрос о химической индивидуальности таннинов того или иного происхождения в настоящее время спорен, и поэтому остается неясным, представляют ли они смеси сложных эфиров глюкозы, где в одной молекуле содержатся лишь одинаковые ацильные группировки, или, напротив, в одной и той же молекуле различные гидроксилы ацилированы различными кислотами (галловая, дигалловая). Однако более вероятным представляется последнее предположение.

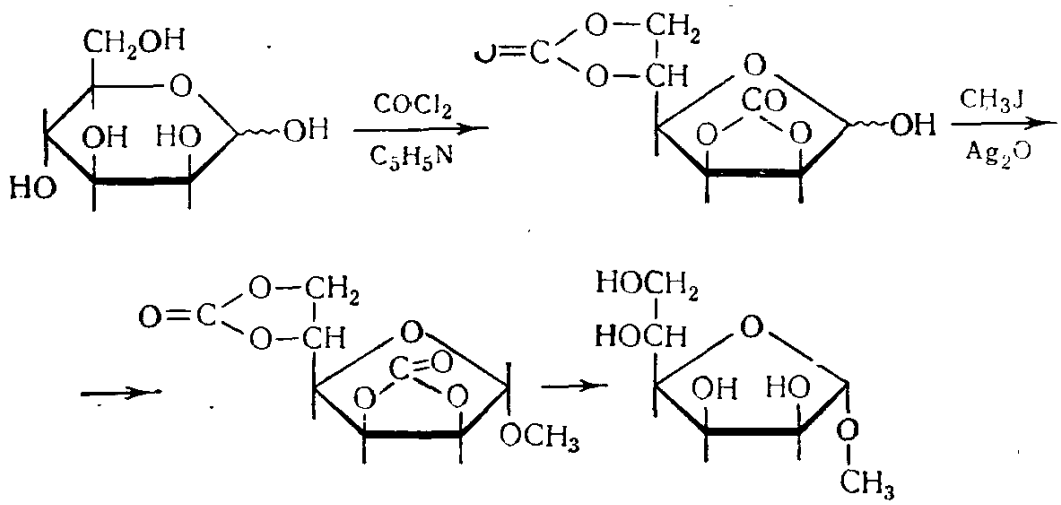
Карбонаты

Интересные возможности для синтеза представляют циклические карбонаты моносахаридов, которые в последние годы с этой точки зрения начинают привлекать внимание. Циклические карбонаты получаются при обработке моносахарида фосгеном в пиридине. Очень важным обстоятельством является то, что циклические карбонаты получаются только для цис-α-гликольной группировки, и поэтому их образование может использоваться также и для опознавания этой структурной единицы в моносахариде, например,



Метод перевода в карбонат применяется для временной защиты двух соседних цис-гидроксильных групп и пригоден для избирательной защиты, которая легко снимается при обработке основаниями.

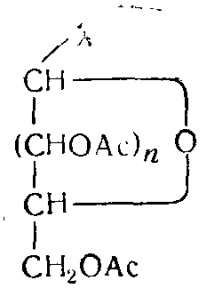
Часто реакция гексозы с фосгеном приводит к образованию карбоната фуранозной структуры, которая характеризуется двумя гидроксилами



в нециклической части, способными дать карбонат. Эта реакция используется для приготовления часто труднодоступных производных фуранозных форм гексоз. В качестве примера можно привести получение этим путем метилманнофуранозида (см. стр. 68).

О-Ацилгликозилгалогениды

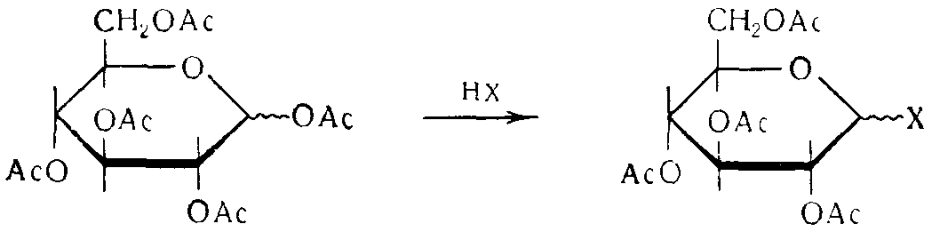
Особое значение в синтетической химии углеводов имеют так называемые О-ацилгликозилгалогениды, т. е. соединения общего типа (XVIII), в которых все спиртовые гидроксильные группы проацилированы, а гликозидный гидроксил замещен на галоид. Значение О-ацилгликозилгалогенидов связано со способностью атома галоида легко замещаться различными нуклеофильными группировками, и поэтому они особенно широко применяются для получения различных О- и N-гликозидов.



где X = F, Cl, Br, J

XVIII

Методы получения О-ацилгликозилгалогенидов основаны на неравноценности ацильных групп в полностью ацилированных моносахаридах (см. выше). В таких полных ацетатах ацетильная группа у гликозидного атома при действии кислот весьма легко обменивается на другие группировки, такие, как ONO_2, OSO_2OH, $OPO(OH)_2$ и т. д. Особое значение имеет обмен гликозидной ацильной группировки на галоид под действием галоидоводородных кислот или сходных реагентов, в результате чего и образуется О-ацилгликозилгалогениды, например (XIX).

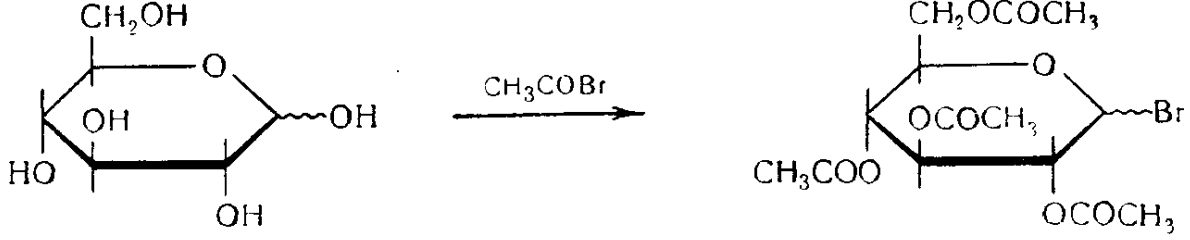


XIX

Такая замена ацилоксигруппы на галоид может производиться действием на полностью ацилированный сахар раствора галоидоводорода в уксусной кислоте или эфире, что особенно часто применяется для получения бромидов и хлоридов. В некоторых случаях, особенно при синтезе фторидов, полностью ацилированный сахар обрабатывается жидким галоидоводородом, в частности, плавиковой кислотой.

Применяется также, хотя и имеет меньшее значение, обработка ацилированных сахаров смесью хлористого алюминия и пятихлористого фосфора; для этих же целей предложено использовать четыреххлористый титан.

Наиболее старым, но сохранившим до сих пор свое значение методом получения О-ацилгликозилгалогенидов является обработка углевода галоидангидридом кислоты. Этот реагент, наряду с ацилированием спиртовых гидроксилов моносахарида, производит замещение гликозидного гидроксила на галоид, например:



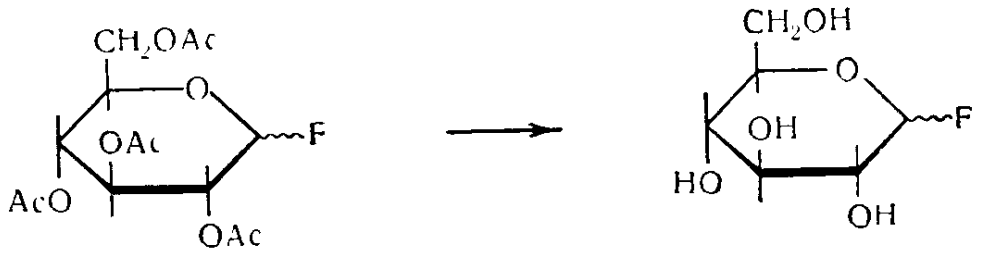
До последнего времени в синтетической химии сахаров применялись почти исключительно соответствующие ацетаты, которые и сейчас используются наиболее часто, но в последние годы во многих случаях, особенно для синтеза более сложных гликозидов, например, в химии нуклеотидов, все чаще используются О-бензоилгликозилгалогениды, так как они более устойчивы и могут быть легче очищены.

Реакционная способность О-ацилгликозилгалогенидов зависит прежде всего от природы галоида и падет в ряду J>Br>Cl>F. Наименее устойчивы и особенно легко подвергаются превращениям с отщеплением галоида иодиды. Последние устойчивые лишь при температурах не свыше 0° и испытывают сложные превращения; известно лишь несколько представителей этого типа, выделенных в индивидуальном состоянии. Иодиды из-за неустойчивости не находят применения в синтезе.

Наиболее удобны в работе бромиды, которые могут быть легко получены и, если нужно, очищены, и обладают вместе с тем весьма активным атомом брома, легко обменивающимся при воздействии нуклеофильного реагента. Бромиды чаще всего применяются в синтезе.

Несколько менее реакционноспособны хлориды, хотя они достаточно легко обменивают свой галоид; хлориды часто применяются в синтезе, когда соответствующий бромид оказывается слишком активным, что в сочетании с лабильностью второго реагента, представляющего агликонную часть будущего гликозида, может привести к нежелательным побочным процессам.

Наиболее устойчивы и очень мало реакционноспособны О-ацилгликозилфториды, которые легко могут быть получены в индивидуальном состоянии и очищены. Реакционная способность атома фтора, стоящего у гликозидного центра, настолько незначительна, что в О-ацилгликозилфториде могут быть сняты ацильные группы со спиртовых гидроксилов с сохранением атома фтора у гликозидного центра. В результате этого образуется фторид свободного моносахарида.

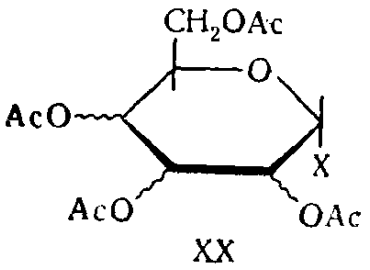


Соединения такого типа являются уникальными в химии углеводов; ни для хлоридов, ни для бромидов такие соединения не могут быть получены, так как они немедленно испытывают превращения, очевидно, за счет самоконденсации внутри- или межмолекулярного типа.

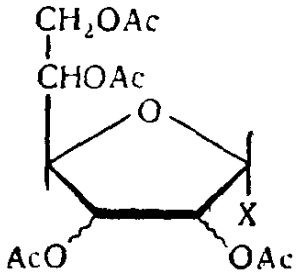
Очень сложным и важным вопросом является вопрос о конфигурации гликозидного центра О-ацилгликозилгалогенидов. В повседневной синтетической работе выделение и очистка индивидуального аномера О-ацилгликозилгалогенида обычно не производится, так как чаще всего

получается преимущественно один аномер, или же оказывается возможным успешно работать со смесью аномеров. Однако в случае необходимости при достаточной устойчивости О-ацилгликозилгалогенидов такие аномеры могут быть выделены в индивидуальном виде.

В силу аномеризации у гликозидного центра соотношение получающихся аномеров определяется их относительной устойчивостью. Имеющийся в настоящее время экспериментальный материал показывает, что для природных альдогексоз D-ряда обычно более стойким является α-аномер (XX), в котором группа — CH_2OAc и атом галоида расположены по разные стороны плоскости пиранозного кольца и вследствие этого максимально удалены друг от друга.



XX



XXI

Это справедливо и для фуранозных производных (XXI), где атом галоида и группировка —CHOAc — CH_2OAc также находятся на наибольшем расстоянии.

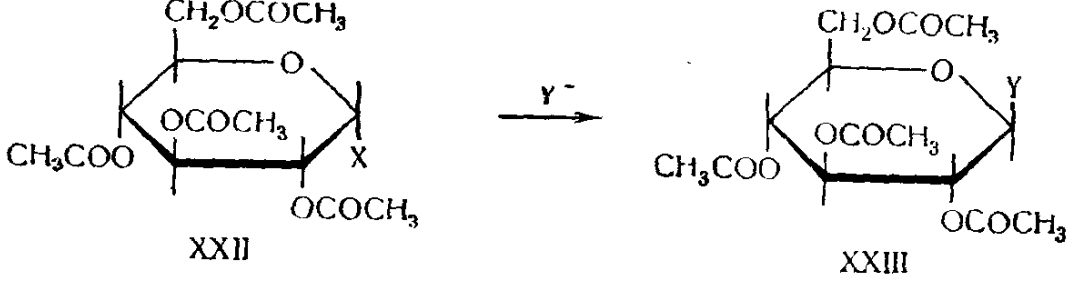
Для пиранозных производных альдопентоз, в которых отсутствует —CH_2OAc-группировка, закономерность менее четкая.

По-видимому, в этом случае наиболее сильное влияние оказывает конфигурация у $C_{(3)}$ и более устойчивой формой О-ацилгликозилгалогенида оказывается такая, где ацилоксигруппа у $C_{(3)}$ и атом галоида у $C_{(1)}$ находятся по разные стороны плоскости кольца. Для наиболее важных пентоз это приводит к большей устойчивости β-аномерного галогенида.

Весьма важным для синтетической химии сахаров вопросом является механизм и стереохимия замещения галоида в О-ацилгликозилгалогенидах, так как это определяет конфигурацию образующегося при реакции замещения О- или N-гликозида. Этот вопрос в настоящее время можно считать в общих чертах выясненным. Оказалось, что решающим фактором, влияющим на механизм реакции и ее стереохимическое течение, является конфигурация у второго углеродного атома. Нужно различать два принципиально разных случая: 1) атом галоида у $C_{(1)}$ и ацилоксильная группа у $C_{(1)}$ находятся в цис-положении, т. е. по одну сторону плоскости кольца, и 2) атом галоида у $C_{(1)}$ и ацилоксильная группа у $C_{(2)}$ находятся в транс-положении, т. е. максимально удалены и расположены по разные стороны кольца.

Решающее влияние соседней ацетоксильной группы на механизм и стереохимию обмена в О-ацилгликозилгалогенидах есть проявление общей закономерности влияния стереохимии соседнего углеродного атома на механизм замещения у насыщенного атома углерода; этому вопросу уделяется последнее время большое внимание в работах Уинштейна и др., и само явление получило название «эффекта соучастия».

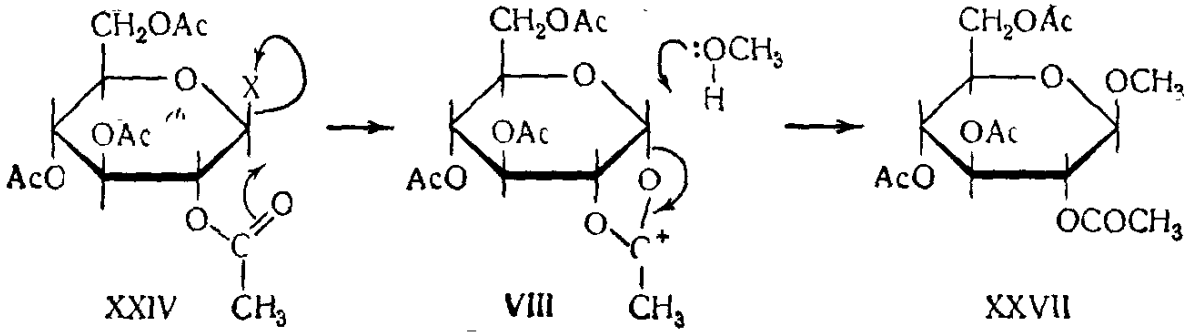
В случае О-ацилгликозилгалогенидов оказывается, что для цис-конфигурации у $C_{(1)}$—$C_{(2)}$, например, для α-аномера тетра-О-ацетилглюкозилгалогенида (XXII) все реакции идут с обращением конфигурации у $C_{(1)}$, в результате чего при замещении галоида образуются β-глюкозиды (XXIII).



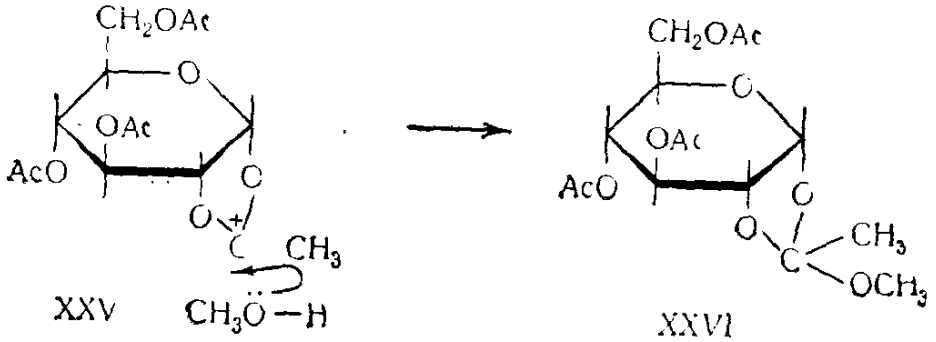
XXII XXIII

Если принять, что обмен галоида является реакцией первого порядка и, следовательно, стадией, определяющей скорость реакции, является диссоциация связей C—X, то очевидно, далее нуклеофильная атака направляется строго однозначно в стереохимическом отношении, благодаря пространственному влиянию ацилоксигруппы у $C_{(2)}$, а также благодаря ее нуклеофильному характеру, препятствующему приближению к ней нуклеофильного агента.

Для О-ацилгликозилгалогенидов, имеющих транс-конфигурацию у $C_{(1)}$— $C_{(2)}$, например, для β-аномера тетра-О-ацетилглюкозилгалогенида (XXIV), механизм реакции совершенно иной и может быть представлен схемой



XXIV VIII XXVII



XXV XXVI

В этом случае первоначальным актом в реакции является тыловая атака нуклеофильного атома кислорода ацилоксигруппы у $C_{(2)}$, находящейся в транс-положении к атому галоида. Возможность атаковать гликозидный атом с тыла, которая имеется только при транс-конфигурации у $C_{(1)}$—$C_{(2)}$, определяет именно этот ход реакции. Образующийся при этом промежуточный циклический карбониевый ион (XXV), в котором положительный заряд сосредоточен главным образом на С-атоме бывшей ацильной группы, может реагировать далее по двум направлениям. При действии сильного нуклеофильного реагента, например, метилата натрия (т. е. фактически метоксильного иона) или метилового спирта в присутствии карбоната серебра происходит прямая атака на углеродный атом, несущий основную часть положительного заряда, в результате чего образуется ортоэфир (XXVI). Соединения этого типа в настоящее время хорошо известны, они могут быть выделены в индивидуальном состоянии и достаточно устойчивы.

При атаке карбониевого иона (XXV) более слабым нуклеофильным реагентом, например, метанолом без каких-либо добавок, атаке подвергается более слабый электрофильный центр молекулы — гликозидный углеродный атом. В результате этого происходит раскрытие циклической группировки карбокатиона, регенерируется ацетоксильная группа у $C_{(2)}$, и новый заместитель у $C_{(1)}$ занимает транс-положение, т. е. образующееся в рассматриваемом случае соединение (XXVII) получается в виде β-аномера. Из этого видно, что и в данном случае реакция также стереохимически направлена, так как нуклеофильная атака гликозидного центра в (XXV) происходит с тыльной стороны по отношению к циклической группировке. Таким образом, хотя для обоих аномерных галогенидов механизм реакции совершенно различен, и в одном случае реакция может привести к образованию ортоэфира, независимо от конфигурации аномерного галогенида у $C_{(1)}$, в обоих случаях при замещении атома галоида на нуклеофильные группировки образуется производное с транс-расположением группировок у $C_{(1)}$ и $C_{(2)}$.

Этот вывод имеет очень важное практическое значение. Ясно, что для моносахаридов, имеющих конфигурацию у $C_{(2)}$, подобную конфигурации у глюкозы, β-гликозиды легко доступны, а синтез α-гликозидов представляет серьезную проблему. При противоположной конфигурации у $C_{(2)}$ (например, у маннозы) дело обстоит как раз наоборот. Наконец, в том случае, когда у $C_{(2)}$ отсутствует заместитель, например, в 2-дезоксисахарах, направляющее влияние при обмене атома галоида отсутствует, и должна образоваться смесь обоих аномерных гликозидов. Следует отметить, что приведенное выше правило представляет собою несколько идеализированный результат реакции обмена галоида в ацилгликозилгалогенидах. При практическом осуществлении синтеза гликозидов этим путем реакция часто сопровождается эпимеризацией образующегося гликозида у $C_{(1)}$, в результате чего образуется смесь аномерных гликозидов с преобладанием более устойчивого. Эта эпимеризация особенно легко происходит в кислой среде, что может иметь место, например, при обработке реакционной смеси.

Эфиры сульфокислот

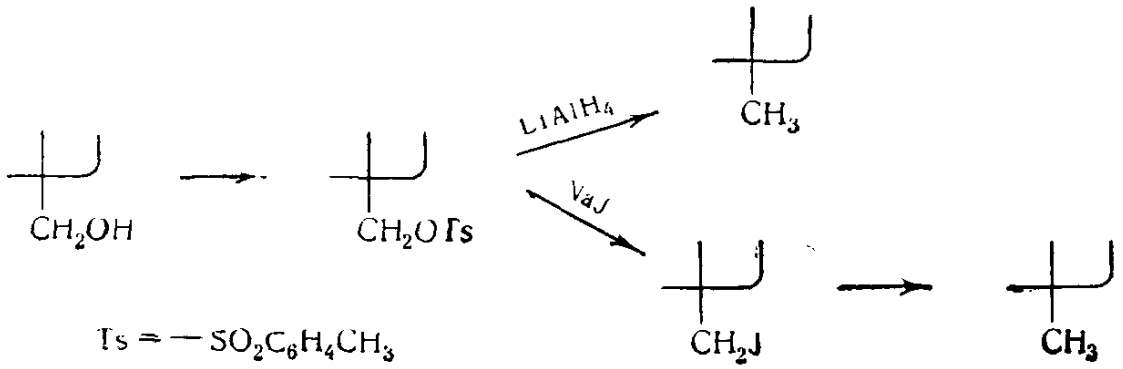
Эфиры некоторых сульфокислот, особенно *п*-толуолсульфокислоты (тозилаты) и метансульфокислоты (мезилаты), представляют большой интерес. Они имеют значение почти исключительно в синтетической химии сахаров, однако их использование в этом направлении непрерывно возрастает, и в настоящее время трудно найти более или менее сложный синтетический переход в ряду моносахаридов или их производных, который не включал бы на некоторых стадиях превращение эфиров сульфокислот. Введение тозильной или мезильной группы в отличие от получения сложных эфиров карбоновых кислот делается не для временной защиты гидроксильной группы, а для дальнейшего превращения в другую функцию. Поэтому наибольший интерес представляют производные углеводов, содержащие эти группировки у заданных фиксированных атомов в молекуле.

Тозилаты и мезилаты обычно получают действием *п*-толуолсульфохлорида или соответственно метансульфохлорида на моносахарид, в котором защищены все гидроксильные группы, кроме той, эфир которой желают получить. Реакцию проводят в пиридине или концентрированном растворе едкого натра на холоду. Часто и тозилаты и мезилаты хорошо кристаллизуются и легко могут быть очищены.

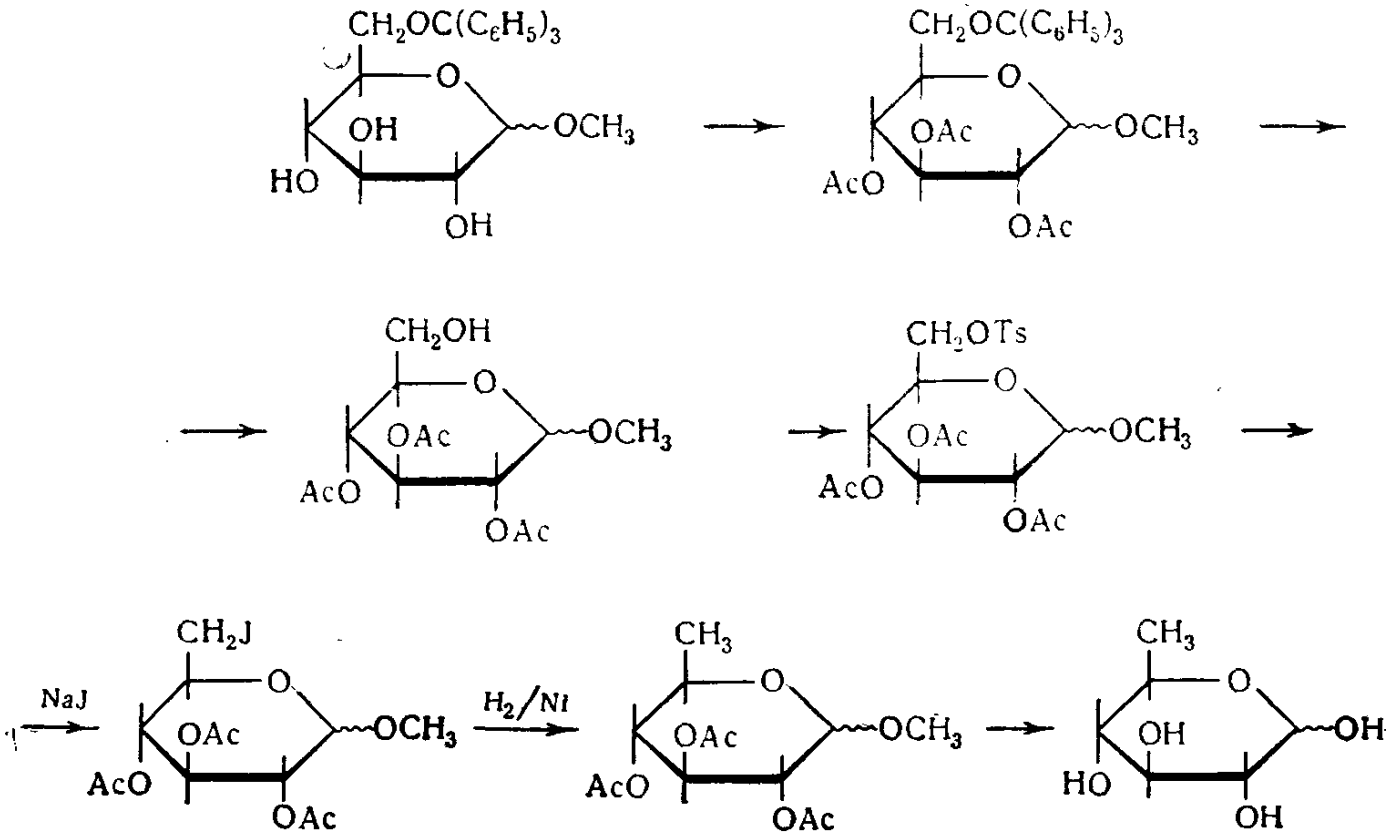
Хотя хорошо известно, что первичноспиртовая группа тозилируется (и мезилируется) быстрее вторичной и в ряде случаев это может быть использовано, однако эта разница не всегда достаточна для того, чтобы можно было во всех случаях достигнуть избирательного тозилирования. Для введения тозильной группы в нужное место моносахарида последний должен быть поэтому подходящим образом защищен. При проведении реакции с моносахаридом, имеющим свободный гликозидный гидроксил, последний замещается на галоид, поэтому обычно в реакцию вводят гликозиды или иные производные с защищенным гликозидным гидроксилом.

Использование тозилатов и мезилатов моносахаридов является перспективным в синтетической химии углеводов, поскольку эти производные должны быть по своему поведению сходны с обычными эфирами сульфокислот, являющимися алкилирующими средствами. В настоящее время их в основном используют по двум линиям — для синтеза дезоксисахаров и для синтеза ангидросахаров.

При синтезе дезоксисахаров можно либо прямо восстанавливать тозилат алюмогидридом лития, либо переходить от тозилата к иодиду реакцией с иодистым натрием с последующим каталитическим гидрированием иодида:

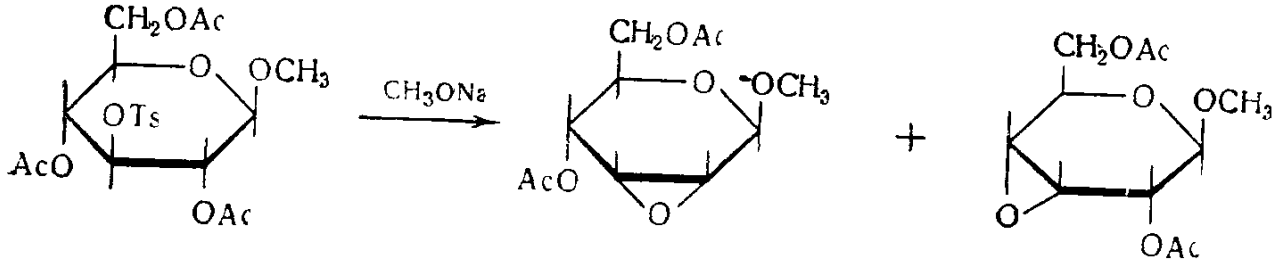


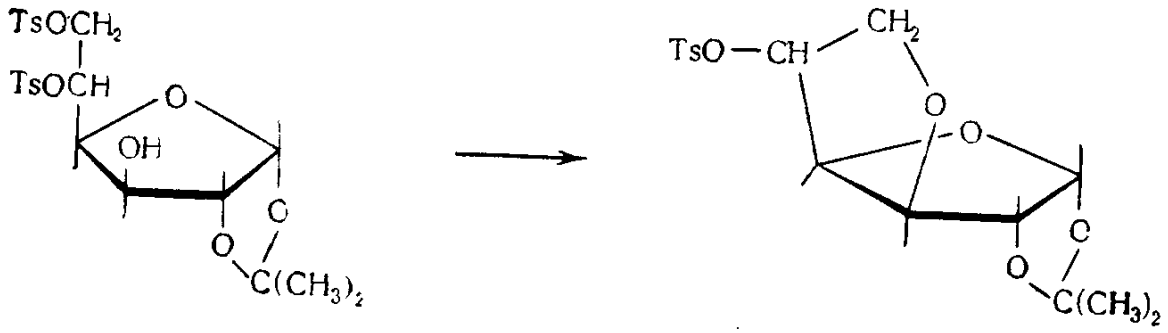
К сожалению, подобная последовательность реакций возможна пока только для тозилатов, образовавшихся при этерификации первичноспиртовой группы, так как вторичные тозилаты неспособны к столь легкому



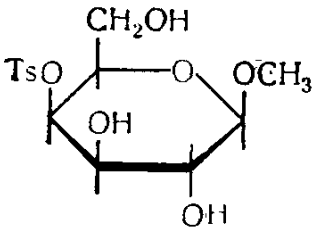
обмену тозильной группы на иод и реакции этого типа для вторичных тозилатных групп неизвестны, а имеющиеся исключения связаны с особенностями структуры тозилата, которые обусловливают сложный обходной путь реакции. Таким образом, этот метод применяется для получения 6-дезоксигексоз или 5-дезоксипентоз, примером чего может служить синтез 6-дезоксиглюкозы (см. стр. 74).

Если тозильная (или мезильная) группировка находится в молекуле моносахарида, остальные гидроксильные группы которого достаточно прочно защищены, то обычно омыление этой группировки проходит с большим трудом и, по-видимому, без обращения конфигурации. Однако, если по соседству с тозильной (или мезильной) группой имеется свободная гидроксильная группа или легко омыляемая группировка, например, ацетокси- или бензоилоксигруппа, то тозильная группа легко отщепляется с замыканием окисного кольца, например:





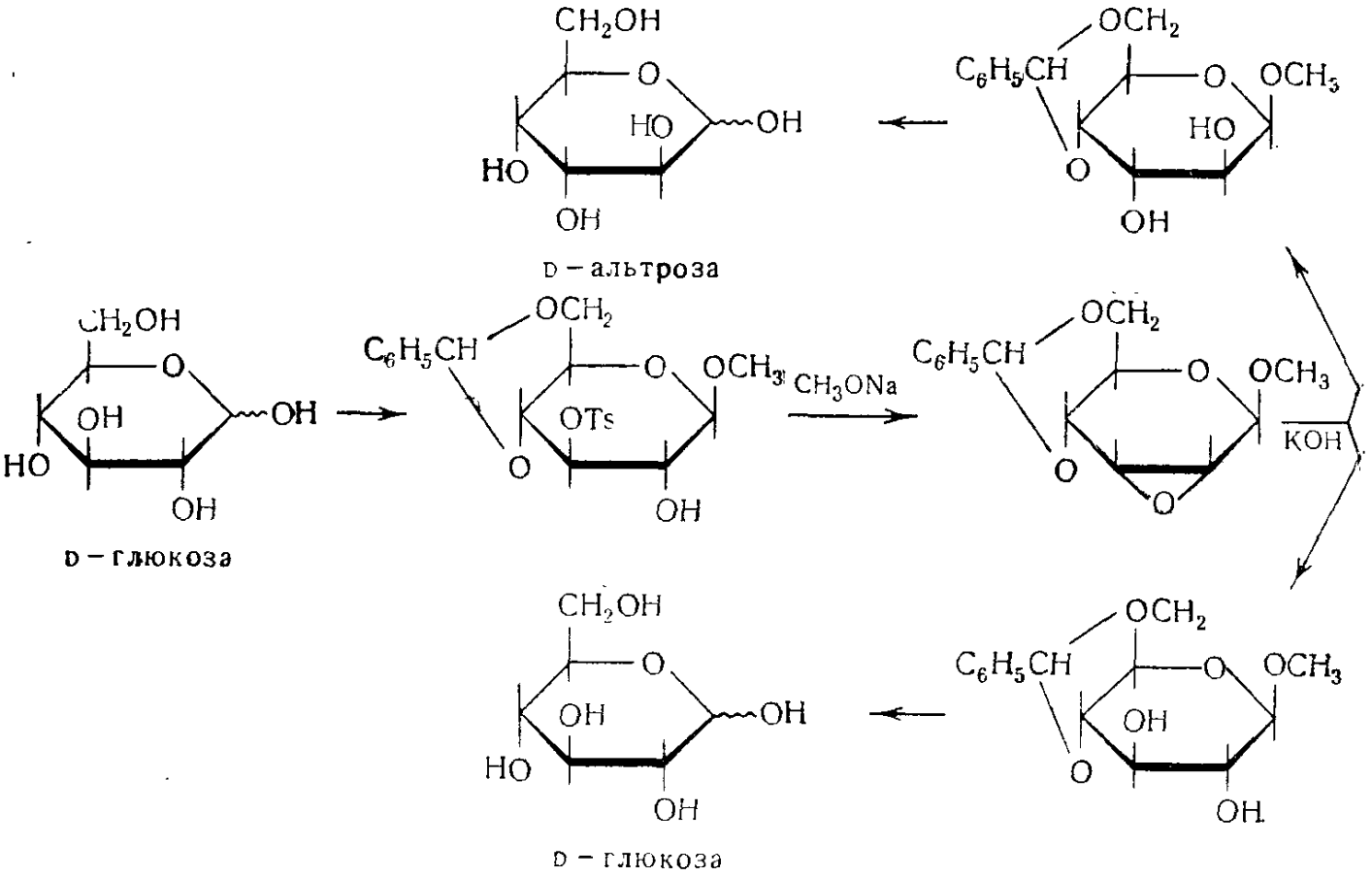
Как видно из примеров, замыкание кольца окиси может происходить как при взаимодействии с соседними углеродными атомами, когда образуется α-окись, так и с более удаленными. Таким образом, этот метод синтеза ангидросахаров имеет широкое применение. Существенно, что окисное кольцо замыкается всегда с обращением конфигурации у атома углерода, несущего тозильную группу. Если это условие не может быть соблюдено, окисное кольцо не замыкается, как, например, у 4-тозилата галактозы, не имеющего соседних гидроксильных групп в транс-положении к тозильной группировке.



$\xrightarrow{CH_3ONa}$ Не реагирует (в жестких условиях регенерируется галактоза)

У получающихся ангидросахаров, особенно у тех из них, которые имеют α-окисное кольцо, легко раскрывается окисный цикл. Эта реакция идет с обращением конфигурации у одного из С-атомов окисного кольца, причем часто не у того, у которого происходило обращение при замыкании окисного цикла. Последнее обстоятельство дает возможность применить эту последовательность реакций (тозилат→α-окись→продукт раскрытия кольца α-окиси) для обращения конфигурации сразу у двух соседних углеродных атомов моносахарида, т. е. для перехода от одного

моносахарида к другому. Существенный недостаток этого метода заключается в том, что α-окисные циклы раскрываются неоднозначно; в большинстве случаев это приводит к образованию смеси двух моносахаридов, разделение которых иногда оказывается весьма затруднительным. В качестве примера можно привести давно известный переход от глюкозы к альтрозе.



Эфиры неорганических кислот

Из эфиров неорганических кислот в ряду углеводов по разным причинам имеют значение эфиры азотной, серной и фосфорной кислот.

Эфиры азотной кислоты. Нитраты углеводов имеют большое практическое значение как взрывчатые вещества; нитраты полисахаридов, особенно нитраты целлюлозы, служат основой бездымных порохов.

Нитраты получаются обычно непосредственным действием на углевод «нитрующей смеси», т. е. концентрированных серной и азотной кислот; их можно получать также действием одной азотной кислоты или окислов азота. В таких условиях этерифицируются все свободные гидроксильные группы, и получаются полные нитраты, которые и применяются в качестве взрывчатых веществ. При необходимости можно получить и неполные эфиры моносахаридов, если предварительно защитить соответствующие гидроксильные группы. Нитратная группа — ONO_2 легко может быть замещена другими группировками и по своему поведению напоминает тозильную группировку.

Однако широкого синтетического применения нитраты сахаров еще не получили.

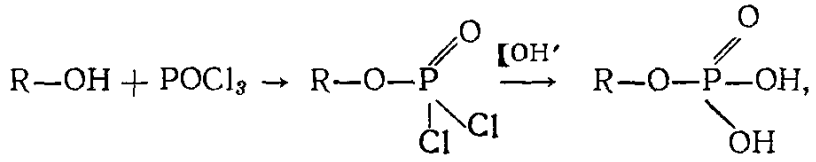
Эфиры серной кислоты. Сульфаты углеводов не получили пока какого-либо существенного практического применения, однако, они встречаются в природе и, несомненно, имеют биологическое значение. Важнейший природный антикоагулянт крови — полисахарид гепарин — содержит на каждое звено моносахарида по две —SO_3H группы, которые этерифицируют гидроксильные группы моносахаридов или входят

в состав сульфаминогрупп —$NHSO_3H$. Большое количество эфиров серной кислоты содержится также в полисахаридах морских водорослей. Синтетическое получение сернокислых эфиров сахаров мало исследовано; обычно их получают прямым действием серной кислоты на углевод.

Эфиры фосфорной кислоты. Фосфаты сахаров имеют исключительно важное биологическое значение. Многие фосфаты являются продуктами обмена углеводов в животном и растительном организме.

Так, хорошо известно, например, что распад углеводов в животном организме (гликолиз) протекает через сложную последовательность реакций, в которой промежуточное образование фосфорных эфиров и их превращения играют центральную роль. Далее, некоторые фосфаты сахаров входят в ферментные системы. Наконец, едва ли не самыми важными природными продуктами исключительного биологического значения, представляющими собою сложные эфиры углевода, являются нуклеиновые кислоты, роль которых в биосинтезе белка и передаче наследственных признаков общеизвестна.

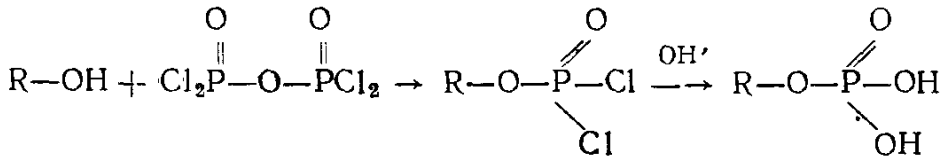
В настоящее время разработано довольно значительное число методов введения остатка фосфорной кислоты в молекулу моносахарида (так называемые методы фосфорилирования). Наиболее старым, но наименее удовлетворительным методом является получение фосфорных эфиров прямым действием хлорокиси фосфора на углевод с последующим гидролизом получающегося хлорангидрида — эфира:



где R — остаток углевода.

Реакцию обычно проводят в пиридине, который является и растворителем, и средством, связывающим хлористый водород. Она протекает со значительными осложнениями, главными из которых является образование ди- и три-эфиров $(RO)_2P(O)Cl$ и $(RO)_3P{=}O$.

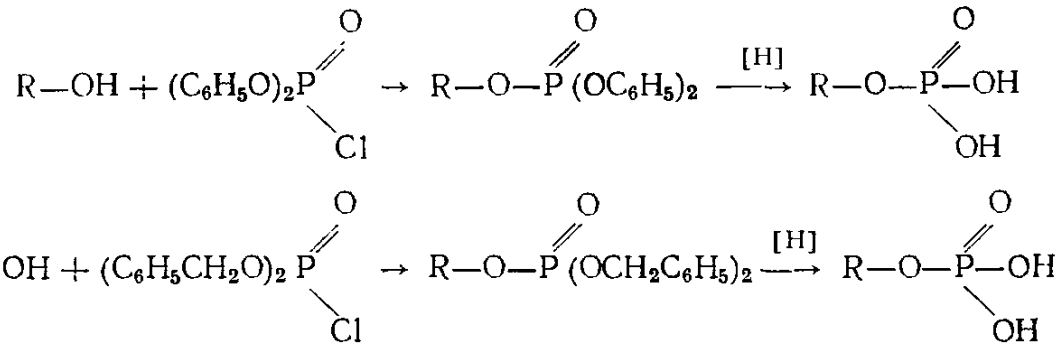
Их образования даже при использовании большого избытка углевода избежать не удается, и поэтому выход целевого продукта очень незначителен, а выделение его весьма трудно. Только что появилось сообщение об очень близкой по характеру реакции, представляющей, по-видимому, существенный интерес. Вместо хлорокиси фосфора в качестве фосфорилирующего агента был применен хлорангидрид пирофосфорной кислоты.



По сообщению авторов, даже при фосфорилировании сложного объекта — нуклеотидов — выходы фосфатов достигают 65—85%. Недостаток экспериментального материала не позволяет еще окончательно оценить значение этого метода.

Наиболее широко используется в настоящее время метод получения фосфатов, который основан на фосфорилировании хлорангидридами

дизамещенных фосфорных кислот с последующим удалением замещающих радикалов гидрогенолизом. Наиболее часто применяются для этой цели хлорангидрид дифенилфосфорной кислоты $(C_6H_5O)_2P(O)Cl$ и хлорангидрид дибензилфосфорной кислоты $(C_6H_5CH_2O)_2P(O)Cl$, предложенный и широко использованный в области нуклеотидов А. Тоддом.

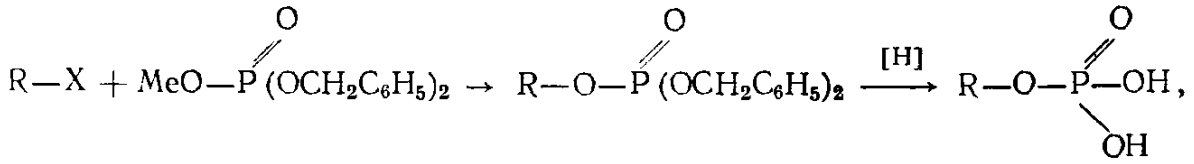


Несмотря на добавление одной стадии реакции и меньшую доступность исходного материала, этот метод имеет серьезные преимущества перед фосфорилированием хлорокисью, так как образование ди- и тризамещенных эфиров в данном случае исключается.

Фенильные и бензильные группы могут быть удалены гидрированием над платиной или над палладием в достаточно мягких условиях в нейтральной среде, причем снятие бензильного радикала достигается легче.

Оба приведенных метода фосфорилирования пригодны для введения остатка фосфорной кислоты в любую гидроксильную группу в молекуле сахара.

Для получения 1-фосфатов углеводов, т. е. углеводов, фосфорилированных по гликозидному гидроксилу, применяется, хотя и довольно редко, обратный метод, а именно, взаимодействие ацилгликозилгалогенидов с солями фосфорной кислоты.



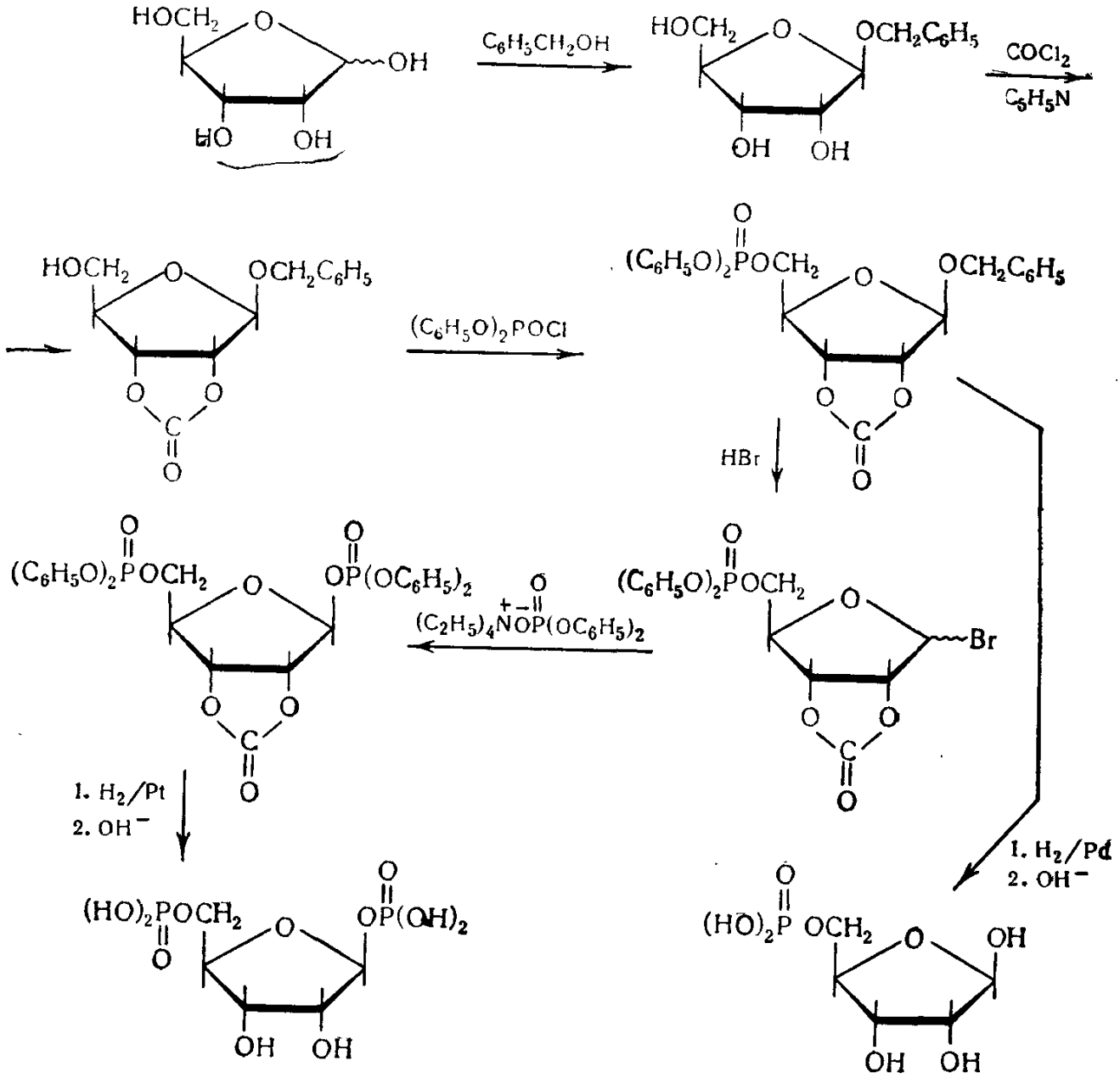
где R — остаток углевода.

Другие возможности получения фосфатов сахаров не использованы для разработки настоящих синтетических методов; это относится, например, к раскрытию окисного кольца ангидросахаров солями фосфорной кислоты.

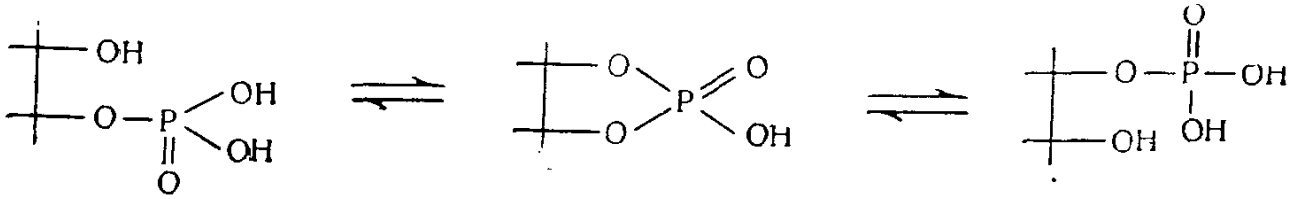
Некоторые специфические методы фосфорилирования, широко применяющиеся при работе с нуклеотидами, например, фосфорилирование смешанными ангидридами фосфорной и фосфористой кислот, будут рассмотрены в соответствующем месте книги.

Естественно, что для получения фосфата сахара заданного строения все гидроксильные группы в молекуле, кроме гидроксила, подлежащего фосфорилированию, должны быть подходящим образом защищены группировками, которые можно затем удалить в условиях, исключающих гидролиз фосфорноэфирной связи.

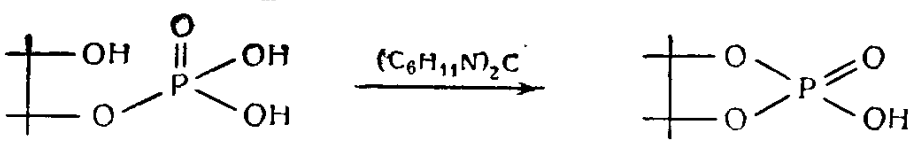
В качестве примера использования двух вариантов фосфорилирования можно привести синтез 5-фосфата и 1,5-дифосфата рибозы, осуществленный Хораной.



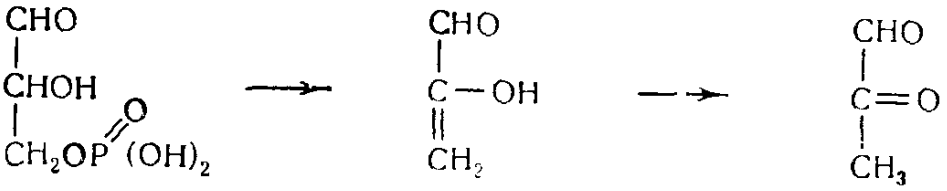
Одним из характерных свойств фосфорнокислых эфиров является склонность к легкой миграции в них фосфорильной группировки к соседней свободной гидроксильной группе, особенно в кислой среде. Этот обмен легко происходит в том случае, когда соседние гидроксилы находятся в цис-положении, и, как было доказано, протекает через образование промежуточного циклического эфира.



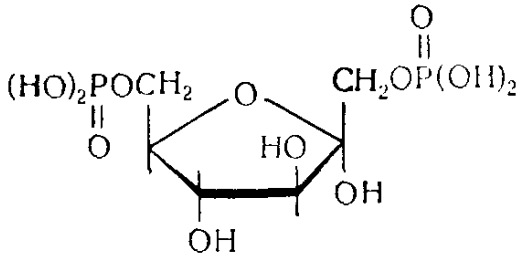
Промежуточный циклический фосфат может быть выделен из реакционной смеси при проведении реакции в подходящих условиях. Наилучшим синтетическим методом получения циклических фосфатов является взаимодействие монофосфатов с дициклогексилкарбодиимидом:



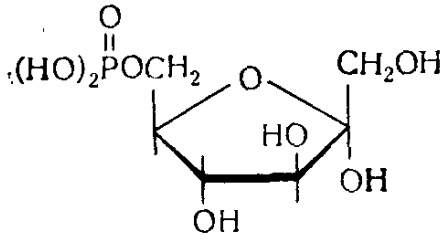
Гидролиз фосфорных эфиров углеводов протекает с различной легкостью в зависимости от характера исходного эфира, т. е. от строения, конфигурации и конформации молекулы сахара и местоположения в ней фосфорильного остатка. В некоторых случаях, как, например, при получении фосфата глицеринового альдегида, содержащего фосфор в β-положении к альдегидной группе, гидролиз эфира идет по типу элиминации и дает аномальный результат.



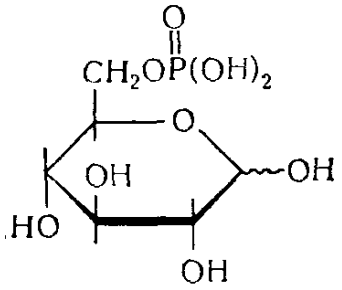
Как уже упоминалось, многие фосфаты моносахаридов имеют важное биологическое значение, участвуя в качестве промежуточных продуктов в процессе гликолиза. Наибольший интерес в этом отношении представляют:



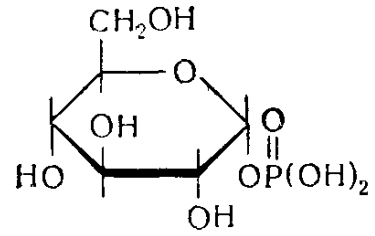
1,6-дифосфат D-фруктофуранозы или эфир Гардена — Янга;



6-фосфат D-фруктофуранозы или эфир Нейберга;

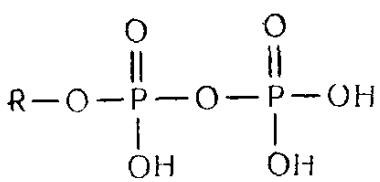


6-фосфат D-глюкопиранозы или эфир Робинсона;

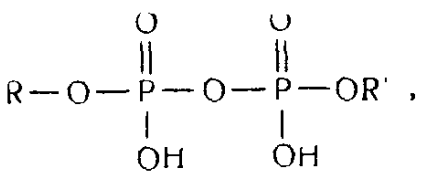


1-фосфат D-глюкопиранозы или эфир Кори

В заключение следует упомянуть, что весьма важное значение имеют также пирофосфаты сахаров типа



и



где R — остаток сахара, а R′ — обычно остаток нуклеозида; и тот, и другой тип пирофосфатов выполняет важные функции в различных

процессах обмена, в частности, в процессах трансфосфорилирования и энергетического обмена. Этот тип соединений будет подробнее рассмотрен в разделе о нуклеотидах.

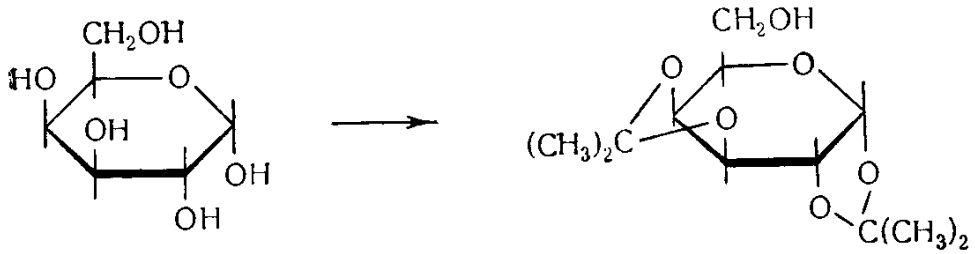
ПРОДУКТЫ КОНДЕНСАЦИИ МОНОСАХАРИДОВ С АЛЬДЕГИДАМИ И КЕТОНАМИ

(АЦЕТАЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ МОНОСАХАРИДОВ)

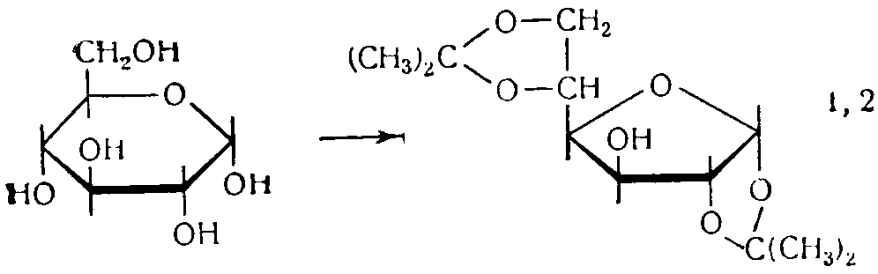
Будучи многоатомными спиртами, углеводы образуют циклические ацетали с соединениями, содержащими карбонильную группу. Наибольшее значение приобрели продукты конденсации моносахаридов с ацетоном (изопропилиденовые производные); из продуктов конденсации с альдегидами наиболее интересны бензилиденовые производные, полученные конденсацией с бензальдегидом.

Изопропилиденовые производные

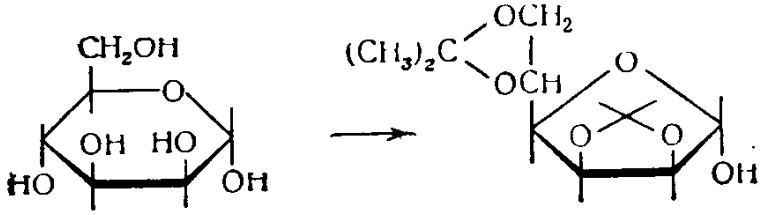
Продукты конденсации моносахаридов с ацетоном имеют очень большое значение в синтетической химии сахаров. Они легко получаются в обычных условиях образования ацеталей, т. е. при взаимодействии моносахарида с ацетоном в присутствии кислых катализаторов — небольших количеств серной или соляной кислоты, а также в присутствии безводной сернокислой меди или хлористого цинка. Чаще всего употребляется безводный хлористый цинк, который в большинстве случаев дает наилучшие результаты. Обычно в реакцию с ацетоном вступают две соседних гидроксильных группы, находящиеся в цис-положении, причем в тех случаях, когда это возможно, образуется *бис*-изопропилиденовое производное, например:



Если имеется только одна цис-α-гликольная группировка, или она вообще отсутствует, в молекуле моносахарида может произойти перегруппировка, в результате которой образуется изопропилиденовое производное, отличающееся по своей циклической структуре от исходного свободного моносахарида. Это имеет, например, место для глюкозы и маннозы, продукты конденсации которых с ацетоном относятся к фуранозному типу:

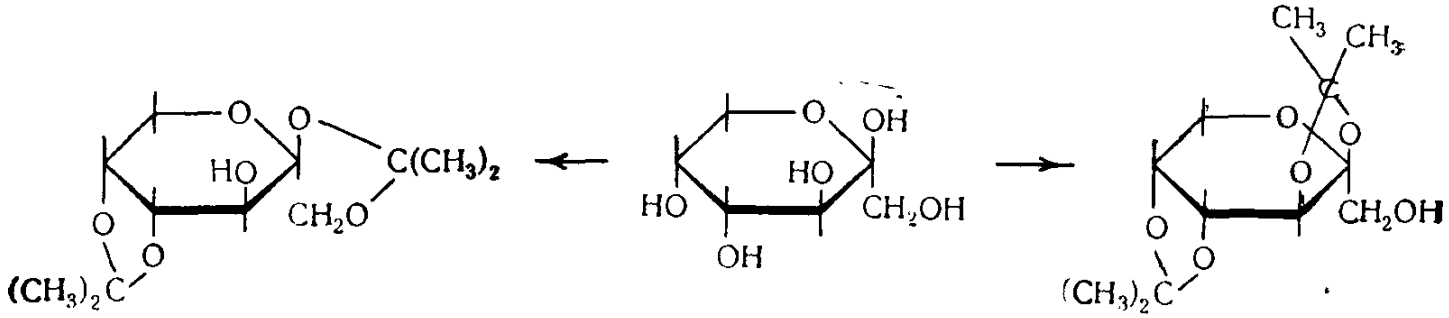


1, 2 : 5, 6 – диизопропилиден – D – – глюкофураноза



2, 3 : 5, 6 – диизопропилиден – D – – маннофураноза

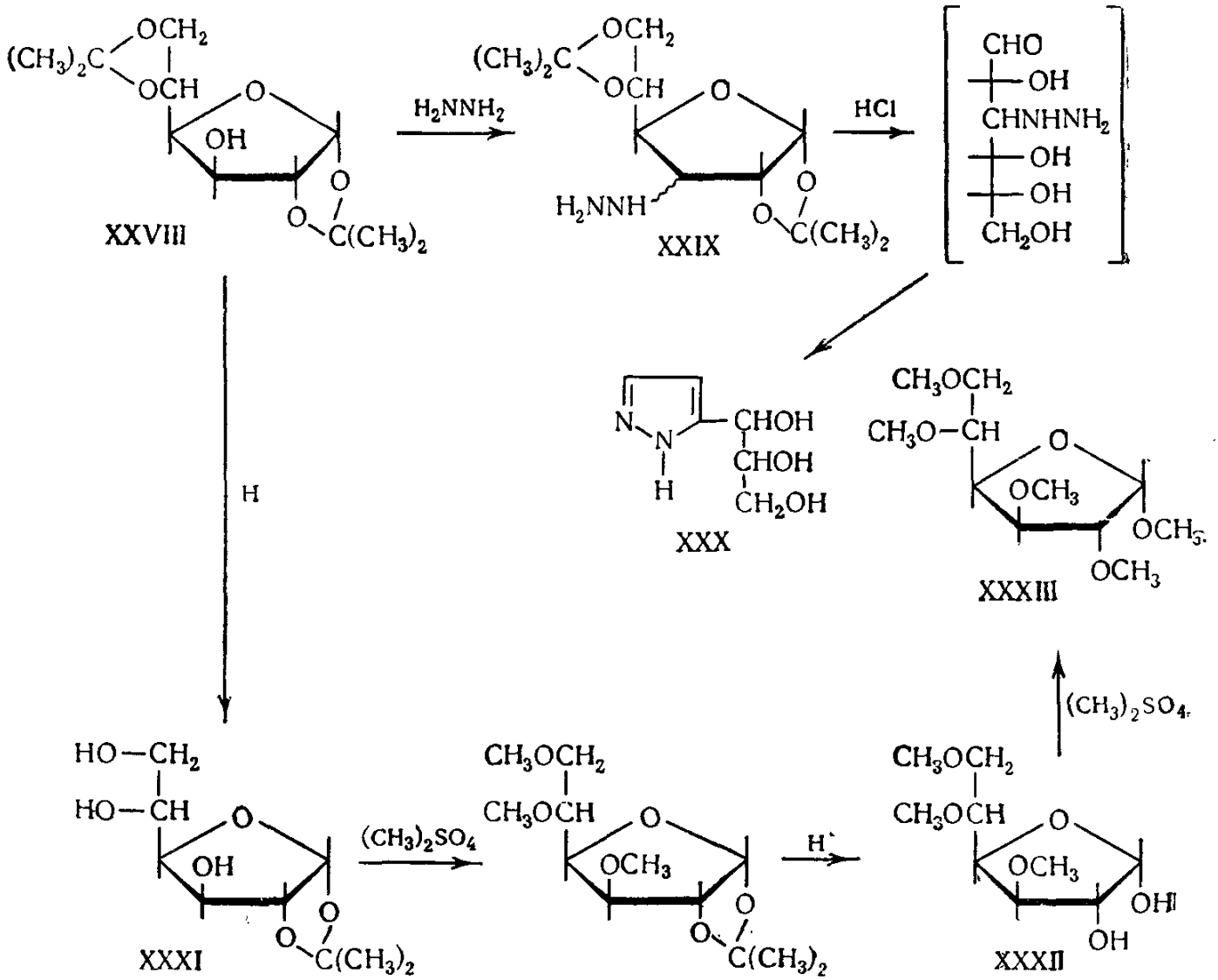
Когда в молекуле исходного моносахарида имеется более двух цис-α-гликольных группировок, иногда может образоваться смесь нескольких изопропилиденовых производных, например, для фруктозы



1,2 : 4,5 – диизопропилиден-D-фруктопираноза

2,3 : 4,5 – диизопропилиден-D-фруктопираноза

Уже из приведенных примеров видно, что получение изопропилиденовых производных не может служить для доказательства структуры моносахарида или наличия каких-либо структурных элементов в его молекуле, вследствие перегруппировок, которые при этом могут произойти. Более того, строение получающихся изопропилиденовых производных само нуждается в каждом отдельном случае в строгих доказательствах, которые иногда представляют значительные трудности. В качестве примера можно привести доказательство строения 1,2 : 5,6-диизопропилиден-D-глюкофуранозы.



При нагревании диизопропилиденглюкозы (XXXVIII) с гидразингидратом в реакцию вступает единственный свободный гидроксил. и получающиеся гидразинопроизводное (XXIX) после обработки концентрированной кислотой дает 5-глицерилпиразол (XXX). Замыкание пиразольного цикла возможно только в том случае, если гидразинная группировка находится в положении 3. Таким образом, это доказывает, что в диизопропилиденглюкозе (XXVIII) свободной является гидроксильная группа у $C_{(3)}$. При частичном гидролизе (XXXVIII) отщепляется лишь одна изопропилиденовая группа, и образуется моноизопропилиденглюкоза (XXXI); при метилировании ее и последующем гидролизе образуется 3,5,6-триметилглюкоза (XXXII), а при полном метилировании продукта гидролиза — 2,3,5,6-триметилглюкофуранозид (XXXIII). Образование (XXXII) доказывает, что одна из изопропилиденовых групп занимает положение 5,6; образование (XXXIII) доказывает для (XXVIII) фуранозную структуру и положение 1,2 для второй изопропилиденовой группы, чем и выясняется полностью вся структура диизопропилиденглюкозы.

Изопропилиденовая группировка, подобно любой ацетальной группировке, неустойчива в кислой среде, и поэтому снятие ее легко осуществляется действием разбавленных водных кислот. Обычно изопропилиденовая группа, связанная с гликозидным С-атомом, устойчивее изопропилиденовой группировки, образованной только спиртовыми гидроксилами, поэтому при должном подборе условий иногда удается осуществить частичный гидролиз и получить моноизопропилиденовые производные моносахаридов, примером чему может служить переход (XXVIII) в (XXXI).

Легкость образования изопропилиденовых производных и простота удаления изопропилиденовых группировок с регенерацией исходного моносахарида делает продукты конденсации моносахаридов с ацетоном излюбленными промежуточными веществами в синтетической химии сахаров, в тех случаях, когда требуется временная защита гидроксильных групп.

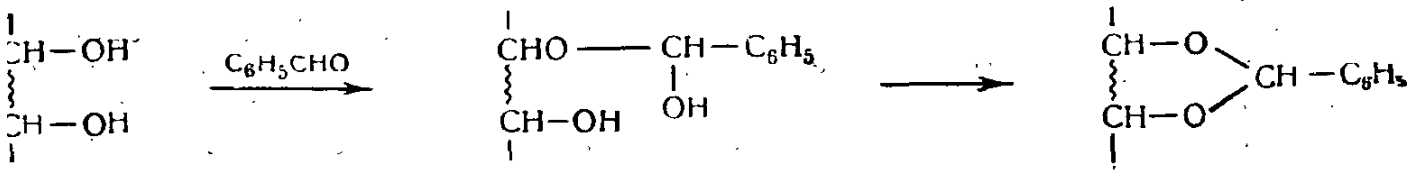
Однако при этом нужно всегда иметь в виду, что каждый новый представитель этого класса в ряду моносахаридов требует очень тщательного доказательства структуры, без чего работа с ним может привести к неверным выводам.

Бензилиденовые производные

Из других ацетальных производных моносахаридов большое значение имеют продукты конденсации углеводов с бензальдегидом, называемые бензилиденовыми производными. В отличие от изопропилиденовых производных, которые, как правило, являются производными диоксолана и содержат пятичленную циклическую систему, бензилиденовые производные обычно являются производными мета-диоксана и содержат шестичленную циклическую ацетальную группировку, образовавшуюся взаимодействием бензальдегида с β-гликольной системой. Однако это отнюдь нельзя считать общим правилом, так, как хорошо известны случаи образования бензилиденовых производных с пятичленным циклом (взаимодействие с α-гликольной системой) и с семичленным циклом (взаимодействие с γ-гликольной системой).

Бензилиденовые производные получаются нагреванием моносахарида с бензальдегидом в присутствии кислого катализатора, чаще всего в присутствии хлористого цинка.

Обычно принимают, что циклический ацеталь образуется в две стадии по следующему механизму:



Достаточно однозначные доказательства такого механизма для данного случая, по-видимому, отсутствуют, хотя образование ацеталей через предварительное образование полуацеталя является достаточно обоснованным.

Сложным и еще далеким от разрешения является вопрос о сравнительной легкости образования бензилиденового производного в зависимости от взаимного положения гидроксилов в углеводе, т. е., другими словами, вопрос о том, какого типа бензилиденовое производное образуется, если имеются несколько возможностей замыкания циклического ацеталя вследствие присутствия нескольких гидроксильных групп в моносахариде. На основании имеющегося, правда, не слишком обширного, материала обычно считают, что по своей сравнительной реакционной способности в этом случае гликольные группировки могут быть расположены в следующий ряд: цис-β-гликоль > транс-β-гликоль > цис-α-гликоль > γ-гликоль. Однако эта закономерность никак не может считаться строгой и в каждом отдельном случае структура бензилиденового производного нуждается в точном доказательстве, причем в данном случае вопрос еще более запутан, чем для изопропилиденовых производных.

Бензилиденовые производные широко применяются в синтетической химии сахаров в тех случаях, когда требуется временная защита гидроксильных групп. Для снятия бензилиденовой группировки, помимо обычного для ацеталей кислого гидролиза, может быть применено также каталитическое гидрирование над палладием или над платиной, поскольку гидрогенолиз этой группировки проходит еще легче, чем гидрогенолиз бензильного радикала. Последний способ снятия бензилиденовой защиты представляет особый интерес, так как он не требует воздействия даже слабых кислот и проводится в строго нейтральных уловиях.

Продукты конденсации моносахаридов с другими альдегидами

Соединение этого типа не получили пока серьезного применения и сведения о них очень скудны. Лучше других известны продукты конденсации моносахаридов с формальдегидом; эта конденсация приводит обычно к производным мета-диоксанового типа, так как в реакцию легче вступает β-гликольная группировка. По-видимому, изучение продуктов конденсации моносахаридов с формальдегидом может оказаться достаточно интересным для применения в синтетической химии.

Известны также продукты конденсации сахаров с ацетальдегидом, которые часто получаются и при взаимодействии углевода с ацетиленом в присутствии серной кислоты. Соединения этого типа очень редки, а закономерности образования структуры получающихся веществ не изучены.

ГЛИКОЗИДЫ

Гликозиды, т. е. продукты замещения водорода гликозидного гидроксила на какой-либо простой или сложный радикал, являются наиболее важными производными углеводов. Гликозиды очень широко распространены в природе; большинство растительных пигментов, физиологически активные вещества, многие алкалоиды встречаются в виде

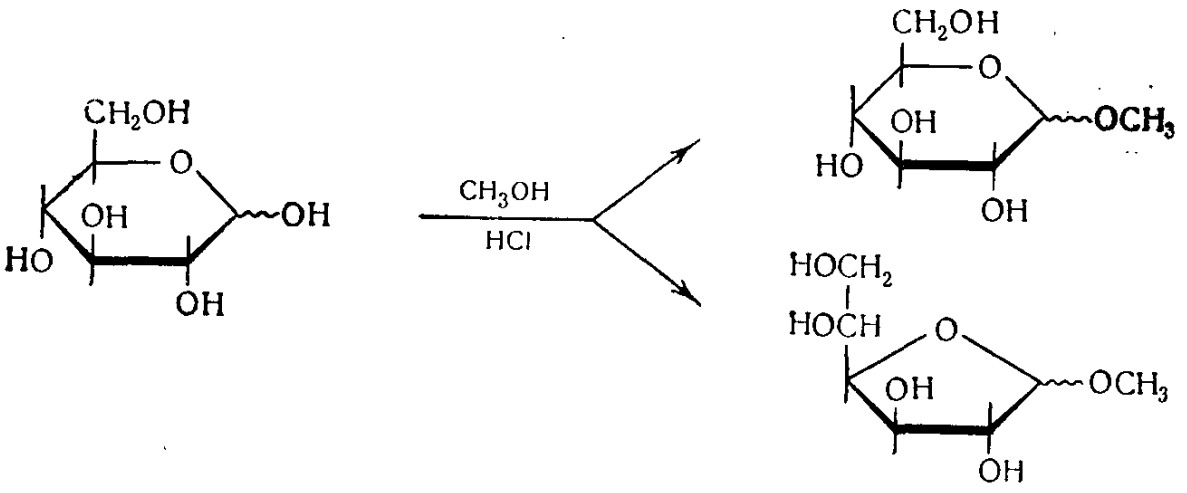
гликозидов; наконец, полисахариды, составляющие главный тип природных углеводов, представляют собою полимеры гликозидного типа.

Спирт, радикал которого замещает в гликозиде водород гликозидного гидроксила, обычно называют агликоном. Гликозиды являются по существу полными ацеталями альдегидной формы моносахарида, в которых одним из радикалов ацетальной группы является радикал агликона, а роль второго радикала играет сама молекула моносахарида. Это находит свое отражение как в методах синтеза, так и в свойствах гликозидов.

Методы синтеза гликозидов

Существует несколько методов синтеза гликозидов, из которых следует применять те или другие в зависимости от характера получаемого гликозида.

1. Метод Фишера является простейшим из известных и состоит во взаимодействии моносахарида с соответствующим спиртом в присутствии небольших количеств хлористого водорода. Этот метод является простым перенесением обычного метода ацетализации альдегидов на моносахариды и пригоден только для получения простейших гликозидов. Поскольку при реакции в растворе находится свободный моносахарид, представляющий собою равновесную таутомерную смесь различных циклических форм, каждая из которых, реагируя со спиртами, может дать соответствующий гликозид, при синтезе Фишера в обычных условиях получается смесь гликозидов с фуранозной (фуранозиды) и пиранозной (пиранозиды) структурой, например:

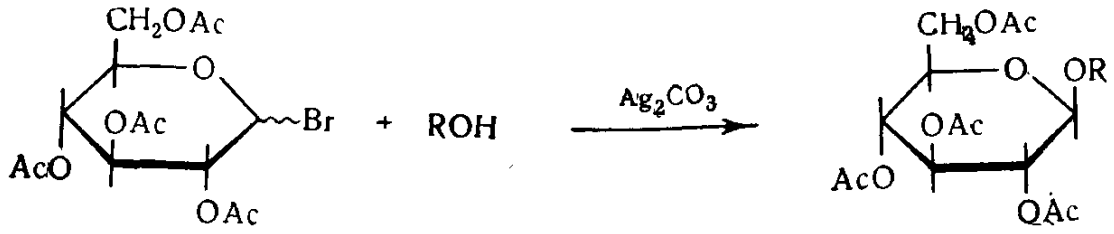


Как будет разобрано ниже, из двух изомерных гликозидов пиранозиды более устойчивы, но образуются медленнее; напротив, фуранозиды образуются значительно быстрее, но менее устойчивы. Если учитывать это обстоятельство, можно, подобрав соответствующим образом условия реакции, добиться получения пиранозидов или фуранозидов. Так, если проводить реакцию, применяя более концентрированный раствор хлористого водорода (4%-ный) и повышенную температуру (70°), то образуется пиранозид; напротив, при проведении реакции при комнатной температуре в 0,7%-ном растворе хлористого водорода образуется преимущественно фуранозид.

Практически метод Фишера применяется только для получения простейших пиранозидов, причем большинство моносахаридов преимущественно дают более устойчивые β-изомеры, имеющие тяжелый радикал агликона в экваториальном положении.

2. Метод Кенигса—Кнорра в силу универсальности и однозначности получаемых результатов является наиболее важным и часто используемым методом получения гликозидов. Он состоит во

взаимодействии ацилгликозилгалогенида с соответствующим гидроксилсодержащим соединением (в том числе и с простейшими спиртами) в присутствии карбоната серебра, реже в присутствии окиси серебра, например,



Из ацилгликозилгалогенидов используются чаще всего наиболее доступные и реакционноспособные ацетилбромиды, хлориды реагируют более вяло и применяются реже. В последнее время иногда предпочитают заменять ацетилбромиды более устойчивыми и легко очищаемыми бензоилбромидами.

Частным, но важным случаем синтеза Кенигса — Кнорра является синтез гликозидов фенолов по Михаэлису, состоящий во взаимодействии гликозилгалогенида с фенолятом калия в ацетоне. Этот метод, открытый в 1878 г., был первым методом получения гликозидов.

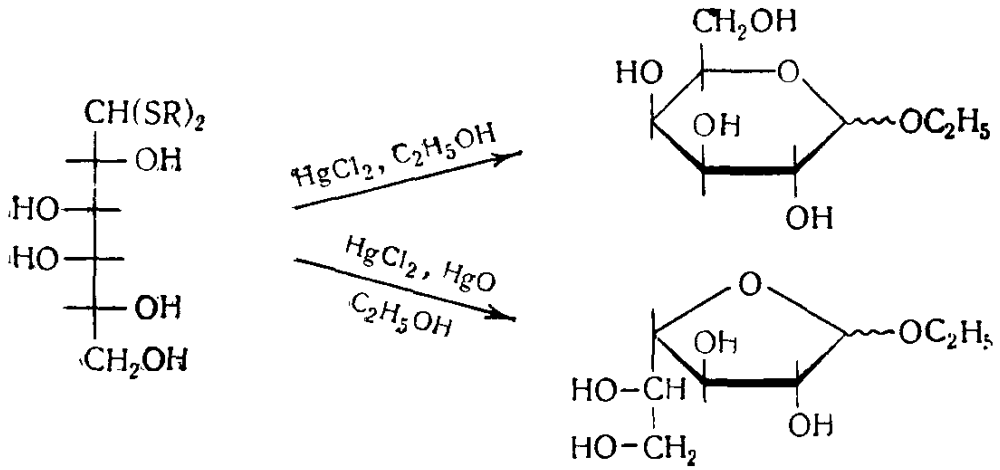
Весьма важным является вопрос о стереохимическом ходе реакции Кенигса—Кнорра. Как указывалось ранее при рассмотрении реакционной способности ацилгликозилгалогенидов (ст. 71), решающим для стереохимического итога реакции является влияние конфигурации у атома $C_{(2)}$, соседнего с гликозидным углеродным атомом. Если учесть все сказанное ранее, то становится ясным, что при синтезе Кенигса-Кнорра обычно получаются лишь гликозиды с транс-конфигурацией у $C_{(1)}$—$C_{(2)}$ -атомов. Действительно, если исходным веществом служил ацилгалогенид с цис-расположением у $C_{(1)}$— $C_{(2)}$, то гликозидация идет без участия ацетоксигруппы у $C_{(2)}$, сопровождается обращением конфигурации у $C_{(1)}$ и дает гликозид с транс-конфигурацией у $C_{(1)}$ — $C_{(2)}$. Если атом галоида в ацилгалогениде находится в транс-положении к ацетоксигруппе у $C_{(2)}$, последняя принимает участие в реакции, которая проходит через циклический карбониевый ион, сопровождается двойным обращением у $C_{(1)}$ и приводит также к гликозиду с транс-конфигурацией у $C_{(1)}$ — $C_{(2)}$. Кроме того, в этом случае возможно также образование и орто-эфира. Данные о том, что проведение реакции в присутствии ртутных солей дает гликозиды с цис-конфигурацией у $C_{(1)}$ — $C_{(2)}$, если и справедливы, то, вероятно, только для очень ограниченного числа частных случаев.

Ацилоксигруппа, находящаяся у гликозидного атома в полных ацилатах моносахаридов, также способна к обмену в присутствии кислых катализаторов, таких, как хлористый цинк или *п*-толуолсульфокислота. Эта реакция, которая может применяться, например, для получения гликозидов фенолов, не находит, однако, широкого применения. Метод Кенигса — Кнорра, как указывалось, является универсальным методом синтеза гликозидов и почти единственным методом получения гликозидов со сложным агликоном. Его значительное преимущество заключается во вполне определенной структуре углеводной части будущего гликозида, которая обусловливается строением исходного ацилгликозилгалогенида. Так, в частности, он может быть применен и для получения более трудно доступных фуранозидов, при этом для создания исходного ацилгликозилгалогенида фуранозной структуры используют в качестве защищающих ацильных групп циклические карбонаты.

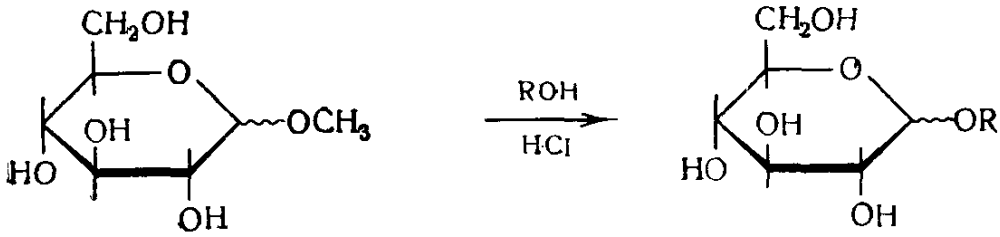
Главный недостаток этого метода, как и всех других методов синтеза гликозидов, сводится к невозможности управлять стереохимическим ходом реакции и получать по желанию α- или β-гликозиды независимо от конфигурации исходного моносахарида, в частности, независимо от конфигурации у $C_{(2)}$.

3. Другие химические методы синтеза гликозидов по своему значению уступают методу Кенигса — Кнорра. Так, гликозиды могут быть получены в условиях алкилирования углеводов (см. выше) при использовании одного моля алкилирующего средства, так как гликозидный гидроксил алкилируется быстрее, чем спиртовые гидроксильные группы сахара. Однако этот способ не находит практического применения.

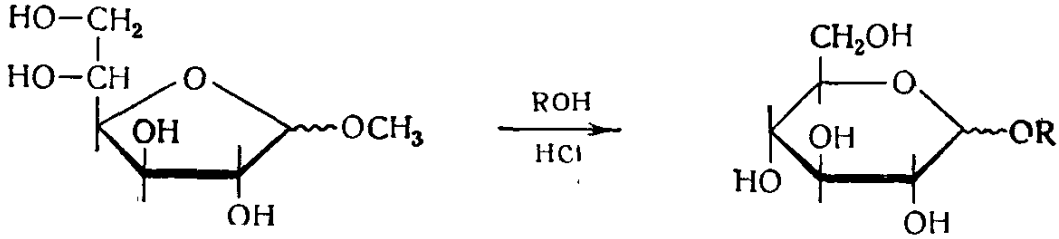
Интересны такие недостаточно удобные с препаративной точки зрения методы получения гликозидов, как синтез их из тиоацеталей моносахаридов при обработке их спиртами в присутствии солей ртути. Эту реакцию можно направить по желанию как в сторону образования пиранозида, так и в сторону образования фуранозида, и в этом ее особый интерес. Нагревание со спиртом в присутствии сулемы дает пиранозид; однако, если к реакционной смеси добавить окись ртути, то в этом случае образуется фуранозид, например:



В некоторых случаях гликозиды получают обменной реакцией простейших гликозидов с требуемым агликоном. Такая реакция носит название перегликозидации или трансгликозидации. Ее можно осуществить, обрабатывая простейший гликозид соответствующим гидроксильным производным в присутствии сухого хлористого водорода



При проведении этой реакции с фуранозидами она сопровождается изомеризацией кольца и переходом фуранозида в более устойчивый пиранозид.



4. Ферментативный синтез. Специфические ферменты, содержащиеся обычно в растениях, являются катализаторами обратимой реакции

$$\text{углевод} + \text{ROH} \rightleftarrows \text{гликозид},$$

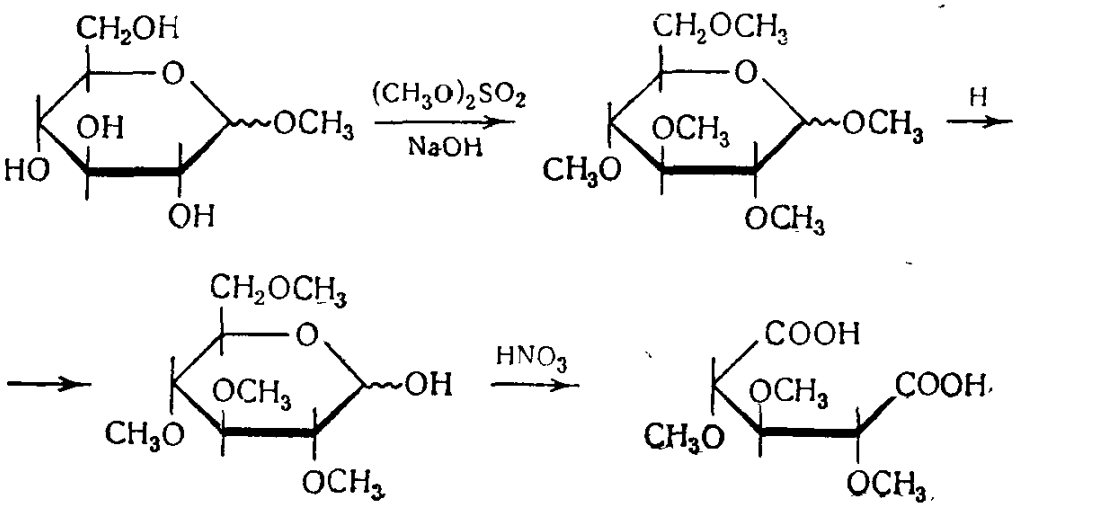
и могут применяться как для гидролитического распада гликозидов, так и для их синтеза. Для этого углевод вместе с соответствующим гидроксилсодержащим соединением подвергают воздействию фермента. Важным преимуществом ферментативного синтеза является его строгая стереоспецифичность. Так, например, эмульсин — фермент горького миндаля — дает всегда β-гликозиды, дрожжевая гликозидаза — только α-гликозиды. Ферментативный метод позволяет весьма просто решить очень сложный в препаративном отношении вопрос о стереохимической направленности реакции образования гликозидов. Недостатком ферментативного метода является высокая термолабильность ферментов, чем вызывается необходимость проведения работы в строго определенных условиях.

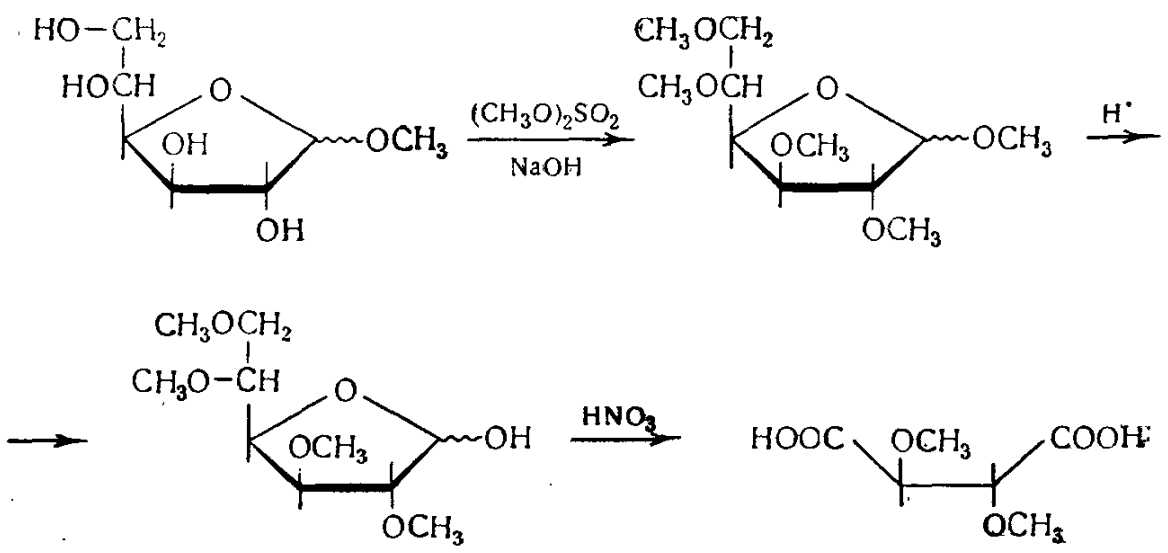
Установление строения гликозидов

При установлении строения гликозида в том случае, если строение исходного моносахарида известно, необходимо решить вопрос о размере окисного кольца и о конфигурации гликозидного центра.

Размер окисного кольца устанавливается методом метилирования и окислением иодной кислотой, которые подробно описаны при рассмотрении вопроса о строении углеводов.

Сущность этого метода (метод Хеуорзса) ясна из приведенной схемы метилирования глюкопиранозида и глюкофуранозида

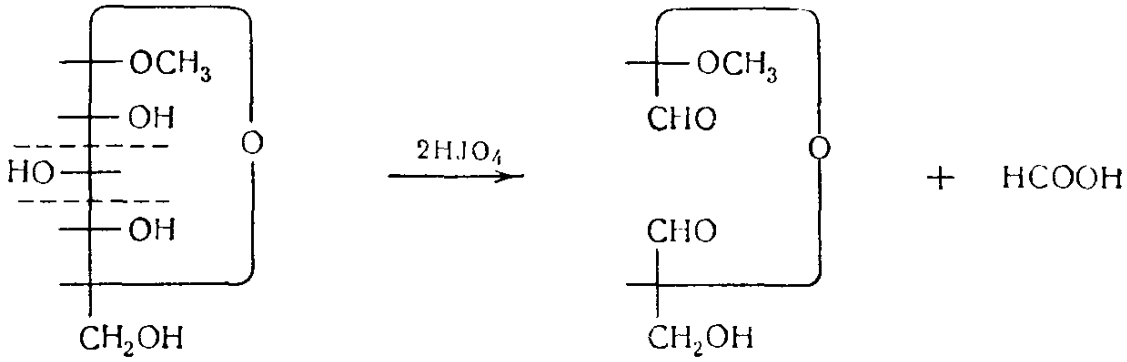


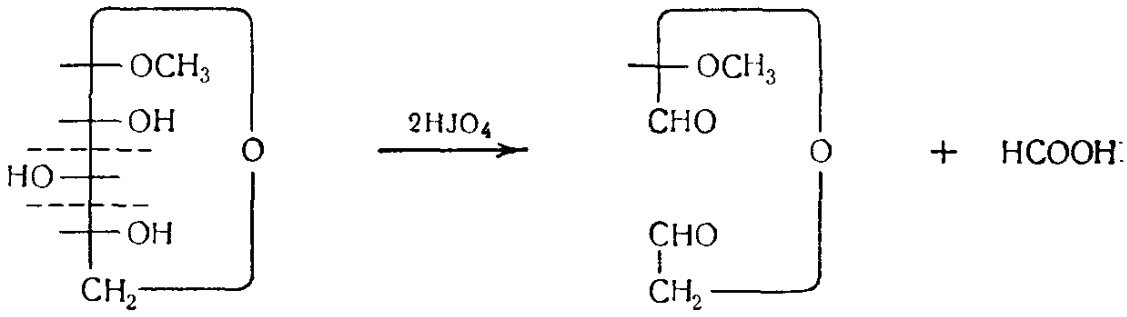


Установление строения продуктов окисления метилированных гликозидов дает возможность во всех случаях совершенно строго различать пиранозидную и фуранозидную структуру гликозида.

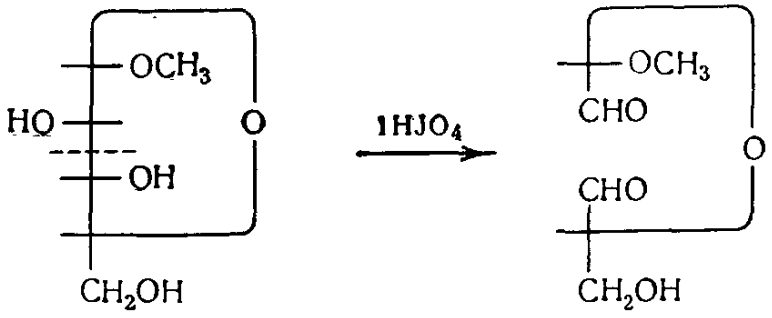
Более простым, хотя и не всегда строгим по получаемым результатам, является окисление периодатом; принципы этого метода рассмотрены выше (стр. 35—37).

Окисление пиранозидов гексоз и пентоз проходит без каких-либо осложнений, идет с поглощением двух молей HJO_4 и освобождением одного моля муравьиной кислоты и не сопровождается выделением формальдегида.





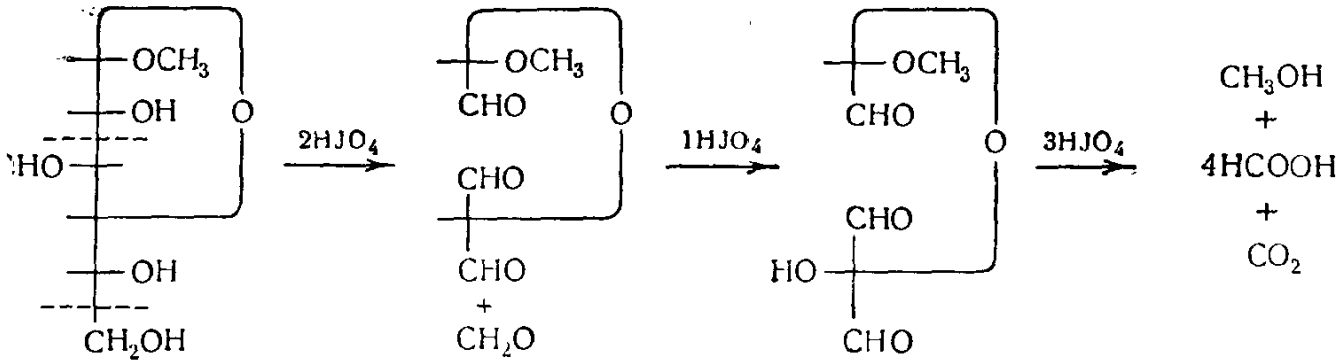
Также без осложнений происходит окисление пентофуранозидов, идущее с поглощением одного моля HJO_4 и без выделения муравьиной кислоты и формальдегида.



Напротив, окисление гексофуранозидов происходит гораздо сложнее, поскольку первоначальный продукт окисления, содержащий группировку малондиальдегида, может подвергаться дальнейшему окислению. Последнее приводит в конечном счете к поглощению 6 молей HJO_4 и полному распаду углевода с выделением спирта — агликона, четырех молей муравьиной кислоты, одного моля углекислоты и одного моля формальдегида (см. стр. 90).

Таким образом, зная структуру исходного углевода, по результатам окисления периодатом легко различить фуранозиды и пиранозиды.

Вместо иодной кислоты в качестве окислителя можно применять тетраацетат свинца, также разрывающий углерод-углеродную связь в α-гликольной группировке. Хотя окисление тетраацетатом свинца



проходит в более жестких условиях и с этой точки зрения менее удобно, однако при проведении полуколичественных кинетических измерений в результате окисления тетраацетатом свинца удается иногда различить цис- и транс-гликольные группировки, так как последние окисляются медленнее. Это обстоятельство может способствовать выяснению конфигурации углевода.

Вывод о конфигурации гликозидного центра, т. е. отнесение гликозида к α- или β-ряду, может быть сделан на основании измерения угла вращения гликозида, поскольку для D-ряда α-гликозид имеет всегда большее правое (или меньшее левое) вращение, чем β-гликозид. Для L-ряда справедлива обратная закономерность, т. е. β-аномеры имеют более сильное правое (или меньшее левое) вращение, чем α-аномеры.

Для более строгого определения конфигурации гликозидного центра можно воспользоваться окислением гликозида периоданом по Хэдсону — Джексону с последующим определением угла вращения образовавшегося в результате окисления диальдегида или полученной из него двухосновной кислоты, как это подробно описано ранее при выяснении стереохимии углеводов стр. 40). Если известно, к какому ряду, D-или L-, относится исходный углевод, то по величине вращения полученной при окислении двухосновной кислоты (стр. 40) легко отличить α-гликозид от β-гликозида.

Свойства гликозидов

Гликозиды простейших агликонов представляют собою бесцветные кристаллические вещества, легко растворимые в воде; по мере увеличения молекулярного веса агликонов их растворимость в воде быстро падает, например, алкилгликозиды агликонов, имеющих девять и более углеродных атомов, уже практически нерастворимы.

Усиление гидрофильных свойств агликона при превращении его в гликозид является весьма существенным обстоятельством, играющим большую роль в процессах жизнедеятельности животных и растительных организмов. В животном организме транспортировка и выделение многих продуктов обмена осуществляется путем превращения их в гликозиды, которые далее в растворенном состоянии перемещаются в нужном направлении. Большинство веществ растительного происхождения содержится в природных объектах в виде гликозидов, которые могут быть выделены в надлежащих условиях. Однако в ряде случаев при недостаточно осторожной обработке происходит гидролиз, и выделенное из растений вещество является уже агликоном.

Наиболее характерной особенностью гликозидов, определяющей их химическое поведение, является относительная легкость гидролитического разрыва гликозидной связи. Этот гидролиз легко происходит в кислой

среде, к щелочам же, как правило, гликозиды устойчивы. Исключение в этом отношении составляет лишь особая группа гликозидов, лабильных в щелочной среде, которые будут рассмотрены ниже.

Кислотный гидролиз гликозидов изучен достаточно подробно, и в настоящее время можно уже сделать некоторые заключения о тех структурных особенностях, которые оказывают влияние на устойчивость гликозидной связи. Как и следует ожидать, существенным фактором при этом является как структура агликона, так и строение самой углеводной части гликозида.

Что касается влияния структуры агликона, то эта сторона вопроса менее ясна, однако известно, что, например, алкилгликозиды устойчивее арилгликозидов, а гликозиды жирноароматического ряда занимают среднее положение; так, как гидролитической устойчивости глюкозидов была установлена следующая закономерность влияния характера агликона R:

$$C_2H_5 > CH_3 > CH_2C_6H_5 > C_6H_5,$$

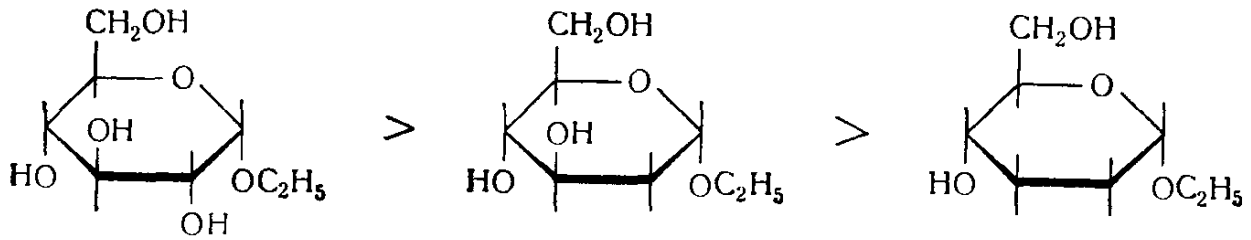
причем обычно α-гликозиды устойчивее β-гликозидов.

Вместе с тем более тонкие детали (например, влияние строения алкильного радикала на скорость гидролиза) не подвергались систематическому исследованию. Более подробно изучено влияние на скорость гидролиза структурных особенностей углеводной части гликозида.

Существенным фактором устойчивости являются размеры окисного кольца углеводной части. Так, фуранозиды гидролизуются со скоростью, в 50—200 раз превышающей скорость гидролиза пиранозидов. По-видимому, именно этим можно объяснить тот факт, что природные гликозиды в большинстве случаев имеют пиранозную структуру, и фуранозиды встречаются лишь в редких случаях. К этому нужно добавить, что и синтез фуранозидов представляет большие трудности по сравнению с синтезом пиранозидов, поэтому последние изучены гораздо лучше. В частности, вопрос об устойчивости к гидролизу подробно изучен только для пиранозидов.

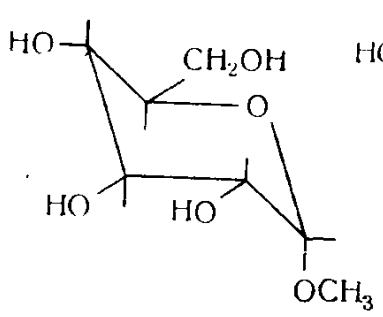
Известно, что гликозиды дезоксисахаров, т. е. углеводов, лишенных одной или нескольких гидроксильных групп, которые будут подробнее рассмотрены ниже, менее устойчивы к гидролизу. Точнее, устойчивость гликозидной связи уменьшается с уменьшением числа гидроксильных групп углеводной части.

Для иллюстрации этого положения можно привести следующий ряд устойчивости, выведенный при изучении кислого гидролиза этилгликозидов:

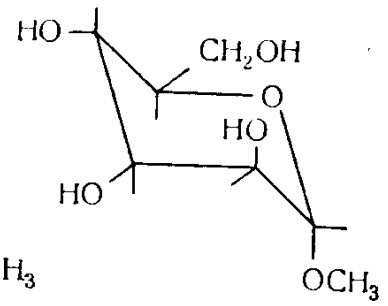


Эта интересная закономерность важна для понимания тех особенностей, которые имеют место при гидролизе некоторых природных гликозидов, содержащих дезоксисахара. В частности, повышенной неустойчивостью гликозидов дезоксисахаров объясняется большая лабильность сердечных гликозидов, что привело в свое время к ошибкам при установлении их строения.

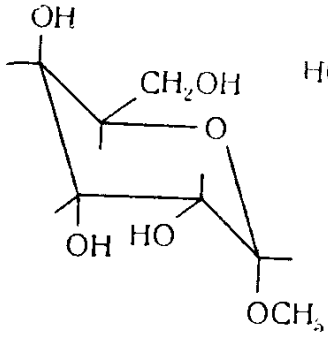
Наиболее подробный анализ всестороннего влияния строения углеводной части гликозида на его гидролитическую устойчивость возможен, по-видимому, на основе конформационных представлений. Хотя приложение принципов конформационного анализа в химии углеводов находится еще в начальной стадии, однако уже сейчас можно отметить несомненную и логически понятную закономерность, а именно: гидролитическая устойчивость гликозидов понижается с увеличением числа факторов неустойчивости, т. е. с понижением устойчивости данной конформации. Разумеется, при этом нужно рассматривать ту конформационную форму пиранозного кольца, которая наиболее благоприятна (устойчива) для данного моносахарида. Если число факторов неустойчивости конформационной структуры гексопиранозидов (см. стр. 51) сопоставить с данными о скорости гидролиза соответствующего гликозида в стандартных условиях, то существование определенной закономерности становится достаточно очевидным.



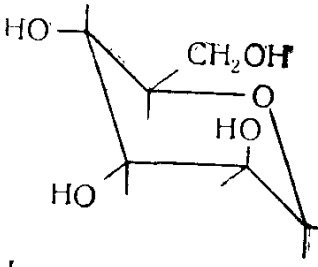
α-D-глюкозид



α-D-маннозид



α-D-гулозид



β-D-маннозид

Факторы неустойчивости	1	1; 2	1; 3; 4	Δ 2
Относительная скорость гидролиза	1	2, 4	58, 1	5, 7

Этим примером не исчерпываются известные из литературы данные, которые говорят о том, что эта закономерность имеет более или менее общий характер. Вместе с тем ясно, что эта закономерность является пока чисто качественной, поскольку и сами конформационные представления пока не носят количественного характера.

Кроме того, независимо от конфигурации и конформации самого моносахарида, устойчивость гликозида к гидролизу определяется тем, связан ли агликон экваториальной или аксиальной связью.

Очевидно, что во всех случаях гликозидная связь может занять более выгодное экваториальное положение, если моносахарид примет нужную для этого конформацию (за счет конверсии $C1 \rightleftarrows 1C$). Однако это может повлечь за собою невыгодное аксиальное положение других заместителей, особенно (в случае гексопираноз) CH_2OH-группы. Поэтому в конечном счете гликозид существует в такой конформационной форме, которая выгодна с учетом всех факторов неустойчивости. Опыт показал, что для гексопиранозидов решающим является положение CH_2OH группы и гликозидной связи, причем оказалось, что система, где налицо имеется конверсия типа

$$OR_э,\ CH_2OH_A \rightleftarrows OR_A,\ CH_2OH_э,$$

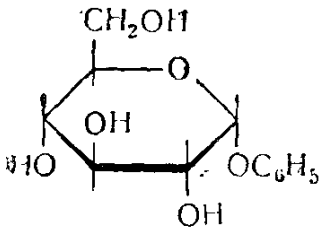
выгоднее, и, следовательно, соответствующий гликозид устойчивее, чем система, для которой характерна конверсия

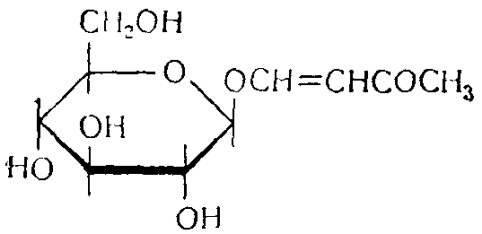
$$OR_A,\ CH_2OH_A \rightleftarrows OR_э,\ CH_2OH_э$$

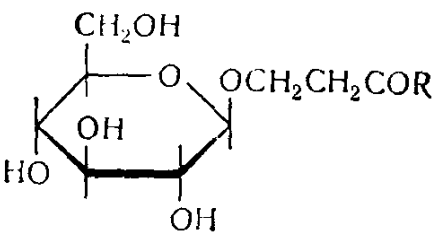
Другими словами, конфигурация, при которой в одной из креслообразных конформаций (C1 или 1C) и группа CH_2OH, и агликон OR занимают аксиальные положения, энергетически менее выгодна и соответствующий гликозид менее устойчив.

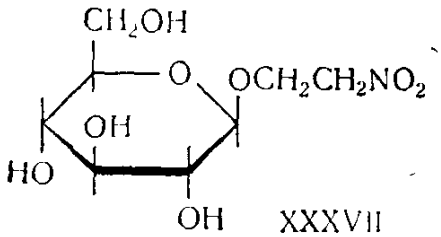
Очевидно, дальнейшее развитие конформационных представлений в приложении к сахарам даст возможность выяснить новые закономерности, хотя бы полуколичественного характера.

Как уже упоминалось выше, гликозиды, как правило, устойчивы в щелочной среде. Однако известны гликозиды, которые лабильны в этих условиях и испытывают гидролитический распад. К гликозидам этого типа относятся гликозиды фенолов (XXXIV) и енолов, например, гликозиды типа (XXXV), а также гликозиды спиртов, содержащих в β-положении сильные электроотрицательные группировки (—NO_2, COR и т. п.), например, (XXXVI) и (XXXVII).


XXXIV

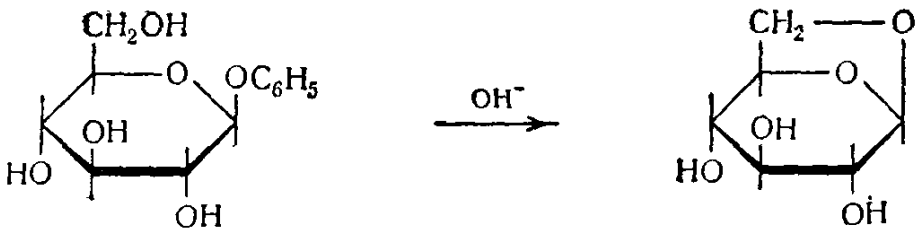

XXXV


XXXVI

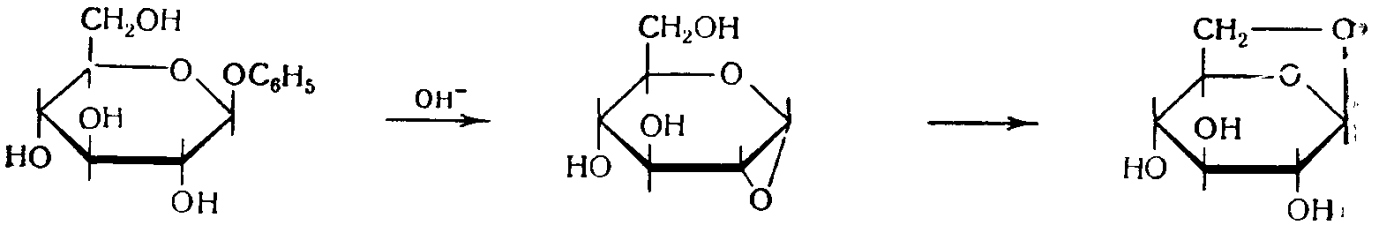

XXXVII

Наиболее распространенным и важным типом лабильных к щелочам гликозидов являются гликозиды фенолов, многие из которых широко распространены в природе. Обработка гликозидов фенолов щелочью часто приводит не к получению самих моносахаридов, а к образованию ангидросахаров, т. е. производных моносахаридов, имеющих второе окисное кольцо и являющихся по существу внутренними гликозидами.

В качестве примера получения этим путем ангидросахаров можно привести образование наиболее известного ангидросахара—1,6-ангидро-β-D-гликозы, или так называемого левоглюкозана (назван так по левому вращению).



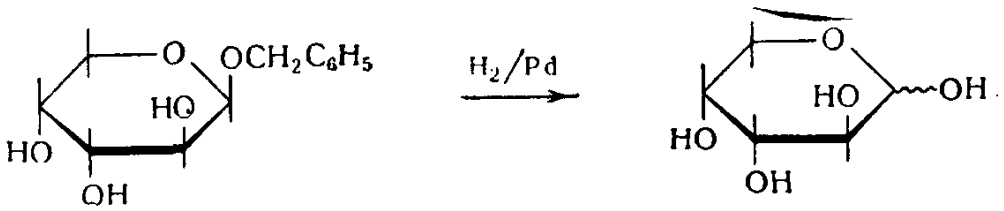
Более подробные исследования механизма этого интересного превращения показали, что левоглюкозан не образуется непосредственно из фенилглюкозида, а реакция проходит через промежуточное образование 1,2-ангидроглюкозы, окисное кольцо которой затем испытывает внутримолекулярное раскрытие с образованием 1,6-окиси.



В пользу этого механизма говорит в числе других тот факт, что 1,6-ангидропроизводное не образуется в том случае, когда гидроксильная группа у $C_{(2)}$ в фенилглюкозиде метилирована, что препятствует образованию промежуточного 1,2-ангидросахара.

1,6-ангидросахара могут быть получены также, и обычно получаются, жестким пиролизом моносахаридов и называются по имени исходного углевода с приставкой «лево» — по аналогии с левоглюкозаном, например, левоманнозан и т. д.

Из особых случаев лабильности гликозидной связи следует упомянуть способность гликозидов бензилового спирта к расщеплению при гидрировании.



Гидрогенолиз бензильного радикала является частным случаем широко известного процесса отщепления бензильных групп при гидрировании. В синтетической химии углеводов он находит применение для временной защиты гликозидного гидроксила, которую затем нужно снять в строго нейтральных условиях.

Природные гликозиды

При рассмотрении химии гликозидов целесообразно привести в кратком виде общие сведения о природных гликозидах — важном типе природных углеводсодержащих веществ. Гликозиды особенно широко распространены в растительном мире, где, как уже упоминалось, подавляющее большинство пигментов, физиологически активных веществ и т. д. содержится в виде гликозидов. Физиологическая роль гликозидов в жизни растения недостаточно ясна. С одной стороны, они могут являться продуктами детоксикации, которые образуются как конечные продукты при обезвреживании некоторых токсинов, попадающих в растительный организм или вырабатывающихся в нем. С другой стороны, некоторые гликозиды играют, очевидно, роль депо углеводов, и в случае необходимости при распаде отдают необходимый для поддержания нормальной жизнедеятельности растения свободный углевод. Однако едва ли этим ограничивается роль гликозидов и, вероятно, многое еще предстоит выяснить.

В животном организме многие гликозиды выделяются как продукты детоксикации различных ядов, попадающих тем или иным путем в организм. Из соединений этого типа наиболее хорошо известны гликозиды глюкуроновой кислоты, в виде которых из организма выделяются фенолы, многие спирты и другие чуждые для животного организма вещества.

Особое значение для всех живых существ, от вирусов до высших животных, играют так называемые N-гликозиды, которые входят в со-

став полимерных нуклеиновых кислот; подробнее этот вопрос будет рассматриваться в другом разделе. Синтез и распад гликозидов в живом организме регулируются специальными ферментными системами, которые катализируют обратимую реакцию

$$\text{углевод} + \text{агликон} \rightleftarrows \text{гликозид}$$

В частности, в растительном организме в зависимости от его потребностей реакция под действием одного и того же фермента сдвигается в ту или другую сторону. Указанные ферменты локализованы в определенных морфологических образованиях растений. Нарушение или разрушение этих клеток ведет к нарушению синтеза и распада гликозидов, чем нарушается нормальный обмен углеводов в растениях.

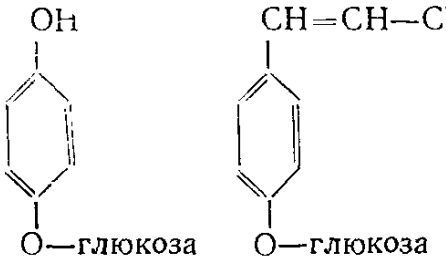
В заключение следует добавить, что синтез и распад гликозидов в растениях проходит, очевидно, в строго определенный период вегетации, т. е. требует совершенно определенного состояния соответствующих клеток.

Природные гликозиды составляют весьма обширный класс соединений, которые наряду с обязательной углеводной структурной единицей содержат в качестве агликона самые различные радикалы. По количеству молекул моносахарида гликозиды можно разделить на монозиды, биозиды, триозиды; редко встречаются гликозиды, содержащие четыре и более молекул моносахарида. Из моносахаридов в состав гликозидов входит особенно часто глюкоза, реже встречаются соединения, содержащие галактозу, маннозу, фруктозу. Относительно широко представлены гликозиды, содержащие дезоксисахара, например, рамнозу, фукозу и др. Хорошо известны также гликозиды, содержащие пентозы (арабинозу, ксилозу). Упомянутые выше нуклеотиды в качестве углеводной компоненты содержат рибозу и дезоксирибозу. Интересно отметить, что большинство природных гликозидов относятся к пиранозидам и являются β-аномерами.

С химической точки зрения наиболее целесообразным принципом классификации природных гликозидов является классификация их по агликонам, так как химическое поведение гликозида и его физиологическое действие в первую очередь определяется природой агликона.

Привести в этом руководстве все известные классы природных гликозидов было бы затруднительно, поэтому ниже будут перечислены только важнейшие типы природных гликозидов.

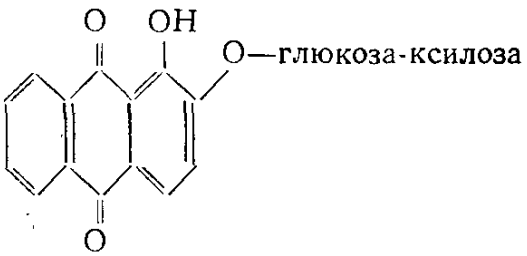
1. Гликозиды простейших фенолов. Гликозиды этой довольно многочисленной группы встречаются очень часто, но не получили какого-либо серьезного применения. Типичными представителями этого класса являются арбутин (XXXVIII) и конифери́н (XXXIX).



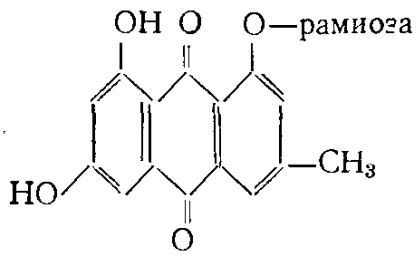
XXXVIII XXXIX

2. Антрахиноновые гликозиды в химическом отношении родственны предыдущей группе, так как являются гликозидами фенолов антрахинонового ряда. Однако, в отличие от предыдущей группы, сюда

относятся вещества, имеющие серьезное практическое значение — многие природные красители, например, рубэритриновая кислота (XL) — гликозид ализарина, а также средства, широко применяемые в медицинской практике как слабительные, например, эмодин (XLI)



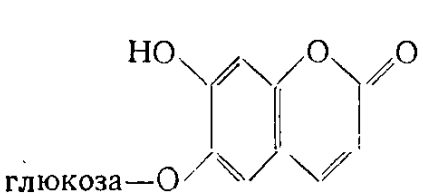
XL



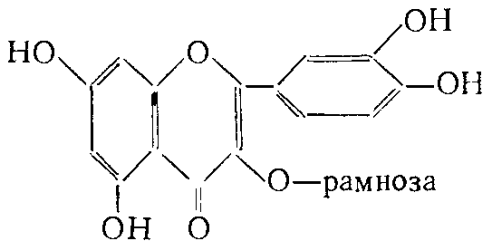
XLII

3. Флавоновые и кумариновые гликозиды — обширная группа гликозидов гетероциклических фенолов ряда кумарина и флавона. Гликозидам этой группы в последнее время уделяется большое внимание в связи с тем, что среди них найдены вещества, уменьшающие хрупкость и проницаемость капиллярных кровеносных сосудов, что часто возникает как результат лучевого поражения.

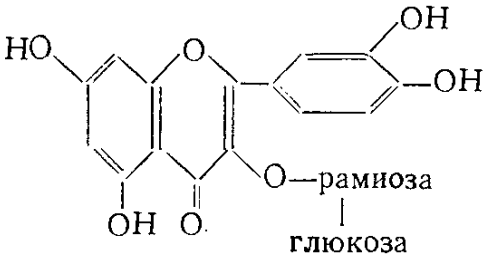
Наиболее распространенными и имеющими практическое значение соединениями этой группы являются эскулетин (XLII), кверцитрин (XLIII) и рутин (XLIV).



XLII

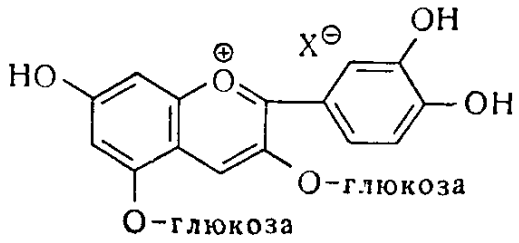


XLIII



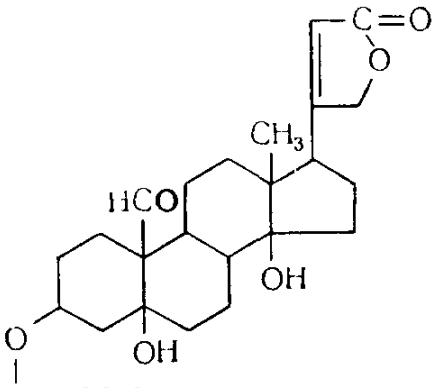
XLIV

4. Антоцианы — гликозиды флавилиевых солей, которые обусловливают окраску цветов и плодов. Как известно, вся палитра природных окрасок обусловлена очень ограниченным количеством антоцианов, которые способны менять свой цвет при различных значениях pH среды. В качестве типичного примера антоциана можно привести цианин (XLV), красящее вещество розы и василька.

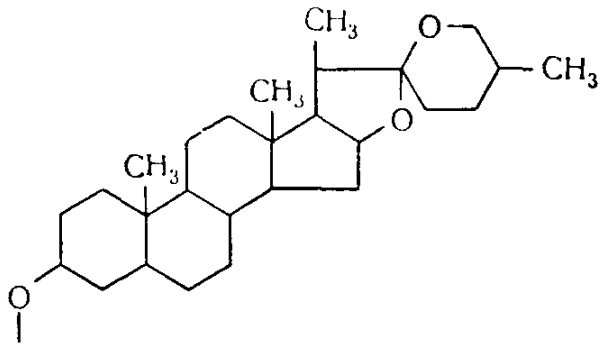


XLV

5. Гликозиды — производные пергидроциклопентанофенантрена. Сюда относятся очень важные с практической точки зрения так называемые сердечные гликозиды, которые являются действующими началами наперстянки (дигиталиса), строфанта и других средств, стимулирующих сердечную деятельность; типичным примером является строфантин (XLVI). К этой же группе относятся сапонины. Они вызывают сильное пенообразование, а также гемолиз красных кровяных шариков, вследствие чего являются сильными ядами для человека и теплокровных животных только при введении в кровь. Практическое значение сапонинов, сильно возросшее за последнее время, состоит в использовании их как исходного сырья для синтеза стероидных соединений. Примером сапонинов является саpсасапонин (XLVII).

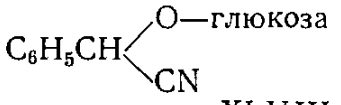


XLVI

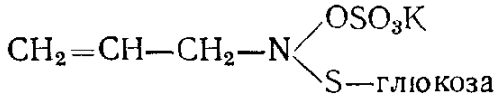


XLVII

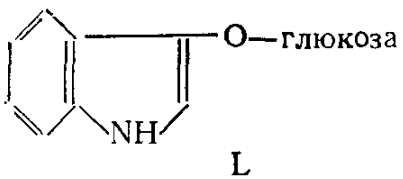
6. Другие растительные гликозиды. В растительном мире встречаются и многие другие гликозиды, содержащие различные жирные, жирноароматические или гетероциклические агликоны. Исследование гликозида амигдалина (XLVIII), содержащегося в горьком миндале, в свое время послужило Либиху и Велеру отправной точкой для создания первой теории органической химии — теории радикалов. Давно известен также S-гликозид синигрин (XLIX), находящийся в горчице и обусловливающий ее едкий вкус. Большое практическое значение имел гликозид индикан (L), содержащий в качестве агликона индоксил, дающий при окислении индиго.



XLVIII



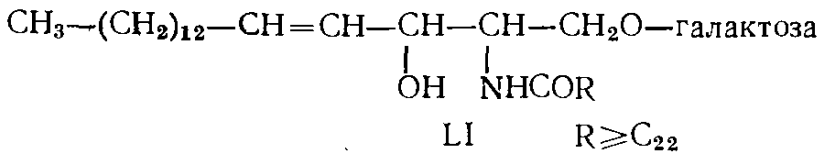
XLIX



L

7. Сложные гликозиды животного происхождения. Исключительно большое, но еще не вполне ясное физиологическое значение имеют многочисленные и очень слабо изученные группы сложных углеводсодержащих веществ животного происхождения, которые построены по гликозидному типу. Сюда относятся гликопептиды — вещества, в состав которых входят пептиды и углеводы. Эти соединения содержат, очевидно, различные типы связей углевод — аминокислота, одной из которых является, несомненно, гликозидная связь.

Также очень мало изучены входящие в состав нервной ткани, в частности, в состав серого вещества головного мозга, гликолипиды. Из них наиболее хорошо исследованы цереброзиды, для которых предполагают групповое строение (LI).



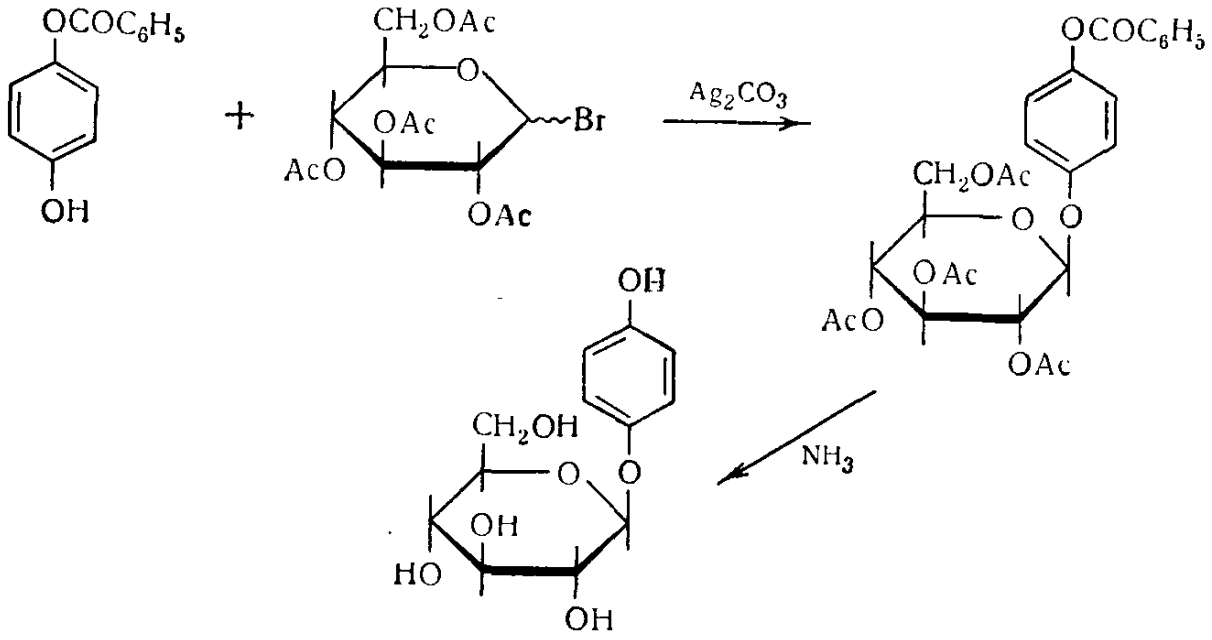
LI $R \geqslant C_{22}$

Интересно отметить, что аналогичные вещества, где место галактозы занимает глюкоза, найдены в организме людей, больных адиссоновой болезнью.

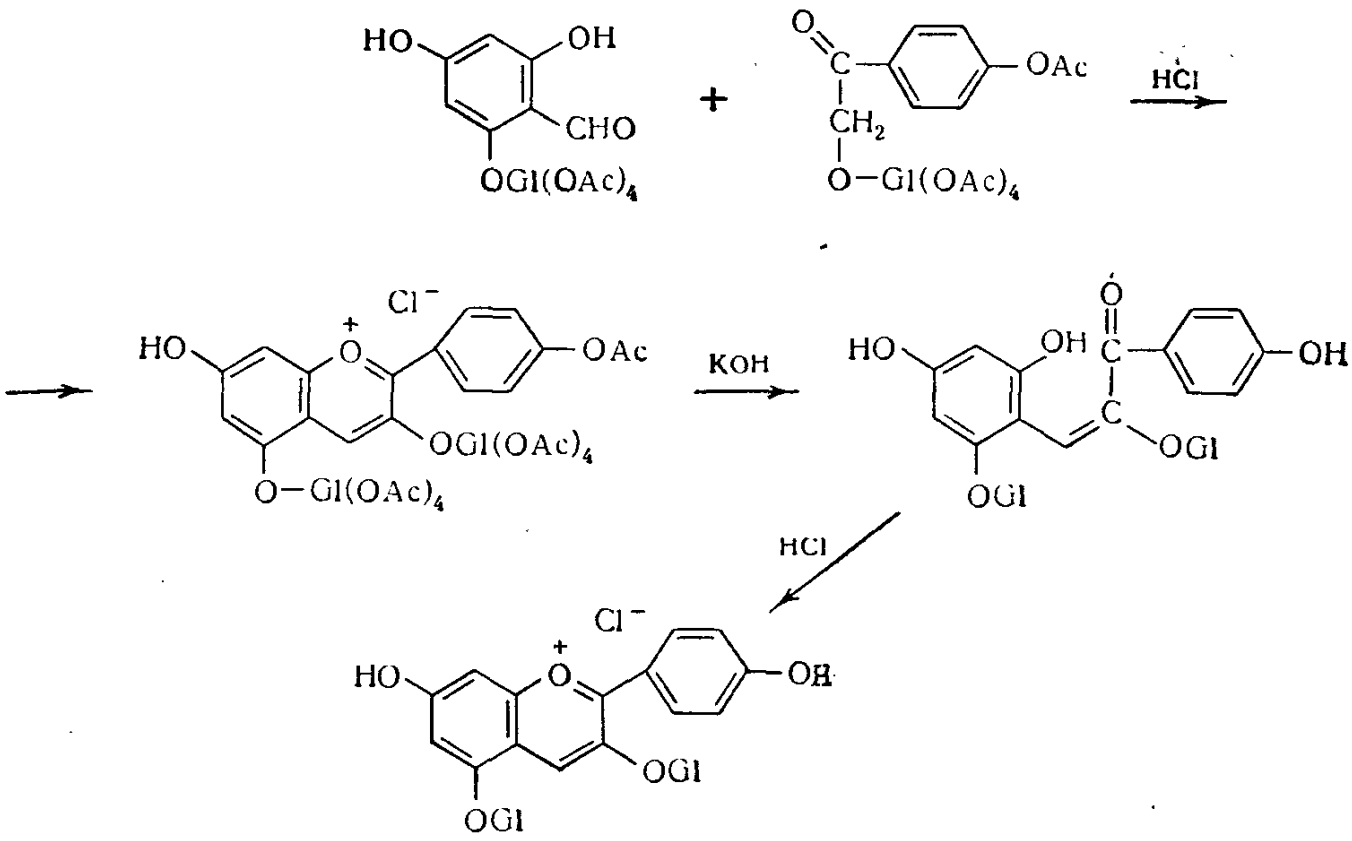
Выше упомянуты наиболее хорошо очерченные и изученные группы природных гликозидов; однако число представителей и новых типов соединений этого класса непрерывно увеличивается. Особенно интересны гликозиды последней группы ввиду их большого значения в жизненных процессах. Эта группа подвергается в настоящее время интенсивному изучению.

Некоторые из природных гликозидов были получены синтетически. Введение углеводного остатка в молекулу агликона производится обычными методами синтеза гликозидов с учетом того, что нужно получить гликозид заданной конфигурации; чаще всего для этого используют обычно метод Кенигса — Кнорра. Для полного синтеза природных гликозидов применяется обычно одна из двух схем.

1. Введение углеводного остатка в готовый агликон, в котором все излишние гидроксилы, кроме подлежащего гликозидации, защищены подходящим образом. После введения остатка сахара, также защищенного, защищающие группы снимаются. Как пример такой схемы можно привести синтез арбутина, осуществленный Робертсоном и Уотерсом.



2. Другая схема, применяемая обычно для синтеза гликозидов со сложным агликоном, состоит во введении остатка углевода в промежуточные продукты синтеза, которые далее в мягких условиях подвергаются соответствующим реакциям конденсации. В результате этих реакций завершается построение агликонной части молекулы, в которой в подходящем месте уже находятся остатки сахара. Таким путем Робинсоном и Тоддом был, например, осуществлен синтез природных антоцианов.



где Gl – остаток глюкозы,

$Gl(OAc)_4$ – остаток тетраацетилглюкозы

ЛИТЕРАТУРА

S. Bayne, J. Fewster. The osones. Adv. carbohydrate chemistry, 1956, **11**, 44.

J. Conchie, G. Levy, C. Marsh. Methyl and phenyl glucosides of common sugar. Adv. carbohydrate chemistry, 1957, **12**, 158.

A. Fester, W. Overend. Carbohydrate phosphates. Quart. Rev., 1957, **11**, 61.

L. Haynes, F. Newth. Glycosyl halides and their derivatives. Adv. carbohydrate chemistry, 1955, **10**, 207.

B. Helferich. The glucals. Adv. carbohydrate chemistry, 1952, **7**, 247.

J. Honeyman, J. Morgan. Sugar nitrates. Adv. carbohydrate chemistry, 1957, **12**, 117.

R. Lemieux. Some implications in carbohydrate chemistry of theories relating to the mechanisms replacement reactions. Adv. carbohydrate chemistry, 1954, **9**, 1.

Ch. Mc Closkey. Benzyl ethers of sugars. Adv. carbohydrate chemistry, 1957, **12**, 137.

L. Mester. Phenylhydrasone und verwandte Derivate der Zucker. IV Inter. Congr. Biochemistry, 1955, **1**, 160.

J. Mills. The stereochemistry of cyclic derivatives of carbohydrates. Adv. carbohydrate chemistry, 1955, **10**, 2.

F. Newth. Sugar oxides. Quart. Rev., 1959, **13**, 30.

E. Pacsu. Carbohydrate orthoesters. Adv. carbohydrate chemistry, 1946, **1**, 77.

S. Peat. The chemistry of anhydrosugars. Adv. carbohydrate chemistry, 1947, **2**, 37.

J. Sugihara. Relative reactivities of hydroxyl groups of carbohydrates. Adv. carbohydrate chemistry, 1953, **8**, 1.

R. Tipson. Sulfonic esters of carbohydrates. Adv. carbohydrate chemistry, 1953, **8**, 107.

Глава 5

ВАЖНЕЙШИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ МОНОСАХАРИДОВ

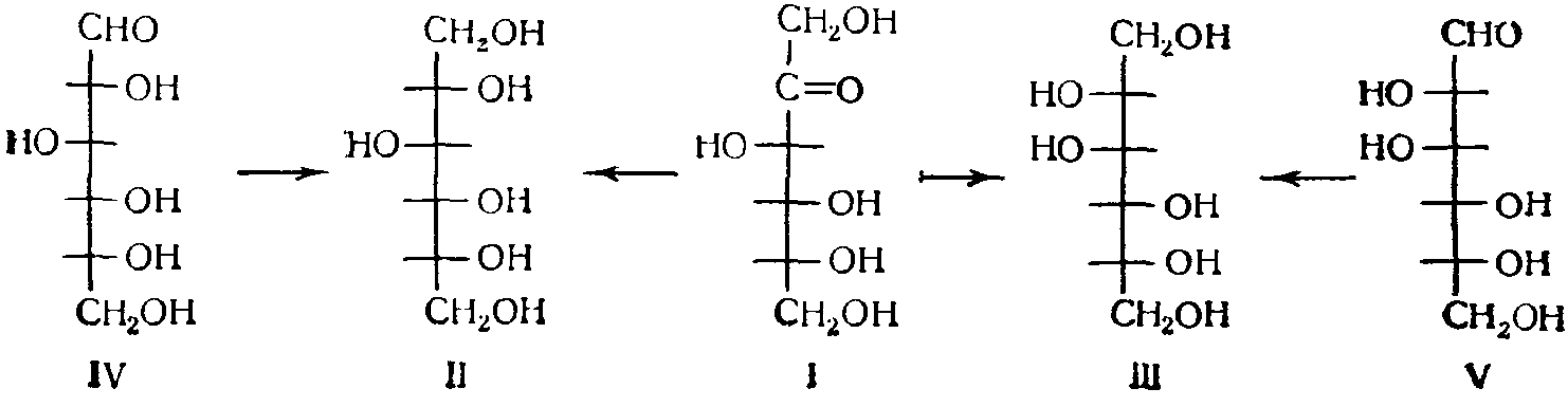
Из всего разнообразия возможных превращений полифункциональной молекулы моносахарида наибольшее значение имеют реакции восстановления, окисления и взаимодействие со щелочами и минеральными кислотами. Эти широко изученные реакции дают возможность просто и удобно перейти к наиболее важным классам соединений, родственным моносахаридам, из которых наибольший интерес представляют многоатомные спирты и многоатомные оксикислоты.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ

Если не касаться не представляющего интереса для препарации жесткого восстановления молекулы моносахарида, приводящего к гидрогенолизу оксигрупп и дающего простейшие галоидпроизводные (см. стр. 12), то единственной способной к восстановлению группировкой в молекуле моносахарида является карбонильная группа. Восстановление этой группы моносахарида достигается достаточно легко самыми различными методами, из которых наиболее употребительными являются восстановление амальгамой натрия или алюминия и каталитическое гидрирование над палладием или над никелем; худшие результаты дает восстановление над платиной.

Каталитическое гидрирование моносахаридов осуществляется в широком масштабе, поскольку получающиеся при этом многоатомные спирты имеют практическое применение.

Альдозы при восстановлении дают лишь один многоатомный спирт; восстановление кетоз, напротив, приводит к образованию двух диастереомеров, поскольку возникает новый асимметрический атом углерода. Там, например, при восстановлении фруктозы (I) образуются два шестиатомных спирта (гексита) — сорбит (II) и маннит (III). Первый из них получается также при восстановлении глюкозы (IV), второй — при восстановлении маннозы (V).



Получающиеся в результате восстановления многоатомные спирты довольно широко распространены в природе. Их названия часто производят от названия соответствующего моносахарида, восстановлением которого они могут быть получены, например арабит, ксилит, маннит, аллит и т. д.

Однако это правило не всегда соблюдается; так, глюкоза дает сорбит, галактоза — дульцит и т. д. Число возможных стереоизомеров в ряду гекситов значительно меньше числа стереозомеров моносахаридов соответствующего ряда, так как спирты содержат на один асимметрический атом углерода меньше (α- и β-аномеры дают один и тот же гексит). Кроме того, число стереоизомеров еще уменьшается вследствие симметричного строения молекулы. Так, для гекситов это число составляет 10, для пентитов 4 и т. д.

Некоторые наиболее доступные многоатомные спирты (сорбит, маннит) имеют техническое применение, и их нитраты служат основой для получения взрывчатых веществ. Так как большинству многоатомных спиртов присущ сладкий вкус, то некоторые из них рекомендованы как сахар для диабетиков, которым противопоказано употребление обычного сахара.

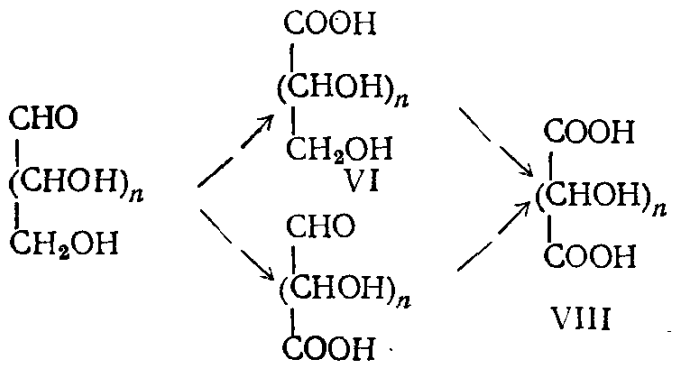
Восстановление углеводов является в настоящее время одним из путей выяснения их строения. Так, например, для выяснения природы концевых моносахаридов в цепи полисахарида, последний подвергается восстановлению; при этом восстанавливаются только концевые моносахариды, имеющие свободные альдегидные группы. Если затем подвергнуть продукт восстановления полисахарида гидролизу и отделить образовавшиеся многоатомные спирты от моносахаридов, то, установив природу спиртов, можно сделать заключение и о концевых группах полимерной цепи полисахарида.

По своему химическому поведению многоатомные спирты вполне аналогичны простейшим гликолям и дают общие для этого класса веществ производные (простые и сложные эфиры, циклические ацетали и кетали, из которых наибольшее применение получили изопропилиденовые и бензилиденовые производные).

ОКИСЛЕНИЕ

В отличие от восстановления, окисление моносахаридов может дать несколько типов соединений. Наибольшее значение имеют продукты окисления альдоз, среди которых важнейшими являются кислоты, образующиеся при окислении концевых углеродных атомов моносахарида.

Окисление альдозы по концевым атомам углерода может в зависимости от условий дать альдоновые (VI), уроновые (VII) или сахарные (VIII) кислоты.

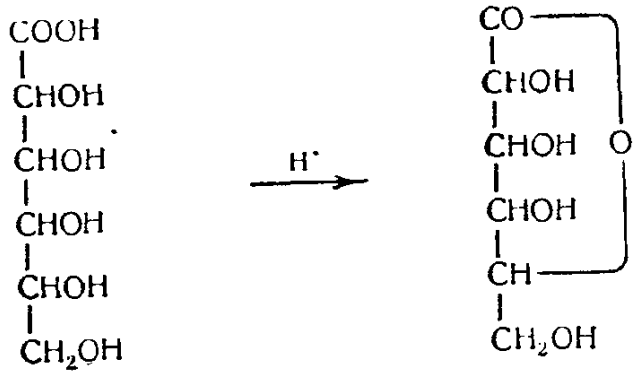


Очень важным процессом, происходящим в живом организме, является биохимическое окисление углеводов, при котором также в различных условиях образуются различные кислоты.

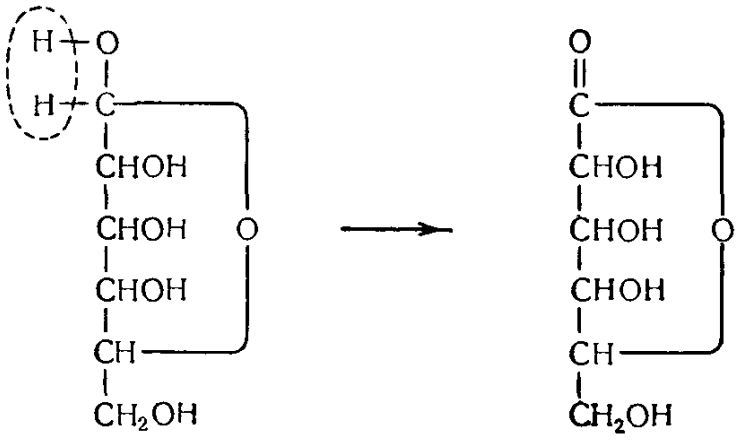
Для получения каждого из упомянутых классов кислот (VI, VII или VIII) в настоящее время разработаны надежные препаративные методы.

Альдоновые кислоты (VI) получаются при мягком окислении свободного моносахарида хлорноватистой или бромноватистой кислотой. Наиболее обычным вариантом является окисление сахара в водном растворе бромной водой в присутствии карбоната кальция или бария.

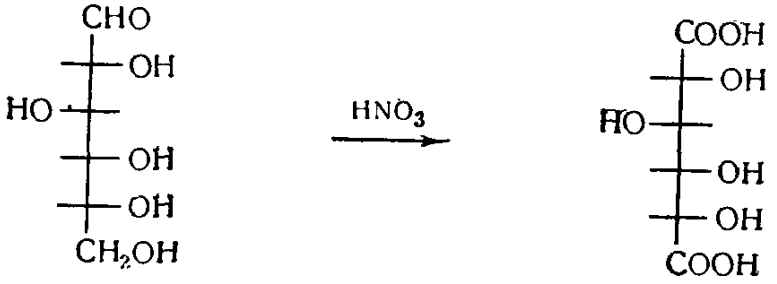
В кислой среде полученные кислоты обычно лактонизуются, и в результате окисления выделяются лактоны.



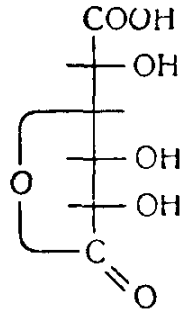
Поскольку в водном растворе подвергающийся окислению моносахарид существует почти исключительно в виде циклической полуацетальной формы, то в настоящее время с полным основанием считают, что образование лактона альдоновой кислоты (альдолактона) происходит непосредственно путем «дегидрирования» полуацетальной формы бромом.



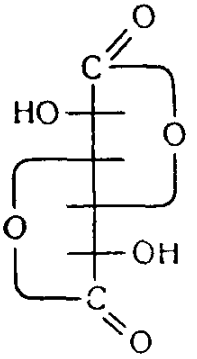
Сахарные кислоты (VIII) получаются при окислении моносахаридов в более жестких условиях; наиболее общий метод основан на окислении азотной кислотой, например,



Названия сахарных кислот образуются от названия соответствующего моносахарида, например, глюкосахарная, манносахарная кислоты и т. д. Они содержат на один асимметрический атом углерода меньше — α- и β-аномеры дают одну и ту же сахарную кислоту. Кроме того, вследствие симметризации молекулы при окислении углевода в сахарную кислоту в ряде случаев из двух углеводов (например, из D-глюкозы и L-гулозы, из D-галактозы и L-галактозы) образуется одна и та же кислота, что еще более уменьшает число изомеров. Сахарные кислоты легко образуют моно- и дилактоны:



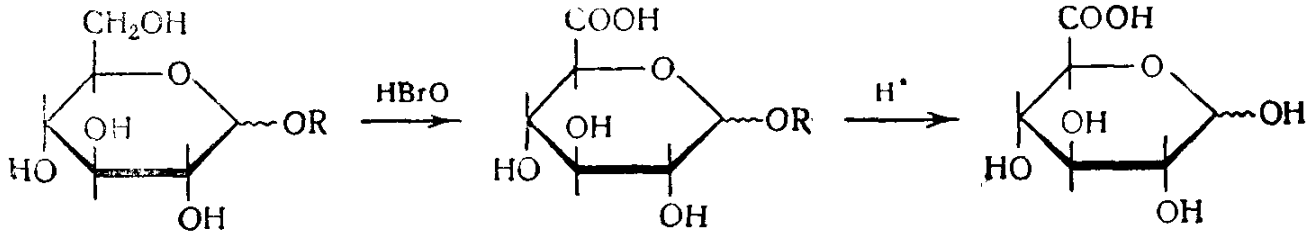
Сахаро-3,6-лактон



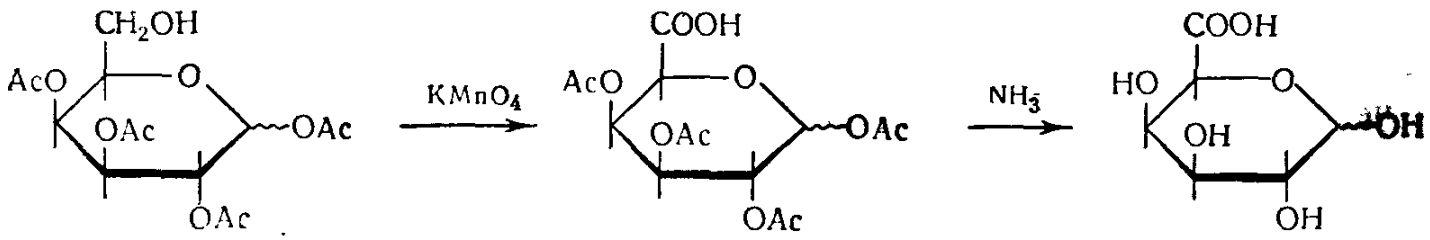
Манно-1,4-3,6-дилактон

Сахарные кислоты имеют большое значение при установлении стереохимических соотношений в ряду моносахаридов (см. стр. 17—19).

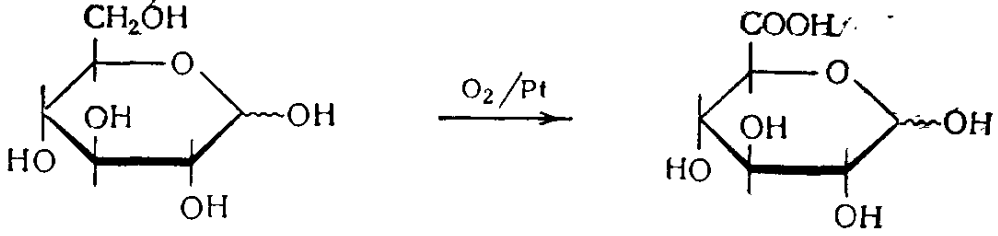
Уроновые кислоты (VII), несомненно, представляют наибольший интерес, особенно с биологической точки зрения. Синтез уроновых кислот связан с некоторыми трудностями, поскольку нужно окислить первичноспиртовую группу моносахарида, не затрагивая весьма склонной к окислению альдегидной группы, поэтому прямое окисление моносахаридов обычными окислителями, как правило, не дает желаемого результата. Для получения уроновых кислот обычно подвергают окислению гликозид, применяя в качестве окислителя бромноватистую кислоту.

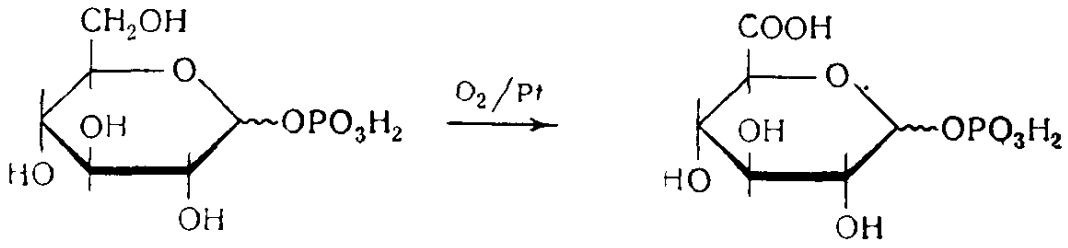


Можно подвергать окислению также моносахарид, в котором все гидроксильные группы, кроме первичноспиртовой, защищены, например,



В последнее время разработан и прямой метод окисления моносахаридов и их производных кислородом воздуха в присутствии платинового катализатора. Например,

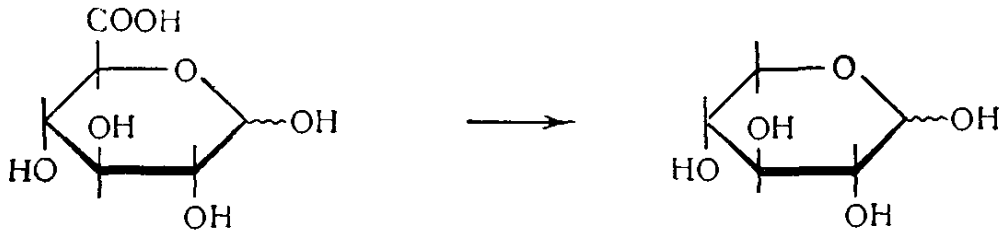




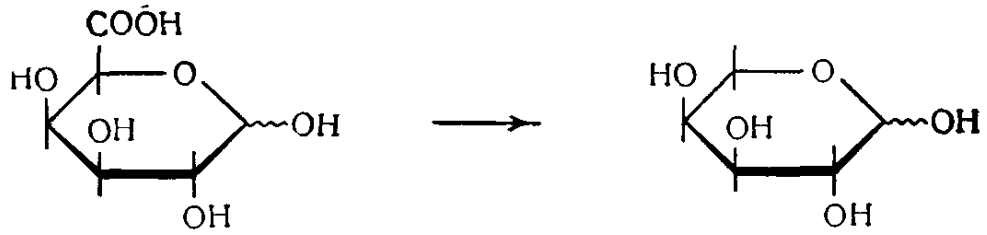
Уроновые кислоты носят названия, корень которых происходит от соответствующего моносахарида — глюкуроновая, галактуроновая и т. д.

Для уроновых кислот, так же как и для моносахаридов, свойственны таутомерные отношения (кольчато-цепная таутомерия). Они легко дают обычные производные, характерные для моносахаридов (простые и сложные эфиры, изопропилиденовые и бензилиденовые производные, гликозиды, озазоны и т. д.), а также обычные производные карбоновых кислот (сложные эфиры, амиды и т. д.).

Из особых свойств уроновых кислот наибольший интерес представляет их склонность к декарбоксилированию, которое происходит под влиянием солей некоторых металлов (магний, цинк, никель, алюминий, свинец) или при действии микроорганизмов; при этом из гексуроновых кислот образуются пентозы, например, из глюкуроновой кислоты — ксилоза



из галактуроновой кислоты — L-арабиноза



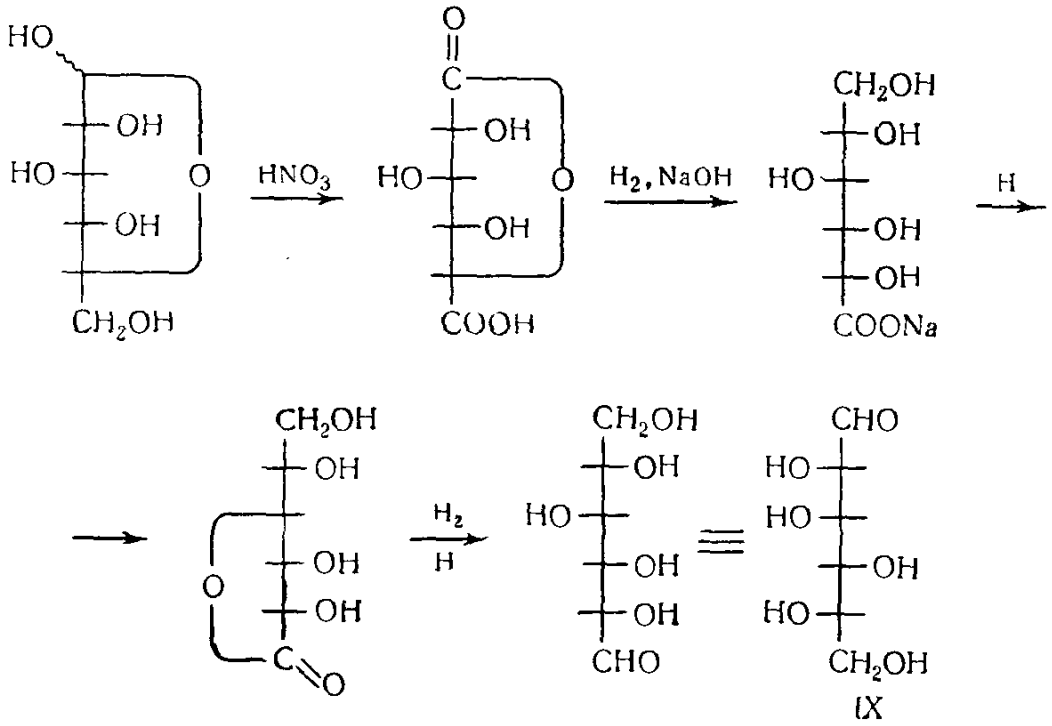
Эта реакция делает возможным синтетический переход от гексоз через соответствующие гексуроновые кислоты к пентозам. Это интересное превращение, которое происходит и в природных условиях, генетически связывает гексозы с пентозами и, если принять гексозы за основной продукт фотосинтеза, указывает биогенетический путь возникновения пентоз.

Уроновые кислоты широко распространены в природе. Они входят как мономерные единицы в различные полисахариды; особенно широко представлены они в полисахаридах некоторых морских водорослей.

Сами мономеры уроновых кислот выполняют важную функцию в животном организме: глюкуроновая кислота реагирует с посторонними токсическими веществами, попадающими в организм (например, с фенолом), связывает их в виде гликозида, который носит название парной кислоты, и в таком виде выводит с мочой из организма.

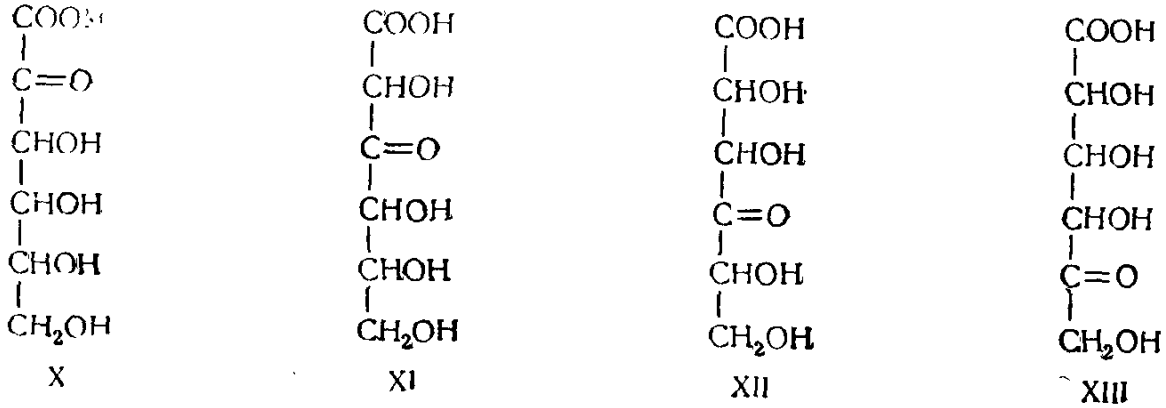
Этот биохимический процесс настолько гладко проходит в организме, что может быть использован для препаративного получения глюкуроновой кислоты. С этой целью собаке скармливают ментол, который связывается с глюкуроновой кислотой и в виде парной кислоты выделяется с мочой. Парную кислоту далее выделяют из мочи, подвергают гидролизу и получают глюкуроновую кислоту.

Окисление и восстановление моносахаридов широко используется в синтетической химии углеводов для самых различных синтетических переходов. В качестве примера комбинированного использования этих двух реакций можно привести очень важный переход от доступных моносахаридов D-ряда к малодоступным сахарам L-ряда. Таким способом, например, из D-глюкозы получают L-гулозу (IX).



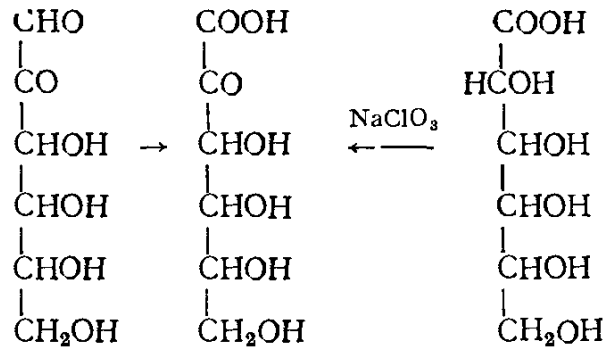
IX

Продукты окисления кетоз представляют меньший интерес и изучены значительно хуже. Наиболее интересны кетуроновые кислоты, которые в зависимости от положения кетогруппы различают как 2-кетуроновые (X), 3-кетуроновые (XI), 4-кетуроновые (XII) и 5-кетуроновые (XIII) кислоты.



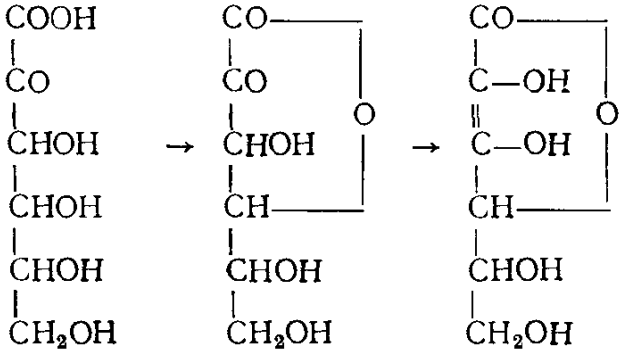
X XI XII XIII

Наибольший интерес представляют 2-кетуроновые кислоты, продукты обмена в животном организме. Синтетически они могут быть получены либо окислением озонов (XIV) каким-либо мягким окислителем, либо окислением альдоновых кислот (XV) хлорноватокислым натрием.



XIV XIII XV

2-Кетуроновые кислоты обычно дают γ-лактоны (XVI), которые легко образуют енолы (XVII).

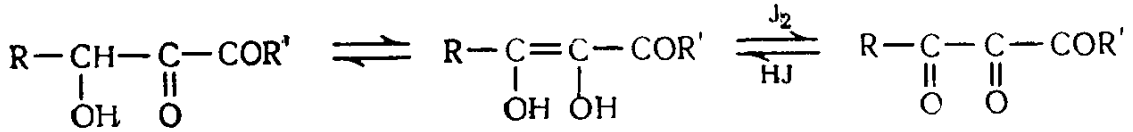


XIII XVI XVII

5-Кетуроновые, а также 4-кетуроновые кислоты, не имеют какого-либо серьезного значения. 3-Кетуроновые кислоты были подвергнуты серьезному изучению в связи с работами по установлению строения и синтезу витамина С.

Витамин С

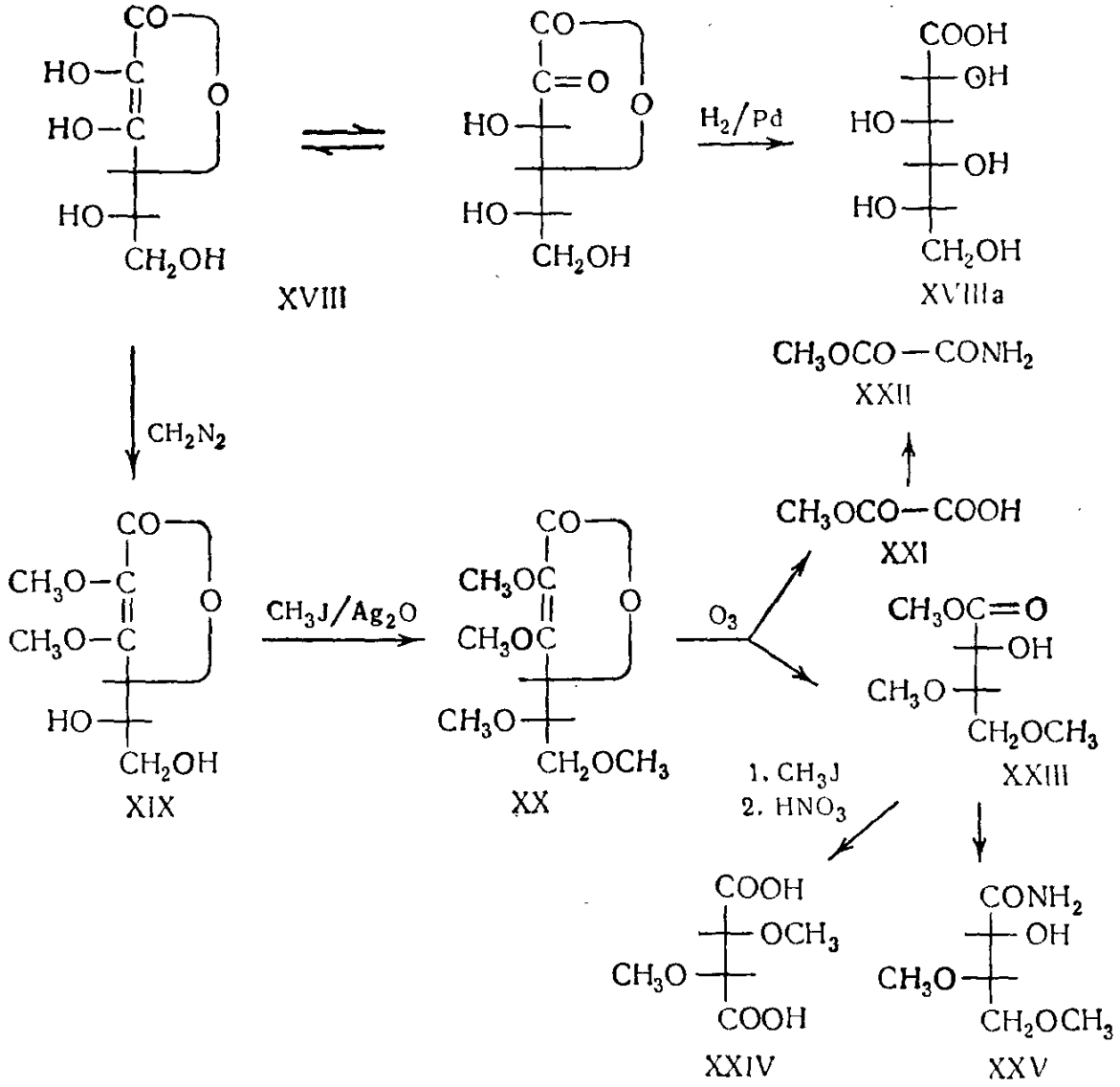
Противоцинготный витамин С (аскорбиновая кислота) был первым из витаминов выделен в чистом состоянии (Сент-Гьорги, 1928 г.). Он содержится в свежих фруктах и овощах (лимоны, апельсины, капуста, помидоры и т. д.), а также был выделен из надпочечников. Витамин С относится к биологически важной группе редуктонов, регулирующих окислительно-восстановительные процессы в организме; в общем виде строение и окислительно-восстановительная функция редуктонов может быть выражена следующим уравнением:



Вскоре после выделения и индивидуализации витамина С для него был установлен состав $C_6H_8O_6$ и доказано, что он имеет строение (XVIII).

Это доказательство основано на следующих фактах. При гидрировании витамин поглощает 1 моль водорода и дает идоновую кислоту

(XVIII *а*). Витамин С обладает свойствами слабой кислоты (разлагает карбонаты) и дает окраску с хлорным железом, его окисленная форма не имеет свойств кислоты, но титруется как лактон. Из этого следует, что кислотная функция обусловливается енольной группировкой, кроме которой в молекуле витамина присутствует еще лактонное кольцо.

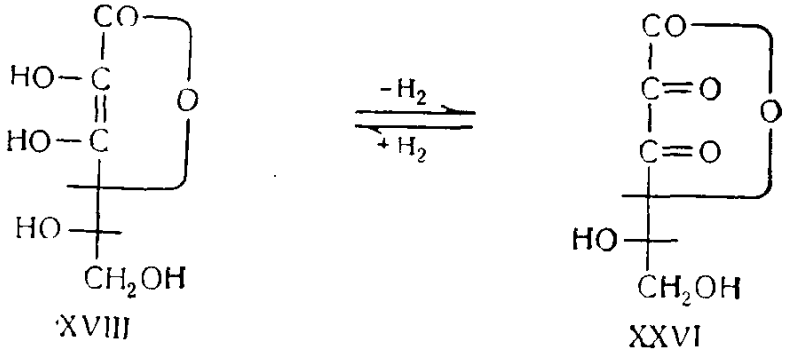


При обработке (XVIII) диазометаном получается диметильное производное (XIX), дальнейшее метилирование которого по Пурди дает тетраметильное производное (XX). Этим выяснена функция всех шести атомов кислорода в молекуле витамина — два атома входят в лактонное кольцо, два — в енольные гидроксильные группы и два — в спиртовые гидроксилы.

Взаимное расположение всех функциональных групп было установлено в результате озонолиза тетраметильного производного (XX). При этом были получены монометилоксалат (XXI), идентифицированный в виде метилового эфира оксаминовой кислоты (XXII). Это устанавливает положение двойной связи енольной системы в положении $C_{(2)}$— $C_{(3)}$. Соединение (XXIII) при метилировании и последующем окислении азотной кислотой дает L-диметоксиянтарную кислоту (XXIV), что определяет строение части молекулы у $C_{(4)}$, $C_{(5)}$ и $C_{(6)}$ и конфигурацию у $C_{(4)}$ и $C_{(5)}$. Наконец, амид (XXV), полученный из (XXIII), подвергается распаду по Вееpману. Это доказывает, что в (XXIII) свободная оксигруппа находится в α-положении к карбоксилу, т. е. у $C_{(4)}$ в молекуле витамина. Таким образом, в молекуле витамина С налицо фуранозное окисное кольцо, т. е. ему соответствует строение XVIII, и он представ-

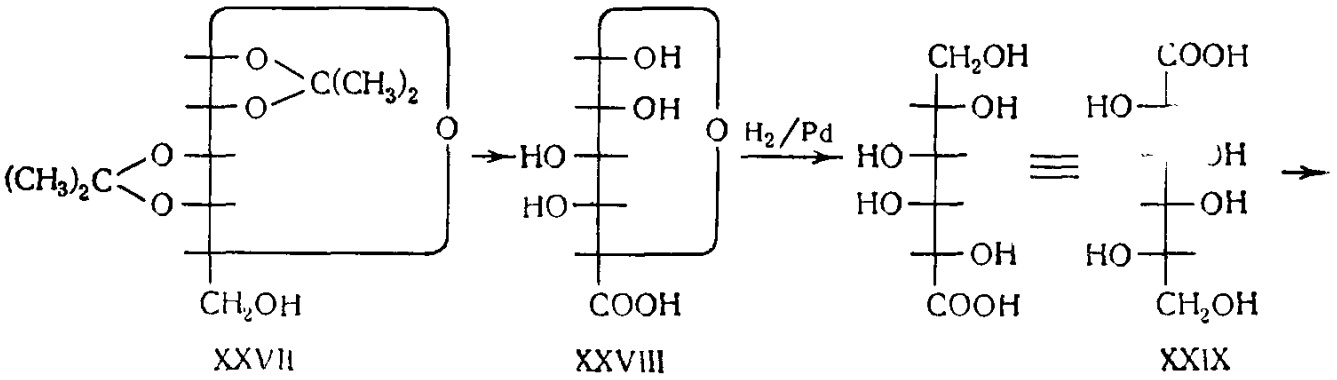
ляет собой енольную форму лактона 2-кетогулоновой или 3-кетоидоновой кислот.

Аскорбиновая кислота является коферментной частью окислительно-восстановительных ферментных систем. Функция аскорбиновой кислоты как переносчика кислорода основывается на чрезвычайно легком обратимом переходе ее в свою окисленную форму — дегидроаскорбиновую кислоту (XXVI).

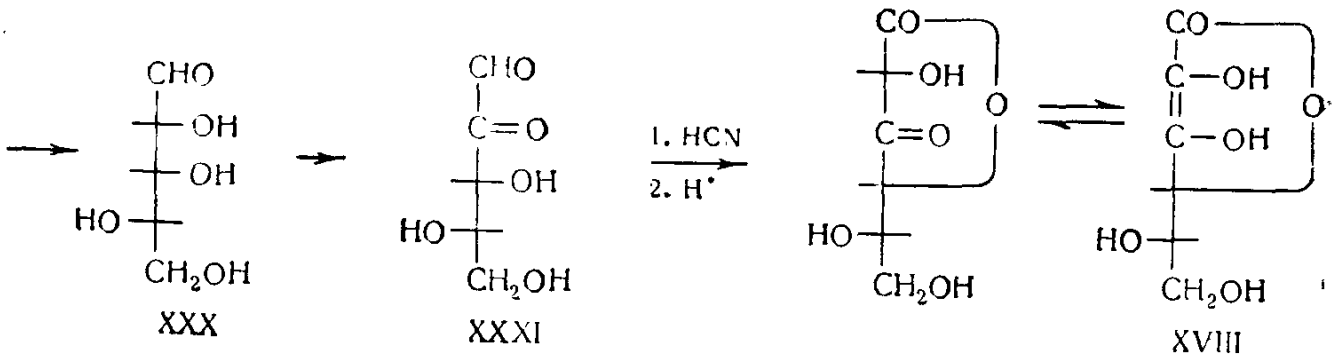


XVIII XXVI

Вскоре после установления строения витамина С было предложено несколько методов его синтеза. Первый синтез, выполненный одновременно Рейхштейном и Хеуорзсом, может быть представлен схемой



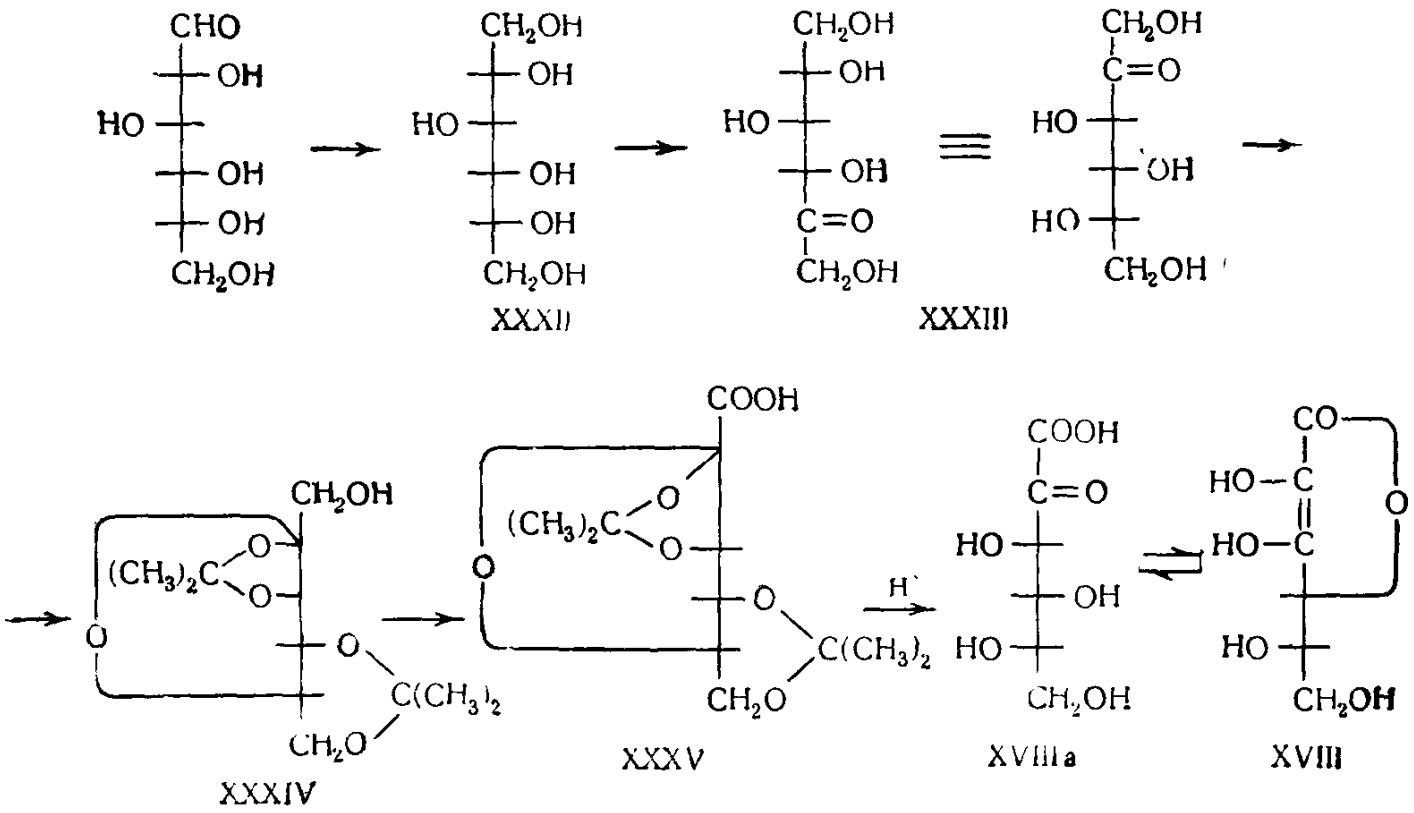
XXVII XXVIII XXIX



XXX XXXI XVIII

Окислением диизопропилиденгалактозы (XXVII) щелочным перманганатом с последующим снятием изопропилиденовых групп получают галактуроновую кислоту (XXVIII); восстановлением последней получают L-галактоновую кислоту (XXIX), чем завершается важный переход от исходной D-галактозы к производному L-ряда, к которому относится аскорбиновая кислота. L-галактоновую кислоту (XXIX) подвергают распаду по Веерману, а полученную при этом L-ликсозу (XXX) окисляют в L-ксилозон (XXXI). Последний цианогидриновым синтезом превращают в лактон 3-кетогулоновой кислоты, т. е. в витамин С.

Годом позже, в 1934 г., Рейхштейн разработал новый, значительно более удобный синтез витамина С, который и до сих пор служит основой его промышленного получения. Путь Рейхштейна изображается схемой:



Каталитическим восстановлением глюкозу переводят в сорбит (XXXII), который подвергают биохимическому окислению с использованием, например, культуры *Acetobacter xylinum*, в результате чего образуется L-сорбоза (XXXIII). Диизопропилиденовое производное L-сорбозы (XXXIV) при окислении перманганатом дает диизопропилиденовое производное 2-кето-L-гулоновой кислоты (XXXV), обработка которого кислотой дает свободную 2-кето-гулоновую кислоту (XVIIIa), т. е. одну из таутомерных форм витамина С.

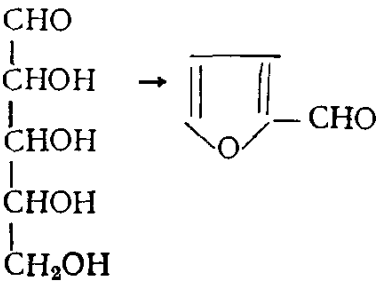
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОНОСАХАРИДОВ С КИСЛОТАМИ

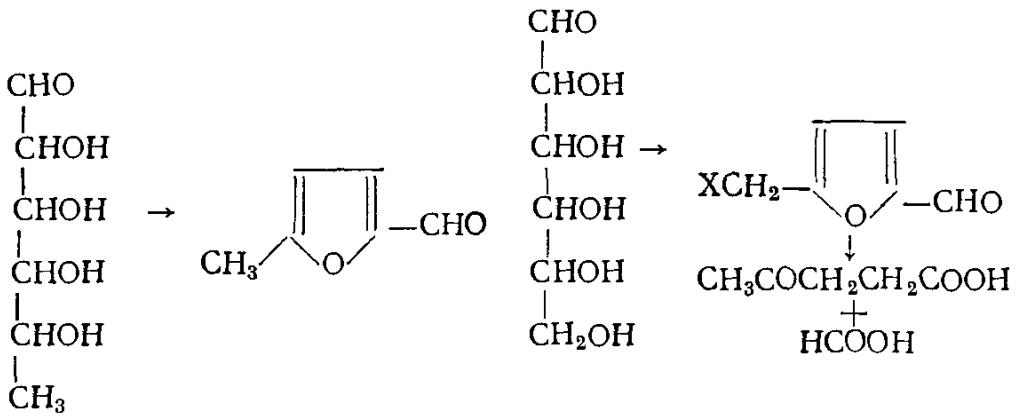
При воздействии минеральных кислот на моносахариды в зависимости от концентрации кислоты и условий реакции протекают более или менее сложные превращения. Эти реакции не используются в синтетической химии сахаров, однако они представляют интерес для качественного отличия моносахаридов разных классов, а также применяются в широком масштабе для синтеза производных фурана.

При действии разбавленных минеральных кислот на моносахариды может происходить эпимеризация у некоторых асимметрических центров, однако особенности этой реакции недостаточно хорошо изучены, и поскольку она не проходит однозначно, то ее использование в препаративных целях не представляет интереса. Часто в этих условиях происходит, кроме того, дегидратация, в результате чего образуются ангидросахара.

Важной реакцией является взаимодействие моносахаридов с концентрированными минеральными кислотами (соляной, бромистоводородной, серной), приводящее к производным фурана. Эта реакция протекает различно в зависимости от того, к какому классу относятся моносахариды:

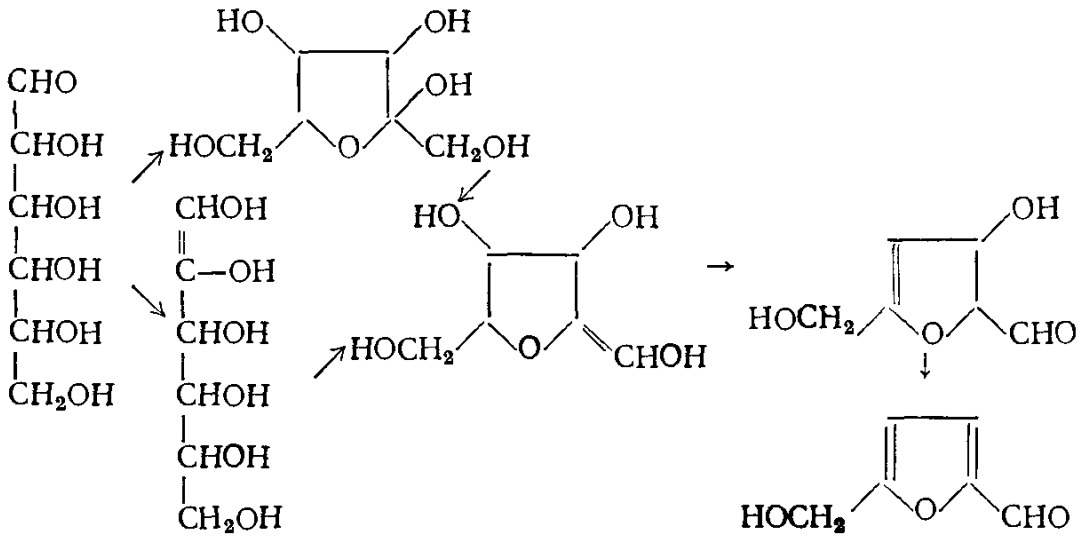
пентозы дают при этом фурфурол, 6-дезоксисахара (метилпентозы) —5-метилфурфурол, гексозы — 2-оксиметилфурфурол или 5-галоидметилфурфурол, которые далее распадаются с образованием левулиновой кислоты.





Это и используется для установления качественного различия между указанными типами моносахаридов. В настоящее время на нем основано также получение производных фурана в химической промышленности; для этой цели пентозансодержащее сырье (солома, шелуха подсолнуха, початки кукурузы и другие отходы) подвергают обработке кислотами, а образующаяся в результате гидролиза смесь пентоз далее в условиях реакции дегидратируется с образованием фурфурола.

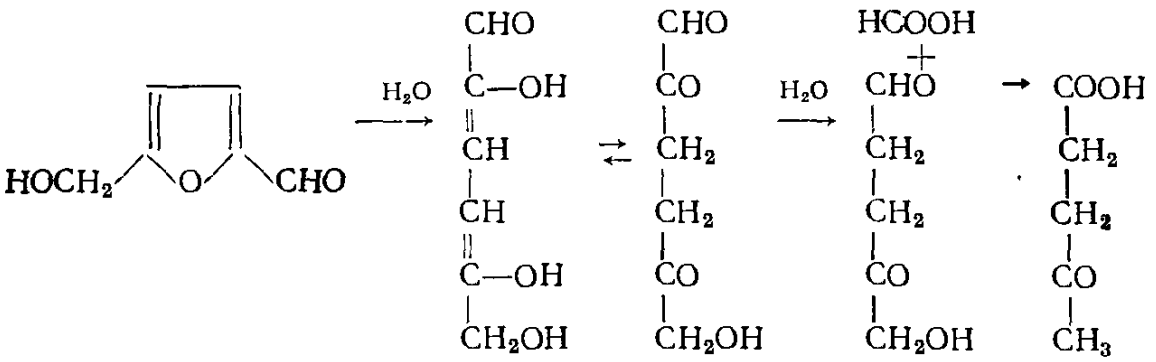
Механизм этого интересного и сложного превращения до настоящего времени еще не вполне ясен. Ближе всего к истине, по-видимому, схема, предложенная Хеуорзсом и Джонсом.



Эта схема предусматривает ступенчатую дегидратацию гексозы (альдозы или кетозы в циклической форме); первая фаза реакции непосред-

ственно или через диенол приводит к циклическому енолу, содержащему будущую альдегидную группу оксиметилфурфурола.

Механизм дальнейшего распада оксиметилфурфурола с образованием левулиновой кислоты может быть представлен схемой



Эта схема может считаться частично доказанной, в частности, доказано с использованием меченого углерода происхождение муравьиной кислоты.

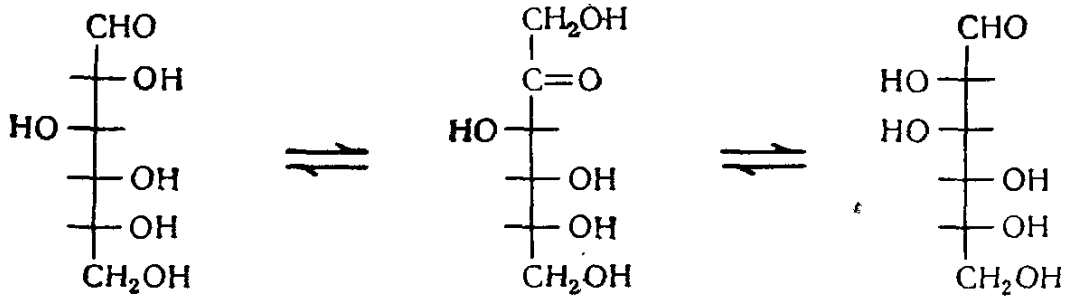
Однако последняя стадия процесса — превращение оксикетоальдегида в левулиновую кислоту — является чисто гипотетической и не имеет аналогий.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОНОСАХАРИДОВ СО ЩЕЛОЧАМИ

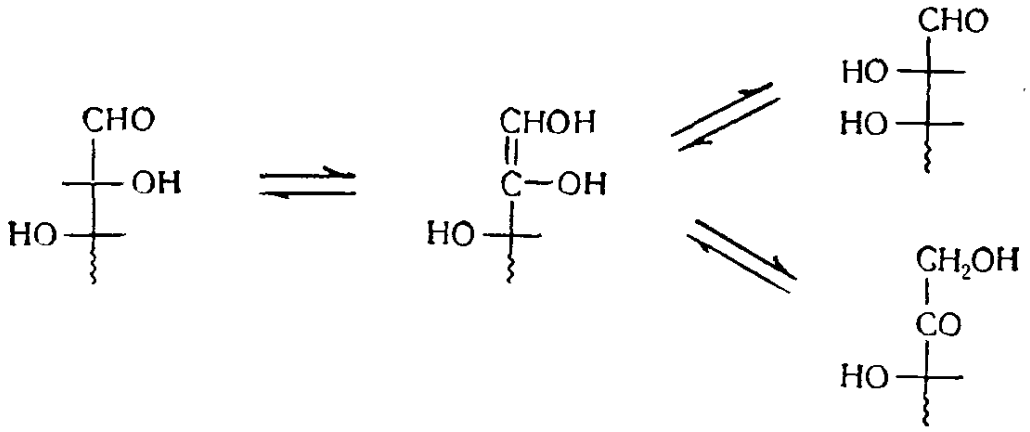
При действии едких щелочей и веществ основного характера углеводы способны к различным, часто очень сложным и запутанным превращениям, ход которых во многом еще не ясен. Тем не менее некоторые из этих реакций в настоящее время для моносахаридов достаточно хорошо разработаны и используются в синтетической химии.

Известные превращения углеводов под действием оснований могут быть разделены на три типа: 1) эпимеризация; 2) распад; 3) дисмутация.

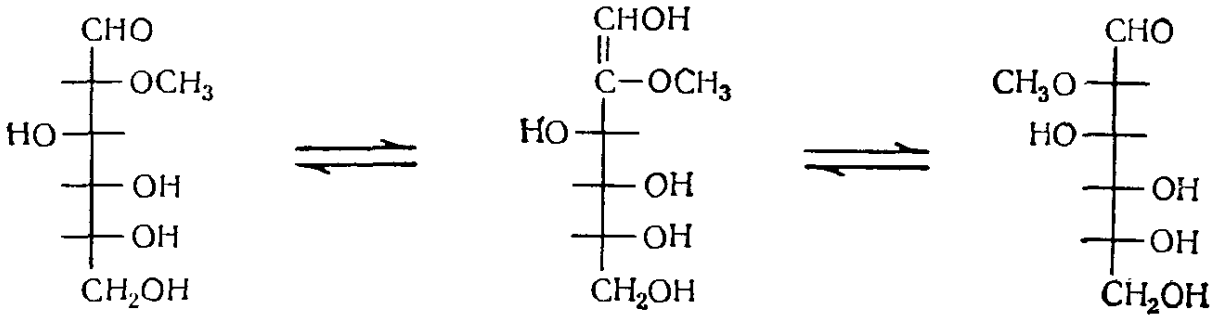
Эпимеризация моносахаридов происходит под действием разбавленных щелочей при комнатной температуре. Это превращение было открыто в 1895 г. Лобри де Брюином и Ван Экенштейном и в настоящее время подробно исследовано. Вместо едких щелочей часто применяют гидрат окиси кальция, гидрат окиси свинца, а также некоторые органические основания, например пиридин. Результат реакции сводится к эпимеризации моносахарида у второго углеродного атома, причем одновременно с этим может происходить и изомеризация альдозы в кетозу или наоборот. Другими словами, образуется равновесная смесь двух эпимерных у $C_{(2)}$ альдоз и кетозы, примером чего является равновесная смесь, которая может быть получена при действии щелочей на глюкозу, маннозу или фруктозу.



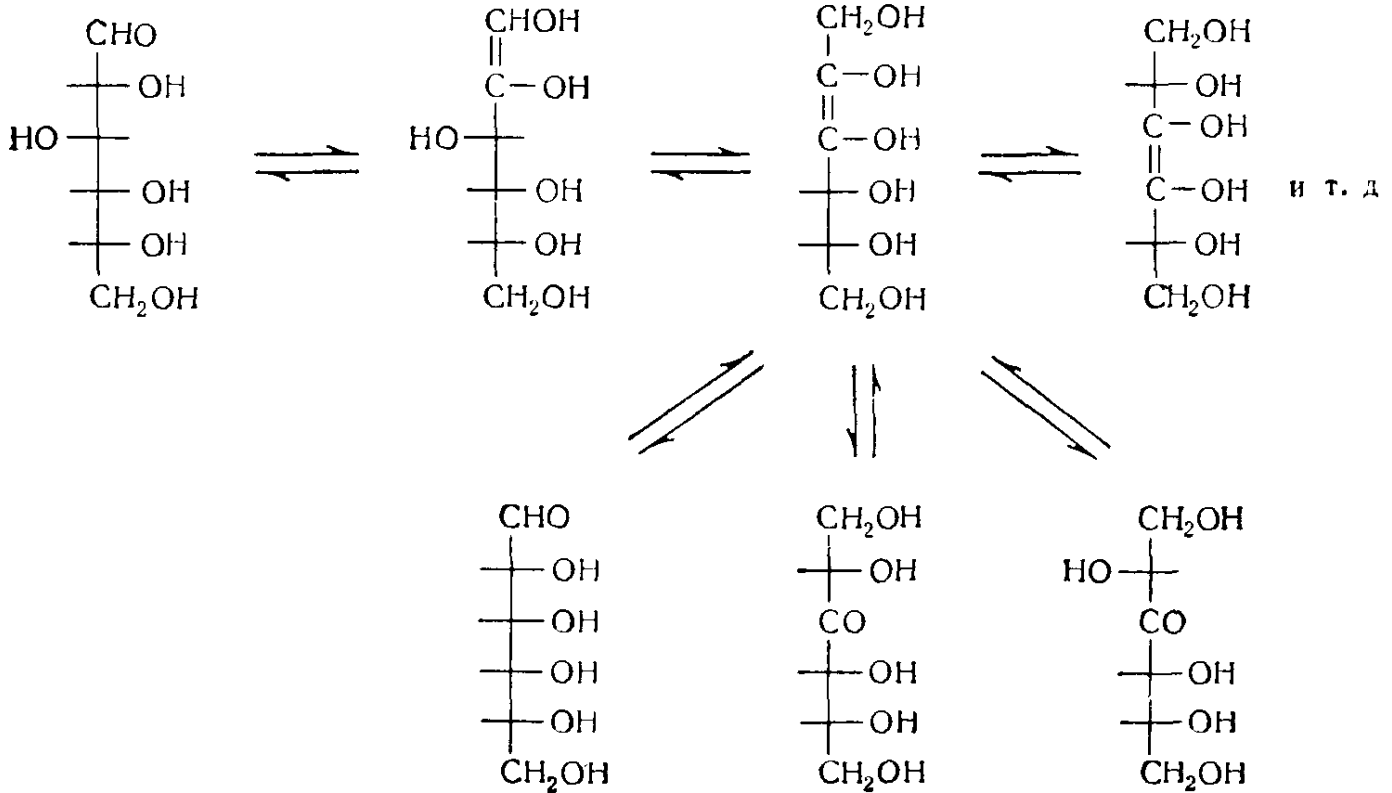
В такой равновесной смеси содержится 63% глюкозы, 31% фруктозы и 2,5% маннозы, однако на положении равновесия определенным образом сказывается природа основания. Механизм этого превращения связывают в настоящее время с предварительной енолизацией моносахарида и изображают схемой



В пользу такой схемы говорит результат воздействия щелочи на 2-метоксиглюкозу, которое приводит к образованию 2-метоксиманнозы в согласии со схемой, но совершенно не дает фруктозы.

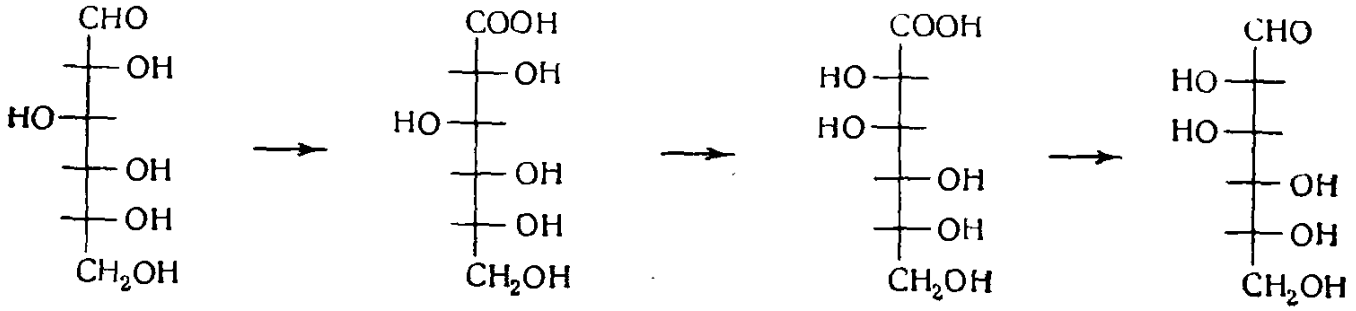


Естественно, что в соответствии с предложенным механизмом реакции Лобри де Брюина следовало бы ожидать эпимеризации не только $C_{(2)}$, но и у более удаленных от карбонильной группы атомов.



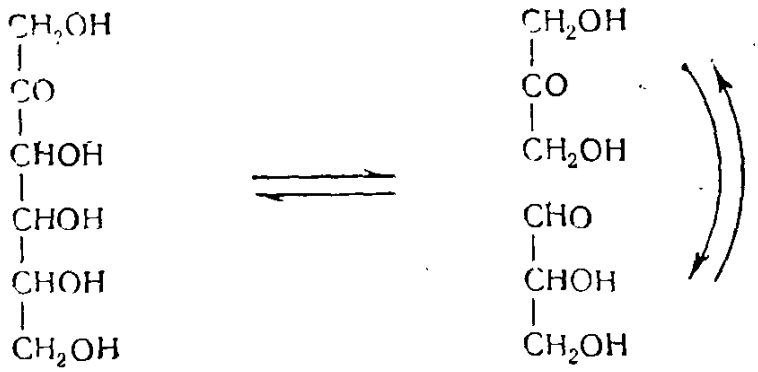
Действительно, подробные исследования показали, что в реакционной смеси в небольших количествах удается обнаружить такие продукты более глубокой эпимеризации исходного моносахарида.

В настоящее время эта реакция используется в препаративной практике для синтеза некоторых моносахаридов и их производных эпимеризацией у $C_{(2)}$. Наиболее удобный вариант метода состоит в эпимеризации альдоновых кислот в присутствии пиридина или хинолина.



Несмотря на лишние стадии, этот путь удобнее, так как эпимеризация кислот идет более гладко, а разделение полученной смеси эпимеров достигается легче.

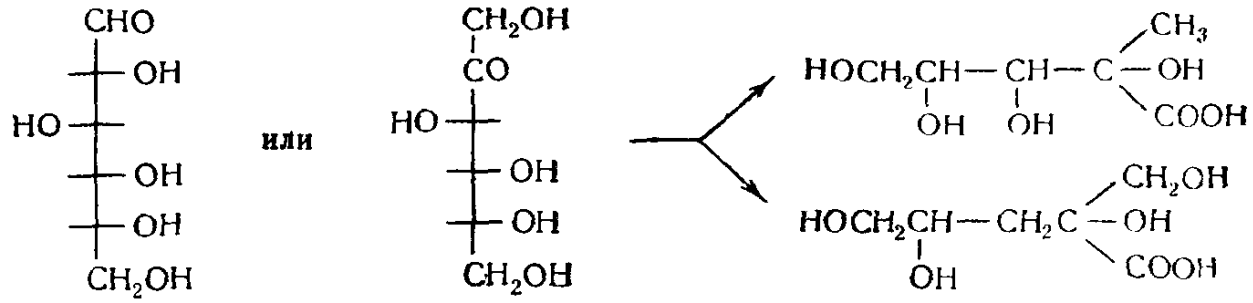
Распад моносахаридов происходит в более жестких условиях — под действием концентрированных щелочей, обычно при нагревании. Этот распад идет по типу реакции обратной альдольной конденсации.



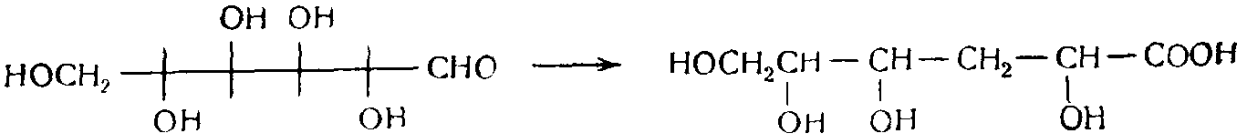
Реакция это обратима, так как можно осуществить синтез гексозы из смеси глицеринового альдегида и диоксиацетона, которые в присутствии щелочи также находятся в равновесии друг с другом. Молекула моносахарида под действием концентрированной щелочи может распадаться аналогичным образом и по другой схеме, образуя, например, формальдегид + пентозу, или гликолевый альдегид + тетрозу и т. д. Словом, молекула моносахарида может в этих условиях испытывать разрыв любой из своих углерод-углеродных связей. Точно так же моносахариды могут быть получены при любом сочетании исходных оксикарбонильных соединений. Крайним случаем такого синтеза является известная реакция Бутлерова — синтез смеси гексоз из простейшего карбонильного соединения — формальдегида — в присутствии гидроокиси кальция.

В обычных условиях реакция проходит по различным возможным направлениям и дает сложную и весьма трудно разделимую смесь продуктов распада, поэтому она не имеет препаративной ценности. Однако она весьма интересна тем, что представляет собой чисто химическую модель процесса, происходящего при гликолизе моносахаридов в животном организме.

Дисмутация моносахаридов происходит при длительном воздействии концентрированных щелочей. В результате реакции образуются так называемые сахариновые кислоты. Так, например, из глюкозы или фруктозы в этих условиях образуется смесь сахариновой и изосахариновой кислот

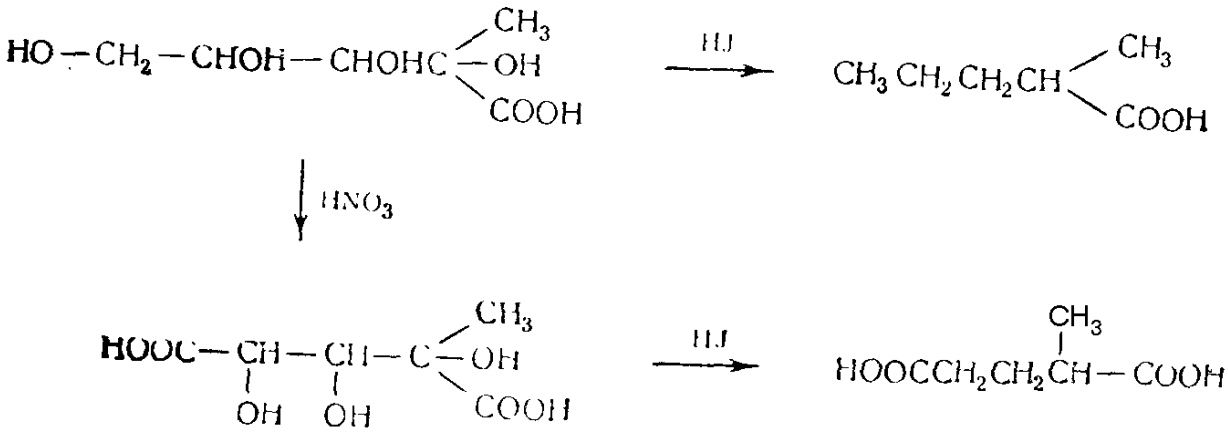


и галактозы — метасахариновая кислота:

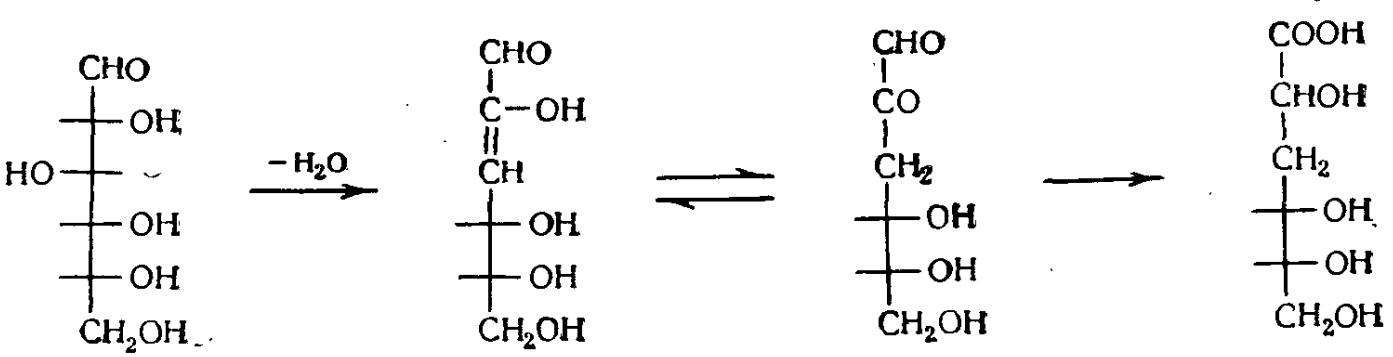


Строение сахариновых кислот было доказано обычными методами, когда помимо функционального анализа решающее значение для определения углеродного скелета молекулы имеет полное восстановление этих полиоксикислот иодистым водородом (в результате этой реакции образовываются соответствующие жирные кислоты), а также сочетание восстановления с окислением.

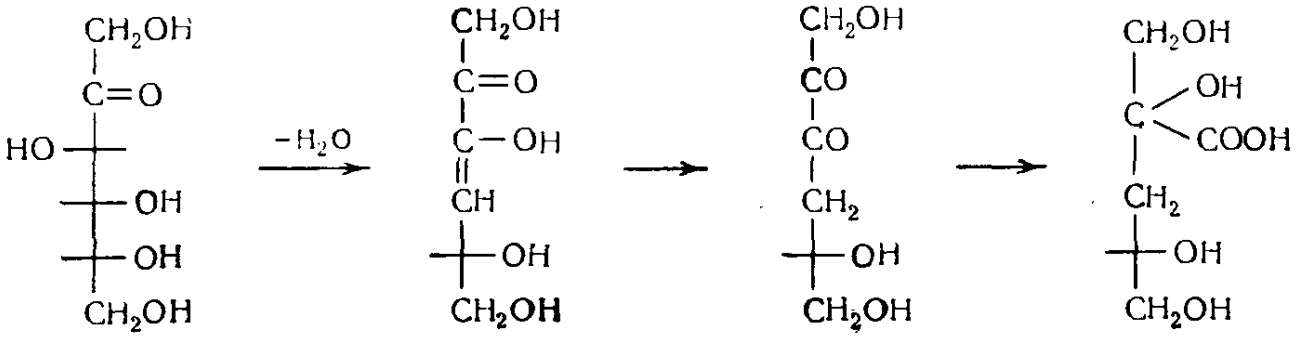
Строение скелета сахариновой кислоты ясно, например, из следующих превращений:



Реакция дисмутации представляет собою, как это совершенно очевидно, внутренний окислительно-восстановительный процесс в молекуле моносахарида, сопровождающийся перегруппировкой углеродного скелета. Истинный механизм этой реакции, иногда носящей название сахариновой перегруппировки, неясен. Наиболее принятым в настоящее время объяснением механизма реакции является объяснение, предложенное первоначально Нефом и в дальнейшем откорректированное Исбеллом. Этот механизм, лишь на отдельных стадиях, но далеко не полностью, подтвержденный с помощью меченых соединений, может быть для образования метасахариновой кислоты изображен схемой:



для образования изосахариновой кислоты схемой



Согласно этим схемам сама дисмутация происходит на конечной стадии реакции и связана с диспропорционированием α-кетоальдегида в первом случае или с перегруппировкой типа бензиловой кислоты для α-дикетона во втором случае. Эти реакции в настоящее время используются для синтетического получения некоторых производных углеводов, которые невозможно получить иным путем.

ЛИТЕРАТУРА

J. Green. The halogen oxydation of simple carbohydrates. Adv. carbohydrate chemistry, 1948, **3**, 129.

F. Newth. The formation of furan compounds from hexoses. Adv. carbohydrate chemistry, 1951, **6**, 83.

J. Sowden. The saccharinic acids. Adv. carbohydrate chemistry, 1957, **12**, 36.

J. Speck. The Lobry de Bruin — Alberda van Ekenstein transformation. Adv. carbohydrate chemistry, 1958, **13**, 63.

Глава 6

ДЕЗОКСИСАХАРА

Наряду с рассмотренными выше моносахаридами, которые можно было бы назвать моносахаридами нормального строения, существует довольно многочисленный и все разрастающийся класс углеводов, которые можно условно определить как моносахариды аномального строения в том смысле, что они не являются полиоксикарбонильными соединениями, содержащими у каждого из своих углеродных атомов кислородную функцию. К этому типу моносахаридов относятся так называемые дезоксисахара и аминосахара. Дезоксисахарами называют обычно моносахариды, которые по сравнению с нормальными лишены одного или двух, и очень редко большего числа, гидроксильных групп. Таким образом, молекулы дезоксисахаридов вместо обычных звеньев CH_2OH и CHOH могут содержать звенья CH_3 и CH_2.

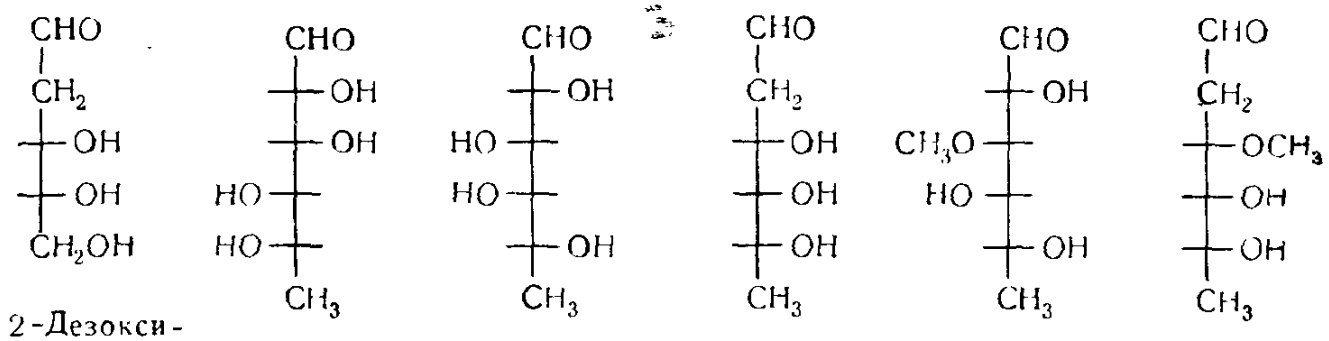
Дезоксисахара распространены в природе. Они являются почти обязательным компонентом природных сердечных гликозидов. Новым природным объектом, в котором богато представлены дезоксисахара, являются антибиотики, особенно недавно открытые и расшифрованные макролиды. Важным классом природных соединений, содержащих дезоксисахара, являются бактериальные сахара, а также дезоксирибонуклеиновые кислоты, в которых углеводной компонентой является дезоксирибоза. Эти кислоты — важный природный полимер, определяющий генетические характеристики живых организмов.

Дезоксисахара по своему поведению отличны от обычных моносахаридов, что делает целесообразным их отдельное рассмотрение. Для отличия дезоксисахаров от обычных углеводов существует ряд качественных реакций; наиболее часто применяется реакция Килиани — образование характерной синей окраски на поверхности раздела раствора испытуемого сахара в уксусной кислоте и нижнего слоя, содержащего растворенную в концентрированной серной кислоте соль трехвалентного железа. Характерной реакцией дезоксисахаров является образование при их окислении иодной кислотой, в зависимости от строения, ацетальдегида или малондиальдегида, которые не могут образоваться при окислении обычных моносахаридов. Ацетальдегид и малондиальдегид могут быть легко обнаружены качественными реакциями, в том числе и на бумажных хроматограммах, и этот метод также весьма часто применяется для распознавания дезоксисахаров.

Дезоксисахара, помимо обычных принципов деления (гексозы, пентозы, кетозы, альдозы и т. д.), различаются также по местоположению дезоксизвена: различают 2-дезокси-, 3-дезоксигексозы, -пентозы и т. д.

Хотя в принципе известны все типы дезоксисахаров, однако два

типа этих соединений представляют наибольший интерес: 2-дезоксисахара (2-дезоксиальдопентозы и 2-дезоксиальдогексозы), т. е. моносахариды, у которых отсутствует гидроксильная группа у соседнего с карбонильной группой звена, и 6-дезоксигексозы (называемые также метилпентозами), т. е. моносахариды, у которых место крайней первичноспиртовой группы занимает метильная группа. Важное значение имеют также дидезоксисахара, у которых отсутствуют две гидроксильные группы; особенно интересны 2,6-дидезоксигексозы, которые входят в состав сердечных гликозидов. Ниже приводятся формулы нескольких наиболее часто встречающихся дезоксисахаров.

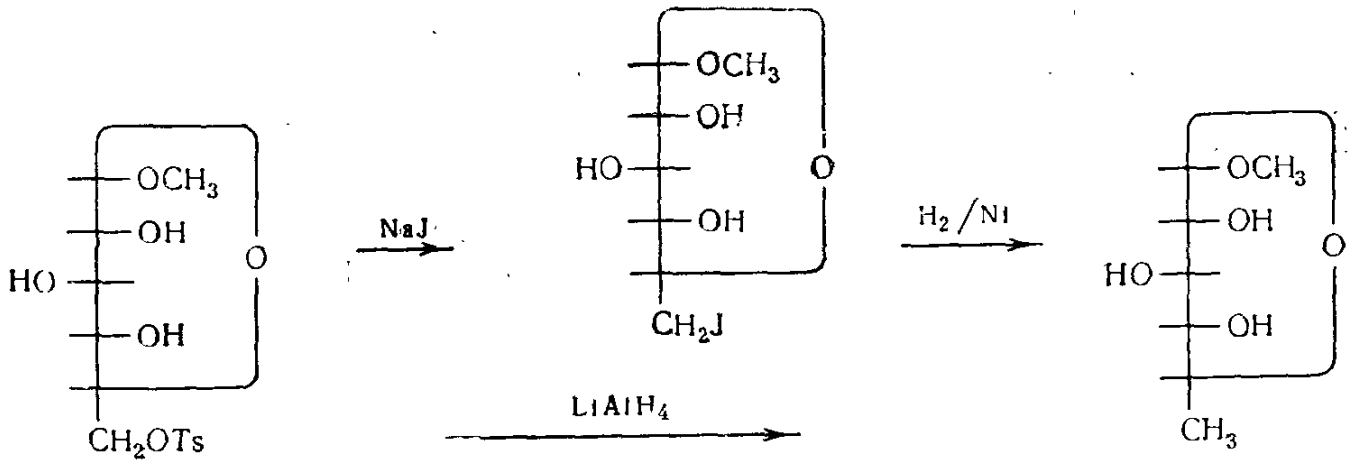


2-Дезокси-D-рибоза L-Рамноза D-Фукоза Дигитоксоза Дигиталоза Цимароза

МЕТОДЫ СИНТЕЗА ДЕЗОКСИСАХАРОВ

Методы синтеза дезоксисахаров различаются в зависимости от того, о каком типе дезоксисахаров идет речь.

6-Дезоксигексозы (метилпентозы) или 5-дезоксипентозы получают в настоящее время единственным методом — через 6- (или соответственно 5-) тозильные производные моносахаридов. Для этого последние либо непосредственно восстанавливают алюмогидридом лития, либо переводят действием иодистого натрия в соответствующие иодиды, которые затем подвергают каталитическому восстановлению. В качестве примера можно привести синтез 6-дезоксиглюкозы.

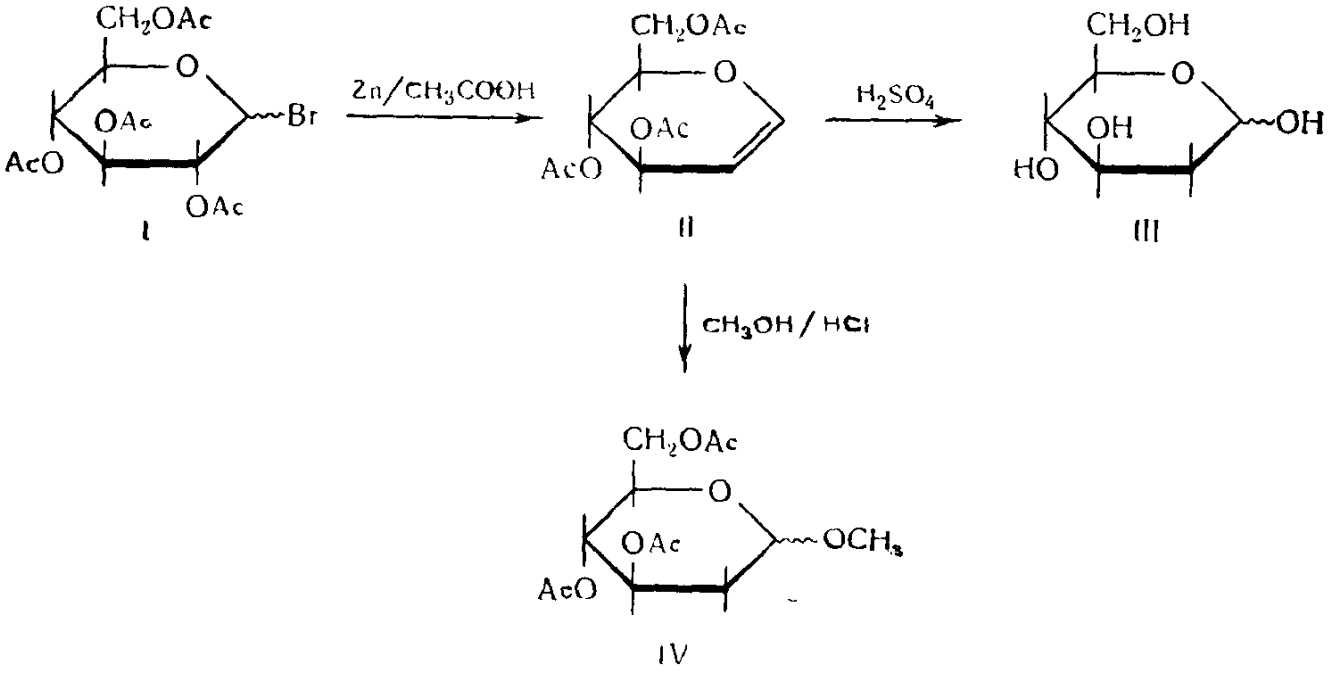


Исходные тозилаты, как указывалось (стр. 73), могут быть получены либо тозилированием должным образом защищенного моносахарида, либо непосредственным тозилированием свободного сахара в определенных условиях, обеспечивающих тозилирование только первичной гидроксильной группы.

Как уже рассматривалось ранее (стр. 74), тозилаты вторичных спиртов не способны к обмену тозильной группы на атом иода, а при восстановлении дают только гидроксильные производные, поэтому тозилатный метод не пригоден для синтеза дезоксисахаров другого типа, например, для получения 2-дезоксисахаров.

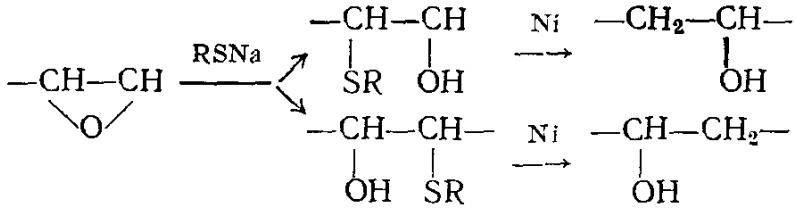
Синтез 2-дезоксисахаров, который несколько более трудоемок, может проводиться различными методами, из которых три имеют наибольшее значение: синтез через гликали, синтез через α-ангидросахара и метод Фишера — Саудена.

Синтез через гликали на примере синтеза 2-дезоксиглюкозы может быть изображен следующей схемой:



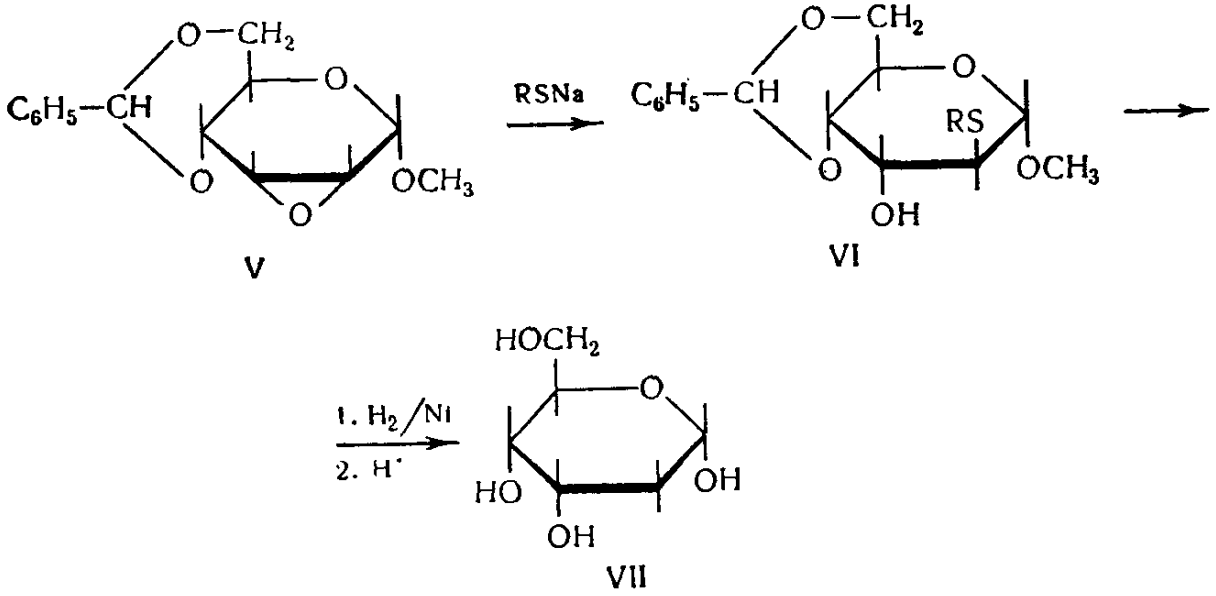
При обработке ацетилгликозилбромида (I) цинком и уксусной кислотой образуется непредельное соединение (II), которое называется гликалем (соответственно глюкаль, галакталь, арабиналь и т. д.). Последний при гидратации в присутствии серной кислоты дает 2-дезоксисахар, а при обработке спиртовым раствором хлористого водорода — гликозид соответствующего 2-дезоксисахара. Этот метод является наиболее удобным и часто применимым, но, естественно, годится только для синтеза 2-дезоксисахаров.

Универсальный, хотя и достаточно сложный метод синтеза дезоксисахаров основан на использовании реакции раскрытия окисного кольца в α-ангидросахарах. Идея этого метода, разработанного Рейхштейном, видна из следующей схемы:



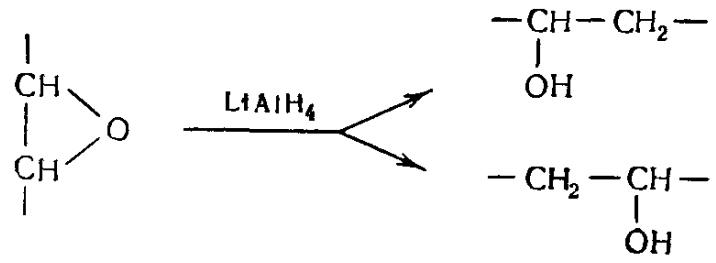
Наиболее слабым местом этого синтеза является возможность неоднозначного раскрытия окисного кольца, что должно далее привести к смеси двух дезоксисахаров, разделение которых очень сложно. Указывается, что во многих случаях α-окись раскрывается однозначно, однако это положение нельзя считать твердо установленной закономерностью, и полученный результат в каждом случае нуждается в серьезной и трудоемкой проверке.

Однако, если исходная α-окись доступна, этот метод синтеза является достаточно удобным. Примером его применения является синтез 2-дезоксиаллозы.



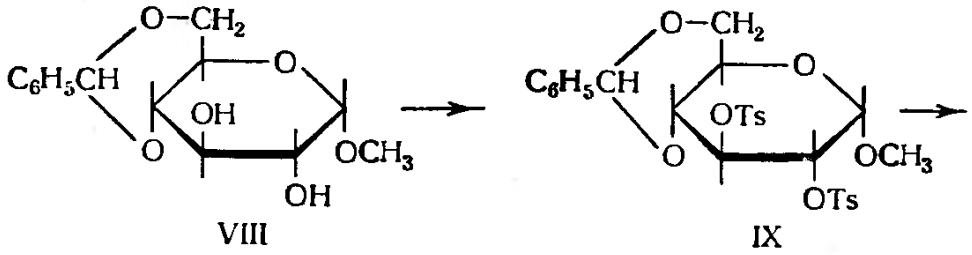
Бензилиденовое производное 2,3-ангидро-α-метил-D-аллозида (V) при взаимодействии с меркаптаном дает тиосахар (VI), имеющий у $C_{(3)}$—$C_{(6)}$ конфигурацию аллозы (альтрозы). При жестком гидрировании (VI) одновременно происходят гидрогенолиз связи сера-углерод у $C_{(2)}$, в результате чего образуется дезоксизвено, и гидрогенолиз бензилиденовой группировки у $C_{(4)}$—$C_{(6)}$. После кислого гидролиза образуется свободный дезоксисахар (VII). Нужно отметить, однако, что обычно исходная α-окись гораздо менее доступна, чем в указанном выше примере, что сильно затрудняет практическое использование этого метода.

Позднее Принс модифицировал этот метод синтеза дезоксисахаров, применив вместо раскрытия окисного кольца меркаптаном восстановление окиси алюмогидридом лития, что дает возможность получить дезоксисахар непосредственно из окиси. Хотя этот вариант синтеза делает его более удобным, однако он не устраняет главного недостатка — неоднозначного раскрытия окисного кольца и образования смеси двух дезоксисахаров.

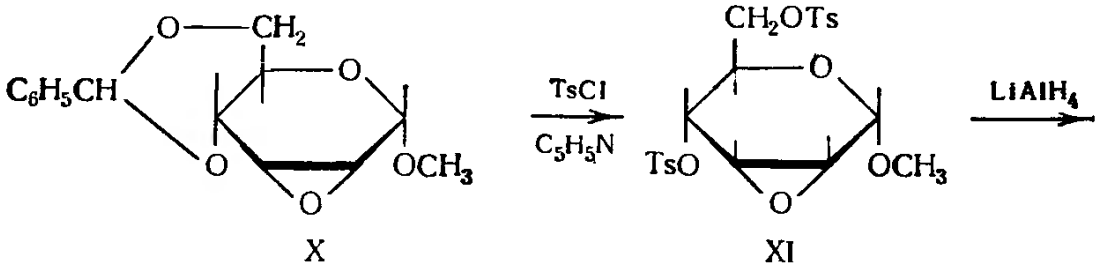


Для синтеза более сложных дезоксисахаров, таких, как дидезоксисахара, входящие в состав сердечных гликозидов, обычно используют комбинацию обоих приведенных выше методов. В качестве типичного примера можно привести синтез цимарозы (см. стр. 120).

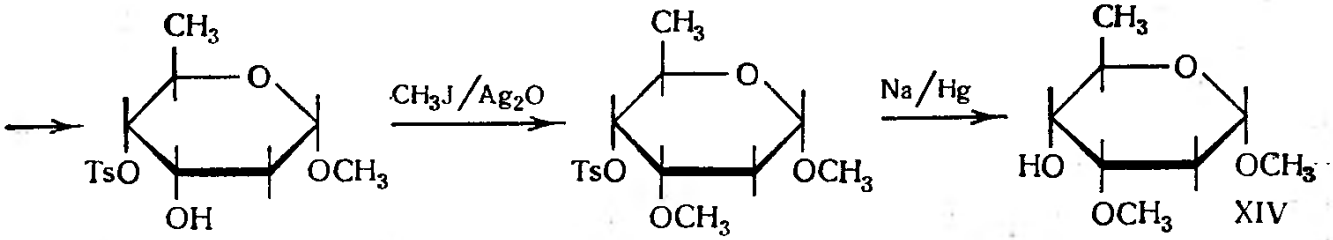
Исходным веществом для синтеза цимарозы является также бензилиденовое производное 2,3-ангидрометилаллозида (X), получающееся из 4,6-бензилиденметилглюкозида (VIII) через дитозилат (IX), который при обработке щелочью дает (X). Дальнейшее тозилирование окиси в особых условиях приводит к снятию бензилиденовой защиты и получению тозилированной окиси (XI); при восстановлении (XI) алюмогидридом лития разрывается окисное кольцо и гидрогенизуется тозильная группа у $C_{(6)}$, в результате чего образуется тозилат дидезоксисахара (XII). Метилирование единственного свободного гидроксила в (XII) и



VIII IX



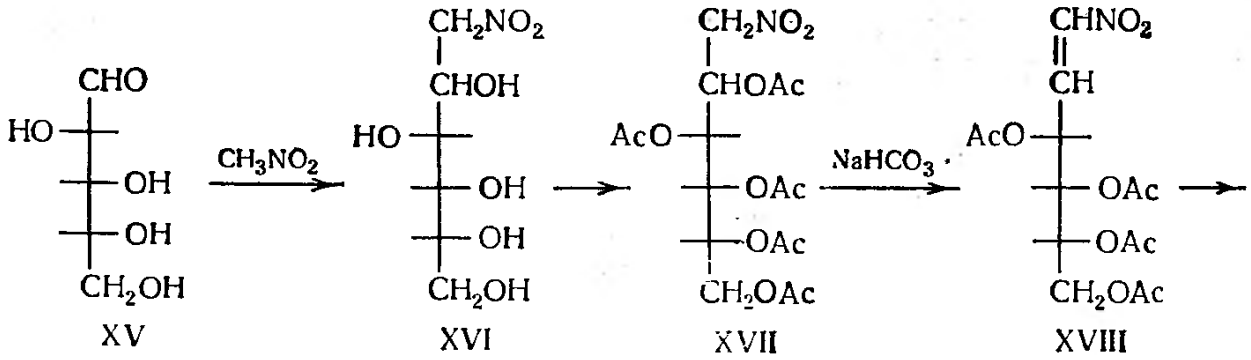
X XI



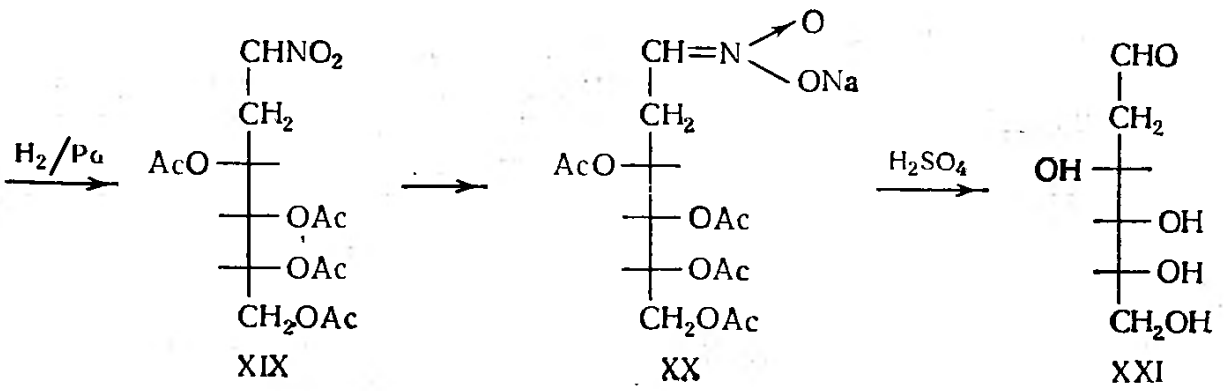
XII XIII XIV

заключительное отщепление тозильной группы в метилированном производном (XIII) дает метилгликозид цимарозы (XIV).

Сравнительно недавно Фишером и Сауденом был предложен новый, чисто синтетический путь получения 2-дезоксисахаров, который на примере синтеза 2-дезоксиглюкозы может быть представлен схемой.



XV XVI XVII XVIII



XIX XX XXI

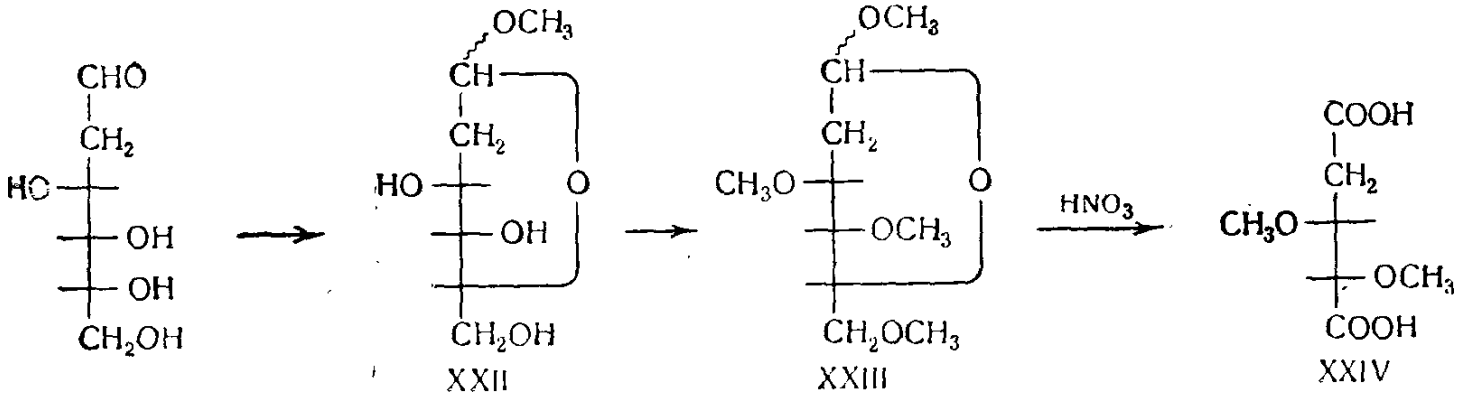
Как видно, здесь используется тот же прием, что и при наращивании цепи в моносахаридах по Фишеру — Саудену, описанный ранее (стр. 22).

Конденсацией низшего сахара, в данном случае арабинозы (XV), с нитрометаном получается нитроспирт (XVI), который после ацетилирования и обработки ацетата (XVII) бикарбонатом натрия дает непредельное нитросоединение (XVIII). Гидрирование (XVIII) над палладием насыщает двойную связь, не затрагивая нитрогруппы, и полученное насыщенное нитропроизводное (XIX) в виде натриевой соли (XX) подвергается обработке серной кислотой. В результате происходящего распада по Нефу образуется альдегидная группа и получается дезоксисахар (XXI).

Как видно из приведенного материала, все методы синтеза дезоксисахаров имеют серьезные ограничения, не позволяющие использовать их для синтеза дезоксисахара любой заданной структуры. Для развития такого метода необходимо иметь реакцию, позволяющую в подходящих условиях заменять на водород любую гидроксильную группу моносахарида. Однако до сих пор подобные методы отсутствуют.

СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ДЕЗОКСИСАХАРОВ

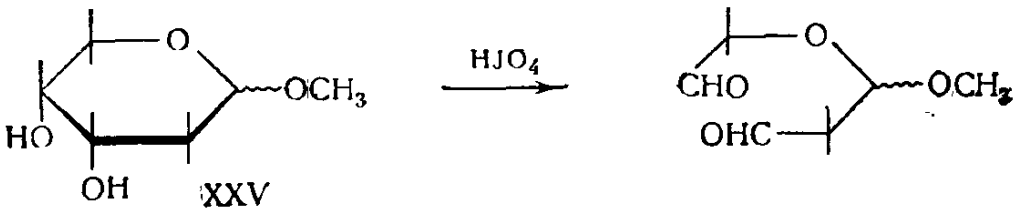
Строение дезоксисахаров устанавливается обычными методами, применяемыми в структурной химии углеводов. Для выяснения строения и частично конфигурации дезоксисахаров может быть привлечен метод Хеуорзса — метилирование с последующим окислением. Так, например, строение 2-дезоксиглюкозы становится ясным из такой последовательности реакций:



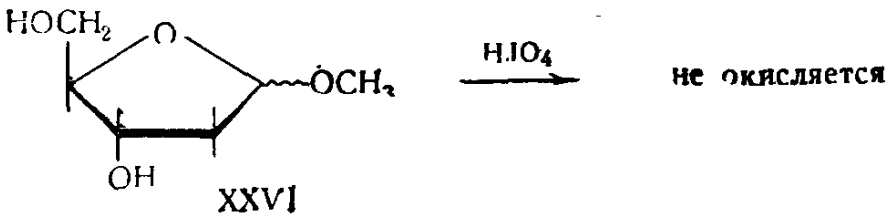
Метил-2-дезоксиглюкозид (XXII) после метилирования и окисления метильного производного (XXIII) азотной кислотой дает α,β-диметоксиглутаровую кислоту (XXIV), что доказывает местоположение «дезоксизвена» и структуру дезоксисахара. Конфигурация полученной диметоксиглутаровой кислоты определяет и конфигурацию исходного дезоксисахара.

Многие вопросы строения дезоксисахаров можно решить, исходя из данных окисления иодной кислотой. Как уже указывалось выше, образование при этом малондиальдегида и ацетальдегида может служить качественным указанием на присутствие дезоксисахара. С помощью окисления иодной кислотой можно определить величину окисного кольца. Таким образом, для решения вопроса о строении дезоксисахаров метод используется так же, как для решения вопроса о строении обычных моносахаридов. В качестве важного примера использования этого метода можно привести определение размеров окисного кольца в производных 2-дезоксирибозы, которое в настоящее время широко применяется в химии нуклеотдиов. Ясно, что гликозид с пиранозным кольцом — метил-2-дезоксирибопиранозид (XXV) — поглотит один моль иодной кислоты, не образуя при этом ни муравьиной кислоты, ни фор-

мальдегида, а фуранозное производное — метил-2-дезоксирибофуранозид (XXVI) — вовсе не будет окисляться иодной кислотой.

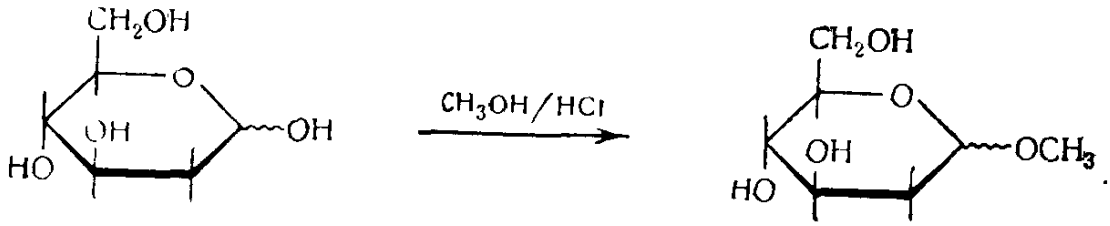


XXV



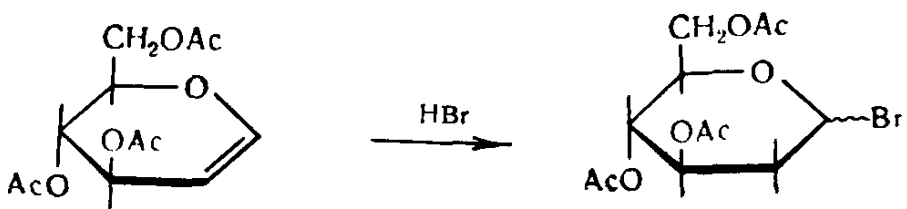
XXVI

В основных чертах химическое поведение дезоксисахаров не отличается от поведения обычных углеводов. Так, они образуют, хотя иногда и с большим трудом, обычные производные по карбонильной группе (гидразоны, оксимы, ацетали) и гидроксильным группам (простые и сложные эфиры, изопропилиденовые, бензилиденовые производные и т. д.). Однако в поведении дезоксисахаров, и особенно наиболее важных 2-дезоксисахаров, можно отметить и существенные особенности. Наиболее важны и интересны характерные отличия в поведении гликозидных производных 2-дезоксисахаров. При обработке дезоксисахара спиртом в присутствии галоидоводородной кислоты образуется, как обычно, разновесная смесь аномерных гликозидов. Например,



Однако, в отличие от обычных моносахаридов, гликозидация здесь происходит крайне легко. Так, образование метилгликозида 2-дезоксиглюкозы заканчивается в течение 15 мин. и требует присутствия лишь 0,25% хлористого водорода. Вместе с тем и омыление гликозидов 2-дезоксисахаров происходит гораздо быстрее гидролиза обычных гликозидов.

Весьма серьезное обстоятельство, сильно осложняющее синтез производных 2-дезоксисахаров, связано с особенностями их ацилгалогенидов, которые являются, как это указывалось ранее (стр. 70), главными исходными веществами для синтеза различных O- и N-гликозидов. Указанные ацил-2-дезоксигликозилгалогениды могут быть получены присоединением соответствующего галоидоводорода к ацетилированному гликалю.



Получаемые таким способом ацилгелогениды отличаются неустойчивостью, и выделение их в чистом виде удалось лишь в одном-двух случаях; поэтому работа с ними весьма затруднена. Вторая особенность, которая должна быть учтена при синтетическом использовании ацилгалогенидов, состоит в том, что при реакциях обмена атома галоида в этих производных отсутствует стерическая направленность, в результате чего образуется смесь α- и β-гликозидов. Эта особенность связана с отсутствием заместителя у соседнего C -атома, вследствие чего отсутствует его влияние («эффект соучастия») на стереохимию замещения, и получаются оба аномера. Это делает крайне затруднительным направленный синтез гликозидов 2-дезоксисахаров с заданной конфигурацией, соответствующей природным соединениям.

Указанные особенности поведения дезоксисахаров и некоторые другие являются причиной того, что дезоксисахара, несмотря на их значительную биологическую роль, изучены значительно хуже углеводов обычного типа.

ЛИТЕРАТУРА

R. Elderfield. The carbohydrate components of the cardiac glucosides. Adv. carbohydrate chemistry, 1946, **1**, 147.

W. Overend, M. Stacey. The chemistry of 2-deoxysugars. Adv. carbohydrate chemistry, 1953, 8, 45.

T. Reichstein. Die Zucker der herzaktiven Glykoside. IV Inter. congr. biochemistry, 1958, **1**, 124.

Глава 7

МОНОСАХАРИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ АЗОТ, И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ

Производные углеводов, содержащие азот, играют исключительно важную биологическую роль, которая во многих случаях еще далеко не может считаться выясненной до конца. Однако достаточно указать на такие азотсодержащие производные углеводов, как гликопептиды, к которым относятся важнейшие природные полимеры, содержащие одновременно углеводы и аминокислоты, полисахариды, в состав которых наряду с обычными моносахаридами входят аминосахара и, наконец, нуклеиновые кислоты, чтобы понять ту ответственную биологическую роль, которая принадлежит соединениям этого типа.

Азотистые производные моносахаридов являются теми первичными кирпичами, из которых строятся далее более сложные, иногда исключительно сложные полимеры. Все азотистые производные моносахаридов являются соединениями, в которых первичная, вторичная, третичная аминогруппа или ее производное занимает место того или иного гидроксила в обычном моносахариде. Если аминогруппа занимает место одной из спиртовых гидроксильных групп моносахарида, то такие соединения называются аминосахарами. В отличие от этого азотистые производные, полученные замещением гликозидного гидроксила на аминогруппу или замещенную аминогруппу, называют обычно гликозиламинами или N-гликозидами. Поскольку методы получения и свойства этих обоих классов соединений в значительной мере отличаются друг от друга, их целесообразно рассматривать отдельно.

АМИНОСАХАРА

В зависимости от того положения, которое занимает аминогруппа в молекуле, различают 2-амино-, 3-амино-, 4-аминосахара и т. д. По более строгой номенклатуре их называют обычно аминодезоксисахарами, подчеркивая, что аминогруппа занимает место отсутствующего гидроксила, например, 2-амино-2-дезоксиглюкоза, 3-амино-3-дезоксирибоза и т. д. Тривиальная номенклатура аминосахаров исходит из корня названия соответствующего моносахарида, к которому добавляют окончание «амин», например, глюкозамин, галактозамин и т. д. В обеих системах номенклатура охватывает и стереохимию, подразумевая, что конфигурация у углеродного атома, несущего аминогруппу, соответствует конфигурации обычного моносахарида.

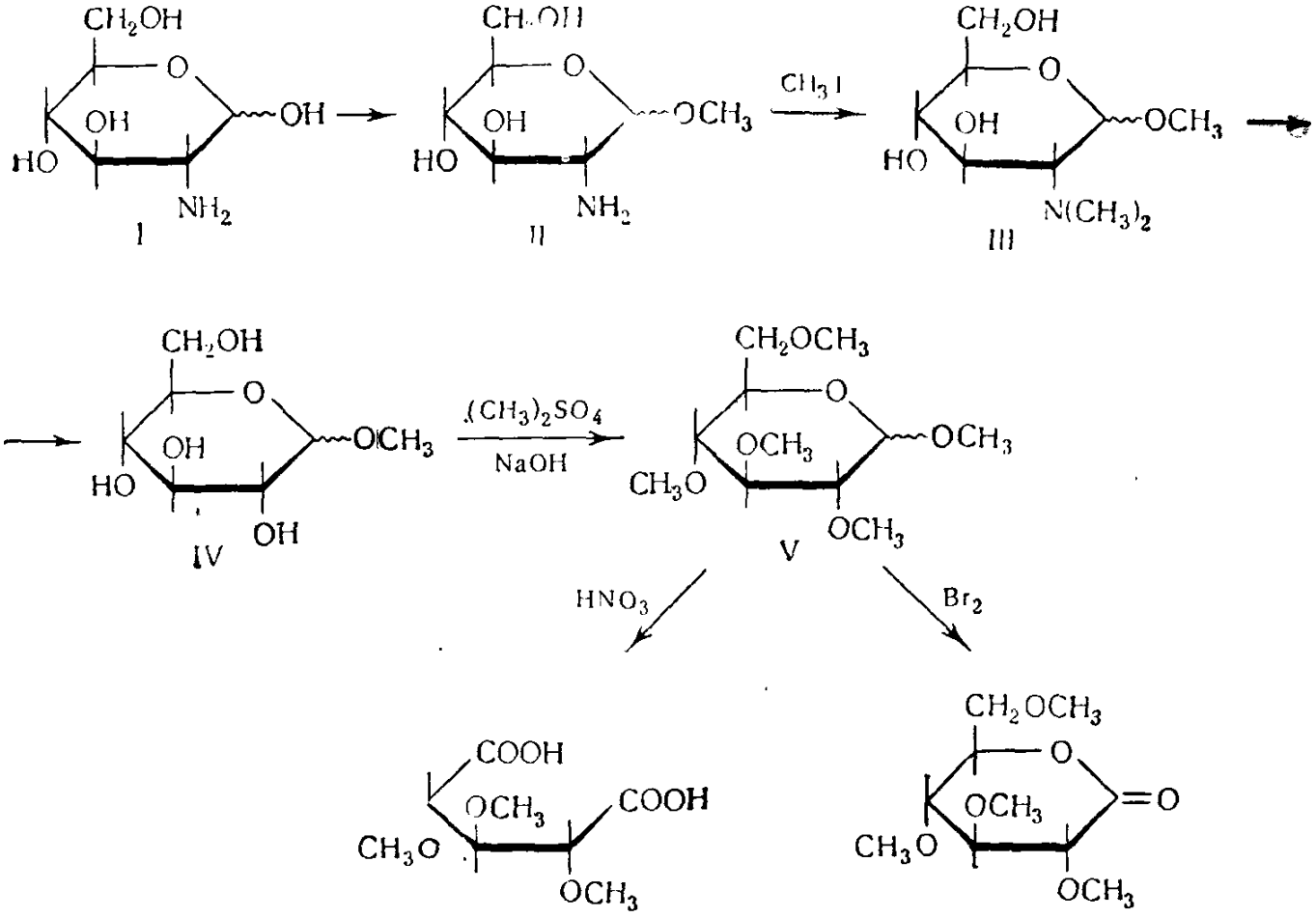
Из перечисленных выше типов аминосахаров наибольшее значение имеют 2-аминосахара, которые изучены лучше других; хорошо известны также 6-аминосахара, многие представители которых найдены в различ-

ных антибиотиках. В самое последнее время также в антибиотиках найдены многочисленные представители дезоксиаминосахаров, т. е. таких моносахаридов, которые являются одновременно аминосахарами и дезоксисахарами. Этот тип соединений проявляет свойства, характерные для обоих классов, и не будет рассматриваться в этой книге.

2-Аминосахара входят в состав полисахаридов различного происхождения (полисахариды плазмы крови, иммунополисахариды, полисахариды, выделенные из хрящей, покрытий насекомых и т. д.).

Для доказательства строения аминосахаров привлекаются те же методы, что и при исследовании обычных моносахаридов, причем наибольшие трудности представляют вопросы стереохимии. В качестве примера можно рассмотреть установление строения наиболее важного из аминосахаров — глюкозамина (2-амино-2-дезоксиглюкозы), который в виде полисахарида хитина составляет основу наружного покрытия раков, крабов, майских жуков и т. д.

Глюкозамин дает нормальные реакции на альдегидную группу (восстановление окисной соли меди, окисление бромной водой в соответствующую кислоту и др.) и образует с фенилгидразином озазон, получаемый также из глюкозы или маннозы. Из этих фактов следует, что глюкозамин является гексозой, содержащей вместо гидроксила аминогруппу в положении 2. Размер окисного кольца в глюкозамине был установлен на основании следующего ряда реакций:



Глюкозамин (I) переводился в гликозид (II), в котором при обработке иодистым метилом метилировалась аминогруппа и получалось диметиламинопроизводное (III). Последнее при обработке гидроокисью бария переходило в метилглюкозид (IV), который затем метилировался по Хеуорзу в (V). Окислением его обычными методами было показано, что он является пиранозидом. Поскольку ни на одной из предыдущих стадий, в том числе и при переходе от диметиламинопроизводного (III) к (IV), не могло произойти изомеризации кольца, так как во всех случа-

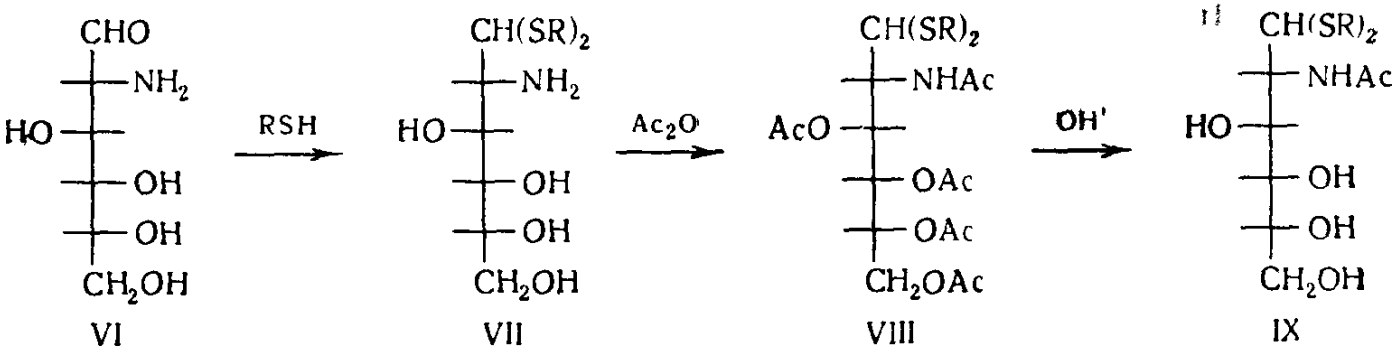
ях была нейтральная или щелочная среда, то, очевидно, и исходному гликозиду глюкозамина соответствовала пиранозидная структура

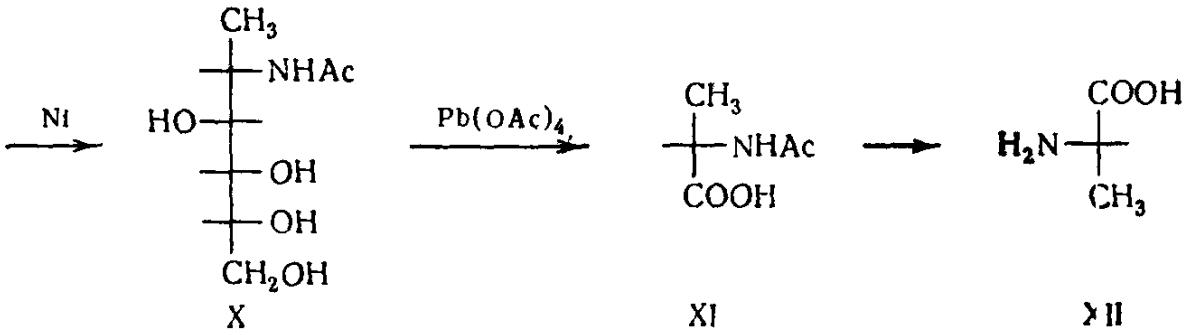
Аналогичным путем было установлено строение и другого важнейшего аминосахара — галактозамина, широко распространенного в виде сульфаминопроизводного в полисахариде, выделенном из хрящей Галактозамин тоже давал реакцию на альдегидную группу и образовывал озазон, получаемый также из галактозы или талозы Размер кольца определялся так же, как у глюкозамина

Все эти реакции, однако, не помогали выяснению вопроса о конфигурации углеродного атома, связанного с аминогруппой

Этот вопрос представлялся наиболее трудным, так как прямая замена аминогруппы на гидроксил (например, при обработке азотистой кислотой) может идти как с обращением, так и с сохранением конфигурации и сопровождаться образованием ангидросахара Так, например, бензилиденовое производное глюкозамина дает при такой замене производное маннозы напротив, упомянутый выше метилгликозид N, N-диметилглюкозамина (III) при обработке едким баритом дает производное глюкозы. Вследствие этого для доказательства конфигурации у $C_{(2}$ можно использовать только прием, который не связан с какой-либо обменной реакцией у этого атома

Конфигурация глюкозамина совершенно однозначно была доказана следующим способом

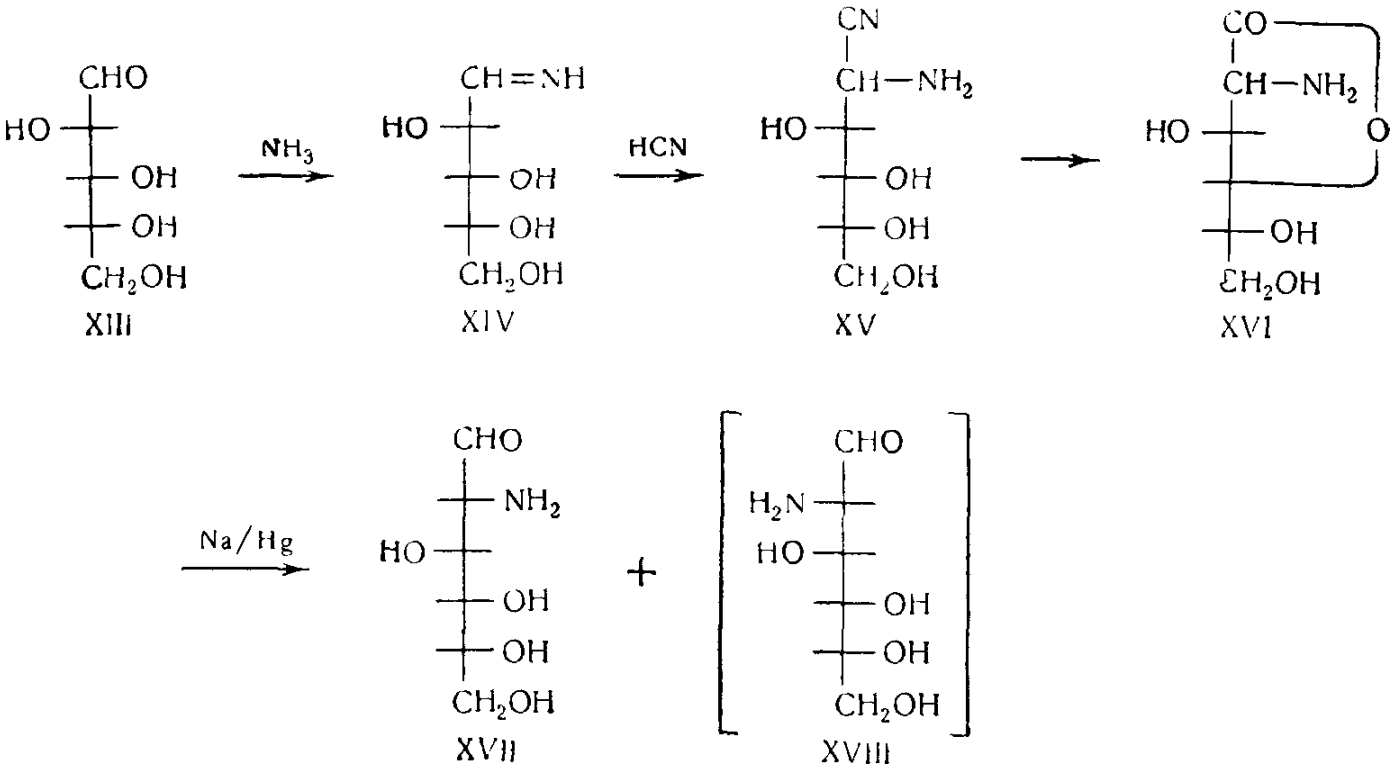




Глюкозамин (VI) переводился обычным методом в меркапталь (VII), последний ацетилировался уксусным ангидридом, и полученный пентаацетат меркапталя (VIII) при обработке щелочью подвергался гидролизу, причем омылялись только сложноэфирные группировки, в результате чего образовывалось N-ацетильное производное меркапталя (IX) Последнее при обработке скелетным никелем переходило в N-ацетиламинополиол (X) Заключительной стадией всей схемы доказательства являлось окисление тетраацетатом свинца, которое разрушало молекулу, сохраняя лишь один асимметрический центр у $C_{(2)}$ Полученный при этом N-ацетилаланин (XI) после гидролиза дал -аланин Поскольку ни на одной из стадий этого превращения не могло произойти обращения конфигурации, то конфигурация полученного аланина соответствовала

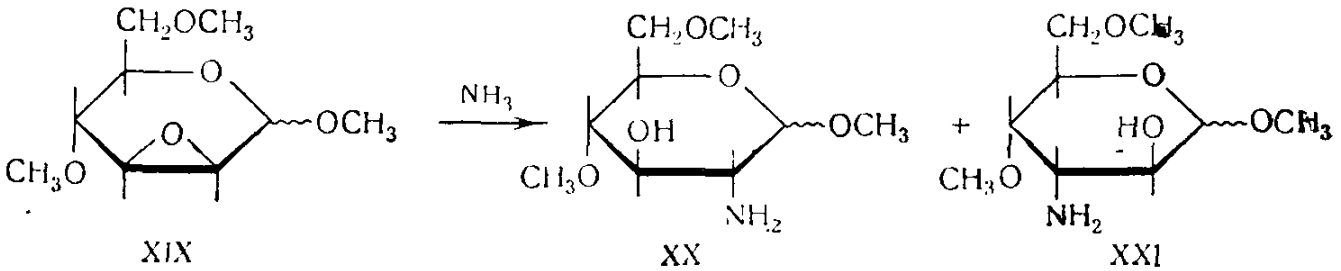
конфигурации $C_{(2)}$ у исходного глюкозамина, и, следовательно, конфигурация последнего соответствовала конфигурации глюкозы. Это заключение было подтверждено при синтезе глюкозамина; конфигурация галактозамина была выяснена только синтезом этого соединения (см. ниже).

Простейший синтез 2-аминосахаров представляет собою сочетание синтеза Килиани и циангидринного синтеза α-аминокислот. Синтез глюкозамина был осуществлен по следующей схеме:

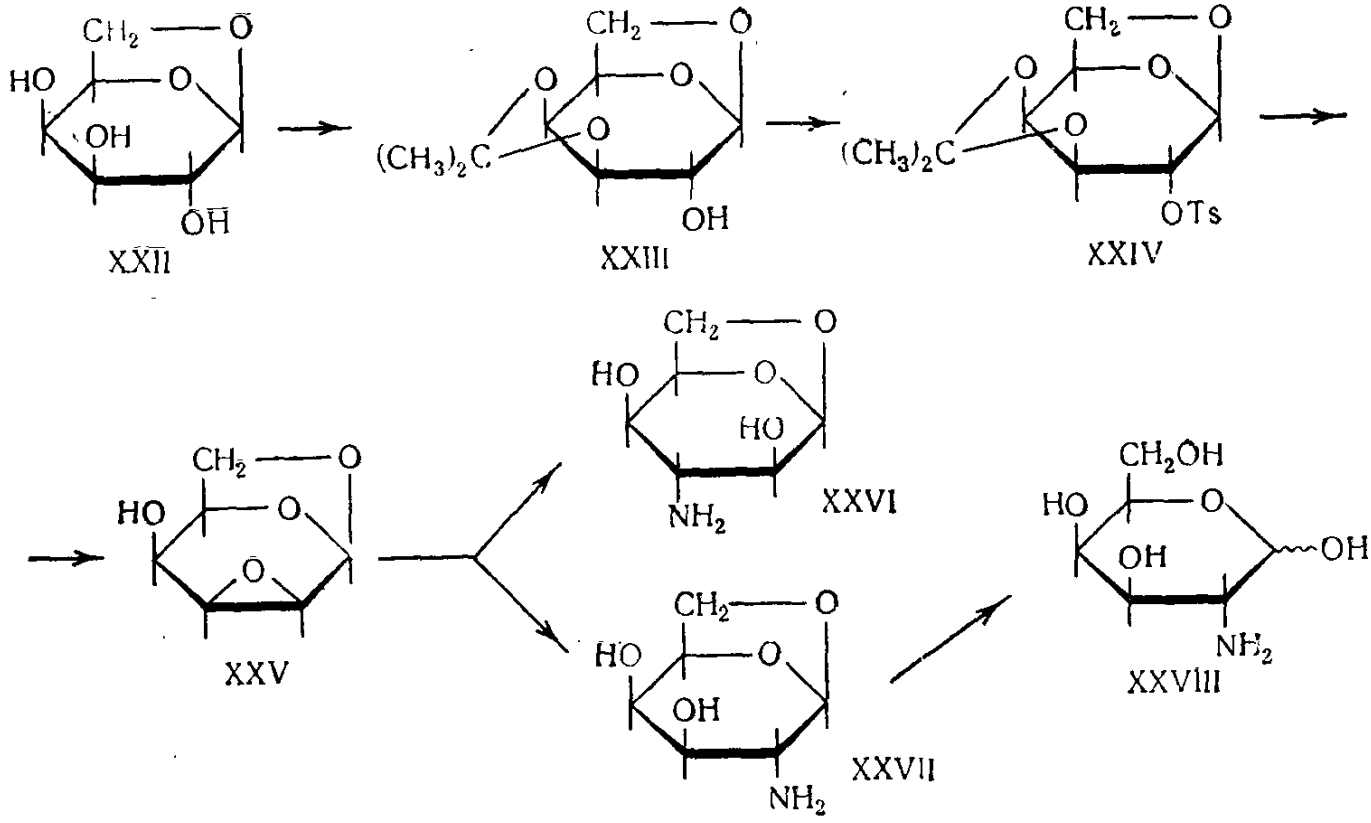


При действии аммиака на арабинозу (XIII) получается альдимин (XIV), одна из таутомерных форм арабинозиламина; последний действием синильной кислоты переводится в аминонитрил (XV), который омыляется, а полученный аминолактон (XVI) при восстановлении амальгаммой натрия дает 2-аминосахар (XVII). Как и при синтезе Килиани, на стадии циангидринового синтеза образуется два диастереомерных аминонитрила (XV), в результате чего в конечном счете получается смесь глюкозамина (XVII) и маннозамина (XVIII). Это обстоятельство является главным недостатком метода, так как разделение диастереомеров на одной из стадий представляется достаточно затруднительным. Кроме того, этот метод синтеза не пригоден для решения сложного вопроса о конфигурации аминосахаров у $C_{(2)}$, так как образуется смесь обоих аномеров, и однозначное решение вопроса посредством синтеза невозможно.

Другой метод синтеза 2-аминосахаров — действие аммиака на 2,3-ангидросахара — также не дает однозначного результата, однако позволяет решить вопрос о конфигурации. Этим методом была подтверждена конфигурация глюкозамина путем синтеза его метилированного производного, что может быть изображено схемой.



При взаимодействии метил-4,6-диметил-2,3-ангидроманнозида (XIX), конфигурация которого известна, с аммиаком образуются два аминосахара (XX) и (XXI) в соответствии с двумя направлениями раскрытия α-окисного кольца. Один из этих сахаров оказался 3-аминосахаром, второй — производным глюкозамина. Поскольку конфигурация α-окиси (XIX) известна, и раскрытие ее идет всегда атакой с тыльной стороны, то для 2-аминосахара возможна только конфигурация (XX), и, таким образом, он соответствует глюкозе; следовательно, природный аминосахар, идентичный с полученным синтетическим (XX), действительно имеет конфигурацию, соответствующую глюкозе, и является глюкозамином, а не маннозамином. Аналогичным образом была выяснена конфигурация другого важнейшего 2-аминосахара — галактозамина, полученного по схеме



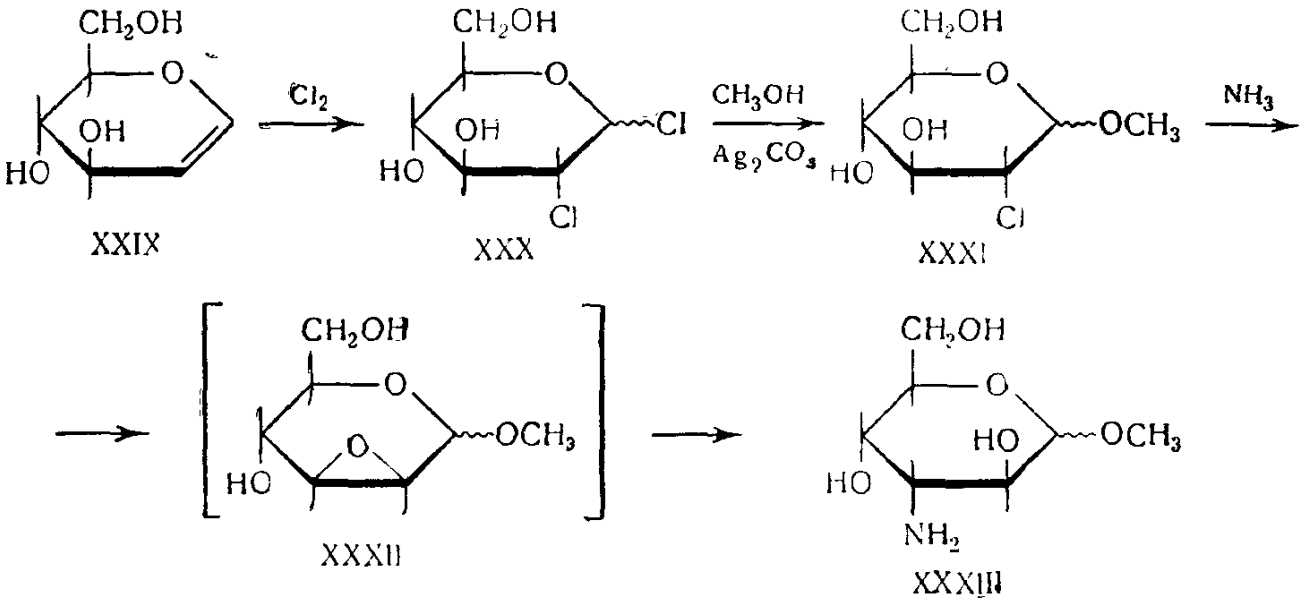
Исходным веществом для синтеза послужила 1,6-ангидрогалактоза, или β-галактозан (XXII). После получения его 3,4-изопропилиденового производного (XXIII) и тозилирования единственной свободной гидроксильной группы полученный тозилат (XXIV) при обработке щелочью дает 1,6: 2,3-диангидроталозу (XXV), которая и является центральным промежуточным веществом при синтезе.

При обработке (XXV) аммиаком, как и в предыдущем случае, α-окисное кольцо раскрывается в обоих возможных направлениях; образующееся ангидропроизводное 2-аминосахара (XXVII) после обработки кислотой дает сам 2-аминосахар, идентичный природному галактозамину (XXVIII).

Поскольку конфигурация (XXV) у α-окисного кольца вытекает из конфигурации тозилата (XXIV), то раскрытие этого кольца может дать 2-аминосахар, который должен иметь только конфигурацию (XXVII). Таким образом, природный сахар, идентичный с синтетическим веществом, имеет действительно конфигурацию, соответствующую галактозе, и является галактозамином.

Синтез аминосахаров другой структуры, например, 6-аминосахаров, проводится путем замещения тозильной группы или атома галоида на аминогруппу. Так из 6-тозилатов или 6-бромидов при действии аммиака получаются 6-аминосахара.

Однако в тех случаях, когда при осуществлении реакций замещения подобного рода в молекуле углевода имеются незащищенные оксигруппы, всегда необходимо считаться с возможностью замыкания окисного кольца и его раскрытия аммиаком, в результате чего может образоваться структурный изомер ожидаемого аминосахара. Как пример такого рода осложнения можно привести следующий синтез:



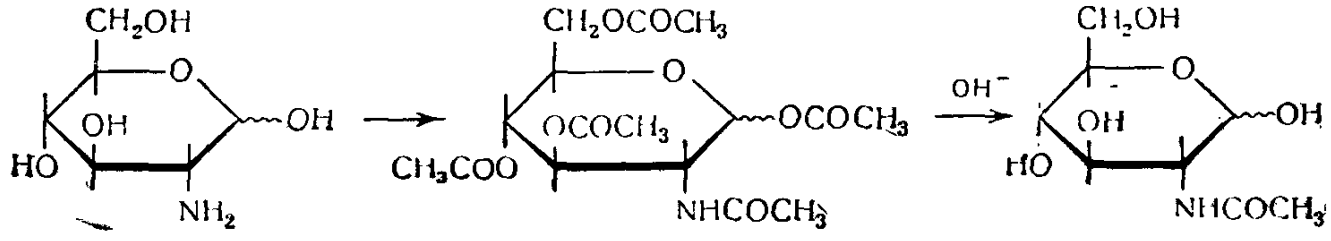
При обработке аммиаком метил-2-хлор-2-дезоксиглюкозида (XXXI), полученного из глюкаля (XXIX) через дихлорид (XXX), происходит вначале замыкание кольца с образованием α-окиси (XXXII); затем это кольцо раскрывается аммиаком, причем вместо ожидаемого 2-аминосахара образуется 3-амино-3-дезоксиальтроза (XXXIII).

Аминосахара проявляют большинство обычных свойств моносахаридов: так, они дают обычные альдегидные реакции и образуют характерные производные по альдегидной группе (оксимы, гидразоны и т. д.). Вместе с тем для аминосахаров характерна мутаротация, причем удается в ряде случаев выделить два аномерных аминосахара.

Спиртовые гидроксилы аминосахара также проявляют себя обычным образом и образуют простые и сложные эфиры, изопропилиденовые и бензилиденовые производные и т. д.

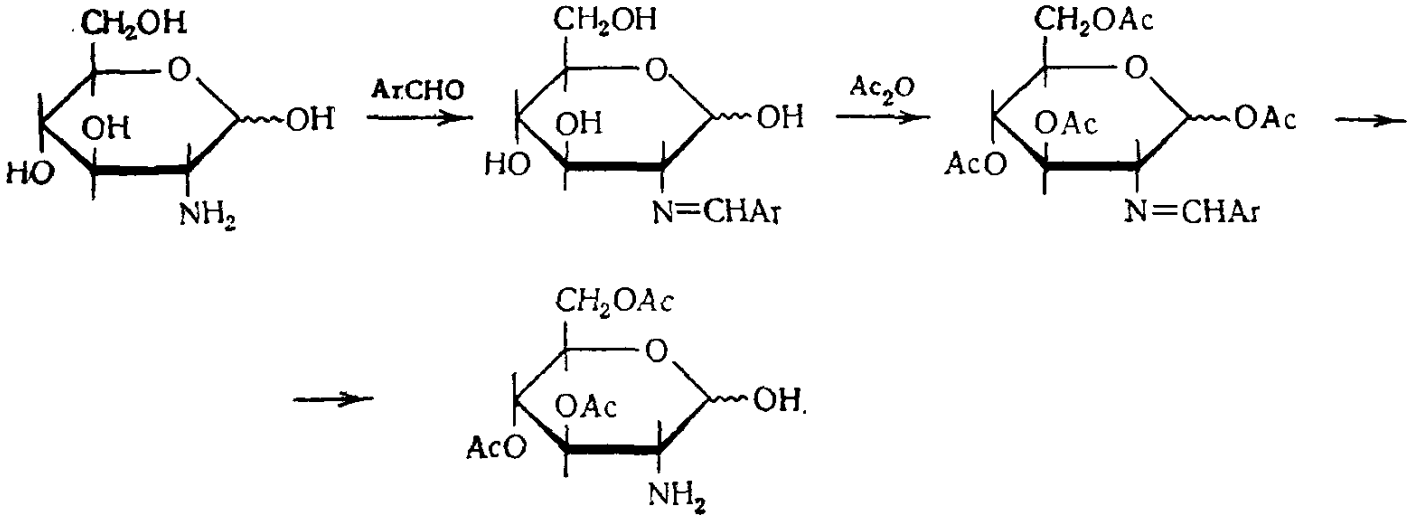
Вместе с тем присутствие аминогруппы в молекуле сахара придает ей ряд особенностей. Аминосахара проявляют наиболее характерные свойства аминов. Они обладают выраженными основными свойствами, легко образуют соли с кислотами. Аминогруппа легко подвергается алкилированию в обычных условиях, причем образуются моно- или диалкиламиносахара, многие из которых в настоящее время найдены в природе. Одним из первых природных алкиламиносахаров был N-метилглюкозамин, входящий в состав антибиотика стрептомицина и выделенный из него в результате гидролиза.

При ацилировании аминосахаров в обычных условиях получаются полные ацетаты: если последние подвергать гидролизу в щелочной среде, то омыляются только сложноэфирные группы и образуются N-моноацетильные производные.

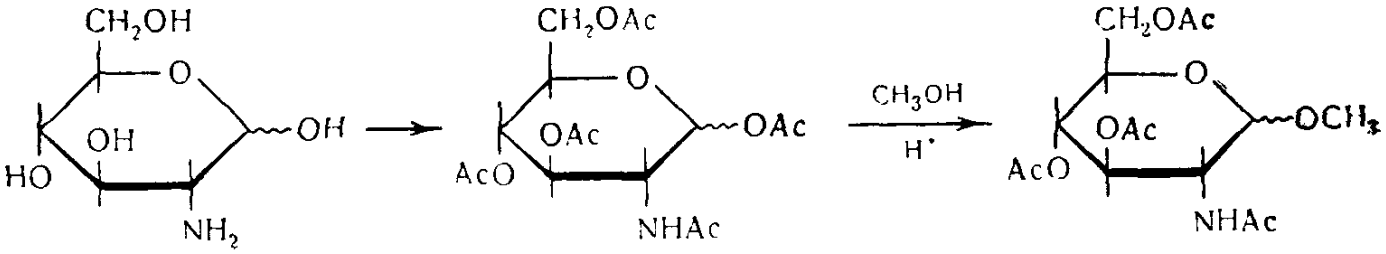


Этим путем обычно готовят N-ацильные производные аминосахаров, которые затем могут использоваться для дальнейшего синтеза как соединения с защищенной и, следовательно, «выключенной» аминогруппой.

Аминосахара, обладающие первичной аминогруппой, как и обычные амины, реагируют с альдегидами, образуя шиффовы основания, которые могут также использоваться в качестве временной защиты аминогруппы, например, для получения О-ацетата аминосахара с сохранением свободной аминогруппы.



Особенности аминосахаров проявляются в получении их гликозидов и в поведении последних. При обычной гликозидации аминосахаров действием спирта в присутствии галоидоводородной кислоты гликозиды не получаются, и для их образования необходимо предварительно проацетилировать аминосахар, точнее, его аминогруппу.



В свою очередь гликозиды 2-аминосахаров со свободной аминогруппой отличаются необычайной стойкостью к гидролизу. Последнее связано, по всей вероятности, с тем, что образующаяся в кислой среде аммонийная группа NH_3^+ отталкивает протон, атакующий гликозидную связь, затрудняя тем самым ее гидролитический разрыв.

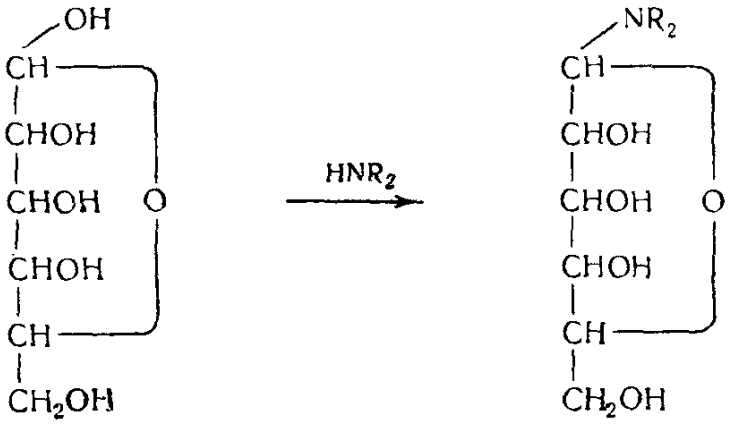
N-ГЛИКОЗИДЫ

(ГЛИКОЗИЛАМИНЫ)

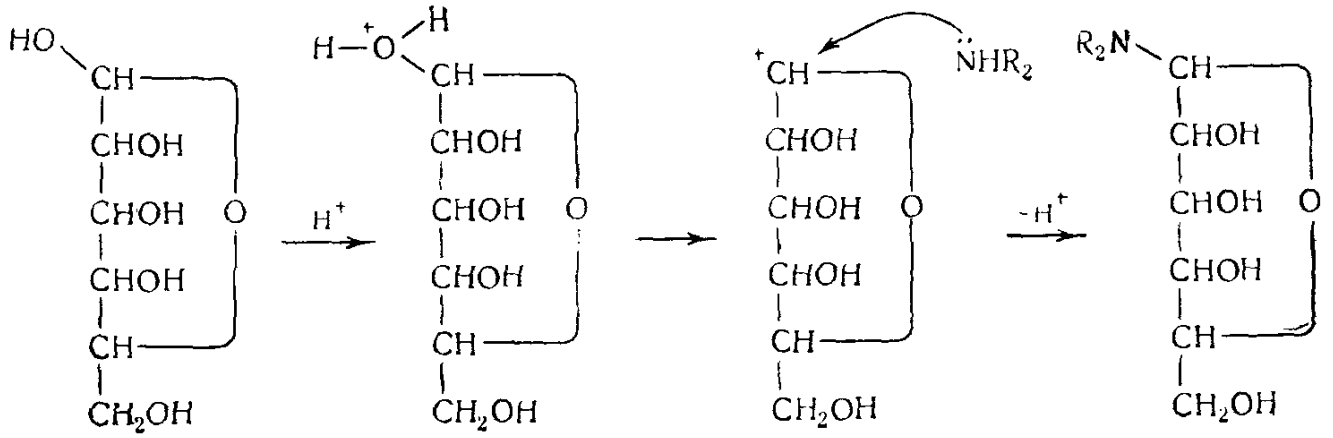
N-Гликозиды, т. е. соединения, имеющие непосредственную связь гликозидного углеродного атома с азотом, являются структурной единицей биологически важных природных полимеров. N-Гликозидная связь соединяет азотистое основание с углеводной частью в нуклеотидах — мономерных единицах нуклеиновых кислот, что уже одно само по себе указывает на исключительное биологическое значение N-гликозидов. Едва ли могут возникнуть сомнения в том, что в другом типе природных полимеров — в гликопротеидах, этим же путем осуществляется связь углеводной единицы с пептидной цепью.

N-Гликозиды легко получаются при замене гликозидного гидроксила или группировки, занимающей его место, на азотсодержащий радикал, и в этом отношении сущность реакции не отличается в принципе от синтеза обычных О-гликозидов.

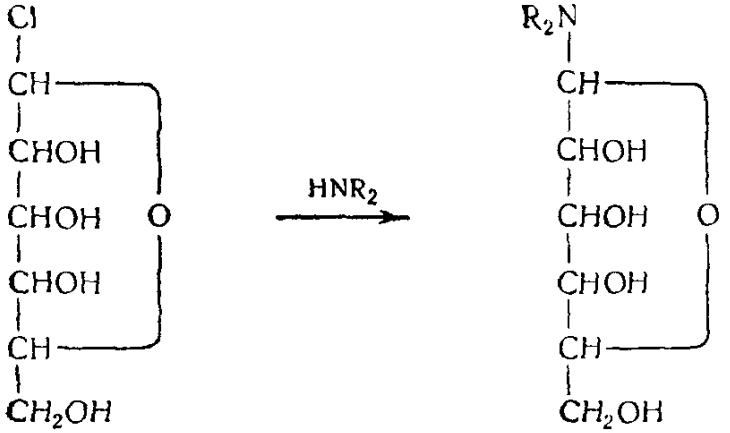
Наиболее простым методом получения N-гликозидов является обработка моносахарида аммиаком или амином.



Для получения незамещенных у азота гликозиламинов лучше всего обрабатывать моносахарид газообразным аммиаком или жидким аммиаком под давлением. Реакцию с моносахаридом первичных и вторичных аминов ведут обычно в спиртовом растворе при комнатной температуре. Амины с низкой основностью не реагируют в этих условиях с моносахаридом; получение N-гликозидов такого типа проводят в присутствии кислот, что повышает электрофильность гликозидного углеродного атома.



Наиболее общим и часто применяемым методом синтеза N-гликозидов является взаимодействие ацилгликозилгалогенидов с аминами.

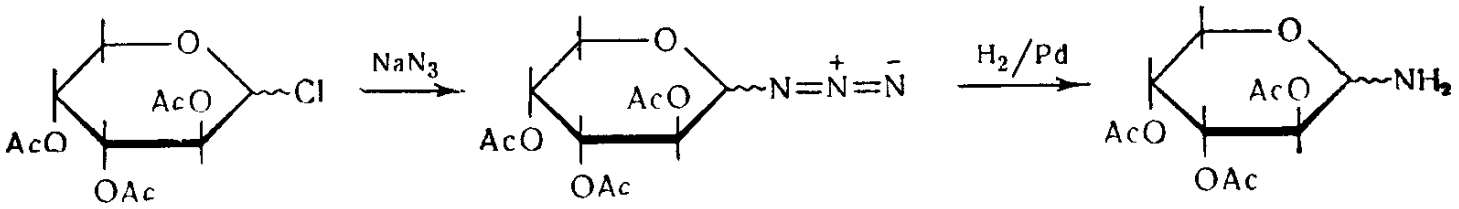


Реакцию обычно проводят при комнатной температуре в уксусно-кислом растворе.

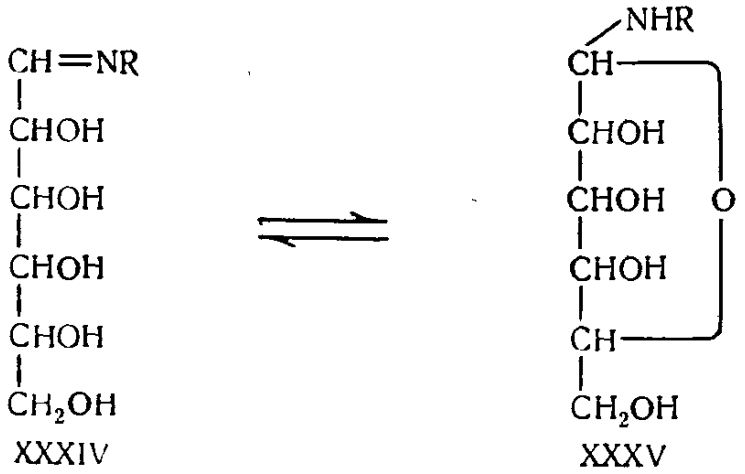
Очень важное видоизменение этого метода состоит во взаимодействии ацилгликозилгалогенидов с металлическими солями аминов. Этот метод нашел особенно широкое применение для синтеза N-гликозидов азотистых гетероциклов, в особенности природных нуклеотидов (см. раздел «Нуклеозиды», стр. 203 и далее).

N-Гликозиды, получаемые этим методом, т. е. при взаимодействии аминов или их металлических солей с ацилгликозилгалогенидами, имеют обычно пиранозную структуру, поскольку ацилгликозилгалогениды, образуемые обычным способом, имеют пиранозное окисное кольцо. Для получения фуранозных производных, к которым, в частности, относятся и природные нуклеотиды, необходимо применять специальные методы, предусматривающие образование ацилгликозилгалогенида фуранозной структуры.

Интересным методом получения N-гликозидов аммиака является взаимодействие ацилгликозилгалогенидов с азидом натрия, проводимое в мягких условиях, с последующим гидрогенолизом полученного азида в амин.



Сложным и далеко не во всех случаях решенным является вопрос об истинном строении гликозиламинов. Очевидно, по аналогии со строением самих моносахаридов для N-гликозидов аммиака и первичных аминов, т. е. таких, которые имеют у азота хотя бы один атом водорода, в растворах следует ожидать наличия таутомерного равновесия.

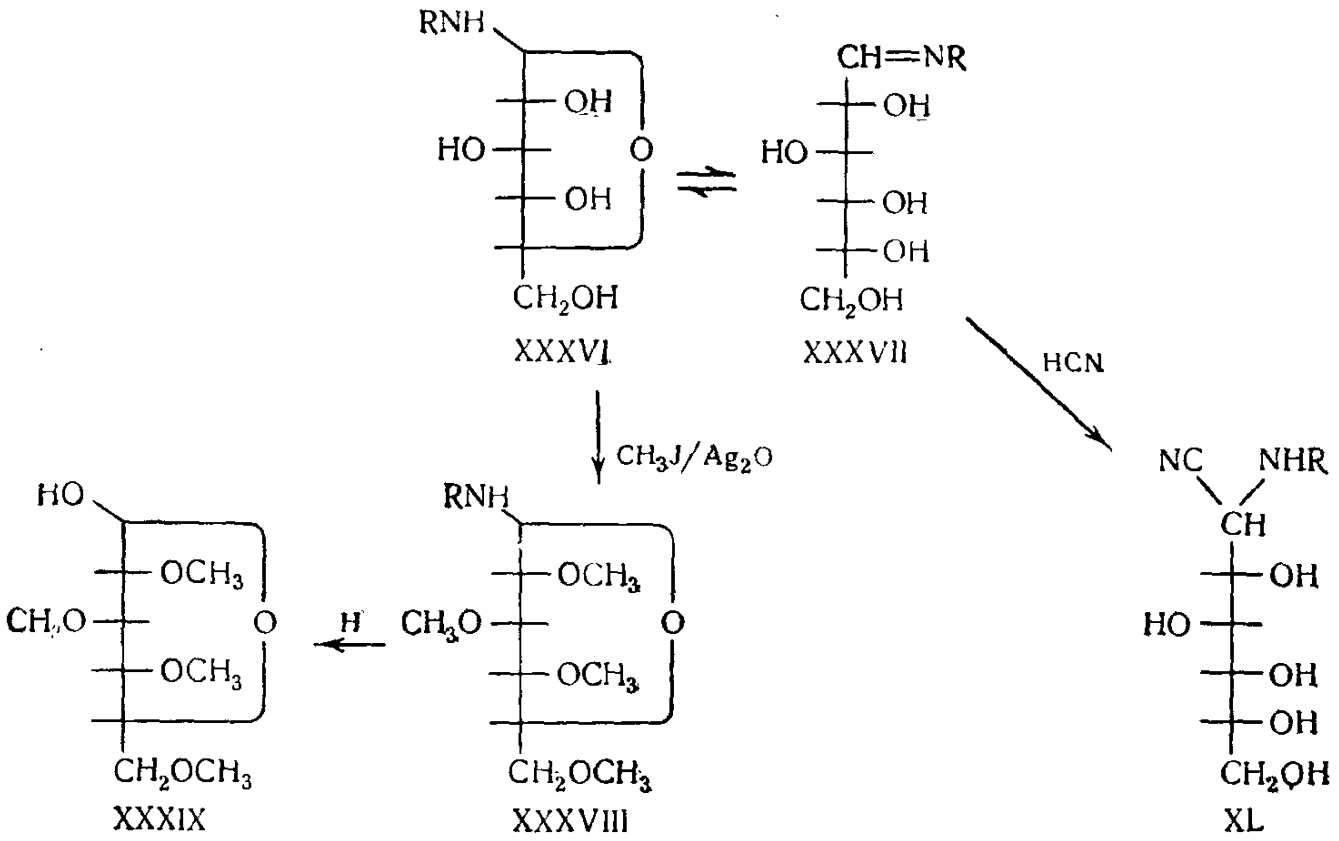


XXXIV XXXV

Естественно, что для N-гликозидов вторичных аминов форма (XXXIV) невозможна, и для них следует, очевидно, допустить существование только циклической формы (XXXV). Последняя, конечно, может иметь как пиранозную, так и фуранозную структуру, для каждой из которых возможно существование двух аномеров.

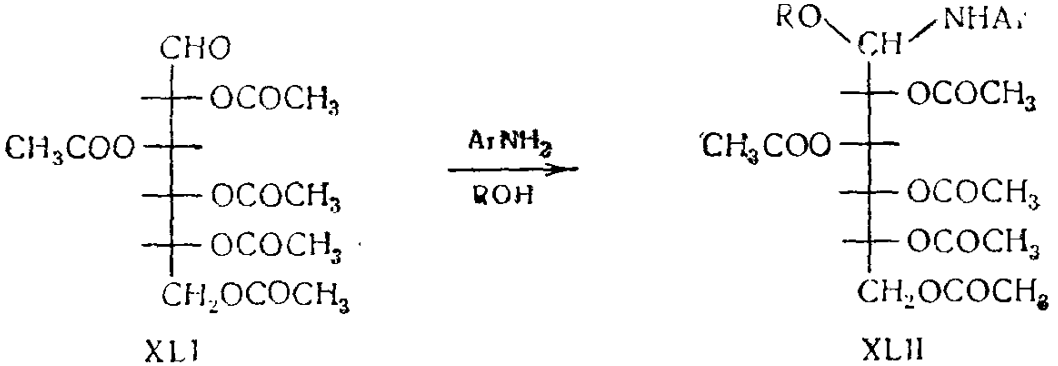
В действительности вопрос об истинном строении N-гликозида нужно решать отдельно в каждом индивидуальном случае, так как, по-видимому, в зависимости от структурных особенностей амина, а возможно и сахара, речь может идти об открытой (XXXIV) или циклической структуре (XXXV). В некоторых случаях таутомерное равновесие обычных форм

можно считать почти окончательно доказанным. Так, например, для N-алкилглюкозидов оно явствует из следующих превращений:



При метилировании глюкозиламина по Пурди образуется тетраметильное производное (XXXVIII), кислый гудролиз которого дает 2,3,4,6-тетраметилглюкозу (XXXIX). Это доказывает, что исходный глюкозиламин хотя бы частично состоит из циклической формы с пиранозным кольцом (XXXVI). Вместе с тем при обработке гликозиламина синильной кислотой образуется аминонитрил (XL), который может быть получен также и иным способом — непосредственно из моносахарида. Это доказывает наличие в исходном глюкозиламине открытой анильной формы (XXXVII).

Однако последнее, а именно, доказательство открытой формы гликозиламина, по некоторым данным недостаточно убедительно. Оказалось, что полные ацетаты альдегидных форм моносахаридов (XLI) при взаимодействии с ароматическими аминами в присутствии спирта (т. е. в условиях, соответствующих образованию N- гликозидов, поскольку углевод, имеющий свободные гидроксильные группы, сам играет роль спирта) образуют не истинные шиффовы основания, а соединения типа (XLII).

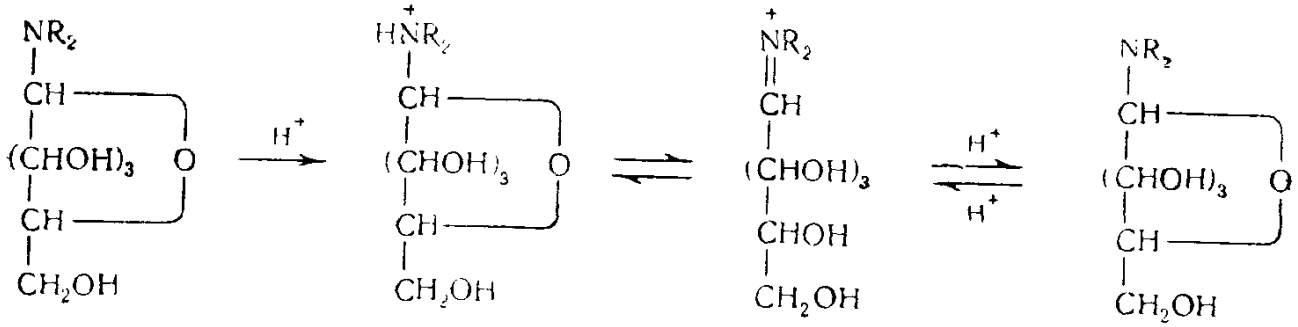


Эти данные не согласуются с предположением о существовании соединений со структурой шиффовых оснований.

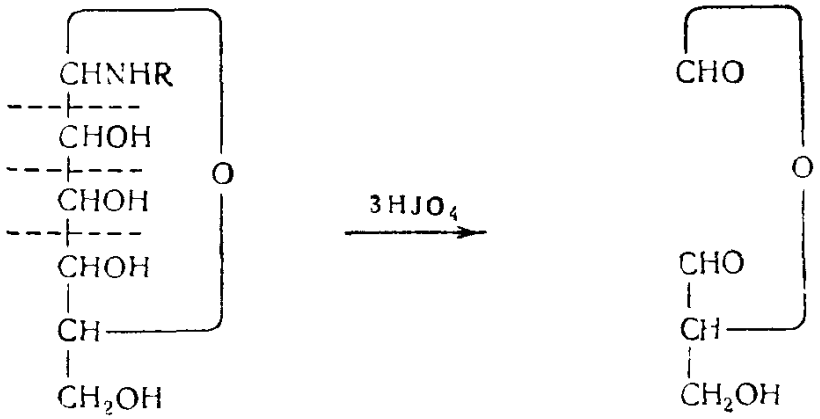
По своему поведению N-гликозиды напоминают обычные О-гликозиды и резко отличаются от аминосахаров.

N-Гликозиды первичных аминов и аммиака, т. е. соединения, имеющие у азота хотя бы один водородный атом, отличаются большой склонностью к гидролизу в кислой среде.

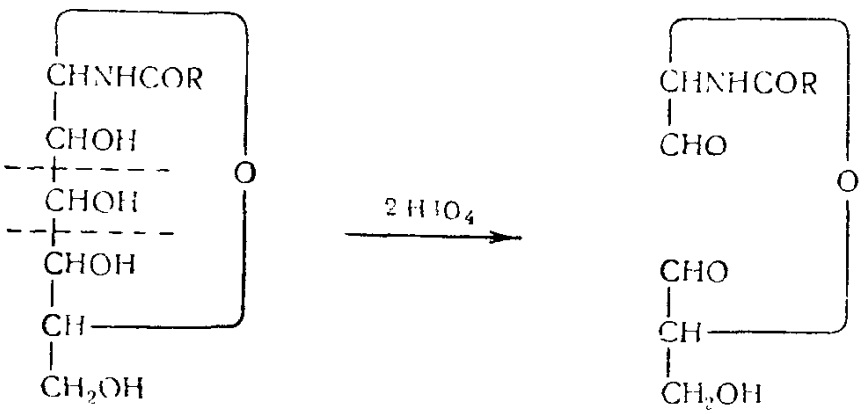
Резким отличием N-гликозидов от О-гликозидов является их способность к мутаротации. Это свойство, очевидно, нельзя объяснить таутомерным переходом через открытую анильную форму, т. е. равновесием (XXXIV) ⇄ (XXXV), так как такая мутаротация характерна и для N-гликозидов вторичных аминов, которые не содержат атома водорода у азота и, следовательно, не способны существовать в виде анила. Для объяснения этого, пока недостаточно понятного явления, предложен следующий чисто гипотетический механизм:



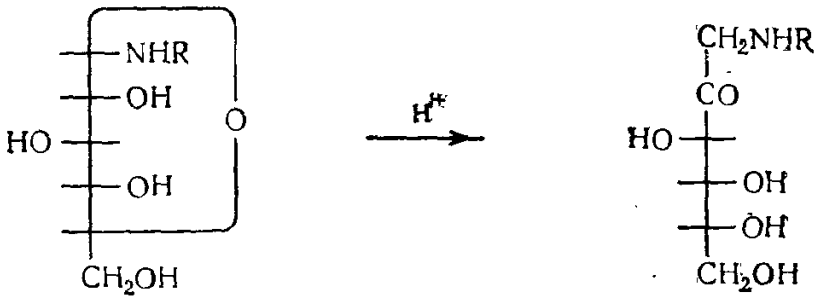
N-Гликозиды легко алкилируются и ацилируются, дают ацетальные производные (изопропилиденовые, бензилиденовые) и ведут себя сходно с обычными гликозидами. Для доказательства строения N-гликозидов важное значение имеет реакция окисления иодной кислотой. При окислении HJO_4 N-гликозидов, содержащих группу NH_2 или NHR, последняя ведет себя как гидроксильная группа, т. е. связь между гликозидным углеводным атомом и $C_{(2)}$-атомом разрывается.



Если N-гликозиды содержат ацилированную аминогруппу NHCOR, то связь $C_{(1)}—C_{(2)}$, насколько это известно, при действии HJO_4 не затрагивается.



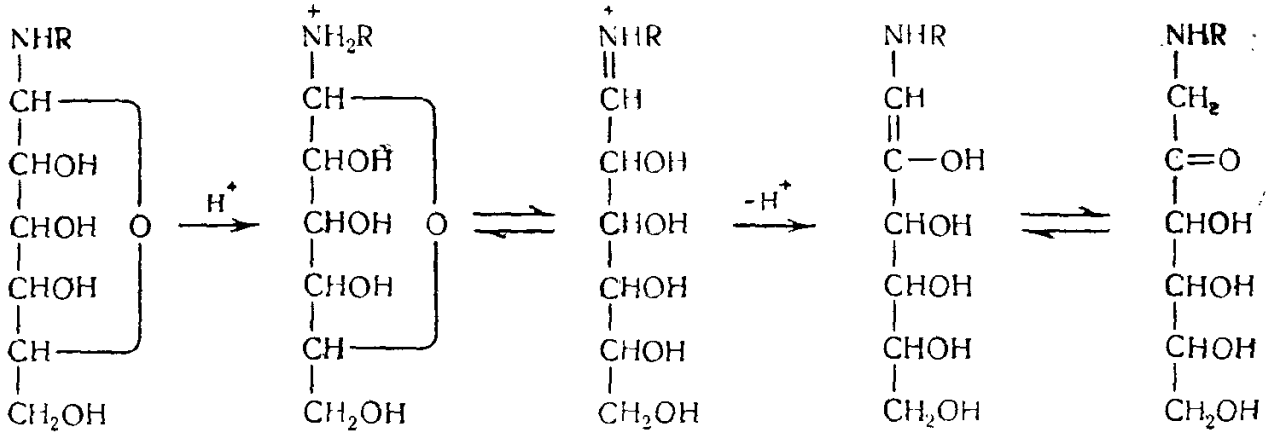
Большой интерес представляет перегруппировка, происходящая с N-гликозидами ароматических и жирноароматических аминов, известная под именем перегруппировки Амадори. Амадори, открывший эту реакцию в 1925 г., наблюдал, что при нагревании N-гликозида (XLIII) образуется аминосахар, а именно, 1-аминокетоза (XLIV).



XLIII XLIV

Позднее было найдено, что значительно лучшие результаты получаются, если эту реакцию проводить в присутствии кислот. Перегруппировка Амадори сейчас используется для получения некоторых аминосахаров и их производных; так, одна из основных стадий синтеза рибофлавина (витамина B_2) основана на перегруппировке Амадори.

Что касается механизма этой интересной реакции, то этот вопрос еще продолжает обсуждаться. В настоящее время чаще всего результат реакции объясняют следующим образом:



Некоторые свойства N-гликозидов будут рассмотрены также в связи с вопросом о строении и поведении нуклеотидов.

Выше совершенно не рассматривались другие типы моносахаридов, например углеводы, являющиеся одновременно дезокси- и аминосахарами. Последнее связано с тем, что этот новый тип соединений пока еще мало изучен, что не позволило выявить в их химическом поведении каких-либо свойств, принципиально отличающих их от аминосахаров с одной, и от дезоксисахаров — с другой стороны.

ЛИТЕРАТУРА

G. Ellis, J. Honeyman. Glycosylamines. Adv. carbohydrate chemistry, 1955, **10**, 95.

A. Foster, M. Stacey. The chemistry of 2-aminosugars. Adv. carbohydrate chemistry, 1952, 7, 247.

J. Hodge. The Amadori rearrangment. Adv. carbohydrate chemistry, 1955, **10**, 169.

R. Kuhn. Über biologische Bedeutung der Aminozucker, IV Inter. congr. biochemistry, 1958, **1**, 67.

A. Foster, D. Horton. Aspects of tht chemistry of the aminosugars. Adv. carbohydrate chemistry. 1959, **14**, 214.

Часть II

ОЛИГОСАХАРИДЫ

Все рассмотренные до сих пор углеводы и их производные являлись веществами, относящимися к типу моносахаридов, т. е. к таким соединениям, молекула которых содержит непрерывную цепь углеродных атомов.

Между тем, моносахариды, так же как и аминокислоты, являются лишь кирпичами, из которых слагаются гигантские молекулы природных биогенных полимеров, имеющих исключительное значение в процессах жизнедеятельности.

Полисахариды, полимеры, или, точнее, продукты поликонденсации моносахаридов, играют часто не меньшую биологическую роль, чем белки, хотя в ряде случаев эта роль еще только начинает обрисовываться в самых общих чертах. Однако достаточно назвать вещества, подобные целлюлозе или крахмалу, чтобы оценить место, которое занимают полисахариды.

Согласно общему определению, полисахаридом называется вещество, которое образовалось из n молекул одного и того же или различных моносахаридов с отщеплением $n - 1$ молей воды.

$$n\,C_6H_{12}O_6 - (n-1)\,H_2O \rightarrow \text{полисахарид}$$

Если полисахариды, состоящие из значительного количества молекул моносахарида, являются по всему своему облику типичными высокополимерами, к которым приложимы все принципы и методы химии высокомолекулярных соединений, то полисахариды, состоящие из нескольких молекул моносахарида, являются обычными, хотя и весьма сложными и своеобразными органическими соединениями. В этой связи с чисто методической точки зрения оба эти типа соединений целесообразно рассматривать раздельно. Естественно, поскольку нельзя провести четкой границы между обоими упомянутыми типами веществ, такое разделение носит искусственный характер.

Углеводы, содержащие несколько молекул моносахарида, обычно, от 2 до 8—10, отделяют при рассмотрении от более высокомолекулярных веществ и называют олигосахаридами.

По числу входящих в состав олигосахарида моносахаридов различают дисахариды, трисахариды, тетрасахариды и т. д. Понятно, что моносахариды могут быть при этом одинаковыми или различными.

Простейшими олигосахаридами являются дисахариды, с которых целесообразнее всего начать рассмотрение соединений этого класса.

Глава 1

ДИСАХАРИДЫ

Все олигосахариды и полисахариды, в том числе и дисахариды с большей или меньшей легкостью подвергаются гидролизу в кислой среде, в результате чего получается смесь моносахаридов. Этот факт указывает

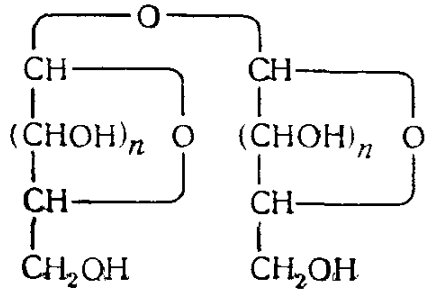
на то, что в полисахаридах, в том числе и дисахаридах, не может быть простой эфирной, и, тем более, углерод-углеродной связи и, очевидно, основной формой связи отдельных моносахаридных звеньев в полимерной цепи является гликозидная связь.

Исходя из этого, в дисахаридах связь двух остатков моносахарида между собою может, очевидно, осуществляться одним из двух способов. Первая возможность — оба моносахарида связаны через атом кислорода своими гликозидными углеродными атомами, и дисахарид этого типа (I) представляет собою как бы «двойной гликозид». Вторая возможность — один из моносахаридов использует для связи свой гликозидный гидроксил, а другой — один из спиртовых гидроксилов, т. е. одна из молекул моносахарида играет роль агликона для второй, гликозидом которой является вся молекула дисахарида.

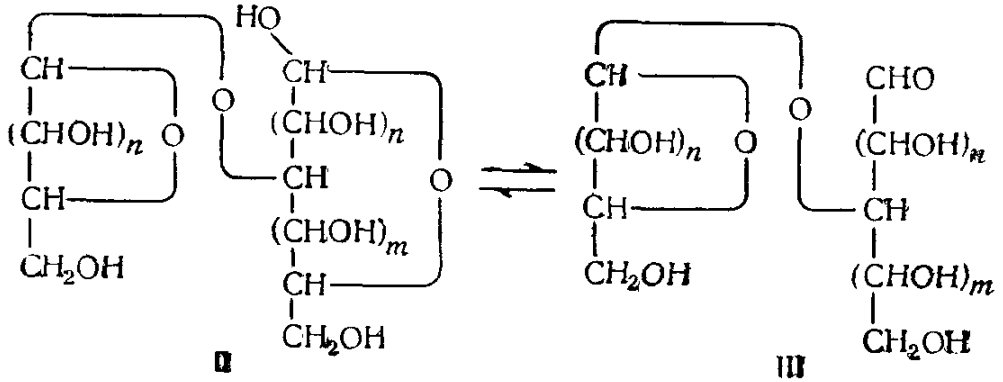
Хорошо известны дисахариды обоих типов. Соединения первого рода (I) часто называют гликозидо-гликозидами, а этот тип связи между моносахаридами — гликозидо-гликозидной. Соединения второго типа (II) называют гликозо-гликозидами и связь — гликозо-гликозидной.

Оба типа дисахаридов резко различаются между собою по химическому поведению. В соединениях I типа оба гликозидных гидроксила закреплены благодаря связи двух моносахаридов, и, следовательно, для этих дисахаридов возможность кольчато-цепной таутомерии исключена. Поэтому такие дисахариды не дают никаких альдегидных реакций.

Напротив, в соединениях II типа один из моносахаридов сохраняет свободным свой гликозидный гидроксил, и тем самым для соединения в целом сохраняется возможность кольчато-цепной таутомерии.



I



II III

Одна из таутомерных форм (III) имеет свободную альдегидную группу, и поэтому дисахариды этого типа дают обычные альдегидные реакции, в частности, восстанавливают соли серебра и одновалентной меди. По этой причине обычно дисахариды I типа называют невосстанавливающими, а дисахариды II типа — восстанавливающими дисахаридами.

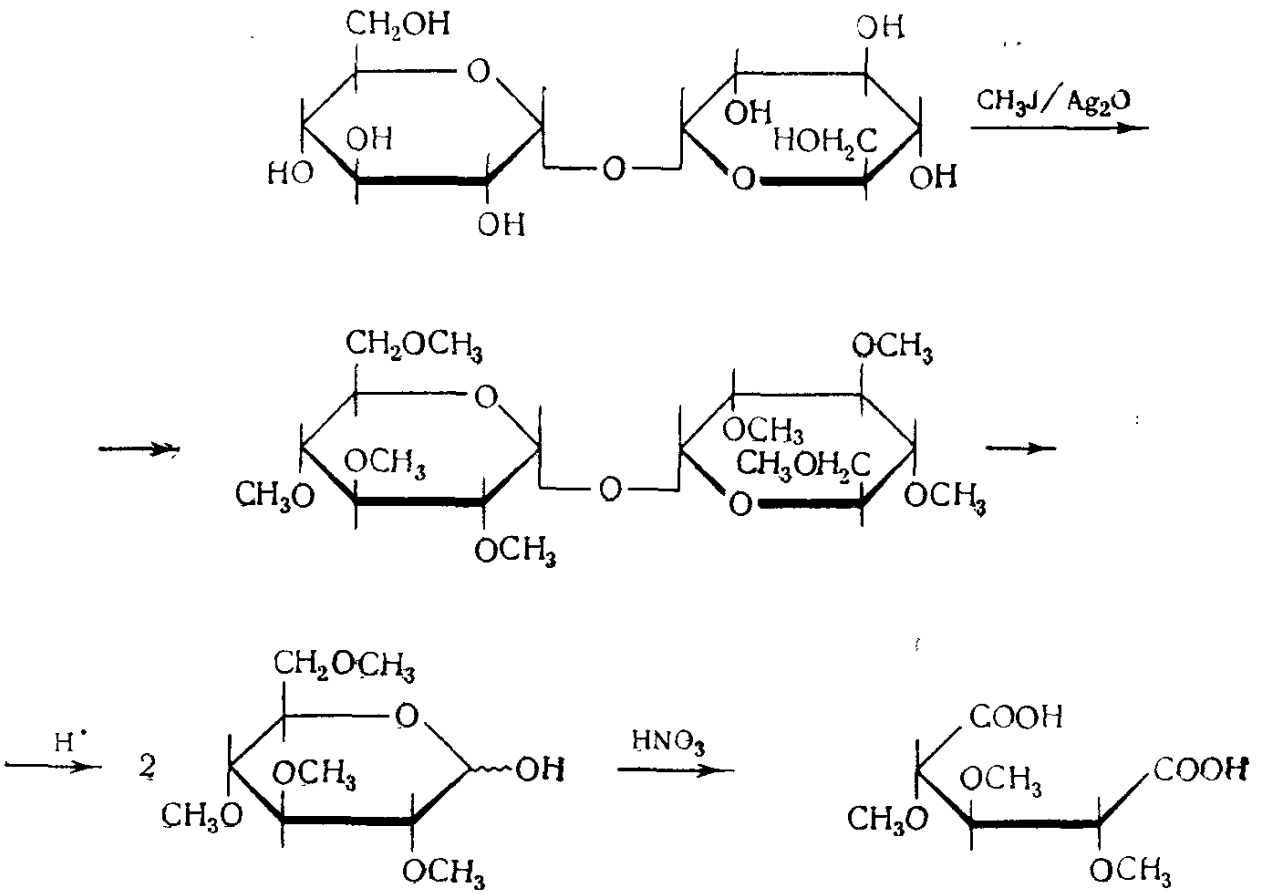
Другим важным различием между дисахаридами первого и второго типа, также основанным на возможности таутомерных превращений для (II), является способность дисахаридов II типа к мутаротации (которая, естественно, происходит за счет эпимеризации у свободного гликозидного атома), в то время как дисахариды I типа к ней неспособны.

СТРОЕНИЕ ДИСАХАРИДОВ

При установлении строения дисахаридов предстоит решить следующие вопросы: 1) природа моносахаридов; 2) размеры окисных колец в каждой из моносахаридных единиц, составляющих дисахарид; 3) место связи моносахаридов между собой; 4) конфигурация гликозидного центра.

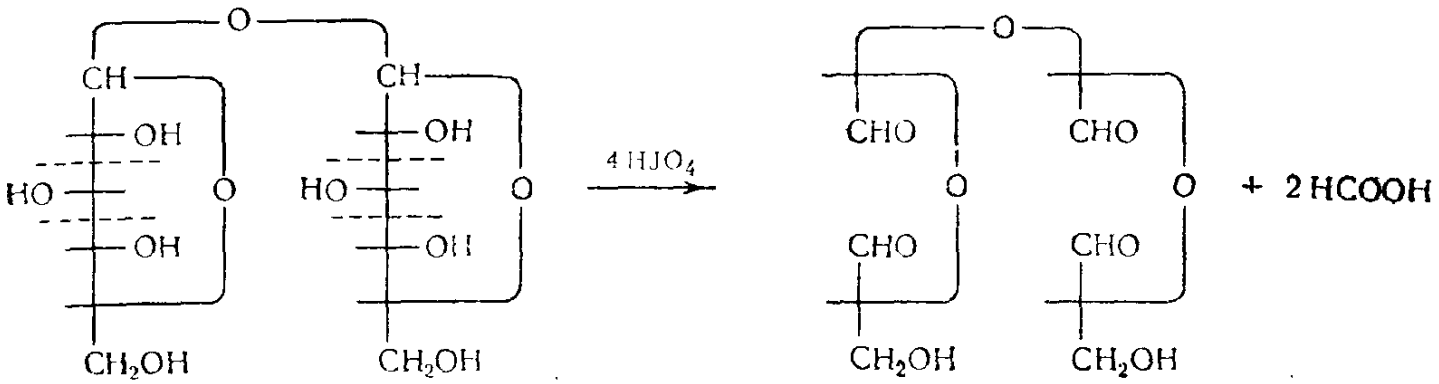
Установление природы моносахаридов. Для установления природы моносахаридов, входящих в дисахарид, последний подвергается кислотному или ферментативному гидролизу. В полученной таким образом смеси моносахаридов последние идентифицируются одним из описанных выше методов. Чаще всего первоначальная оценка проводится с помощью бумажной хроматографии, которая очень подробно разработана для моносахаридов. После этого смесь моносахаридов подвергают разделению методом препаративной распределительной хроматографии на носителе, в качестве которого чаще всего применяются целлюлоза, силикагель, уголь или их комбинации. Разделенные моносахариды идентифицируют в виде одного из кристаллических производных.

Размеры окисных колец. Размеры окисных колец дисахаридов I типа, т. е. гликозидо-гликозидов, определяются методом, описанным ранее для определения размеров окисных колец моносахаридов: дисахарид метилируется, подвергается гидролизу, полученные метилированные моносахариды разделяются и подвергаются окислению; по выделенным в результате окисления кислотам делают заключение о размере окисных колец. В качестве примера можно привести определение размера колец в трегалозе — дисахариде, состоящем из двух остатков глюкозы и содержащемся в некоторых грибах, дрожжах и т. п. Применение описанного выше метода ясно из схемы.



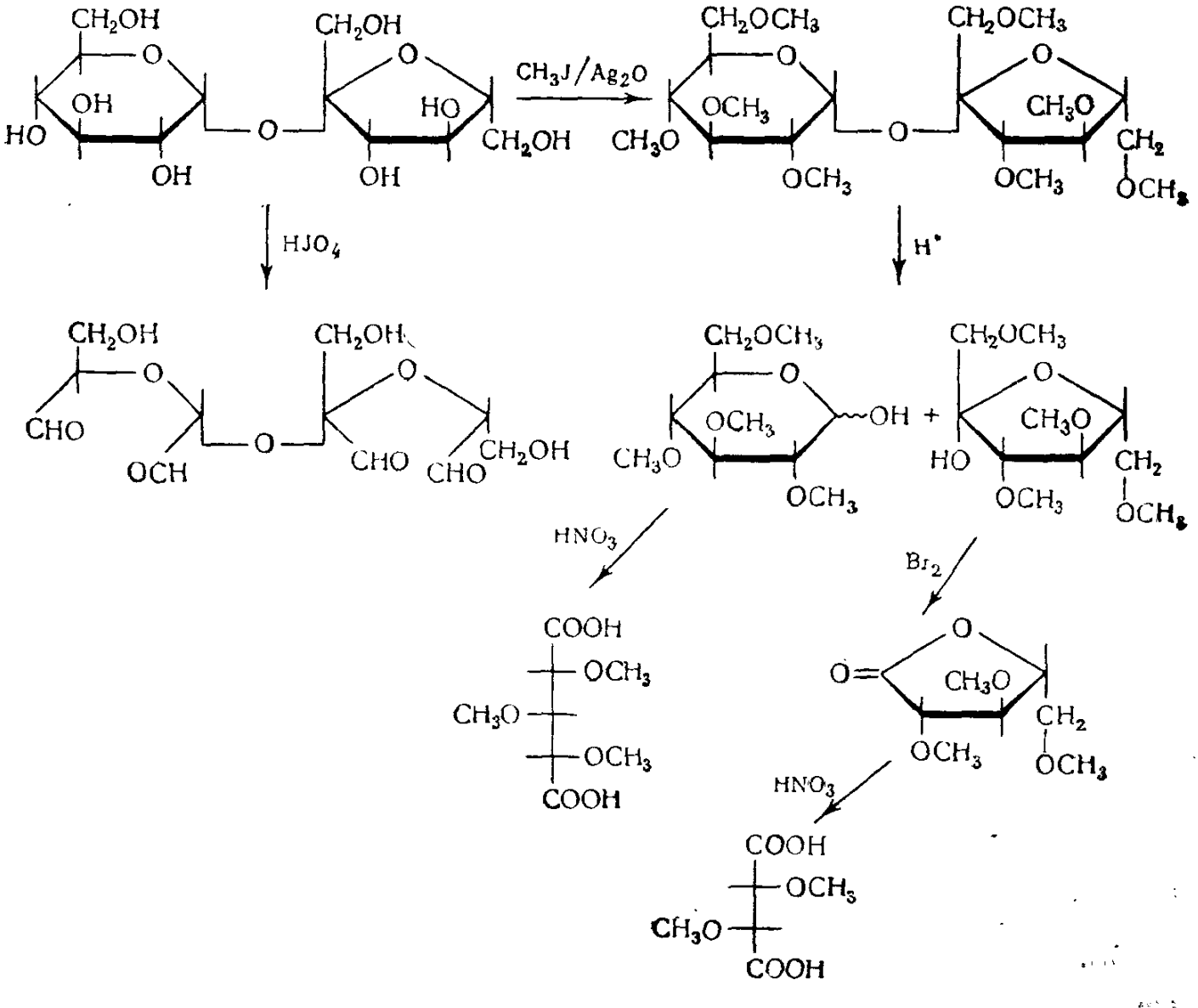
В данном случае задача сильно упрощается тем, что трегалоза состоит из двух совершенно одинаково построенных моносахаридов. Выделение в качестве единственного продукта окисления оптически недеятельной триметокситлутаровой кислоты подтверждает, что этим моносахаридом является глюкоза, находящаяся в пиранозной форме.

В простых случаях, подобных описанному, вопрос о размере окисных колец в дисахариде можно гораздо проще решить с помощью окисления иодной кислотой.



Если принять во внимание, что трегалоза состоит из двух молекул глюкозы, связанных гликозидо-гликозидной связью, то затрату четырех молей иодной кислоты с выделением двух молей муравьиной кислоты можно интерпретировать одним единственным способом: оба остатка глюкозы в трегалозе имеют пиранозное кольцо.

Аналогичным путем можно определить строение и более сложного дисахарида I типа — тростникового сахара (сахарозы), состоящего из глюкозы и фруктозы. Как и в предыдущем случае, может применяться или метод Хеуорзса (метилирование с последующим окислением), или окисление иодной кислотой. Последовательность проведенных при этом операций ясна из схемы.



Выделение в результате окисления триметоксиглутаровой кислоты из глюкозной части молекулы и диметоксиянтарной кислоты из фруктозной части указывает на пиранозное кольцо в первом, и фуранозное — во втором моносахариде. С другой стороны, освобождение только одного моля муравьиной кислоты при затрате трех молей иодной кислоты также подтверждает, что в сахарозе только один из моносахаридов находится в пиранозной форме.

При доказательстве строения дисахаридов I или II типа, и особенно значительно более сложных олигосахаров, обычно всегда пользуются, как и при определении строения сахарозы, сочетанием обоих методов, которые взаимно дополняют и подтверждают друг друга.

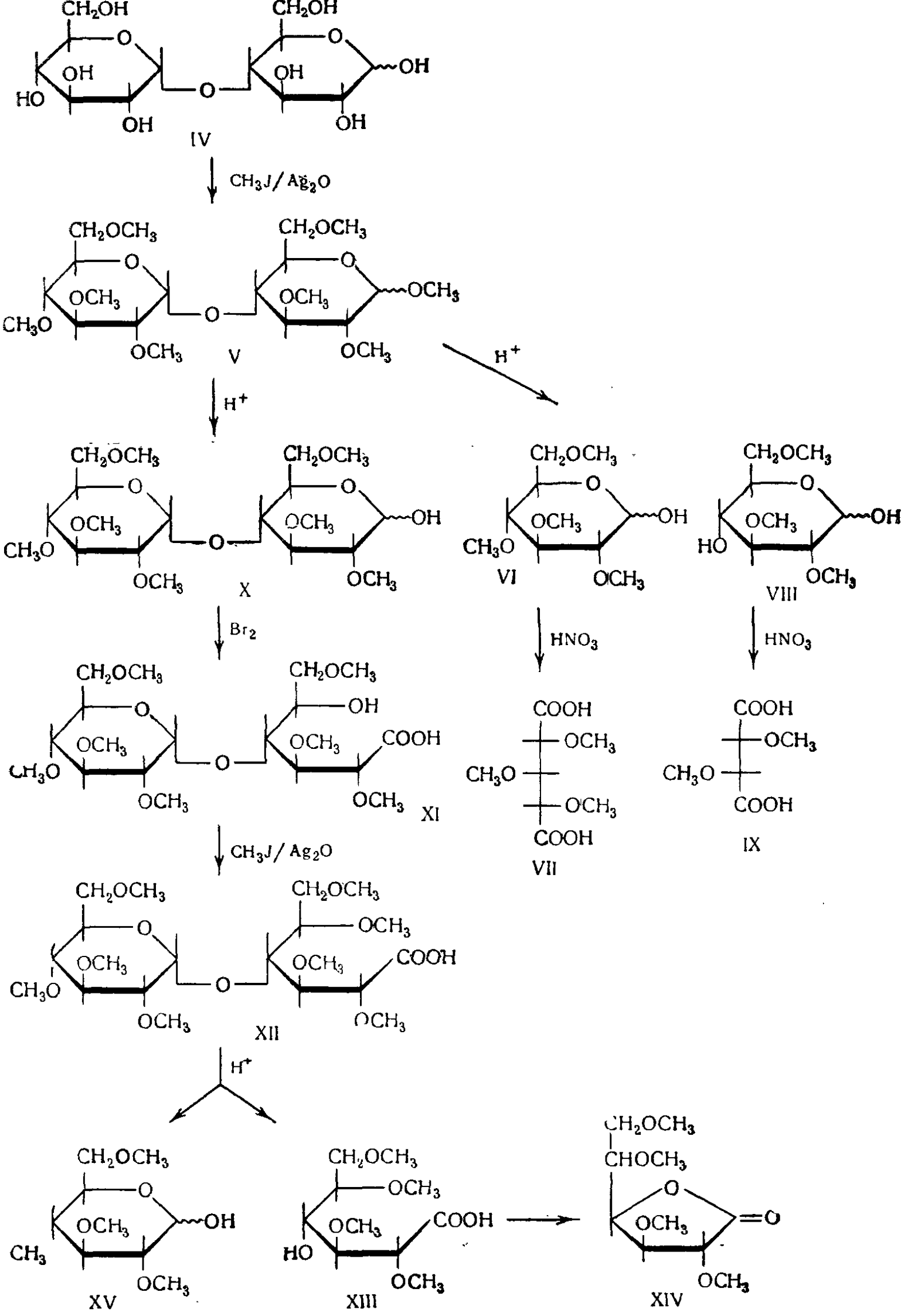
Место связи остатков моносахаридов в молекуле дисахарида. Этот вопрос, который возникает, естественно, только в отношении дисахаридов II типа, решается в данном случае одновременно с вопросом о размере окисных колец, причем для этого используются те же методы, т. е. метилирование и окисление иодной кислотой.

Для примера рассмотрим строение дисахарида мальтозы, получающегося при частичном гидролизе крахмала и состоящего из двух молекул глюкозы.

Примененная для установления строения последовательная деструкция молекулы мальтозы может быть изображена приведенной ниже схемой (см. стр. 141).

Метилированием мальтозы (IV) получают метил-гептаметилмальтозид (V); гидролиз (V) дает 2,3,4,6-тетраметилглюкозу (VI), строение которой доказано окислением в триметоксиглутаровую кислоту (VII), и триметилглюкозу (VIII); последняя при окислении дает оптически деятельную диметоксиянтарную кислоту (IX); это доказывает, что (VIII) является 2,3,6-триметилглюкозой. Приведенные данные показывают, что мальтоза состоит из двух остатков глюкозы, из которых один, на основании получения (VI) при гидролизе, имеет пиранозное строение и связан со вторым остатком глюкозы своим гликозидным атомом. Образование после гидролиза (VIII), в котором имеются свободные гидроксилы в положении 4 и 5, показывает, что этот остаток глюкозы, входящий в мальтозу, либо является фуранозой, связанной с другим остатком глюкозы в положении 5, либо напротив, является пиранозой, связанной с другой частью молекулы четвертым гидроксилом. Для того, чтобы сделать выбор между этими двумя возможностями, метил-гептаметилмальтозид (V) осторожным частичным гидролизом переводят в гептаметилмальтозу (X), а последнюю окисляют в оксикислоту (XI). После метилирования в (XI) единственного свободного гидроксила полученную кислоту (XII) подвергают гидролизу, в результате которого вновь получается 2,3,4,6-тетраметилглюкоза (VI) из того остатка глюкозы, который в мальтозе был связан через свой гликозидный гидроксил, и оксикислота (XIII) из второго остатка глюкозы. Свободная гидроксильная группа в (XIII) является как раз тем гидроксилом, через который первый остаток глюкозы был связан со вторым остатком. Так как (XIII) легко образует γ-лактон (XIV), то ясно, что свободным в (XIII) была гидроксильная группа в положении 4. Из превращений (V) → (X) → (XIV) следует, что в мальтозе вторая молекула глюкозы связана с глюкозидной частью молекулы своим четвертым гидроксилом. Далее, поскольку из получения (VIII) следует, что во втором остатке глюкозы были заняты гидроксилы 4 и 5, ясно, что гидроксил у $C_{(5)}$ участвовал в образовании окисного кольца, т. е. второй остаток глюкозы имел пиранозную форму.

Таким образом, мальтоза является 4-глюкопиранозил-глюкопиранозидом.


IV
CH_3J/Ag_2O
V
H^+
X
Br_2
XI
CH_3J/Ag_2O
XII
H^+
VI
HNO_3
VII
VIII
HNO_3
IX
XIII
XIV
XV

Применяя те же методы и тот же ход логических построений, можно определить строение и других дисахаридов.

Конфигурация гликозидного центра. Этот последний при установлении строения дисахаридов II типа вопрос решается примерно так же, как и для простейших гликозидов. Наиболее часто для этих целей используются стереохимическая избирательность действия ферментов, а также величина угла вращения дисахаридов и ее изменения при гидролизе.

Если дисахарид расщепляется ферментом, расщепляющим α-гликозиды (обычно для этой цели применяется мальтаза), то это позволяет отнести дисахарид к α-типу. Напротив, если дисахарид расщепляется эмульсином или другим ферментом, расщепляющим β-гликозиды, то дисахарид содержит β-гликозидную связь.

Далее, поскольку α-гликозиды имеют более сильное вращение вправо, чем β-гликозиды, то дисахариды II типа с α-конфигурацией гликозидного центра имеют обычно сильное правое вращение, тогда как те же соединения с β-конфигурацией имеют меньшее правое вращение. Используя указанные особенности, легко определить, например, конфигурацию у целлобиозы и мальтозы — двух дисахаридов, различие которых состоит только в конфигурации гликозидного центра. Мальтоза имеет высокое правое вращение ($[\alpha]_D = +130°$) и расщепляется мальтазой, целлобиоза же имеет вращение лишь $+35°$ и расщепляется эмульсином. Из этого ясно следует, что мальтоза является α-гликозидом, а целлобиоза — β-гликозидом.

Труднее решать вопрос о конфигурации для гликозидов I типа, поскольку здесь необходимо установить конфигурации двух гликозидных связей, одновременно изменяющиеся при гидролизе. В отдельных случаях выбор легко сделать на основании знака и величины вращения. Так, например, трегалоза может быть без труда отнесена к α-α-типу на основании очень высокого правого вращения ($[\alpha]_D = +197°$), что может быть только в том случае, когда обе гликозидные связи являются α-связями.

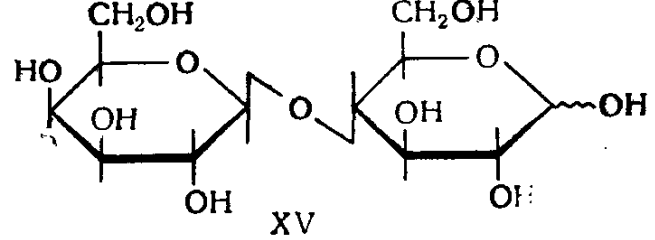
В более сложных случаях приходится прибегать к ферментативному гидролизу. Конфигурация для сахарозы, например, была установлена на основе следующих фактов. Сахароза гидролизуется мальтазой, причем вращение в результате мутаротации глюкозной части молекулы падает, следовательно, налицо α-глюкозид. Вместе с тем так называемая така-инвертаза, фермент, избирательно расщепляющий β-фруктозиды, расщепляет сахарозу, которая, следовательно, содержит β-фруктозидную связь. Таким образом, сахароза является α-глюкозидом и β-фруктозидом.

СИНТЕЗ ДИСАХАРИДОВ

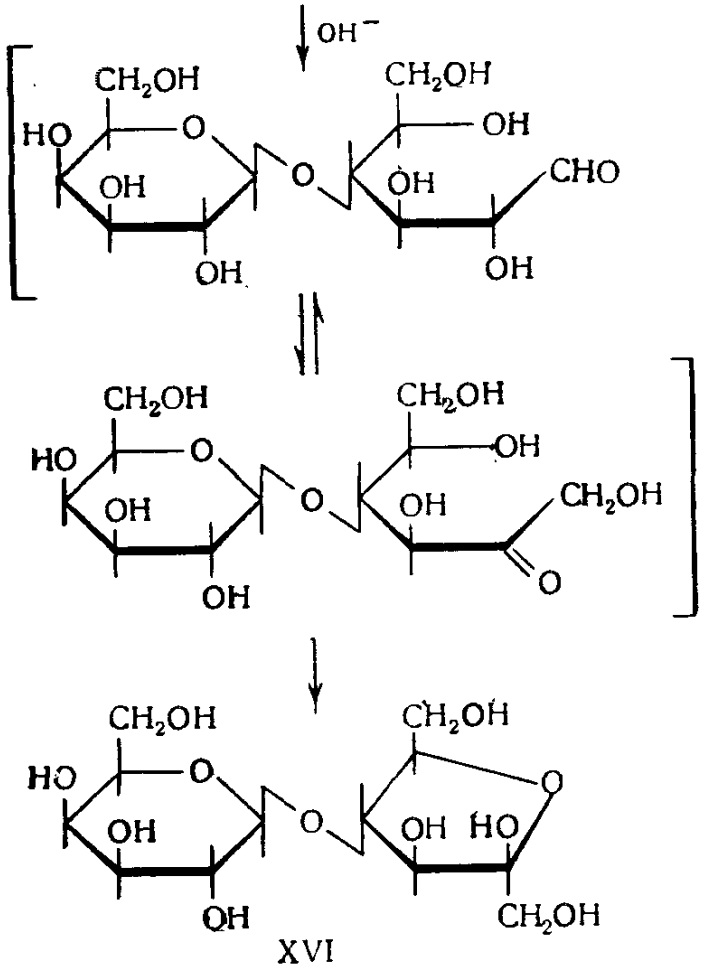
Все известные синтезы дисахаридов, число которых очень невелико, можно разбить на две группы: 1) синтетические преобразования исходного дисахарида в нужный дисахарид, происходящие без разрыва гликозидной связи; 2) конденсация двух моносахаридов с образованием новой гликозидной связи.

В синтезах первого типа используются те же реакции, которые применяются и для перехода от одного моносахарида к другому: щелочная изомеризация, гликальный метод, деградация по Руффу, деградация по Волю и т. д.

Как примеры такого рода синтеза можно привести: 1) синтез лактулозы (XVI) из лактозы (XV) с использованием щелочной изомеризации (перегруппировка Лобри де Брюйна):

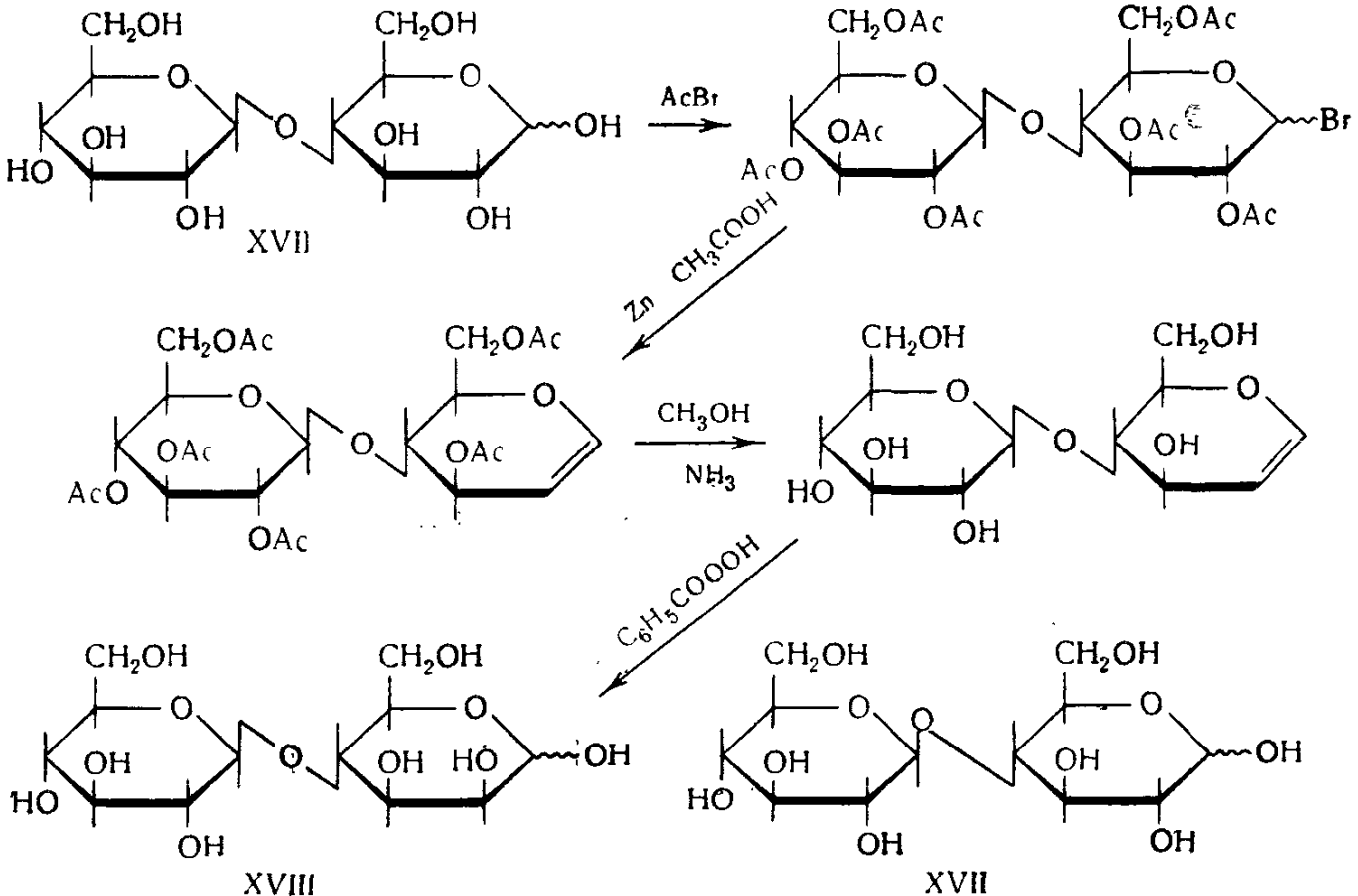


XV



XVI

2) синтез 3-(β-глюколиранозидо)маннопиранозы (XVIII) из целлобиозы (XVII) гликальным методом:

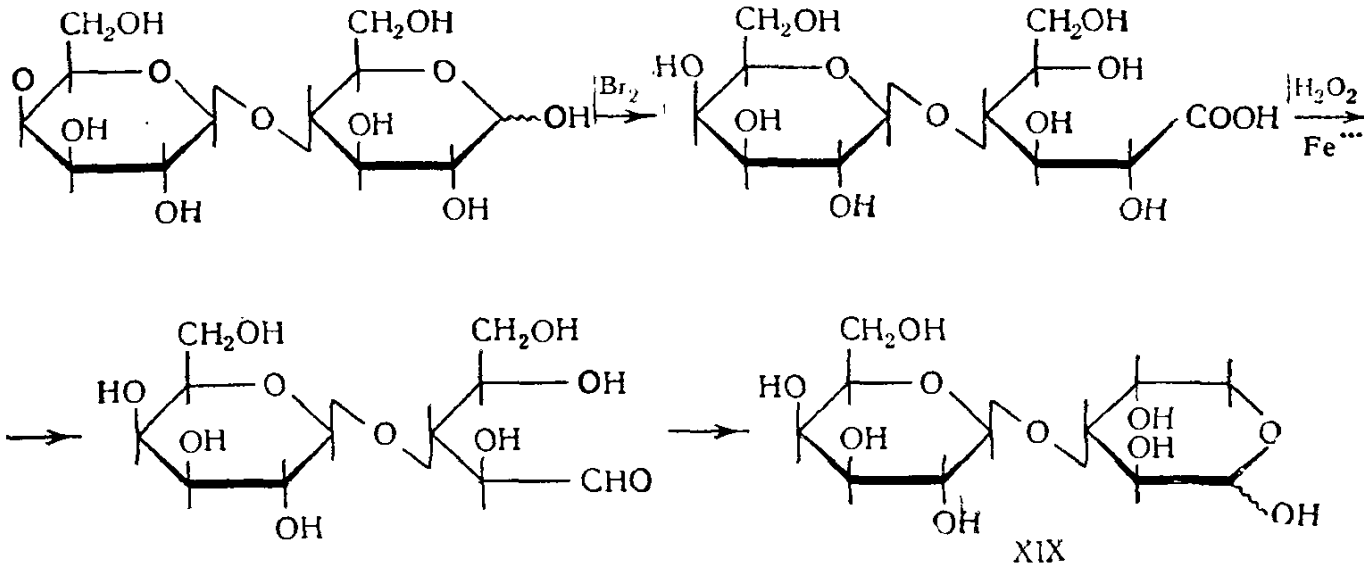


XVII

XVIII

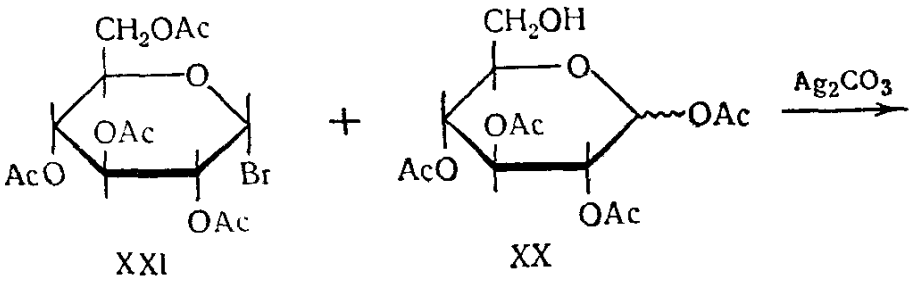
XVII

3) синтез 3-(β-галактопиранозидо)арабинозы (XIX) из лактозы (XV) деградацией по Руффу:

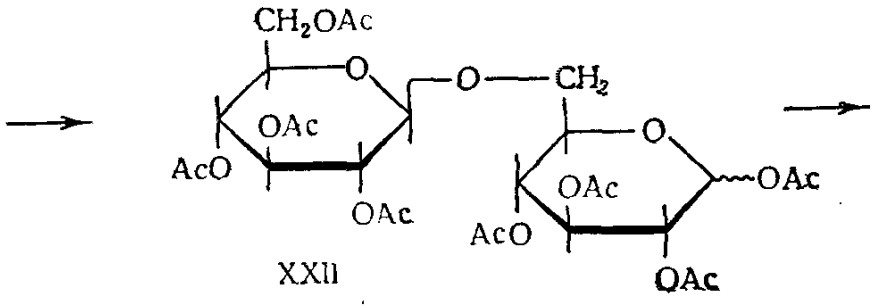


XIX

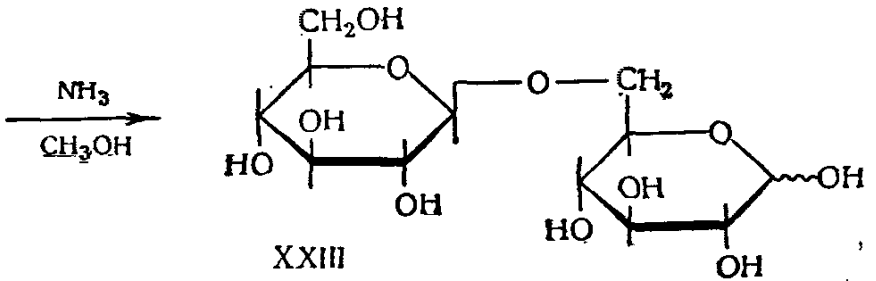
Вторая группа синтезов дисахаридов основана на синтетических методах в полном смысле этого слова — на конденсации двух подходящих производных моносахаридов. Так как дисахарид представляет собой гликозид, то *примененные здесь методы являются по* существу методами синтеза гликозидов, приспособленными для этой цели. Поскольку тот из моносахаридов, который играет в этой реакции роль агликона, содержит несколько гидроксильных групп, то он должен быть соответствующим образом защищен. Обычно применяется метод Кенигса — Кнорра, наиболее обычный метод синтеза гликозидов, который, как известно, дает только гликозиды с транс-расположением у $C_{(1)} — C_{(2)}$; кроме того в том случае, когда группировка у $C_{(1)} — C_{(2)}$ ацилгликозилгалогенида имеет цис-конфигурацию, вместо гликозида может получиться ортоэфир. Примером синтеза дисахаридов методом Кенигса-Кнорра является синтез генциобиозы:



XXI XX



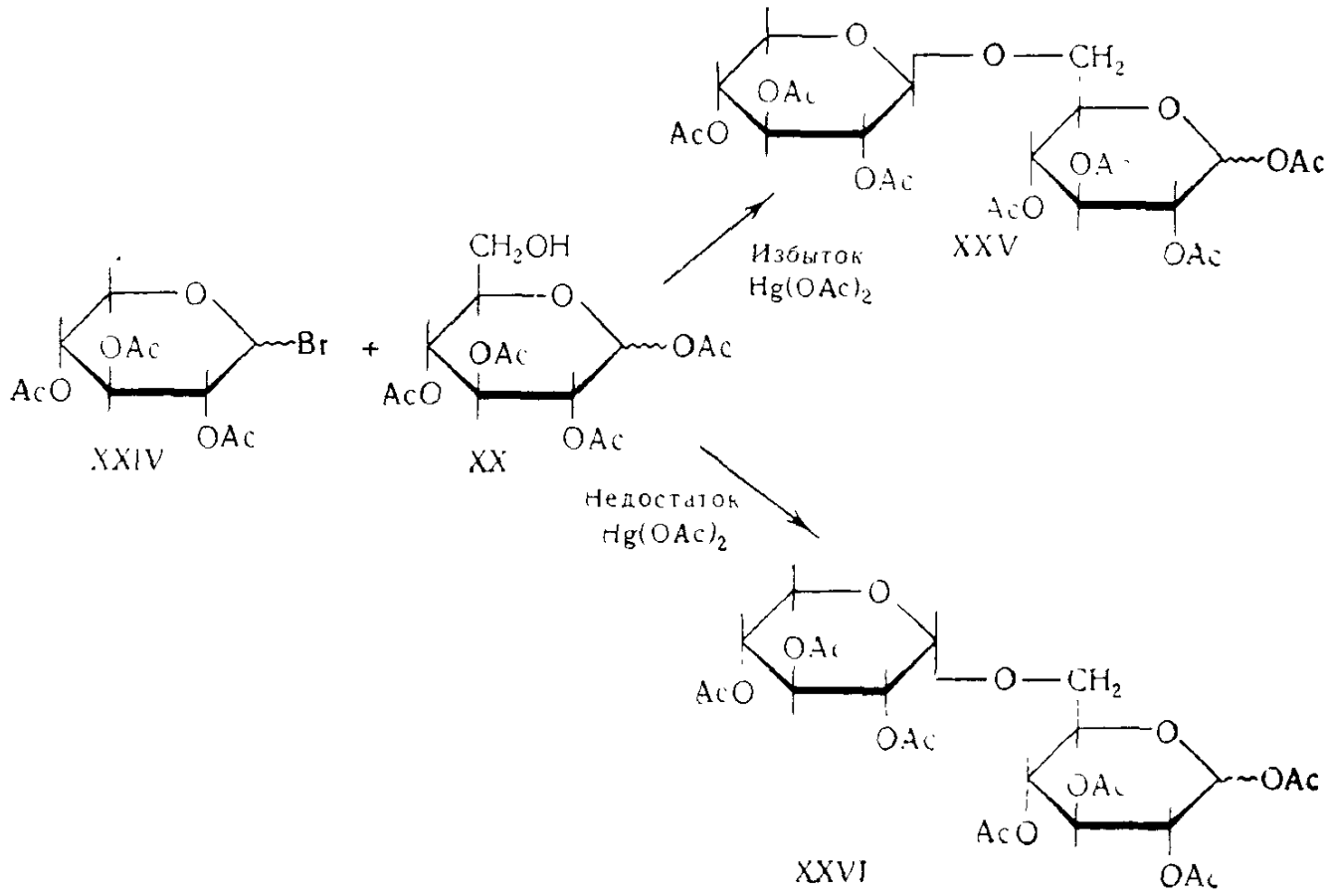
XXII



XXIII

На 1,2,3,4-тетраацетилглюкозу (XX), полученную ацетилированием 6-тритилглюкозы с последующим гидрогенолизом, действуют тетраацетилглюкозилбромидом (XXI) в присутствии карбоната серебра. Полученный таким образом октаацетат генциобиозы (XXII) омыляют действием метанольного раствора аммиака в генциобиозу (XXIII).

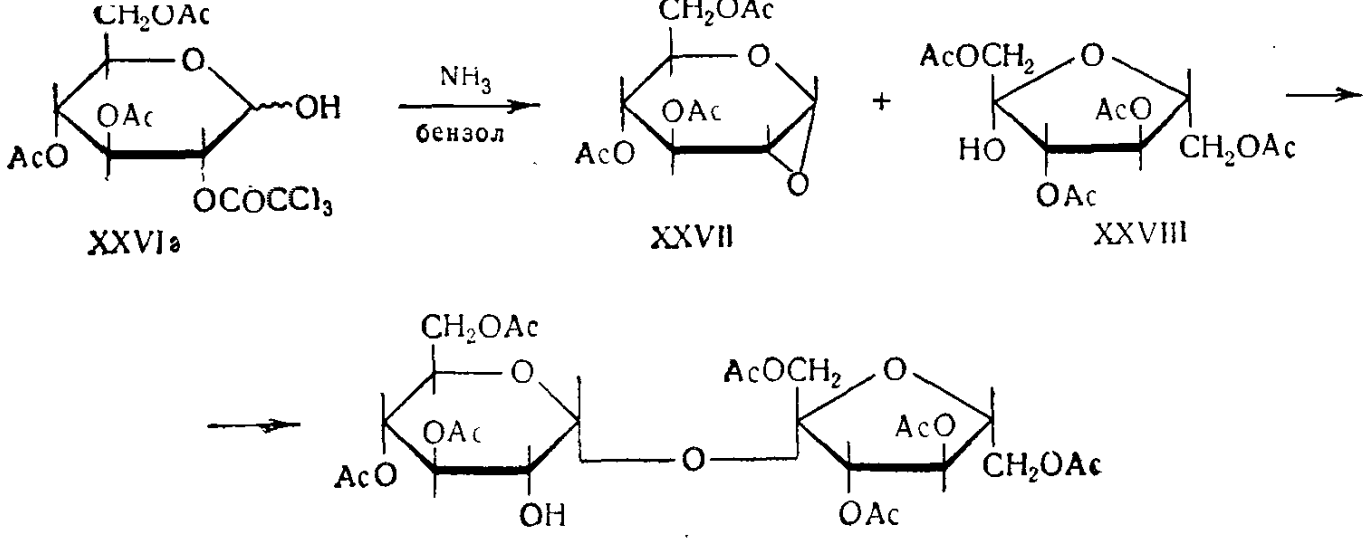
В отдельных случаях удается, заменяя карбонат серебра ртутными солями (обычно ацетат ртути в пиридине), получить в зависимости от количества катализатора α- или β-гликозиды, как, например, при синтезе примверозы:



При конденсации триацетилксилопиранозилбромида (XXIV) с 1,2,3,4,-тетраацетилглюкозой (XX) в присутствии избытка ацетата ртути получается дисахарид примвероза (XXV) с β-гликозидной связью — углеводная часть многих природных гликозидов, например антрахиноновых. Если эту конденсацию вести, напротив, в присутствии малого количества ацетата ртути, то образуется эпимерный примверозе α-гликозид — изопримвероза (XXVI).

Недавно была предложена модификация метода Кенигса — Кнорра, состоящая в том, что ацилгликозилгалогенидом действуют на натровое производное подходящим образом замещенного моносахарида, служащего вторым компонентом конденсации. Это натровое производное (алкоголят) моносахарида получают при действии натрия в жидком аммиаке на моносахарид.

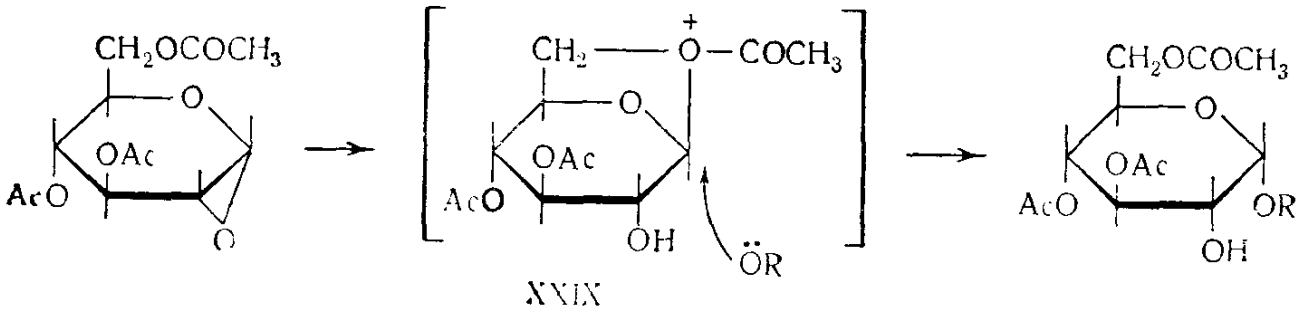
Дисахариды были получены также при раскрытии окисного кольца 1,2-ангидросахаров действием второго моносахарида. Наибольший интерес представляет так называемый ангидрид Бригля, или 3,4,6-триацетил-1,2-ангидроглюкоза (XXVII), так как он дает возможность получить α-глюкозиды. Ангидрид Бригля был совсем недавно использован Лемье для нового синтеза сахарозы, которую удалось получить таким способом с лучшим выходом, чем в первом синтезе Пикте:



XXVIa XXVII XXVIII

При обработке 2-трихлорацетил-3,4,6-триацетилглюкозы (XXVIII) в бензольном растворе аммиаком образуется ангидросахар (XXVII). Взаимодействие последнего с 1,3,4,6-тетраацетатом фруктозы (XXVII) дает (с выходом 5%) октаацетат сахарозы.

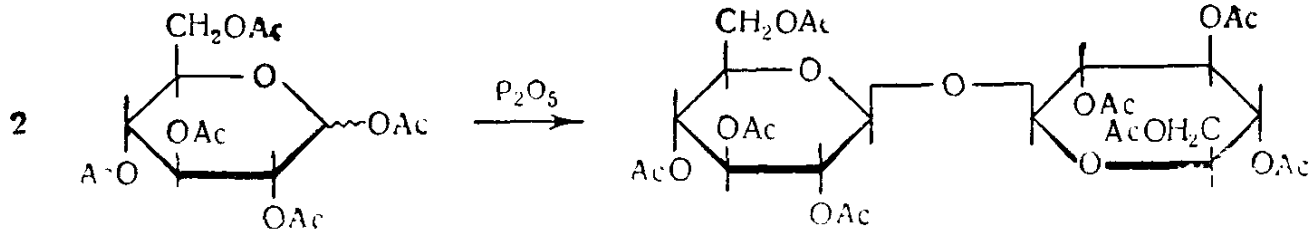
Ангидрид Бригля является уникальным реагентом, приводящим к α-гликозидам. Образование последних при «аномальном» разрыве эпоксидного кольца Лемье объясняет промежуточным образованием циклического иона оксония (XXIX),



который затем атакуется алкоксил-ионом с тыльной стороны, что и приводит к α-конфигурации у гликозидного центра. Следует отметить, что ангидрид Бригля и подобные ему соединения еще не нашли широкого синтетического использования.

Дисахариды могут быть получены и прямой дегидратацией моносахаридов или их ацетатов. При простом нагревании моносахарида в вакууме получается сложная смесь олигосахаридов, имеющих различное строение, поэтому этот метод не может считаться препаративным, хотя процесс такого рода имеет некоторое техническое значение.

Более однозначные результаты дает дегидратация нагреванием с пятиокисью фосфора в растворителе; этим способом был получен, например, эпимер трегалозы, так называемая изотрегалоза (XXX), имеющая β,β-гликозидную связь.



Наконец, определенное значение имеет и ферментативный синтез дисахаридов. Ферментативный гидролиз дисахаридов является обратимой ре-

акцией, и если смесь двух дисахаридов подвергать воздействию специфического фермента, образуется дисахарид, причем, как и при гидролизе, реакция стереоспецифична. Этот метод не всегда удобен с препаративной точки зрения, так как для получения ощутимых количеств дисахарида нужно брать большой избыток исходных моносахаридов с тем, чтобы сдвинуть реакцию в сторону образования дисахарида.

Большой интерес представляет ферментативный синтез дисахаридов из 1-фосфатов сахаров. Эта реакция подобна синтезу дисахаридов в организме, где имеет место обратимая реакция.

$$\text{дисахарид} + H_3PO_4 \rightleftarrows \text{1-фосфат моносахарида} + \text{моносахарид}.$$

При распаде дисахарида под действием фосфорной кислоты, так называемом фосфоролизе, образуется монофосфат одного из моносахаридов и свободный моносахарид. Если смесь фосфата моносахарида, которая может возникнуть в организме различными путями, и свободного моносахарида подвергать действию того же фермента, то происходит обратный фосфоролизу синтетический процесс и образуется дисахарид.

ЛИТЕРАТУРА

W. Hassid, M. Doudoroff. Enzymatic synthesis of sucrose and other disaccharides, Adv. carbohydrate chemistry, 1950, 4, 29.

J. Levi, C. Purves. The structure and configuration of sucrose. Adv. carbohydrate chemistry, 1949, 1, 4.

Глава 2

ВЫСШИЕ ОЛИГОСАХАРИДЫ

В настоящее время хорошо известно значительное количество трисахаридов и несколько индивидуальных тетра- и пентасахаридов.

Олигосахариды, состоящие из большего числа звеньев, в индивидуальном состоянии по существу неизвестны, что связано с трудностью их очистки.

Некоторые из описанных три-, тетра- и пентасахаридов находятся как таковые в различных частях растительного и животного организма. Другие, напротив, выделены как продукты частичного гидролиза полисахаридов и имеют большое значение при доказательстве их строения.

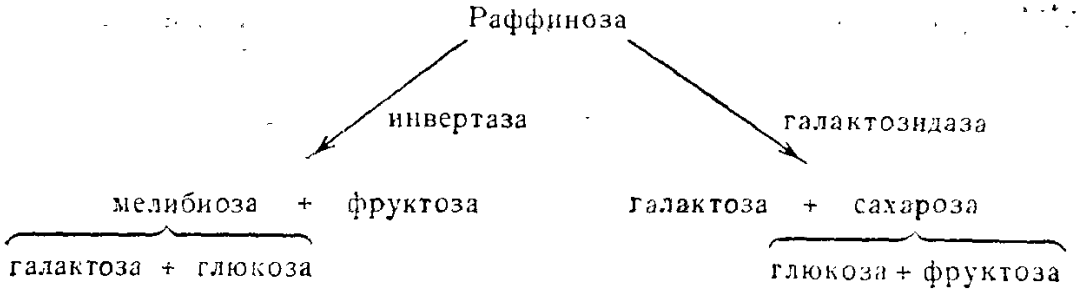
При установлении строения трисахаридов и высших олигосахаридов используются те же приемы и тот же логический метод, которые уже описаны при рассмотрении строения дисахаридов. Круг вопросов, подлежащих выяснению в данном случае, также аналогичен тому, который связан с дисахаридами. Вместе с тем появляется новый момент, чрезвычайно усложняющий дело, особенно при исследованиях высших олигосахаридов, а именно, вопрос о последовательности отдельных моносахаридов в цепи олигосахарида.

При выяснении этого вопроса, по крайней мере в более или менее простых случаях, большую услугу оказывает частичный гидролиз олигосахарида.

Для пояснения всего сказанного целесообразнее всего рассмотреть несколько подробнее установление строения одного из наиболее распространенных в природе трисахаридов — раффинозы, выделенной из различного растительного сырья, в том числе, например, из мелассы и хлопковых семян.

Раффиноза является невосстанавливающим сахаром и, следовательно, содержит одну гликозидо-гликозную и одну гликозидо-гликозидную связь. При полном гидролизе раффинозы образуются по одной молекуле галактозы, глюкозы и фруктозы. Далее возникает вопрос о том, в какой последовательности указанные моносахариды связаны в раффинозе и какая пара из них связана гликозидо-гликозной, а какая гликозидо-гликозидной связью.

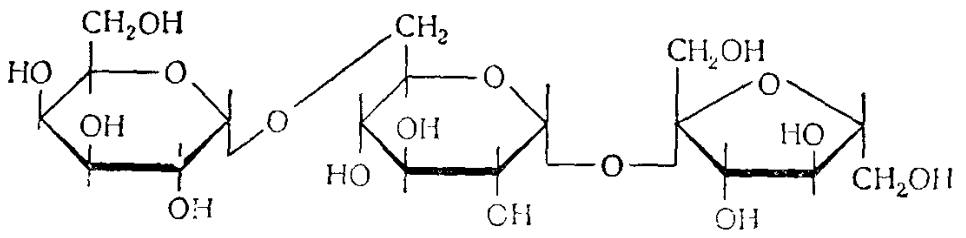
Этот вопрос может быть решен при рассмотрении результатов частичного гидролиза раффинозы, проводимого действием специфических ферментов. Так, под действием инвертазы — фермента, гидролизующего сахарозу, раффиноза распадается на фруктозу и дисахарид мелибиозу, состоящую из галактозы и глюкозы. С другой стороны, ферментативный гидролиз α-галактозидазой дает галактозу и сахарозу.



Из этих данных ясно, что моносахариды в раффинозе могут быть связаны только в последовательности галактоза — глюкоза — фруктоза. Ясен и вопрос о характере гликозидных связей и их конфигурации. Поскольку инвертаза специфически расщепляет связи β-фруктозидов, а также из факта выделения сахарозы, ясно, что глюкоза и фруктоза в молекуле раффинозы связаны гликозидо-гликозидной связью по типу α-глюкозидо-β-фруктозид.

Далее, поскольку α-галактозидаза специфически расщепляет α-галактозиды, ясно, что в раффинозе имеется α-галактозидная связь, т. е. остаток сахарозы играет роль агликона, и раффиноза является α-галактозидом сахарозы.

Наиболее сложным и трудоемким вопросом, требующим выяснения, является вопрос о размере окисных колец в моносахаридных остатках и месте их связи между собою. Частично этот вопрос ясен из факта выделения сахарозы при гидролизе, однако вопрос о размере кольца в галактозе и о месте ее связи с глюкозой требует выяснения. С этой целью раффиноза была подвергнута исчерпывающему метилированию, и метилированное производное подвергалось полному гидролизу. В результате этой операции были выделены: 2,3,4,6-тетраметилгалактоза, 2,3,4-триметилглюкоза (XXXII) и 1,3,4,6-тетраметилфруктоза. Образование последней естественно, поскольку в раффинозе имеется элемент сахарозы, и не требует дальнейших комментариев. Так как в раффинозе галактоза связана гликозидной связью, то выделение 2,3,4,6-тетраметилгалактозы свидетельствует о том, что в остатке галактозы в окисное кольцо был включен гидроксил у C_5, т. е. что галактоза имеет пиранозную структуру. Наконец, выделение при частичном гидролизе сахарозы говорит о том, что глюкозный остаток в раффинозе имеет пиранозную структуру. Вместе с тем выделение (XXXII) указывает на то, что в образовании связи с остатком галактозы участвует гидроксильная группа у $C_{(6)}$. Этим самым решен последний вопрос, касающийся структуры раффинозы, которая, таким образом, может быть представлена формулой (XXXI).



XXXI

Таким же путем определяется строение и других три- и тетрасахаридов, причем возникающие при таком исследовании трудности быстро возрастали при увеличении числа моносахаридных звеньев в цепи.

Что касается свойств олигосахаридов, то последние в основном повторяют свойства входящих в их состав моносахаридов и дают тот же ряд производных по гидроксильным группам, а также производные по альде-

гидной группе, когда речь идет о восстанавливающем олигосахариде. Физические свойства низших олигосахаридов (ди-, три-, тетрасахаридов) близки к свойствам моносахаридов. Это, как правило, твердые кристаллические тела. Однако по мере усложнения молекулы и роста молекулярного веса свойства олигосахаридов все больше напоминают свойства высокомолекулярных соединений. В этом отношении, естественно, высшие олигосахариды с полным правом могут рассматриваться и как простейшие представители полисахаридов.

ЛИТЕРАТУРА

M. Blair, W. Pigman. Fortschritte auf dem Gebiet der Oligosaccharide. Angew. Chemie, 1957, **69**, 422.

W. Evans, D. Reynolds, E. Jalley. The synthesis of oligosaccharides. Adv. carbohydrate chemistry, 1951, **6**, 27.

D. French. The raffinose family of oligosaccharides. Adv. carbohydrate chemistry, 1954, **9**, 149.

Часть III

ПОЛИСАХАРИДЫ

ВВЕДЕНИЕ

Углеводы, содержащие в своем составе большое число остатков моносахаридов, из которых они построены по принципу поликонденсации, называют полисахаридами. Как уже указывалось, строгая граница между полисахаридами и так называемыми олигосахаридами отсутствует, и полисахаридами обычно, чисто искусственно, считают углеводы, содержащие более десяти остатков моносахаридов.

Полисахариды по всему своему химическому облику являются типичными высокомолекулярными веществами, и именно это свойство, очевидно, должно быть принято за критерий, отделяющий типичные полисахариды от моно- и олигосахаридов. Полисахариды имеют исключительно большое значение. Они — один из важнейших типов природных биогенных полимеров, участвующих в различных процессах жизнедеятельности. Их биологическое значение может быть сравнено со значением белков, хотя пока еще гораздо менее изучено. К полисахаридам и их ближайшим производным относятся, например, такие важнейшие в биологическом отношении типы соединений, как полисахариды плазмы крови, определяющие ее групповую принадлежность, полисахариды, определяющие специфичность иммунологических реакций, гликоген — полисахарид, являющийся главным углеводным резервом животного организма, гликопептиды, специфические полисахариды микроорганизмов и т. д. и т. п.

Огромное значение полисахаридов в технике общеизвестно, и в этом отношении они занимают, несомненно, первое место среди природных полимеров. Достаточно назвать целлюлозу и некоторые из ее спутников, чтобы оценить то исключительное значение, которое имеют полисахариды на протяжении всей истории цивилизации, начиная с простейшего использования древесины, производства бумаги и лесохимической промышленности со всеми ее богатыми и многообразными возможностями и кончая современными видами искусственных волокон и технически важных полимеров, изготовляемых на основе переработки целлюлозы.

С этим связана и центральная роль растительных полисахаридов в жизни растения, где целлюлоза играет роль основного строительного материала, а второй важнейший полисахарид — крахмал — роль энергетического резерва.

Вопрос о классификации полисахаридов часто доставляет затруднения. Иногда, особенно в дисциплинах, связанных с биологией, в основу классификации кладется происхождение полисахарида, и их делят на растительные полисахариды, полисахариды животного происхождения, полисахариды микроорганизмов или, более узко, на полисахариды хвойных пород, полисахариды водорослей и т. д.

Однако с точки зрения химика такая классификация представляется малоудовлетворительной.

Согласно химической классификации полисахариды делятся, прежде всего, на два больших класса: гомополисахариды, или полисахариды, в состав которых входит один единственный моносахарид, т. е. «гомогенные», и гетерополисахариды, т. е. полисахариды, которые состоят из двух или более различных моносахаридов.

Гомополисахариды в зависимости от того, состоят ли они из гексоз или пентоз, разделяются на гексозаны и пентозаны и далее на глюканы, маннаны, галактаны, ксиланы, арабаны, фруктозаны, урониды и т. д. по имени моносахарида, являющегося их мономерной единицей.

Строгая классификация и номенклатура гетерополисахаридов отсутствуют. Иногда вещества, состоящие из двух различных моносахаридов, называют смешанным именем, например, сополимер (вернее продукт соконденсации) глюкозы и маниозы может быть назван глюкоманнаном, аналогично могут быть образованы названия глюкогалактаны, глюкоурониды и т. д. Наряду с этим многие гетерополисахариды классифицируют по биологическим признакам, точнее, по происхождению.

Как уже упоминалось выше, полисахариды по своим свойствам являются типичными высокомолекулярными веществами, и поэтому при их исследовании принимаются критерии и используются методы химии высокомолекулярных соединений. Так, естественно, индивидуальный полисахарид является не индивидуальным, с точки зрения химика-органика, соединением, а смесью полимергомологов, и критерием его однородности является лишь отсутствие в нем примеси полимеров другого строения, т. е. содержащих другую последовательность мономерных единиц. В связи с этим вопрос о строении полисахаридов имеет тот же элемент условности, какой имеется в понятии строения полимеров, т. е. речь в данном случае идет не о строении индивидуальной молекулы, а о строении некоей усредненной молекулы со всеми типичными свойствами данного полимера.

Все трудности, характерные для экспериментальной работы с высокополимерами, проявляются и в работе с полисахаридами. Особо сложными представляются выделение и очистка индивидуального полисахарида (понимая индивидуальность соединения в указанном выше смысле). Чаще всего в природных объектах полисахариды встречаются в виде смесей, разделение и очистка которых от соответствующих примесей иной природы представляют большие трудности. Обычно для этой цели используют методы многократного фракционированного переосаждения из различных систем растворителей, иногда применяя для окончательной очистки физико-химические методы.

Критерием чистоты и индивидуальности полисахарида служат некоторые его константы, из которых наиболее важной является вращение плоскости поляризации; в настоящее время для этих же целей применяются и современные физико-химические методы.

В этой книге мы очень кратко рассмотрим полисахариды только с точки зрения обычной органической химии и не будем касаться тех вопросов, при решении которых полисахариды должны рассматриваться как высокомолекулярные соединения.

С точки зрения химика-органика, для установления строения полисахарида необходимо: 1) определить состав моносахаридов, входящих в полисахарид; 2) установить последовательность моносахаридных остатков в полимерной цепи, в том числе количество, место и структуру разветвлений основной цепи; 3) установить типы связей между моносахаридами; 4) определить размеры окисных колец сахаров и 5) выяснить конфигурацию гликозидных центров.

Проблема установления строения полисахаридов совершенно различна для гомополисахаридов и гетерополисахаридов. Для первых, особенно для гомополисахаридов, не имеющих разветвлений в цепи, вопрос решается сравнительно просто и не отличается принципиально от установления строения олигосахаридов. Напротив, вопрос о строении гетерополисахаридов весьма сложен и напоминает проблему строения высокомолекулярных пептидов. Между тем именно гетерополисахариды представляют особый биологический интерес, поскольку к ним относятся вещества, играющие чрезвычайно ответственную специфическую роль в жизненных процессах.

Глава 1

ГОМОПОЛИСАХАРИДЫ

К гомополисахаридам относится большое количество полисахаридов, входящих в состав скелетной части растений, составляющих их покрытие, вместилище для плодов, а также представляющих собою резервный запас углеводов в растении. К гомополисахаридам относятся, в частности, наиболее широко распространенные и важные природные полимеры — целлюлоза и крахмал.

Строение неразветвленных гомополисахаридов устанавливается теми же методами, что и строение олигосахаридов. В качестве примера можно привести установление строения целлюлозы.

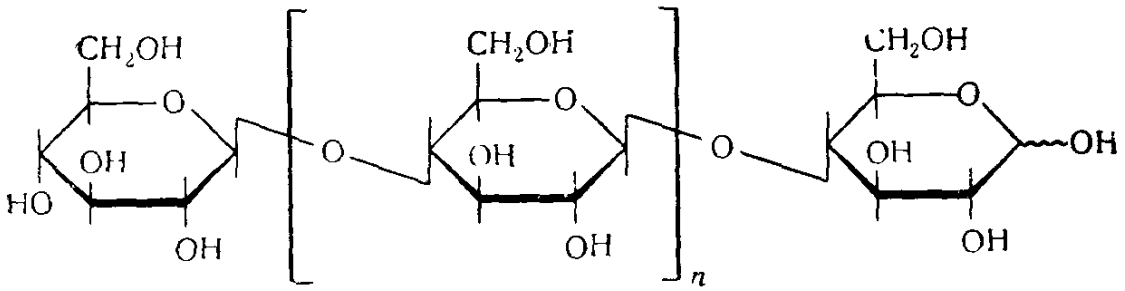
При полном гидролизе целлюлозы под действием серной кислоты образуется только глюкоза. Тот же результат получается при ферментативном гидролизе, который происходит под действием эмульсина, но не мальтазы. Из этих данных следует, что целлюлоза является глюканом и содержит β-глюкозидную связь. Поскольку в данном случае, как и вообще для гомополисахаридов, вопрос о последовательности мономерных единиц в цепи не возникает, необходимо выяснить только размер окисного кольца в глюкозе и место связи моносахаридов между собою. Для выяснения этого вопроса целлюлозу подвергают метилированию и гидролизу по методу, широко развитому Хеуорзсом и имеющему с тех пор фундаментальное значение для химии полисахаридов. В результате такой обработки получается около 90% 2,3,6-триметилглюкозы и очень небольшое количество 2,3,4,6-тетраметилглюкозы. Оставляя пока в стороне вопрос о происхождении 2,3,4,6-тетраметилглюкозы и о значении этого факта, отметим в качестве существенного обстоятельства, что при обработке по Хеуорзсу получается только одно вещество — 2,3,6-триметилглюкоза. Это указывает прежде всего на то, что в целлюлозе вся цепь построена однотипно, т. е. все глюкозные остатки связаны друг с другом совершенно одинаково. Поскольку из результатов метилирования и гидролиза метилцеллюлозы следует, что в полимерной цепи у остатков целлюлозы свободными были гидроксильные группы у $C_{(2)}$, $C_{(3)}$ и $C_{(6)}$, то для построения макромолекулы целлюлозы открываются две альтернативные возможности: либо глюкозные остатки имеют фуранозную структуру и связаны с глюкозидным атомом соседнего звена через кислородный атом у $C_{(5)}$, либо, наоборот, глюкозные остатки имеют пиранозную структуру, и связь с соседними остатками мономера находится у $C_{(4)}$.

Первое предположение представляется весьма маловероятным, так как в этом случае вся гигантская молекула целлюлозы являлась бы многократно повторенным глюкофуранозидом; в то же время хорошо

известно, что гликозиды с фуранозным кольцом очень нестойки к кислому гидролизу (см. стр. 91), что не соответствует относительной гидролитической устойчивости целлюлозы. Таким образом, гораздо более вероятным для целлюлозы является второе предположение — пиранозная структура и связь у $C_{(4)}$.

Это было окончательно подтверждено тем, что при обработке целлюлозы уксусной кислотой в присутствии небольшого количества серной кислоты (ацетолиз) с высоким выходом образуется ацетат дисахарида — октаацетилцеллобиоза, для которой было обычным методом доказано строение 4-β-глюкопиранозидо-глюкопиранозы. Таким образом, строение целлобиозы аналогично строению мальтозы, с тою разницей, что в этом случае налицо β-глюкозидная, а не α-глюкозидная связь. Поскольку в мягких условиях ацетолиза не могло произойти изменений в глюкозных остатках, то целлобиоза представляет собою неизменный фрагмент целлюлозной молекулы, и, следовательно, в последней имеются действительно пиранозные кольца глюкозы, связанные друг с другом через $C_{(4)}$. Этот вывод был подтвержден также выделением и установлением строения высших олигосахаридов — аналогов целлобиозы — целлотриозы и целлотетраозы.

Тем самым строение целлюлозы может считаться окончательно доказанным и выражается формулой (I).



I

Образование 2,3,4,6-тетраметилглюкозы после метилирования и гидролиза обязано крайнему глюкозному звену в цепи, в котором гидроксил у $C_{(4)}$ свободен и, следовательно, подвергается метилированию. Последним вопросом строения целлюлозы, относящимся уже к области высокомолекулярной химии, является установление ее молекулярного веса, т. е., другими словами, числа *n*, или степени полимеризации.

Чисто органохимическое решение этого вопроса возможно путем установления «удельного веса» одной из концевых групп во всей макромолекуле. Так, например, определив соотношение образующихся при обработке по Хеуорзсу 2,3,6-триметилглюкозы и 2,3,4,6-тетраметилглюкозы, мы можем вывести определенное заключение о том, на сколько остатков глюкозы, входящих в цепь, приходится одна концевая группа, и тем самым определить число глюкозных остатков в цепи, или, другими словами, степень полимеризации. Опыты, поставленные в этом направлении, показали, что в продуктах гидролиза метилцеллюлозы содержится приблизительно 0,6% тетраметилцеллюлозы, которая может быть выделена перегонкой в высоком вакууме. Проведенный расчет показывает, что это соответствует степени полимеризации более 100 и молекулярному весу около 15000.

Другой подход к определению среднего молекулярного веса целлюлозы, основанный также на установлении количества концевых групп, состоит в количественном определении восстанавливающей способности целлюлозы. «Удельный вес» концевой группы, содержащей свободный гликозидный гидроксил и, следовательно, обладающей восстанавливаю-

щей способностью из-за таутомерного перехода, очень мал, и поэтому обычными качественными реакциями восстанавливающее действие целлюлозы не обнаруживается. Однако возможно провести количественные определения процентного содержания альдегидной группы путем окисления гипоиодитом или гипобромитом. Установление процента альдегидных групп позволяет рассчитать обычным образом молекулярный вес и степень полимеризации.

Хотя указанные методы определения молекулярного веса по количеству концевых групп очень неточны и дают только ориентировочные данные, тем не менее они до сих пор широко применяются химиками-органиками для первой оценки величины молекулярного веса полисахаридов.

Более точные, хотя также далекие от однозначности данные можно получить, применяя методы определения молекулярного веса, принятые в химии высокомолекулярных соединений. Для полисахаридов применяются в этих целях определения осмотического давления, вязкости, скорости седиментации, из которых затем по известному пути вычисляют молекулярный вес. Последний может быть найден также из данных рентгеноструктурного анализа. Определенный этими способами молекулярный вес целлюлозы колебался в пределах от 100 000 до 1 500 000, что соответствовало степени полимеризации от 600 до 9000.

Такое значительное расхождение полученных разными методами величин объясняется не только недостаточной точностью самих методов. Оказалось, что молекулярный вес целлюлозы, как и многих других природных полимеров, в значительной мере зависит от метода ее выделения и очистки, так как даже мягкие условия обработки ведут к частичному разрыву полимерной цепи и резкому изменению молекулярного веса.

В связи с этим результаты, полученные при определении молекулярного веса данного образца целлюлозы или другого полисахарида тем или иным методом, должны быть всегда тщательно проанализированы, и наиболее достоверную среднюю величину молекулярного веса следует, очевидно, выводить как результат нескольких измерений, сделанных различными методами.

Значительные расхождения в величинах молекулярного веса целлюлозы, полученных с применением химических и физико-химических методов, скорее всего объясняются тем, что в первом случае при той или иной обработке образца, например, при окислении гипобромитом, происходит, очевидно, частичный разрыв полимерной цепи, вследствие чего молекулярный вес резко падает.

Огромный молекулярный вес целлюлозы придает ряд особенностей ее молекуле, что проявляется в ее известных физико-химических свойствах, в первую очередь, как и у всех высокополимеров, в большой склонности к межмолекулярной ассоциации. Особенности конформации полимерной цепи целлюлозы, имеющей вид вытянутой нити, винтообразно закрученной вокруг своей оси, облегчает межмолекулярное взаимодействие полимерных цепей силами водородных связей и вандерваальсовскими силами. Вследствие этого возникают прочные молекулярные агрегаты, имеющие характер продольных волокон, что и обеспечивает характерные механические свойства целлюлозы, обусловливающие ее выдающееся техническое значение.

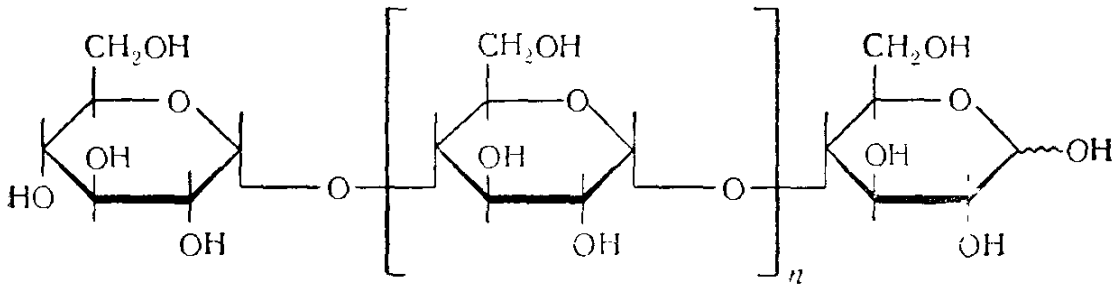
Подробнее эта сторона вопроса химии целлюлозы излагается в специальных руководствах.

Целлюлоза является одним из простейших по своему строению полисахаридов. Более сложным оказался вопрос о строении другого важнейшего полисахарида — крахмала. Крахмал является резервным поли-

сахаридом многих растений и накапливается в различных частях растения, откуда может быть извлечен разными способами. Крахмал является одной из важных составных частей пищи и определяет питательную ценность злаков, картофеля и других углеводных продуктов питания.

Тщательное исследование полисахарида, известного под названием крахмала, показало, что он неоднороден, содержит фосфор и состоит в действительности из двух полисахаридов — амилозы (20—30%) и амилопектина (70—80%). Незначительное количество фосфора, содержащееся в крахмале, приходится на остатки фосфорной кислоты, которые этерифицируют отдельные редкие гидроксильные группы у $C_{(6)}$ глюкозных остатков. Амилоза и амилопектин могут быть без большого труда разделены путем осаждения амилозы некоторыми растворителями (бутанолом, нитрометаном и другими), с которыми она дает комплексы. После освобождения от растворителя амилоза может быть получена в кристаллическом виде. Строение амилозы оказалось весьма близким к строению целлюлозы: вся разница между обоими этими полисахаридами состоит в том, что в амилозе остатки глюкозы связаны не β-гликозидной, а α-гликозидной связью.

Наличие этой связи доказывается тем, что амилоза легко распадается под действием мальтазы. Таким образом, строение амилозы может быть выражено следующей формулой (II).



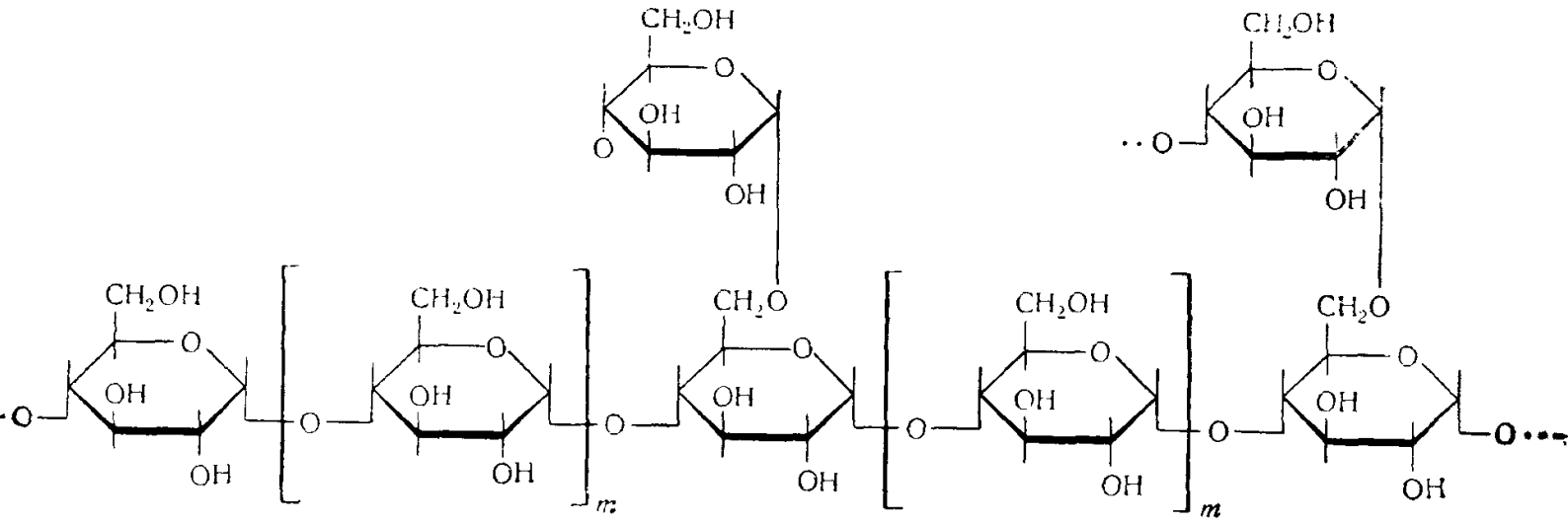
II

Молекулярный вес амилозы составляет около 50 000, что соответствует примерно 300 глюкозным остаткам в полимерной цепи.

Значительно более трудно решение вопроса о строении амилопектина. При полном гидролизе амилопектина единственным продуктом оказывается также глюкоза.

После метилирования амилопектина и гидролиза метильного производного были выделены 2,3,6-триметилглюкоза и около 4% 2,3-диметилглюкозы. Если на основании нормальной устойчивости амилопектина к кислому гидролизу принять, что содержащиеся в нем глюкозные остатки имеют пиранозную структуру, то результаты гидролиза метиламилопектина говорят о следующем. Основной структурной единицей полимерной цепи являются, как и в амилозе, остатки глюкозы, связанные между собою в положениях 1—4 α-гликозидной связью. Однако выделение из продуктов гидролиза небольшого, но вполне определенного количества 2,3-диметилглюкозы убеждает, что такой вид связи в цепи амилопектина не является единственным.

Наличие 2,3-диметилглюкозы показывает, что в полимерной цепи амилопектина имеются глюкозные остатки, в которых свободные гидроксильные группы у $C_{(6)}$ отсутствуют. Это свидетельствует о наличии разветвлений, которые содержатся в основной полимерной цепи, построенной по типу 1→4 связи; общее строение амилопектина может быть изображено, как III (см. стр. 158).



III

Относительные количества выделенных после гидролиза 2,3,6-триметилглюкозы и 2,3-диметилглюкозы позволяют высказать соображения о частоте разветвлений в основной цепи, т. е. о значении m в формуле (III). Если считать достоверным, что 2,3-диметилглюкоза составляет в цепи 4%, то m равно примерно 25—30, т. е. при условии регулярного строения цепи, в ней через каждые 25—30 остатков глюкозы, связанных 1→4 связью, имеется разветвление. Однако вопрос о регулярности таких разветвлений совершенно неясен, и имеющиеся в настоящее время данные говорят как раз об обратном — о нерегулярности строения амилопектина. В этом последнем случае общую картину молекулы следует представить, как клубок полисахаридных цепей, не имеющих какой-либо выраженной главной цепи.

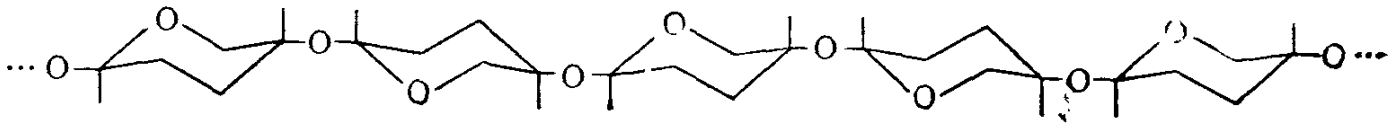
Совершенно ясно, что установление точного строения гигантской молекулы такого типа современными методами, во всяком случае чисто химическими методами, представляется почти немыслимым.

Более того, постановка такой задачи, по-видимому, в какой-то мере лишена смысла, поскольку при определении строения полисахарида речь всегда идет об установлении строения молекулы, являющейся средней в смеси полимергомологов. Если же, как и при определении строения амилопектина, речь идет о сильно и нерегулярно разветвленном полимере, то, очевидно, что некоторые индивидуальные полимергомологи могут отличаться один от другого не только длиной цепи, но и местом и длиной ответвлений, и «средний тип» молекулы такого полимера совершенно отличен от средней по размеру молекулы линейного полимера регулярного строения.

Как хорошо известно, физические свойства целлюлозы и крахмала, в том числе и чистой амилозы, резко отличаются. Если учесть чрезвычайную близость строения этих соединений в чисто органо-химическом аспекте, то эту разницу, естественно, следует отнести за счет разницы в строении в физическом смысле слова, т. е. за счет различия структуры молекулярных агрегатов этих полисахаридов. Однако недостаточно ясным остается вопрос о том, в чем причина именно этих отличий в строении ассоциированных образований. Логично искать ее все-таки в различиях между молекулами того и другого полисахарида. С точки зрения классической органической химии единственная разница между молекулой целлюлозы и амилозы состоит в различии конфигурации у гликозидного центра. Этой разницей и объясняли различия в конформации цепей обоих полисахаридов, следствием которого является, очевидно, различие в характере межмолекулярной ассоциации.

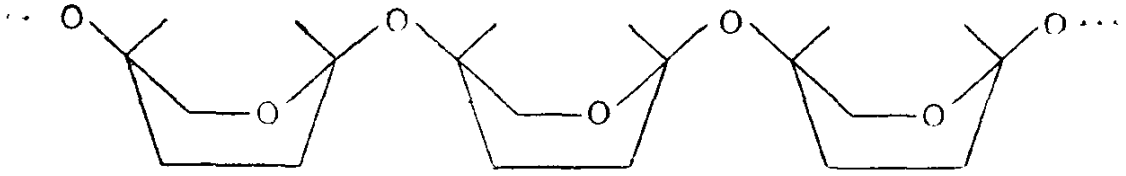
Благодаря развитию конформационных представлений и приложению их к разрешению вопросов строения углеводов начинает все яснее обрисовываться значение конформации глюкозных остатков в полимерной цепи полисахарида для конформации всей цепи в целом и, следовательно, для всей физико-химической характеристики полимера. Хотя многие детали этого интересного вопроса еще непонятны, однако достаточно ясно, что конформации глюкозных остатков в целлюлозе и амилозе резко различны.

По имеющимся данным, требующим, впрочем, еще подтверждений, в молекуле целлюлозы глюкозное кольцо находится в конформации $^4C_1$, вследствие чего вся полимерная цепь имеет форму скрученной вдоль оси тонкой нити (IV), о чем уже говорилось выше.



IV

Напротив, в амилозе глюкозное кольцо по стерическим причинам не может иметь форму кресла и находится в одной из ваннообразных конформаций (3В), вследствие чего вся полимерная цепь приобретает изогнутую волнообразную форму (V), способную в определенных условиях свернуться в спираль.



V

Естественно, что такое резкое различие в конформации полимерной цепи (которое само является следствием различия конформации мономерной единицы) находит отражение во всем комплексе физико-химических свойств.

Очень близок по строению к амилопектину важнейший гомополисахарид животного происхождения — гликоген. Гликоген играет в животном организме роль резервного полисахарида. При избытке углеводов в пище он, образуясь из избыточной глюкозы, откладывается в печени. Напротив, при недостатке углеводов в пище он распадается, и образующаяся при этом глюкоза поступает в кровь.

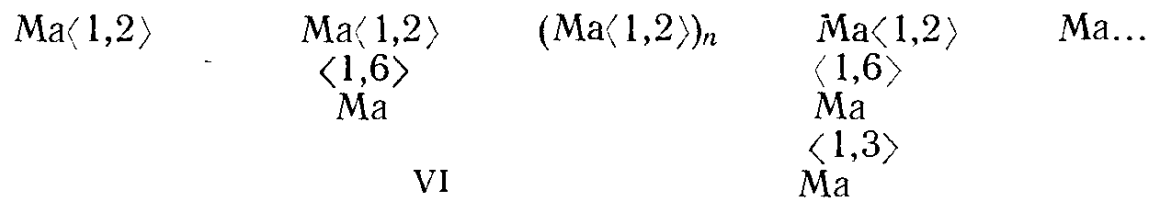
Гликоген, так же как и амилопектин, является глюканом, содержащим в основной цепи 1→4 α-гликозидные связи и имеющим разветвления у $C_{(6)}$. Его отличие от амилопектина состоит, очевидно, в большем числе разветвлений и в более высоком молекулярном весе.

Помимо этих трех важнейших гомополисахаридов, относящихся к глюканам, в природе встречается большое количество гомополисахаридов, и рассмотрение всех их было бы затруднительным.

Ниже приводятся краткие сведения о наиболее важных типах гомополисахаридов, относительно строения которых имеются достаточно надежные данные.

Маннаны часто встречаются во внешних твердых покрытиях плодов, например в кожуре орехов, где присутствует маннан с 1→4 связью

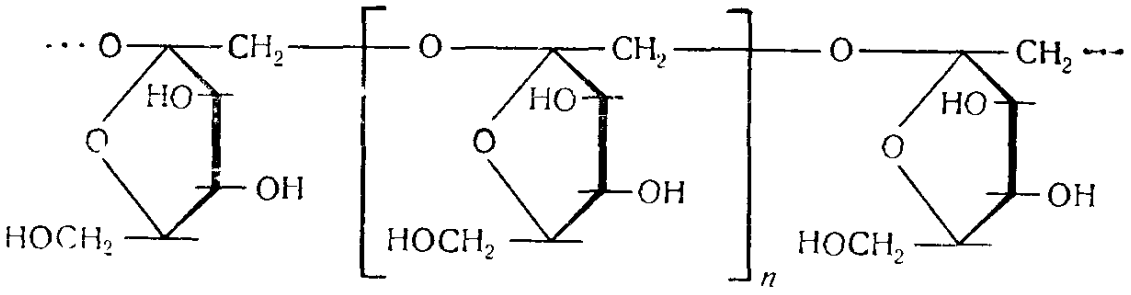
а в дрожжах — маннан с разветвленной цепью типа (VI) *.



VI

Галактаны встречаются также достаточно часто; к ним относится, например, известный агар-агар, представляющий собою 6-сульфоэфир галактана с 1→3 связью между мономерными остатками.

Фруктозаны во многих растениях являются резервными полисахаридами; наиболее известен из них полисахарид земляной груши — инулин, являющийся редким примером полисахарида с фуранозной структурой моносахаридных остатков. На основании выделения после гидролиза метилированного инулина 3,4,6-триметилфруктозы и 3, 4% 1,3,4,6-тетраметилфруктозы для инулина предложено строение (VII).

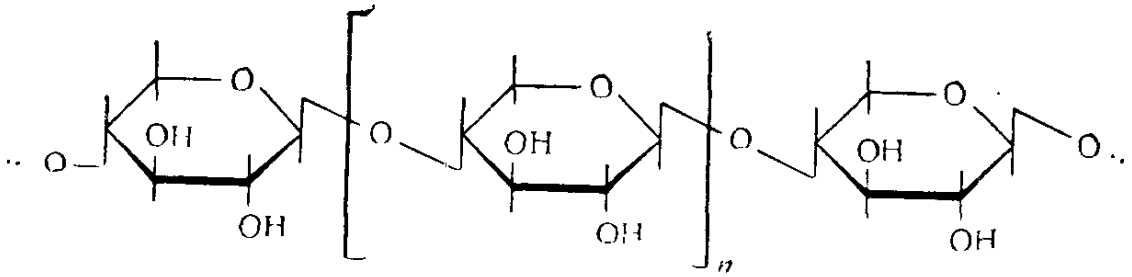


VII

Поскольку тетраметильного производного выделено 3,4%, полимерная цепь инулина содержит около 25 остатков фруктозы, а гидролиз его инвертазой указывает на β-конфигурацию гликозидной связи. Фуранозная структура моносахаридных остатков подтверждается весьма легким гидролизом инулина, который происходит частично уже при простом кипячении с водой.

Пентозаны — весьма распространенный тип полисахаридов. Содержатся в таком природном материале, как солома, кукурузные початки, кожура подсолнуха и т. п. Одним из наиболее распространенных пентозанов является ксилан, состоящий из остатков ксилозы и имеющий строение (VIII).

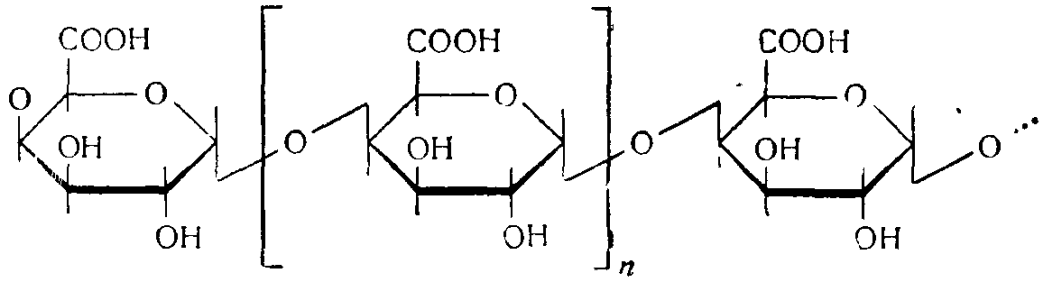
Отходы сельскохозяйственного производства являются неисчерпаемым источником пентозанов. Пентозансодержащее сырье используется для получения фурфурола и далее других производных фурана, однако после удовлетворения потребности в этих видах продукции остаются неиспользованными огромные резервы пентозансодержащих отходов.



VIII

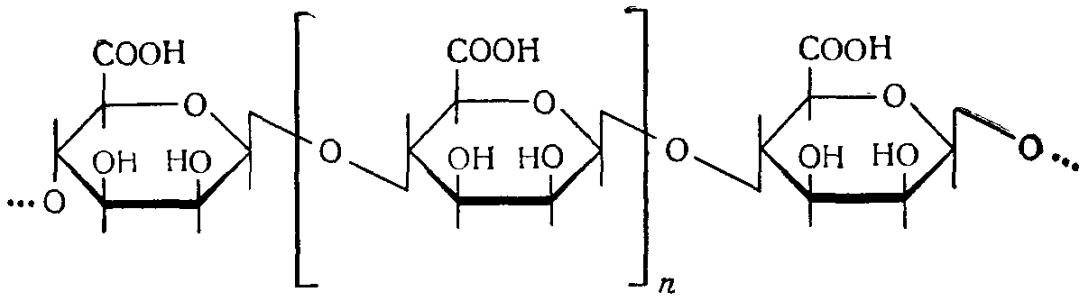
* В приведенной формуле маннана и далее в тексте использована сокращенная запись, очень часто применяемая при описании сложных полисахаридов. Моносахаридные единицы обозначаются первыми буквами английского названия; цифры, стоящие рядом с символами, указывают номер углеродного атома, который связан с соседней моносахаридной единицей.

Полиуронид ы, т. е. полисахариды, состоящие из остатков уроновых кислот, также широко распространены в природе и имеют в ряде случаев техническое значение. Сюда, например, относится так называемая пектиновая кислота, находящаяся во многих фруктах и молодых растительных тканях. Пектиновая кислота состоит из остатков галактуроновой кислоты, и для нее предложено строение (IX).



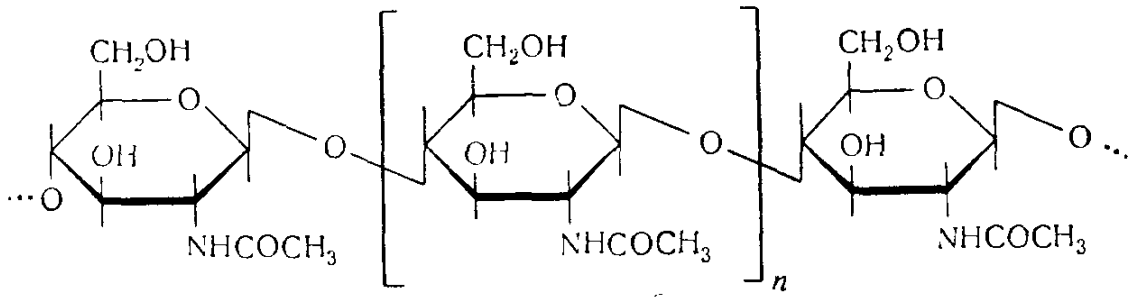
IX

К полиуронидам относится также важнейший из полисахаридов морских водорослей — альгиновая кислота, которая добывается в промышленных масштабах и используется для получения специальных видов волокна, в кондитерском деле и т. п. Она состоит из остатков маннуроновой кислоты и имеет строение (X).



X

Из полисахаридов, содержащих аминосахара, наибольшее распространение имеет хитин, находящийся в панцирях раков, насекомых и т. д. Хитин дает при гидролизе глюкозамин и используется в препаративной практике для его получения. Он состоит из остатков N-ацетилглюкозамина и имеет строение (XI).



XI

ЛИТЕРАТУРА

D. Manners. The molecular structure of glycogens. Adv. carbohydrate chemistry, 1957, 12, 262.

E. Ott, H. Spurlin, M. Grafflin. Cellulose and cellulose derivatives. New York, 1954.

J. Radley. Starch and its derivatives. London, 1953.

Глава 2

ГЕТЕРОПОЛИСАХАРИДЫ

Гетерополисахариды распространены в природе столь же широко, как и гомополисахариды. В отличие от последних они особенно широко представлены в животном царстве. В растительном мире они содержатся во многих соединительных тканях (гемицеллюлозы), камедях (гумми-арабик и другие), слизях. Гетерополисахариды входят в состав многих микроорганизмов, где они выполняют важные биологические функции. Однако наиболее ответственную роль гетерополисахариды играют в жизнедеятельности животных организмов, в которых они являются основой углеводных компонентов соединительных тканей (например, хрящей), входят в состав костей и различных слизей. Особенно значительную роль гетерополисахариды играют во многих сложных биохимических системах. Гетерополисахариды составляют основу так называемых гликопептидов — сложных комплексов белков с углеводами, широко представленных в различных тканях организмов. Гетерополисахариды, содержащие аминосахара (а иногда и полипептидные цепи), играют важную роль в вопросах иммунитета, обеспечивая специфичность иммунологических реакций. Этого же типа гетерополисахариды определяют групповую принадлежность крови. Приведенные примеры не дают исчерпывающего представления о выдающейся роли гетерополисахаридов в биохимических процессах, которая только начинает выясняться в последние годы.

Совершенно ясно, что трудности, с которыми сталкивается экспериментатор при работе с гетерополисахаридами, очень велики. Они начинаются при разрешении вопросов о выделении, индивидуализации и очистке гетерополисахаридов, так как ввиду сложности их состава наличие примесей может привести к роковым ошибкам, влияющим на весь дальнейший ход исследования. В связи с этим так часты противоречивые результаты, с которыми можно встретиться в литературе. Противоречия, естественно, объясняются различными методами очистки природных гетерополисахаридов. Еще большие, для сегодняшнего дня часто не разрешимые, трудности представляет собою установление строения гетерополисахаридов ввиду их структурной сложности. Подход к решению этого вопроса в общих чертах напоминает подход к решению вопроса о строении пептидов и белка с той разницей, что химия самих мономеров — моносахаридов — сложнее, чем химия аминокислот.

Гетерополисахариды, о структуре которых имеются какие-либо сведения, по своему строению могут быть разделены на две большие группы, хотя такое разделение весьма условно и не является общепринятым.

К первой группе относятся неразветвленные гетерополисахариды с регулярной структурой, т. е. такие полимеры, в молекуле которых монотонно повторяется одна и та же комбинация моносахаридов.

Установление строения гетерополисахаридов этого типа вполне возможно, и в принципе такая работа не отличается от установления строения моносахаридов, хотя она гораздо сложнее. Подавляющее большинство гетерополисахаридов, строение которых установлено, относятся именно к этому типу.

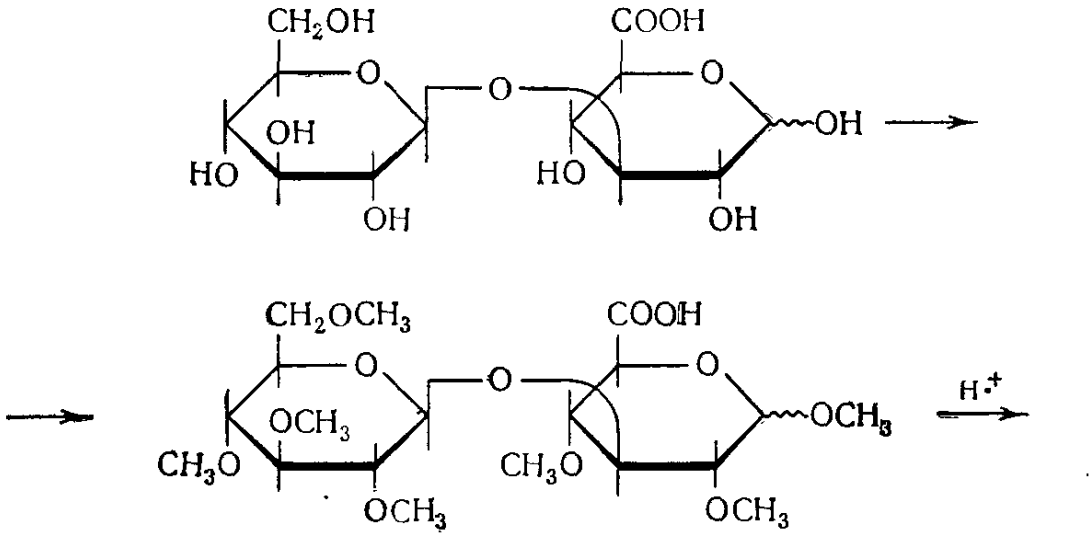
Другую группу гетерополисахаридов составляют гетерополисахариды с нерегулярным или регулярным разветвленным строением, которые настолько сложны по набору и последовательности входящих в них моносахаридов, что установление специфического их строения представляет пока еще почти непреодолимые трудности. Полного представления о строении полисахаридов этого типа еще не имеется, хотя именно они являются по-видимому, наиболее интересными с биологической точки зрения.

Гетерополисахариды весьма различаются по составу входящих в них моносахаридов, и этот состав в значительной мере зависит от происхождения гетерополисахаридов. Чаще всего в качестве мономеров в них встречаются глюкоза (особенно часто), галактоза, глюкуроновая и галактуроновая кислоты, глюкозамин и галактозамин. Несколько реже, но также часто в них содержится маннноза, арабиноза и рамноза.

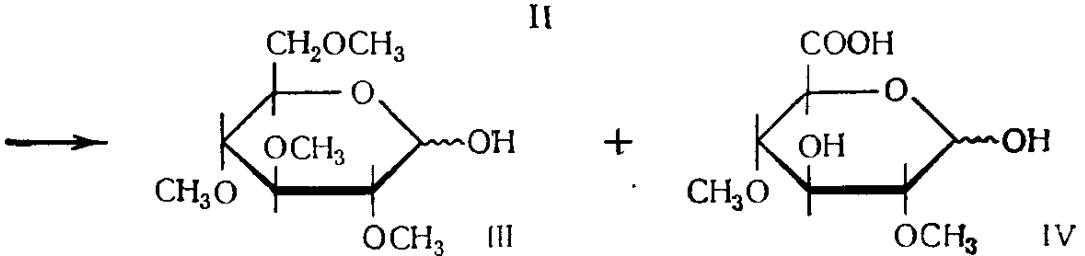
Как уже указывалось, установление строения гетерополисахаридов, во всяком случае простейших их представителей, основано на тех же методических и логических приемах, которые используются при установлении строения гомополисахаридов.

В качестве примера установления строения гетерополисахарида можно привести установление строения одного из бактериальных полисахаридов, так называемого полисахарида пневмококков III.

Полный гидролиз этого полисахарида дает смесь глюкозы и глюкуроновой кислоты в соотношении 1 : 1. При частичном гидролизе образуется дисахарид целлобиуроновая кислота, причем существенно, что она является единственным продуктом реакции. Это последнее обстоятельство показывает, что полисахарид состоит из регулярно повторяемой единицы глюкоза — глюкуроновая кислота, и дальнейшая задача состоит лишь в том, чтобы установить характер связей в повторяющейся цепи: глюкоза — глюкуроновая кислота — глюкоза — глюкуроновая кислота — и т. д.



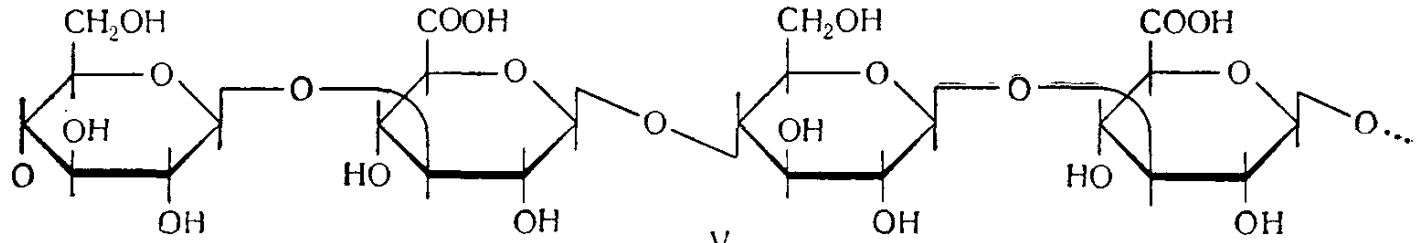
II



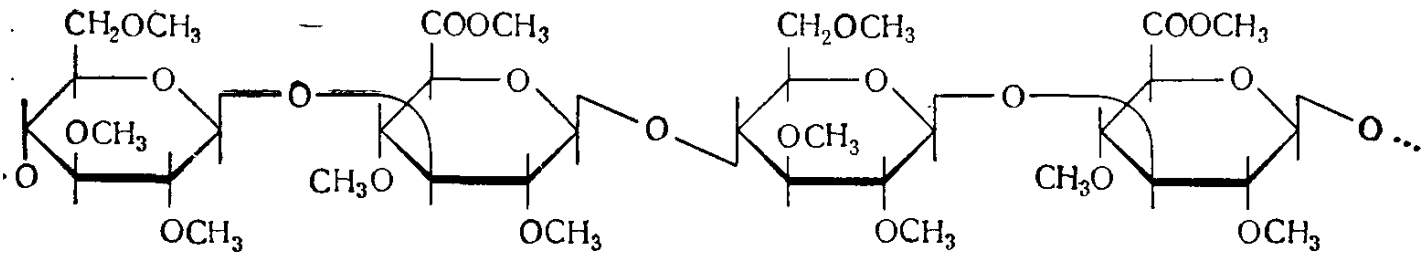
Эти вопросы решаются обычными для химии олигосахаров методами. Целлобиуроновая кислота (I) подвергалась метилированию, при последующем гидролизе метильного производного (II) образуется 2,3,4,6-тетраметилглюкоза (III) и 2,4-диметилглюкуроновая кислота (IV, см. стр. 163).

Этим устанавливается, что в полимерной цепи остаток глюкозы связан с остатком глюкуроновой кислоты в положении 3, причем ферментативным гидролизом показано, что глюкозидная связь имеет β-конфигурацию.

Последний вопрос, который подлежит выяснению, состоит в установлении характера связи остатка глюкуроновой кислоты со следующим за ним в полимерной цепи остатком глюкозы. Для выяснения этого вопроса полисахарид (V) метилировался, и полученное метильное производное (VI) подвергалось каталитическому гидрированию: при этом проходило восстановление только карбометоксильной группы. Восстановленный продукт (VII) при гидролизе дает 2,3,6-триметилглюкозу (VIII) и 2,4-диметилглюкозу (IX). Последняя образовалась из остатка глюкуроновой кислоты при его восстановлении, что подтверждает связь 1→3 в структурной единице глюкоза — глюкуроновая кислота. Другой компонент (VIII), соответствующий остатку глюкозы в полимерной цепи, свидетельствует о том, что в остатке глюкозы гидроксильная груп-

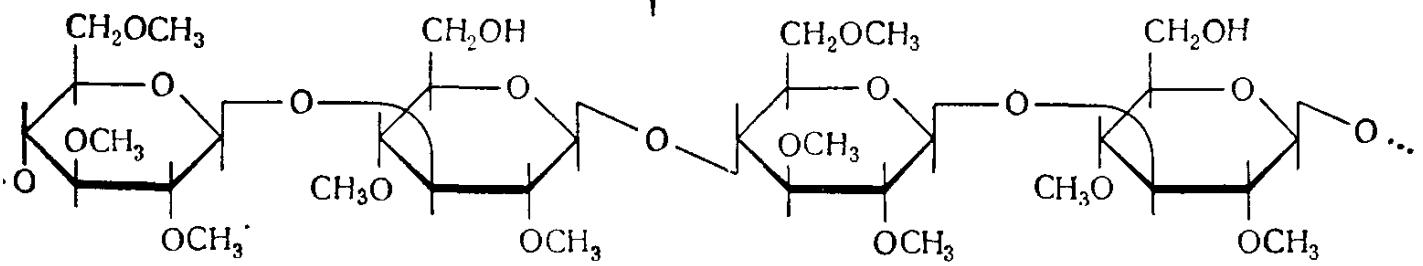


V



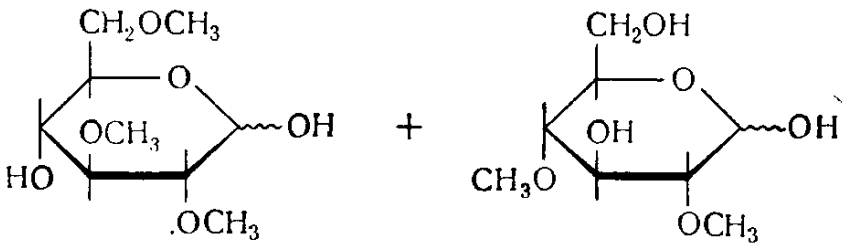
VI

H_2/Pt



VII

H^+



VIII + IX

па у $C_{(4)}$ была закрыта и, следовательно, связь в последовательности глюкуроновая кислота — глюкоза строилась по типу 1→4. Обычным методом установлено, что она является β-связью. Таким образом, общая структура полимерной цепи в полисахариде пневмококков III может быть представлена как (V, см. стр. 164).

Аналогичным путем устанавливалось строение других неразветвленных гетерополисахаридов с регулярным строением полимерной цепи. К важнейшим из них относятся приведенные ниже.

Гиалуровая кислота играет важную биологическую роль; с ней связаны процессы оплодотворения, защита от проникновения микроорганизмов в тело животного, понижение проницаемости оболочек за счет повышения их вязкости; она находится в стекловидном теле глаза, в полости суставов и т. д. Гиалуровая кислота построена из чередующихся остатков глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина и имеет строение (X, см. стр. 166).

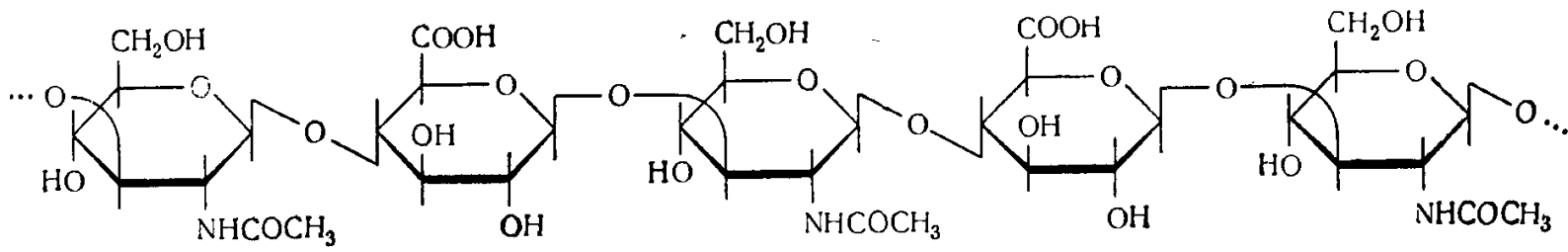
Хондроитинсерная кислота найдена в хрящах, вещество которых представляет собою комбинацию этого гетерополисахарида с белком, и, по-видимому, является солью белка как основания с хондроитинсерной кислотой. По структуре хондроитинсерная кислота напоминает гиалуровую кислоту и представляет собою последовательную цепь, составленную из остатков N-ацетилгалактозамина и глюкуроновой кислоты. Хондроитинсерная кислота содержит серу и является кислым эфиром серной кислоты, чем объясняются ее сильно кислые свойства. Ее строение может быть изображено как (XI, см. стр. 166).

Гепарин широко распространен в животном организме и был выделен из печени, тканей сердца и легких и из мышц. Он является природным антикоагулянтом крови с очень сильным действием и играет поэтому важную биологическую роль. Гепарин, так же как и хондроитинсерная кислота, содержит серу в виде остатков серной кислоты, которые привязаны как сложноэфирные и сульфамидные группы. Его полимерная цепь состоит из чередующихся остатков глюкозамина и глюкуроновой кислоты, и по строению своей основной цепи он, таким образом, близок к гиалуровой кислоте. Для гепарина предложено строение (XII, см. стр. 166).

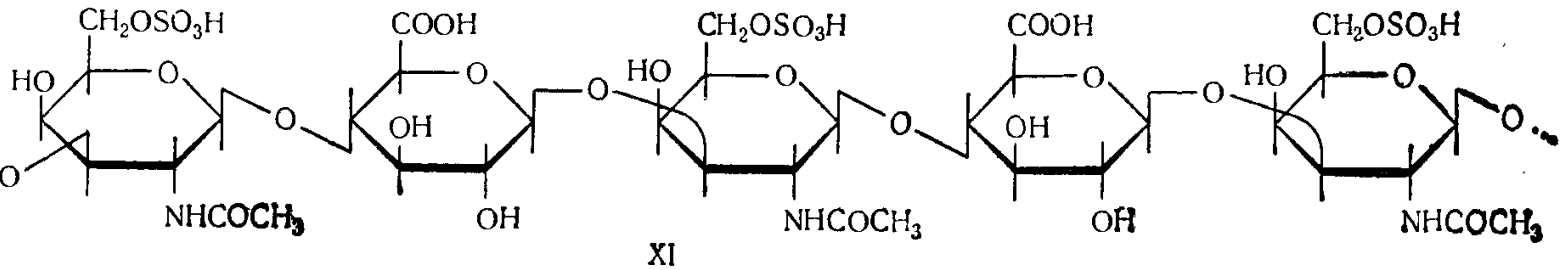
Несравненно более трудным делом является установление строения гетерополисахаридов, состоящих из большого количества различных моносахаридов и содержащих разветвленную цепь. Трудности, с которыми сталкивается в этом случае экспериментатор, растут в геометрической прогрессии с усложнением структуры, и какой-либо общий или более или менее стандартный путь для установления строения такого сорта гетерополисахаридов рекомендовать трудно. Более того, по существу строение полисахаридов этого типа не может считаться до конца выясненным ни в одном случае. Однако в некоторых, сравнительно немногочисленных случаях предложены формулы, которые, по-видимому, соответствуют основным чертам строения.

Для того, чтобы понять тот путь, каким проводится работа по установлению строения сложных гетерополисахаридов, и оценить по достоинству трудности, которые при этом приходится преодолевать, можно рассмотреть вопрос о структуре одного из растительных гетерополисахаридов, широко распространенных в природе и выделенных из различных камедей и природных смол, например из так называемого вишневого клея. Отличительной чертой этих гетерополисахаридов, содержащих в своем составе остатки глюкуроновой кислоты, является их способность к автогидролизу, который происходит в водных растворах. Это обстоятельство очень широко используется при установлении их строения.

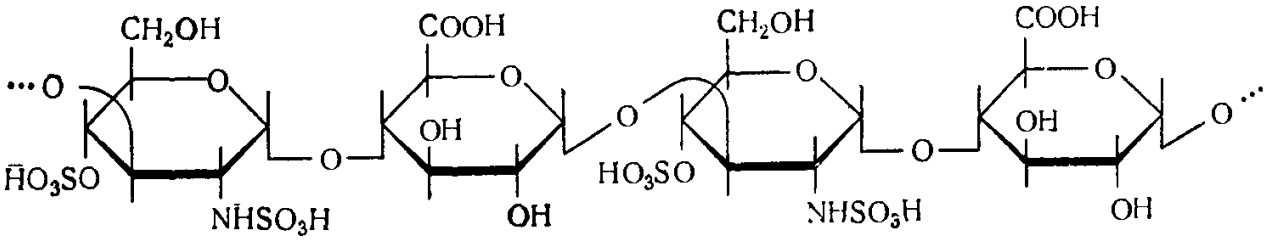
Одним из гетерополисахаридов этого рода является полисахарид гумми-арабика, строение которого можно считать почти полностью выяснен-



X



XI



XII

ным, что позволяет выбрать его в качестве примера для рассмотрения вопроса.

При полном гидролизе полисахарид распадается на галактозу, глюкуроновую кислоту, арабинозу и рамнозу и является, таким образом, сложным гетерополисахаридом. Первой и наиболее трудной задачей, особенно в связи с тем, что полисахарид содержит разветвленную цепь, является установление последовательности моносахаридных звеньев в полимерной цепи. Основной идеей при решении этого вопроса является разбивка полимерной цепи на более простые осколки, установление их строения (что в свою очередь может оказаться достаточно трудной задачей) и «складывание» их в полимерную цепь. Применение этого приема, широко использующегося в химии пептидов, затрудняется в данном случае значительной сложностью самих мономерных единиц. Однако задачу облегчает то обстоятельство, что, в отличие от пептидов, здесь имеет место повторение структуры, которая, впрочем, может быть достаточно многообразной.

При кратковременном автогидролизе, т. е. гидролизе, происходящем самопроизвольно при растворении в воде, полисахарид гумми-арабика дает так называемую деградированную арабовую кислоту, арабинозу, рамнозу и 3-галактозидоарабинозу. Из этого можно вывести единственное заключение о том, что один из остатков арабинозы находится на краю цепи (очевидно, в разветвлении) и связан с остатком галактозы.

Продолжительный автогидролиз полисахарида дает 3-галактозидогалактозу, что указывает на наличие в полимерной цепи структурной единицы, состоящей из двух галактозных остатков, связанных по 1,3-типу.

Дальнейшие усилия были направлены вначале на установление строения продукта частичного гидролиза полисахарида — деградированной арабовой кислоты. Метилирование ее с последующим гидролизом дало следующую смесь метилированных сахаров:

2,3,4,6-тетраметилгалактоза (1 часть);
2,3,4,-триметилгалактоза (5 частей);
2,4-диметилгалактоза (3 части);
2,3,4-триметилглюкуроновая кислота (3 части).

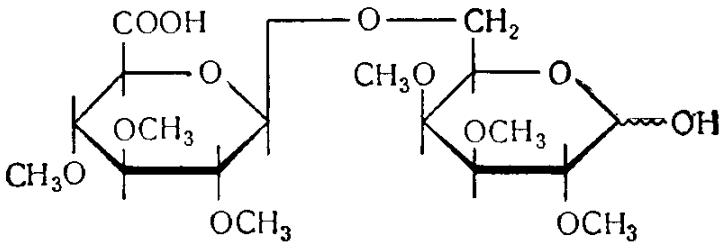
Этот результат показывает, что простейшая повторяющаяся структурная единица («элементарная единица») деградированной арабовой кислоты содержит 9 частей галактозы, из которых одна является терминальной (та, которая дает 2,3,4,6-тетраметильное производное) и 3 части глюкуроновой кислоты, которые все являются терминальными, так как образуют полностью метилированные производные. Другими словами, один остаток галактозы и 3 остатка глюкуроновой кислоты в цепи связаны только своими гликозидными гидроксилами. Из остающихся 8 остатков галактозы 5 остатков содержат заместители только у $C_{(6)}$ (те, которые дают 2,3,4-триметильное производное) и 3 остатка имеют два заместителя — у $C_{(}$ и $C_{(3)}$ (те, которые дают 2,4-диметильное производное), т. е. являются местами разветвлений в главной полимерной цепи.

Эти данные позволяют предложить следующую структуру для монотонно повторяющейся единицы деградированной арабовой кислоты:

...Gal⟨1,6⟩	Gal⟨1,6⟩ ⟨3,1⟩ Gal ⟨6,1⟩ Gluc. ac.	Gal⟨1,6⟩	Gal⟨1,6⟩ ⟨3,1⟩ Gal ⟨6,1⟩ Gluc. ac.	Gal⟨1,6⟩	Gal⟨1,6... ⟨3,1⟩ Gal ⟨6,1⟩ Gluc. ac.

Предложенная формула полностью объясняет образование всех моносахаридов, получающихся после метилирования и гидролиза. Она нахо-

дит свое подтверждение и в том, что при более осторожно проводимом частичном гидролизе метилированной деградированной арабовой кислоты выделяется биуроновая кислота (XIII); выделение последней непосредственно свидетельствует о наличии структурной единицы глюкуроновой кислоты — галактозы, находящейся на конце разветвления в стороне от главной цепи полимера.



XIII

Однако приведенная выше структура деградированной арабовой кислоты не является единственной, которая может объяснить образование указанных продуктов гидролиза. В данном случае, исходят из предположения о максимально упорядоченной регулярной структуре полимера. Однако тот же набор метилированных продуктов после гидролиза получился бы, если: 1) разветвления цепи не повторялись бы регулярно через один галактозный остаток, а были бы нерегулярными и 2) если бы остатки галактозы в главной цепи не всегда были связаны 1—6 связью, а имелась бы иногда 1—3 связь, тогда как ответвления в этом случае отходили бы от шестого углеродного атома.

Таким образом, в предложенной формуле допущена условность, доказать или опровергнуть которую достаточно трудно, хотя и не невозможно. Предложенная структура деградированной арабовой кислоты послужила основой для обсуждения полной структуры полимера. Для этого было необходимо установить места связи ячейки деградированной арабовой кислоты, которая является центральной частью молекулы полимера, с остатками арабинозы, рамнозы и галактозы, которые отрываются от основной цепи при частичном автогидролизе.

С этой целью недеградированный полисахарид гумми-арабика подвергался полному метилированию и последующему гидролизу. При этом были получены следующие метилированные моносахариды:

2,3,4-триметилрамнопираноза;
2,3,5-триметиларабофураноза;
2,3,4,6,-тетраметилгалактопираноза;
2,5-диметиларабофураноза;
2,4-диметилгалактопираноза;
2,3-диметилглюкуроновая кислота.

2,3,4-Триметилгалактоза не была выделена. Из этого последнего факта — отсутствия в продуктах гидролиза 2,3,4-триметилгалактозы — следует, что в основной цепи полисахаридного остатка монозамещенной галактозы нет, т. е., другими словами, все остатки галактозы в основной цепи имеют ответвления.

При неполном гидролизе метилированного полисахарида были в числе прочих продуктов гидролиза получены 3-галактозидоарабиноза и 4-арабинозидоглюкуроновая кислота. Из этих данных был сделан вывод, что, во-первых, остаток арабинозы связан с остатком галактозы, который является терминальным и дает 2,3,4,6-тетраметилгалактозу, выделяе-

мую при полном гидролизе, и, во-вторых, терминальный остаток арабинозы, дающий при полном гидролизе 2,3,5-триметиларабинозу, связан с глюкуроновой кислотой. Наконец, поскольку при полном гидролизе образуется 2,3,4-триметилрамноза, ясно, что она также является терминальной в цепи.

Исходя из принятой ранее структуры деградированной арабовой кислоты и приведенных данных, была предложена следующая структура полисахарида гумми-арабика:

...Gal⟨1,6⟩	Gal⟨1,6⟩ ⟨3,1⟩ Gal⟨3,1⟩Rh ⟨6,1⟩ Gluc.ac. ⟨4,1⟩ Ar	Gal⟨1,6⟩ ⟨3,1⟩ Ar ⟨3,1⟩ Gal	Gal⟨1,6⟩ ⟨3,1⟩ Gal⟨3,1⟩Rh ⟨6,1⟩ Gluc.ac. ⟨4,1⟩ Ar	Gal⟨1.6⟩... ⟨3,1⟩ Ar ⟨3,1⟩ Gal

В этой формуле также сделаны некоторые допущения, помимо тех условностей, которые указаны выше при обсуждении строения деградированной арабовой кислоты. В предлагаемой формуле не доказано однозначно местоположение остатка рамнозы, с одной стороны, и остатка арабинозы и галактозы, с другой; их можно поменять местами, и этот вариант строения также будет отвечать всем известным фактам.

Несмотря на эти не вполне решенные еще вопросы, приводимая выше формула в основном верно отражает строение полисахарида гумми-арабика, который является, таким образом, сложно построенным гетерополисахаридом с разветвленной цепью.

Несмотря на большие усилия многих крупных научных коллективов, решение вопросов о строении других сложных гетерополисахаридов очень медленно продвигается вперед, что связано с огромными трудностями, стоящими на пути исследователей.

Однако еще более сложными и, несомненно, более интересными с биологической точки зрения являются производные углеводов, которые наряду с одним, несколькими или многими остатками моносахаридов содержат неуглеводную часть, подобно тому, как сложные белки содержат наряду с пептидной цепью простетическую группу.

Сведения о таких производных углеводов еще крайне скудны, и познание этих сложнейших природных продуктов пока еще лишь начато. Наибольшее внимание привлекают в настоящее время два класса таких производных углеводов. Более интенсивно идет изучение соединений, содержащих одновременно пептидную и углеводную часть, так называемых гликопептидов, входящих в состав углеводнобелковых комплексов и широко представленных в различных тканях организмов. Трудности проблемы установления строения таких веществ связаны с многообразием возможных комбинаций связей аминокислоты и моносахарида, и в настоящее время делаются вполне резонные попытки использовать для решения этого вопроса синтетический метод, т. е. развить синтез упрощенных модельных соединений этого рода.

Другим классом сложных производных углеводов, изучение которых еще только начинается, являются соединения, содержащие в своем составе наряду с углеводной частью также липидный остаток, известные под названием гликолипидов. По-видимому, соединения этого рода играют весьма серьезную роль в функциях нервной системы, так как они широко распространены наряду с липоидами в нервной ткани, например, в ганглиях.

Исследования строения и функций таких сложных углеводсодержащих природных продуктов, являются проблемами завтрашнего дня; они несомненно помогут раскрыть новые тайны тончайших биохимических процессов.

ЛИТЕРАТУРА

H. Bray, M. Stacey. Blood group polysaccharides, Adv. carbohydrate chemistry, 1949, **4**, 37.

T. Evans, H. Hibbet. Bacterial polysaccharides. Adv. carbohydrate chemistry, 1947 **2**, 203.

E. Hirst, J. Jones. The chemistry of pectic materials. Adv. carbohydrate chemistry, 1947, **2**, 235.

E. Hirst. Seaweed polysaccharides. Proceedings of the chemical society, **1958**, 177.

J. Jones, F. Smith. Plant gums and mucilages. Adv. carbohydrate chemistry, 1949, **4**, 243.

M. Stacey. The chemistry of mucopolysaccharides and mucoproteins. Adv. carbohydrate chemistry, 1947, **2**, 161.

R. Whistler, J. Sanella. Hemicellulose. IV Inter. congr. biochemistry, 1958, **1**, 1.

Раздел второй

НУКЛЕОТИДЫ

ВВЕДЕНИЕ

Под именем нуклеотидов объединяют большую группу природных биологически важных низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений, имеющих в своем составе пуриновое или пиримидиновое основание, моносахарид и остаток фосфорной кислоты.

Выделение нуклеотидов в отдельный класс обширной области природных соединений вызвано прежде всего их исключительно важной биологической ролью, которая была вскрыта исследованиями последних лет. Именно в эти последние годы было показано, что нуклеотиды в виде полимеров играют центральную роль в процессе передачи наследственных признаков и в биосинтезе белка; мономерные нуклеотиды в виде более или менее сложных производных входят в состав важнейших ферментных систем организма, контролирующих такие важные процессы, как фосфорилирование и окислительно-восстановительные процессы, регулируют энергетику организма и т. д.

Нуклеотиды найдены во всех разновидностях живых организмов: в животных, растениях, микроорганизмах, в вирусах.

Химия нуклеотидов является одним из самых молодых разделов органической химии. Хотя первые представители этого важного класса были известны в более или менее индивидуальном состоянии еще Либиху, который в 1847 г. описал так называемую инозиновую кислоту, и Мишеру, впервые выделившему нуклеиновую кислоту, тем не менее подлинному развитию химия нуклеотидов обязана последним 10—15 годам. В 1909 г. Левин, работы которого знаменуют первый период развития химии нуклеотидов, впервые выделил инозин из нуклеиновых кислот и в последующие годы (1910—1930) получил другие мономеры, входящие в состав нуклеиновых кислот, определил их состав и основные черты строения. Решающее значение для развития химии нуклеотидов имели работы, начатые в 1942 г. А. Тоддом, которым было окончательно установлено строение мономерных нуклеотидов и осуществлен их синтез, выяснены основные черты структуры полимерных нуклеотидов, осуществлен синтез многих мононуклеотидов, являющихся коэнзимами важнейших ферментных систем. Приблизительно в это же время биохимиками и биологами была выяснена в общих чертах и биологическая роль нуклеотидов, их участие в важных процессах жизнедеятельности. Развитие химии нуклеотидов продолжается во все нарастающем темпе и трудно найти какой-либо другой раздел химии природных соединений, который в последние годы развивался бы так стремительно.

По своему химическому строению нуклеотиды с одинаковым правом могут быть рассмотрены и как гетероциклические соединения, поскольку они содержат пиримидиновое или пуриновое ядро, и как производные сахаров, потому что все нуклеотиды содержат рибозу, дезоксирибозу или в виде очень редких исключений какой-либо иной из моносахаридов;

наконец, будучи фосфорными эфирами, нуклеотиды могли бы рассматриваться и в этом разделе. Однако, как упоминалось ранее, биологическое значение нуклеотидов так велико, а их строение столь специфично, что они с полным правом могут рассматриваться совершенно самостоятельно. При этом нужно только иметь в виду, что если специфическая биологическая роль нуклеиновых кислот обусловливается характером гетероциклических оснований, входящих в состав мономерных нуклеотидов, из которых слагается полимерная цепь, то главным структурным элементом, от которого во многом зависит химическое поведение нуклеотидов, является остаток моносахарида. В связи с этим в химии нуклеотидов особенно важную роль играют идеи и методы химии углеводов. Эти идеи и методы помогли как при установлении строения нуклеотидов, так и при осуществлении их синтезов.

Все соединения, объединяемые ныне под именем нуклеотидов, можно при их рассмотрении разделить на два больших, имеющих самостоятельное значение подкласса — нуклеиновые кислоты и нуклеотидные коферменты.

Эти два подкласса четко различаются как по строению входящих в них нуклеотидов, так и по их биологической функции. Нуклеиновые кислоты (обычно сокращенно обозначаемые НК) являются полимерными соединениями с очень высоким молекулярным весом, достигающим 6 500 000—13 000 000. В зависимости от того, содержат ли они в своем составе в качестве углеводного компонента рибозу или дезоксирибозу, они называются рибонуклеиновыми кислотами (РНК) или дезоксирибонуклеиновыми кислотами (ДНК). Необходимость такого разделения диктуется не только различиями в химическом поведении РНК и ДНК, но и различием их биологических функций. Нуклеиновые кислоты в комплексах с белками, известных под общим названием нуклеопротеидов, играют ключевую роль в процессах жизнедеятельности самых различных организмов. ДНК являются тем первичным химическим материалом, который лежит в основе сложного и далеко еще полностью не выясненного процесса передачи наследственных признаков при делении клетки, а следовательно, и всех процессов, связанных с размножением. Хотя о механизме такой передачи, механизме в чисто химическом смысле этого слова, еще мало что известно, однако решающая роль ДНК в процессе передачи биологического кода не вызывает никакого сомнения и может считаться в настоящее время экспериментально установленным фактом.

ДНК является, очевидно, тем первичным биогенным полимером, который, возникая во вновь образовавшейся клетке, направляет синтез всех других специфических биогенных полимеров. Возникающие вслед за этим рибонуклеиновые кислоты участвуют далее в чрезвычайно сложном биохимическом процессе синтеза специфических белков, которые в свою очередь в роли ферментов обеспечивают все последующие процессы развития и обмена. Опять-таки несмотря на то, что механизм биосинтеза и обмена белка с участием РНК не ясен во всех деталях (хотя о нем и известно уже достаточно много), сам факт участия РНК в этом важнейшем из биохимических процессов живого организма не вызывает никаких сомнений.

В отличие от нуклеиновых кислот нуклеотидные коферменты не являются веществами полимерного характера и, несмотря на свое порою весьма сложное строение, должны быть отнесены к обычным органическим соединениям, молекулярный вес которых не превышает нескольких сотен водородных единиц. Как видно из самого названия, биологическая роль нуклеотидных коферментов состоит в том, что они, будучи связаны со специфическими белковыми образованиями — апоферментами, играют роль простетических групп ферментных систем. Нуклеотидные коферменты

наряду с обычными составляющими нуклеотидов — гетероциклическим основанием, моносахаридом и остатком фосфорной кислоты содержат другие структурные единицы, которыми чаще всего являются дополнительные остатки фосфорной кислоты, еще один остаток моносахарида или другие более сложные остатки. Нужно отметить, что название «нуклеотидные коферменты» не всегда точно, так как некоторые из веществ этого типа в организме не всегда функционируют только в связи с белком, примером чему является наиболее известный из этих веществ аденозинтрифосфат. Вместе с тем некоторые из известных и расшифрованных нуклеотидов действительно играют роль коферментов важнейших ферментных систем.

Несмотря на принципиальную разницу в строении нуклеиновых кислот и нуклеотидных коферментов, из которых одни являются полимерами, а другие к полимерам не относятся, а также, несмотря на различие в их биологических функциях, оба эти подкласса нуклеотидов целесообразно рассматривать сообща. Это связано с тем, что в основе их химического строения лежат соединения одного и того же типа, которые обычно называют мононуклеотидами. Мононуклеотиды — соединения, в которых на одно пиримидиновое или пуриновое ядро приходится один остаток моносахарида и один остаток фосфорной кислоты. Мононуклеотиды являются мономерами, из которых в результате поликонденсации образуются НК. Вместе с тем мононуклеотиды являются обязательной частью молекулы нуклеотидных коферментов, что и определяет принадлежность коферментов этого типа к классу нуклеотидов.

В химии мононуклеотидов, так же как и в химии других мономеров — аминокислот и моносахаридов, заложены те специфические черты, изучение которых совершенно необходимо для понимания значительно более сложной специфики и нуклеиновых кислот, и нуклеотидных коферментов. В связи с этим именно химии мононуклеотидов в этом разделе книги будет уделено главное внимание.

Поскольку мононуклеотиды являются сложными соединениями, исследование их как при установлении строения, так и при синтезе разбивается на несколько этапов. В связи с этим и в последующем изложении целесообразно вначале кратко рассмотреть вопрос о главных составляющих мононуклеотида — гетероциклических основаниях и моносахаридах, входящих в их состав — рибозе и дезоксирибозе; после этого будет разобран вопрос о соединениях, которые получают при частичном гидролизе нуклеотидов, содержащих только гетероциклическое ядро и остаток моносахарида и известных под названием нуклеозидов. И лишь после этого будут рассмотрены уже сами нуклеотиды.

Такой порядок изложения в общих чертах соответствует и фактическому ходу исследований нуклеотидов.

Действительно, первым этапом исследования нуклеиновых кислот явилось изучение продуктов, образующихся при их гидролизе. При мягком щелочном гидролизе под действием 1 *N* едкого натра при 37°, 0,1 *N* едкого натра при 100° или под действием 2%-ного водного раствора аммиака полимерная молекулы РНК распадается на мононуклеотиды, содержащие гетероциклическое ядро, моносахарид и остаток фосфорной кислоты, которые и могут быть выделены при жесткой деструкции самого мононуклеотида. Изучение частичного гидролиза мононуклеотидов позволило выяснить ту последовательность, в которой связаны между собою эти три структурные единицы. При нагревании мононуклеотида с разбавленным аммиаком при 145° от него отщепляется остаток фосфорной кислоты и образуется нуклеозид, при гидролизе которого в кислой среде получается гетероциклическое основание и моносахарид. С другой стороны, при гидролизе мононуклеотида в кис-

лой среде можно выделить гетероциклическое основание и фосфат моносахарида. Все сказанное может быть изображено схемой.



Из этой схемы видно, что в молекуле мононуклеотида его составляющие могут быть расположены только в следующем порядке: гетероциклическое основание — моносахарид — остаток фосфорной кислоты.

Говоря о нуклеотидах, нельзя не упомянуть также и о том, что в самое последнее время мононуклеотиды и очень близкие к ним соединения выделены, как таковые, из различных природных объектов. Биологическая роль таких нуклеотидов далеко не всегда известна. Они являются продуктами обмена, возникающими, по-видимому, по крайней мере в некоторых случаях как результат распада нуклеиновых кислот. Не исключено также, что они могут возникать как продукты некоторых патологических процессов, протекающих в живом организме. Некоторые мононуклеотиды и родственные им вещества проявляют сильное антибиотическое действие и подробно исследованы с этой стороны, как, например, антибиотик пуромицин.

ЛИТЕРАТУРА

А. Тодд. Сб. Перспективы развития органической химии. М. ИЛ., 1959, стр. 174.
G. Barker. Nucleic acids. Adv. carbohydrate chemistry, 1956. **11**, 285.
E. Chargaff, J. Davidson. Nucleic acids. New York, 1955.
Colowick, Kaplan. Methods in Enzymology III. New York, 1957.
P. Levene, L. Bass. Nucleic acids. New York, 1931.

Глава 1

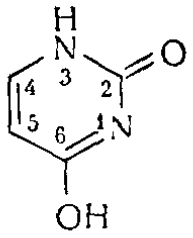
КОМПОНЕНТЫ НУКЛЕОТИДОВ

Как уже указывалось, мононуклеотиды состоят из гетероциклического основания, относящегося к ряду пиримидина или пурина, моносахарида и остатка фосфорной кислоты. В настоящей главе будут в самой краткой форме приведены данные, относящиеся к химии двух составляющих нуклеотид компонентов — пиримидиновых и пуриновых оснований и моносахаридов.

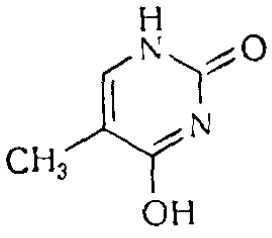
Что касается фосфорной части нуклеотида, то этот вопрос нет необходимости специально рассматривать в этом месте, и он будет изложен в главе, посвященной нуклеотидам в целом.

ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ ОСНОВАНИЯ

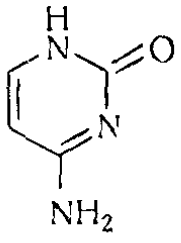
В мононуклеотидах различного происхождения (входящих в состав нуклеиновых кислот или нуклеотидных коферментов, а также мононуклеотидов, выделенных из различных объектов) найдены только основания пуринового и пиримидинового ряда. Из входящих в нуклеиновые кислоты и нуклеотидные коферменты пиримидиновых оснований в наибольшем количестве обнаружены урацил (I), тимин (II), цитозин (III); в значительно меньших количествах найден 5-метилцитозин (IV) и в некоторых видах ДНК 5-оксиметилцитозин (V).



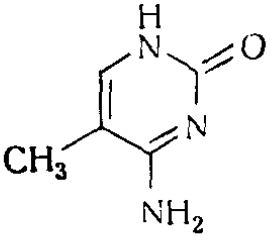
I



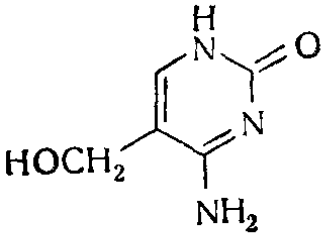
II



III

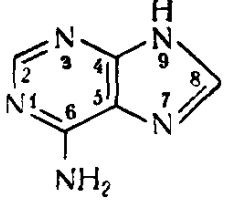


IV

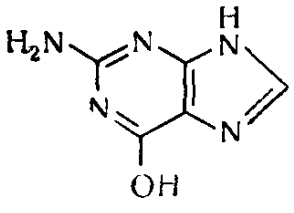


V

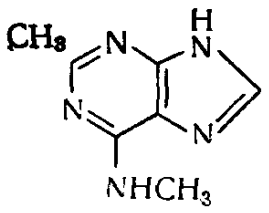
В пуриновых основаниях главными компонентами природных нуклеотидов являются аденин (VI) и гуанин (VII); в НК в количестве всего 0,6% найден 6-метиламинопурин (N_6-метиладенин) (VIII) и в очень малых количествах обнаружены 2-метил-6-аминопурин (2-метиладенин) (IX), 6-диметиламинопурин (N_6N_6-диметиладенин) (X), 1-метил-2-оксипурин (XI), 2-метиламино-6-оксипурин (N_2-метилгуанин) (XII) и 2-диметиламино-6-оксипурин (N_2,N_2-диметилгуанин) (XIII), 1-метил-2-амино-6-оксипурин (N_1-метилгуанин) (XIII *а*).



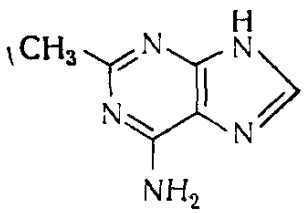
VI



VII



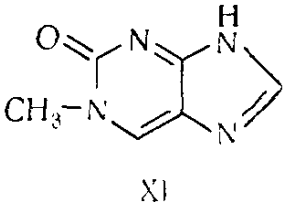
VIII



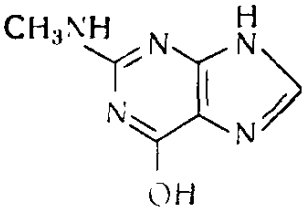
IX



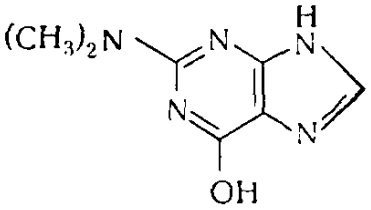
X



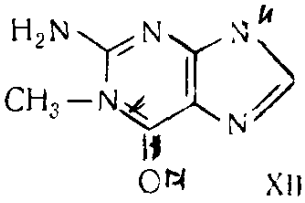
XI



XII



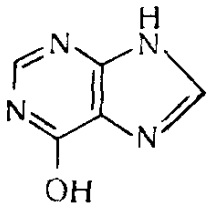
XIII



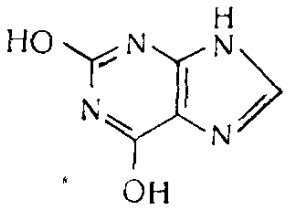
XIIIa

Нужно отметить, что долгое время нормальными компонентами нуклеотидов считались только (I), (II), (III), (VI) и (VII) и только значительно позднее был обнаружен (IV), а присутствующие в очень малых количествах замещенные пиримидины и пурины (V) и (VIII) — (XIII) удалось обнаружить лишь с развитием современной хроматографической техники, причем особую роль в данном случае сыграла хроматография на ионообменных смолах.

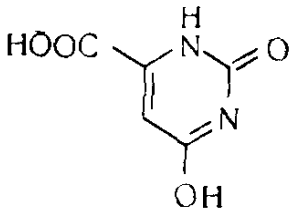
С другой стороны, в течение долгого времени считалось, что гипоксантин (XIV) и ксантин (XV) также являются компонентами нативных нуклеиновых кислот, так как они были выделены из продуктов гидролиза последних. Лишь позднее было доказано, что гипоксантин и ксантин в действительности не входят в состав НК, а возникают в гидролизатах в результате дезаминирования аденина (образование XIV) и гуанина (образование XV).



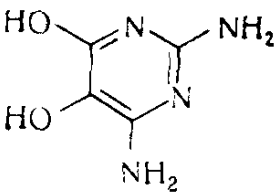
XIV



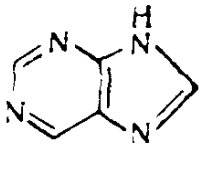
XV



XVI



XVII



XVIII

Гетероциклические основания, входящие в состав других природных нуклеотидов, т. е. мононуклеотидов, выделенных как продукты обмена различных живых организмов, особенно из грибов и растений, более разнообразны. Помимо перечисленных выше оснований, здесь были найдены, например, оротовая кислота (4-карбоксиурацил) (XVI), входящая в состав оротидина из *Neurospora crassa*, 2,6-диамино-4, 5-диоксипиримидин (XVII) из вицина, незамещенный пурин (XVIII) и некоторые другие. В состав известного антибиотика пуромицина в качестве пуринового основания входит 6-диметиламинопурин (X), найденный также в нуклеиновых кислотах.

Все упомянутые выше пиримидиновые и пуриновые основания выделены из природных нуклеотидов. Наряду с этим в настоящее время известно очень большое число близких им по структуре соединений, полученных синтетически. Наибольшее число исследований посвящено синтезу производных пурина. Цель этих исследований — найти, используя некоторые биологические гипотезы, в частности, принцип антиметаболитов, синтетические аналоги природных оснований обладающие физиологической активностью и пригодные для лечения злокачественных новообразований и инфекционных заболеваний.

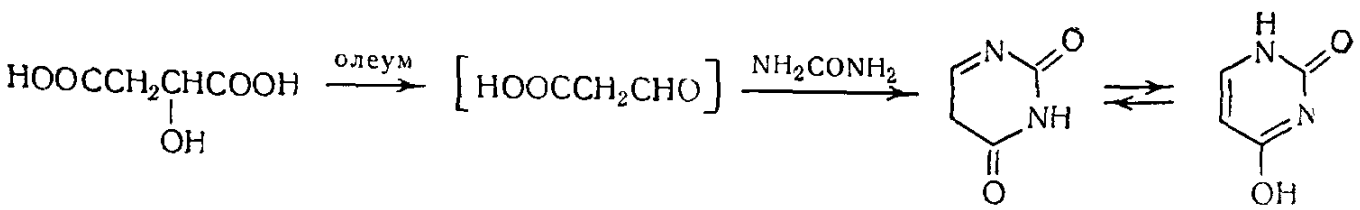
Некоторые из этих веществ, хотя и не нашли еще широкого применения в практической медицине, оказались активными в одном из упомянутых направлений и представляют поэтому серьезный принципиальный интерес для решения ряда вопросов биохимии и смежных с ней дисциплин.

Однако в силу того, что речь идет о синтетических веществах, которые до сих пор никогда не были найдены в природе, и в жизнедеятельности нормальных организмов участия не принимают, они не будут здесь рассматриваться, так как этот обширный материал выходит за рамки настоящей книги.

Синтез и свойства всех пиримидиновых и пуриновых оснований, входящих в состав природных нуклеотидов, и методы их синтеза являются общими для всех производных этих гетероциклических систем. Ввиду того, что этот вопрос должен быть хорошо известен читателю из соответствующих разделов органической химии и из специальных монографий, в последующем изложении будут освещены лишь те его стороны, которые имеют особое значение для химии нуклеотидов. В частности, будут рассмотрены только те методы получения, которые нашли применение в синтетической химии нуклеотидов.

Пиримидиновые основания

Среди методов синтеза производных пиримидина, которые применяются для получения пиримидиновых оснований, входящих в состав нуклеотидов, следует прежде всего назвать общий метод синтеза оксипиримидинов, основанный на конденсации мочевины и ее аналогов (тиомочевины, гуанидина) с соединениями типа ацетоуксусного, малонового, цианоуксусного эфиров и подобных им соединений. Этим общим методом при должном подборе компонентов конденсации могут быть получены любые из природных пиримидиновых оснований. В качестве иллюстрации можно привести синтез двух важнейших из них — урацила (I) и тимина (II).

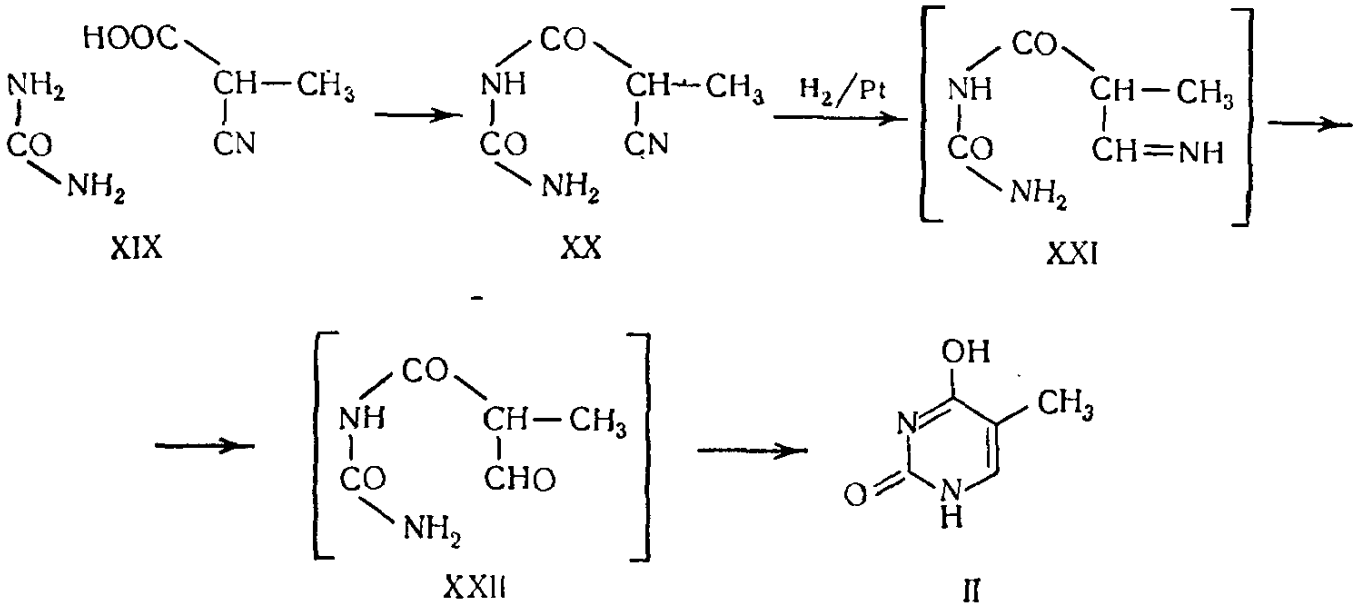


Урацил получают при нагревании яблочной кислоты с мочевиной в присутствии олеума; при этом яблочная кислота как всякая α-оксикислота под действием олеума распадается с образованием неустойчивой β-альдегидокислоты, которая немедленно конденсируется с мочевиной, образуя (I).

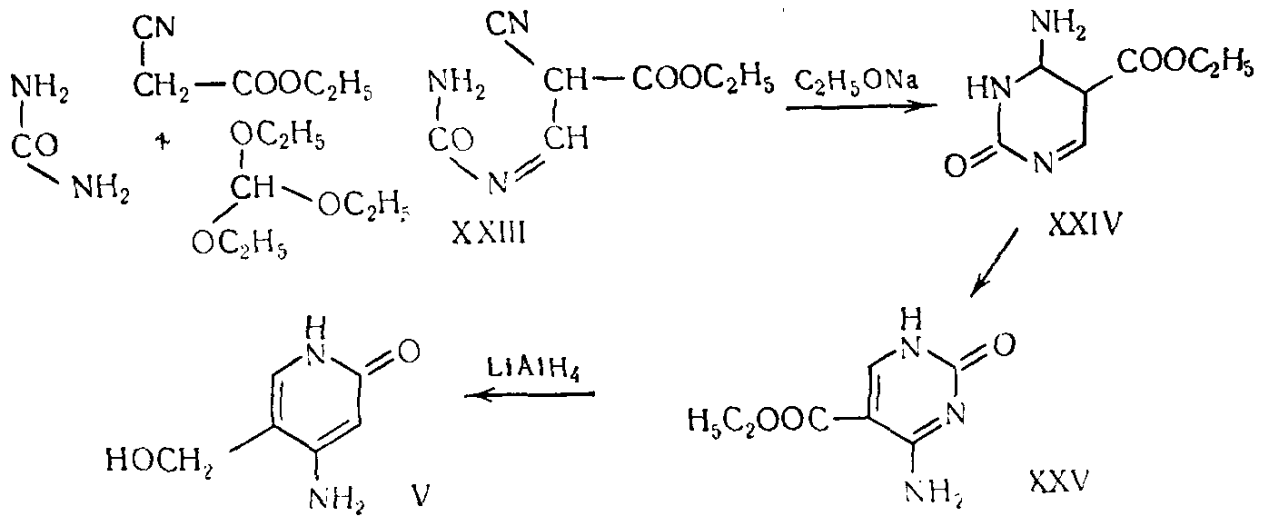
Этот метод получения урацила является наиболее удобным и до сих пор используется в лабораторной практике.

Для получения тимина проводят конденсацию мочевины с α-цианпропионовой кислотой (XIX), приводящую к замещенному натрилу (XX);

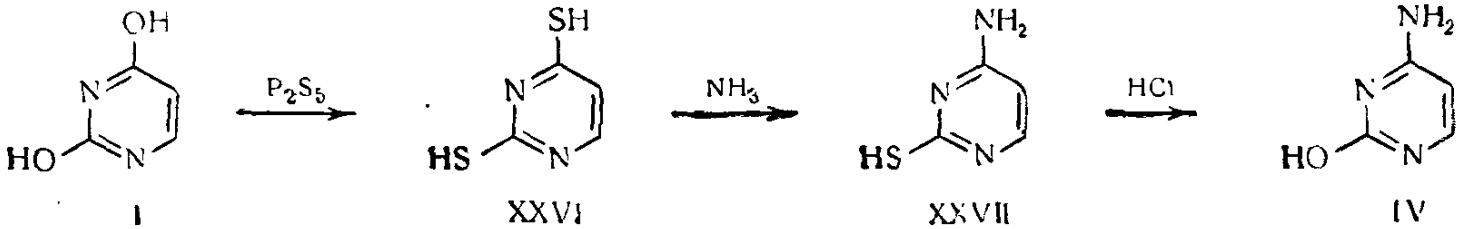
при каталитическом восстановлении последнего над платиной получается тимин (II). По всей вероятности, реакция включает промежуточное образование альдимина (XXI), который в этих условиях распадается до альдегида (XXII); последний и вступает в реакцию циклизации.



Иногда указанный общий метод модифицируют, применяя трехкомпонентную конденсацию, когда нужное для конденсации β-дикарбонильное соединение возникает непосредственно в реакционной смеси. Как пример можно привести синтез 5-оксиметилцитозина (V).



При конденсации смеси циануксусного эфира и ортомуравьинового эфира с мочевиной получается, вероятно, через стадию образования этоксиметиленциануксусного эфира, производное мочевины (XXIII), которое при нагревании с алкоголятом циклизуется в (XXIV). При осторожном окислении (XXIV) образуется этиловый эфир (XXV); восстановление (XXV) алюмогидридом лития дает 5-оксиметилцитозин. Цитозин целесообразнее получать не прямой циклизацией, а синтезом из урацила, который может быть изображен схемой

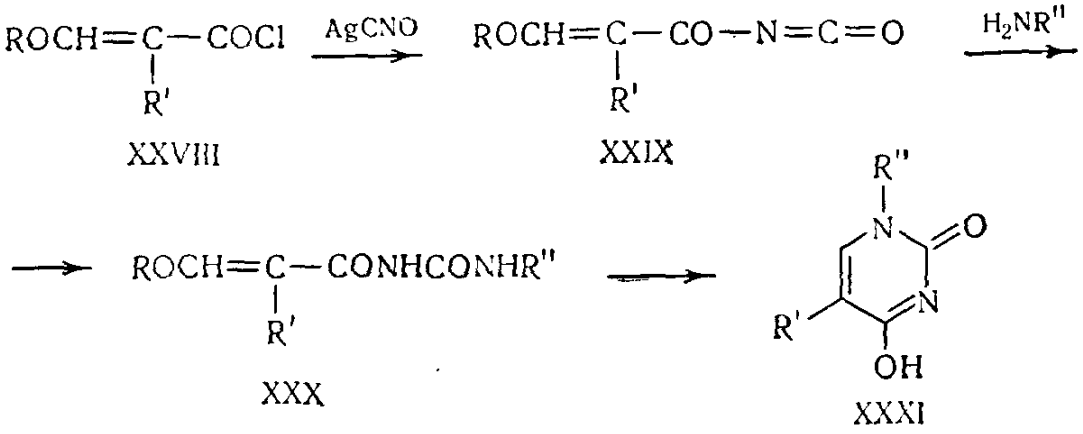


При нагревании урацила (I) с пятисернистым фосфором образуется 2,4-димеркаптопиримидин (XXVI), в котором при нагревании до 100° с водным аммиаком одна из сульфгидрильных групп замещается на аминогруппу. При обработке получившегося меркаптоамина (XXVII) соляной кислотой происходит гидролиз сульфгидрильной группы и образуется цитозин (IV).

Все эти данные показывают, что конденсация с мочевиной является удобным в препаративном отношении методом синтеза пиримидиновых оснований, входящих в природные нуклеотиды. Однако относительно жесткие условия, которые необходимо соблюдать, позволяют использовать этот метод только для синтеза самих оснований и делают его малопригодным для замыкания соответствующим образом замещенного пиримидинового ядра с каким-либо лабильным заместителем, например с остатком сахара, а именно к таким производным относятся природные нуклеотиды.

В связи с этим интерес представляет новый метод синтеза пиримидинового ядра, предложенный недавно Шоу. Хотя синтез относительно сложен и включает большее количество стадий, он проходит в мягких условиях, и поэтому пригоден для получения пиримидиновых производных с лабильными, в том числе углеводными заместителями, что в действительности и было выполнено (стр. 209).

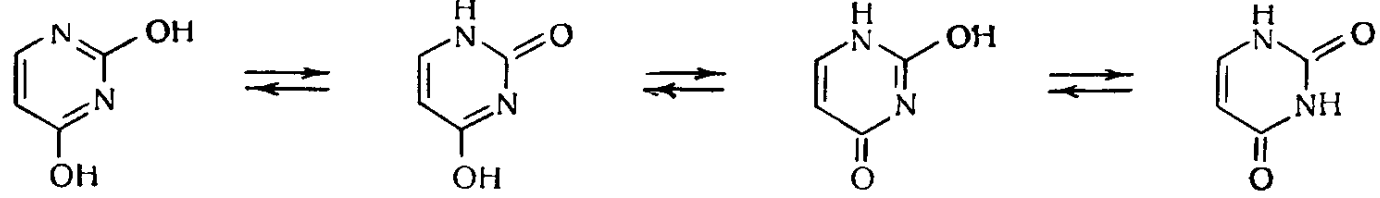
Синтез Шоу представлен следующей общей схемой:



В качестве исходного соединения используется хлорангидрид замещенной β-алкоксиакриловой кислоты (XXVIII); при конденсации его с цианатом серебра образуется ацилизоцианат (XXIX). Последний, обладая активной двойной связью углерод-азот, гладко присоединяет амины, а полученная ацилмочевина (XXX) в мягких условиях циклизуется в производное пиримидина (XXXI).

Таким образом, применяя соответствующим образом замещенный (XXVIII) и амин, можно получить нужное пиримидиновое основание, в том числе и замещенное у N_3, к которым относятся природные нуклеотиды. Если вместо цианововокислого серебра употреблять роданистое серебро, то синтез Шоу приводит к получению сернистых аналогов природных пиримидиновых оснований, также нашедших свое место при исследовании нуклеотидов.

Из химических свойств пиримидиновых оснований необходимо отметить следующие, важные для химии нуклеотидов. Всем оксипиримидинам свойственна двойственная реакционная способность, и они могут давать два ряда производных — производные оксиформы (XXXII) и производные оксоформы (XXXIII *а*, *б*, *в*). Это явление до последнего времени объяснялось таутомерией (точнее псевдомерией) оксипиримидинов и их производных, например:



XXXII XXXIIIа XXXIIIб XXXIIIв

В настоящее время известно, что подобные случаи в действительности не имеют отношения к истинной таутомерии, а образование двух рядов производных объясняется двойственным реагированием соответствующего соединения или его производного.

Особенно важным для синтетической химии нуклеотидов свойством оксипиримидинов является их способность образовывать металлические производные. Истинное строение этих металлических производных, которые могут быть построены по типу кислород — металл или по типу азот — металл, неизвестно и, по-видимому, должно быть различно для различных металлов. Эти металлические производные при обработке галоидными алкилами могут давать N- или O-замещенные производные, соответствующие оксиформе или оксоформе исходного соединения.

Пиримидиновые основания, имея ароматическую систему связей, обладают характерным поглощением в ультрафиолетовой части спектра, причем характер кривой заметно отличается для различных пиримидиновых оснований. Это дает возможность по спектру поглощения в ультрафиолетовой области делать выводы о строении пиримидинового основания и нуклеотида, в состав которого оно входит.

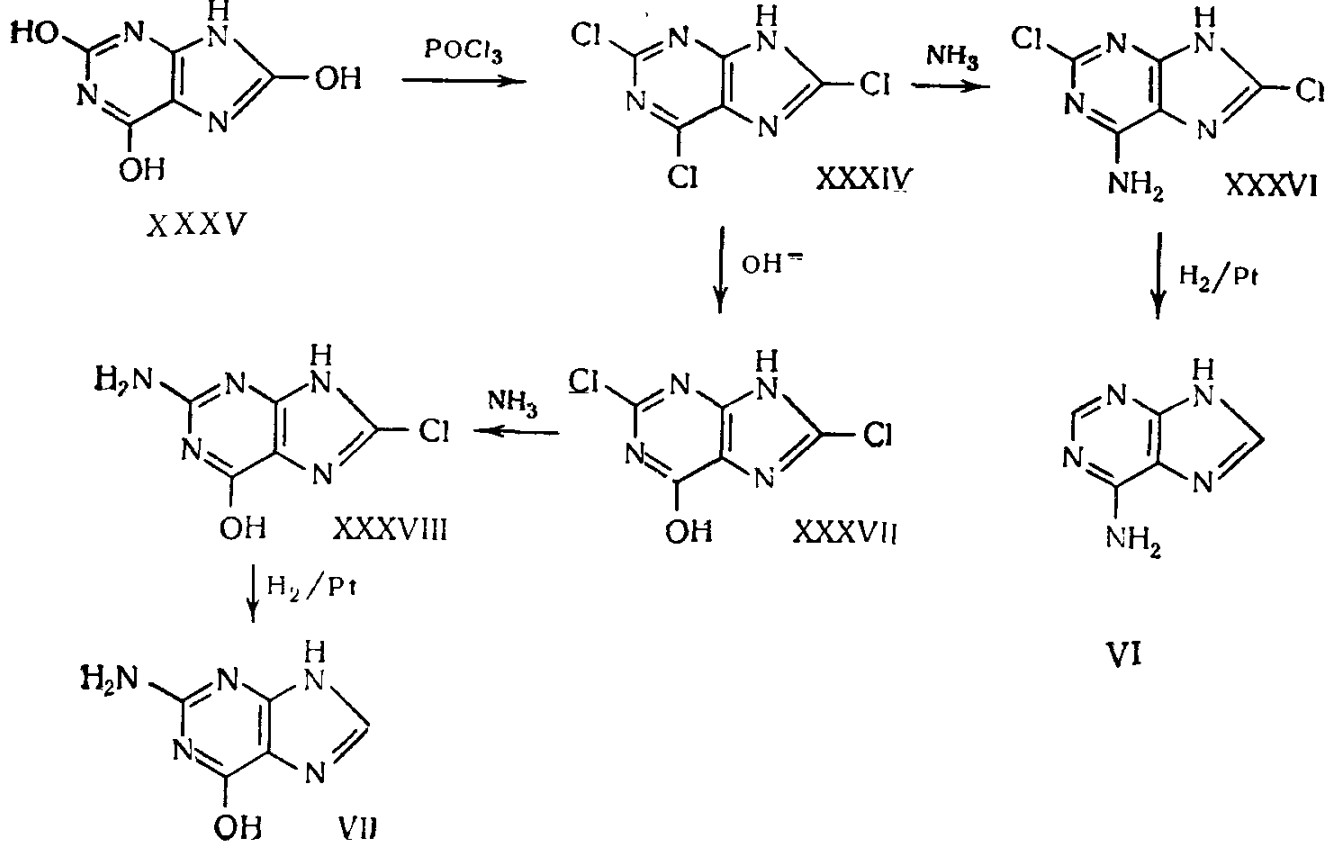
Пуриновые основания

Синтезы пуриновых оснований, пригодные для использования в химии нуклеотидов, можно разбить на две категории: 1) частичные синтезы из производных пурина, главным образом из галоидопроизводных и 2) полные синтезы.

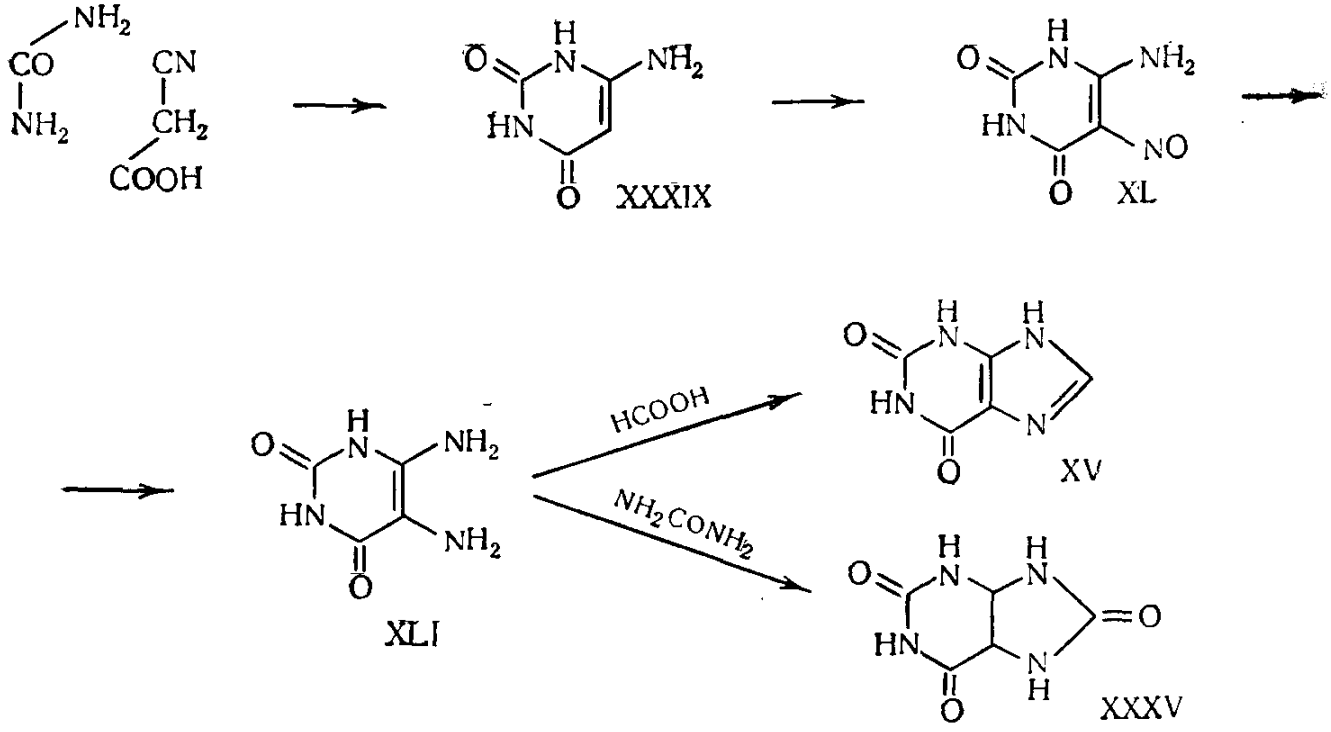
Частичные синтезы пуриновых оснований, принципы которых были разработаны. Э. Фишером, основаны на введении в нужное место готового пуринового ядра окси- или аминогрупп. Это достигается последовательным замещением атомов галоида в 2,6,8-тригалоидпурине (XXXIV), который получается при обработке мочевой кислоты (XXXV) хлорокисью фосфора. Как установил Э. Фишер, активность трех атомов галоида в (XXXIV) достаточно различна и падает в ряду $C_{(6)} > C_{(2)} > C_{(8)}$, поэтому, комбинируя должным образом реакции замещения хлора у этих атомов, можно получить природные пуриновые основания, как это видно из схемы (см. стр. 183).

При обработке трихлорпурина (XXXIV) аммиаком первым замещается галоид в положении 6 и образуется 6-амино-2,8-дихлорпурин (XXXVI), восстановление которого иодистоводородной кислотой или каталитически дает аденин (VI). При обработке (XXXIV) водной щелочью также первым гидролизуется атом хлора у $C_{(6)}$ и образуется 6-окси-2,8-дихлорпурин (XXXVII), который после аминирования и восстановления полученного амина (XXXVIII) дает гуанин (VII).

Сходным образом может быть получено большое количество самых различных производных пурина. При получении упомянутых выше (стр. 179) многочисленных синтетических антиметаболитов пуринового ряда использованы аналогичные схемы. Этим путем, в частности, могут быть получены и другие пуриновые основания, входящие в состав природных нуклеотидов (стр. 178).

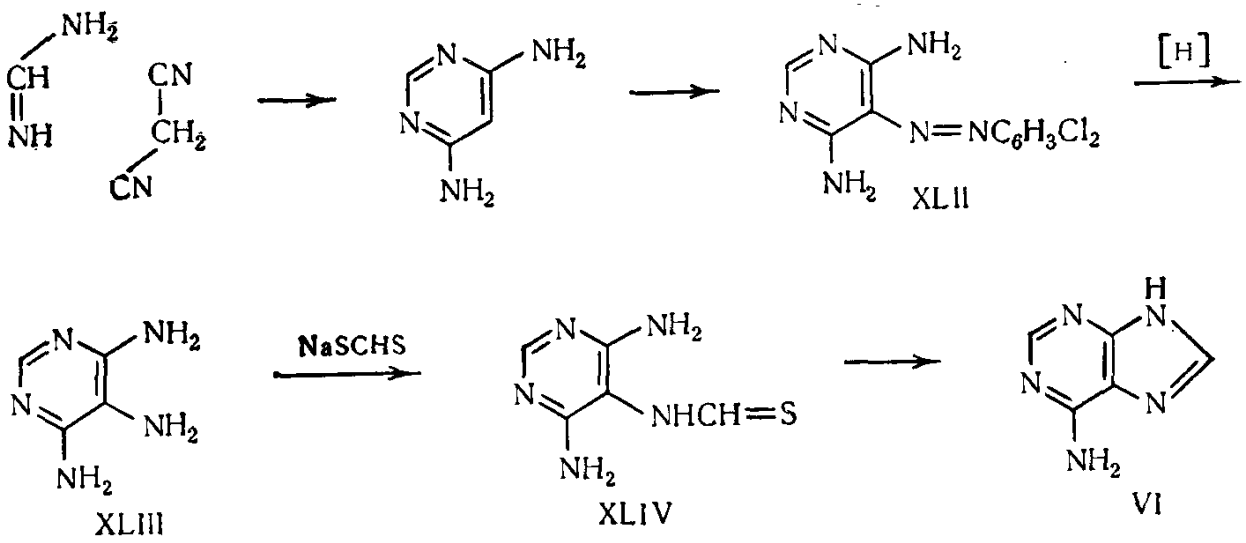


Из известных в настоящее время полных синтезов пуринового ядра для химии нуклеотидов имеет значение лишь схема Траубе, принцип которой ясен из синтеза мочевой кислоты и ксантина:



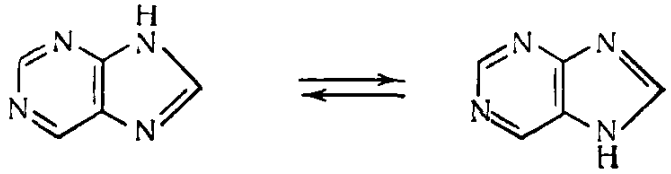
Конденсацией циануксусного эфира или кислоты с мочевиной получают 2,6-диокси-4-аминопуримидин (XXXIX); эта стадия синтеза является новым примером приведенного ранее общего синтеза оксипиримидинов. Нитрозированием (XXXIX) и восстановлением нитрозопроизводного (XL) действием гидросульфита получают 2,6-диокси-4,5-диаминопиримидин (XLI). Эта стадия синтеза Траубе является ключевой и доступность получаемых по Траубе производных пурина определяется прежде всего удобством синтеза соответствующего замещенного 4,5-диаминопиримидина. XLI при конденсации с муравьиной кислотой дает производные пурина.

Важной модификацией синтеза Траубе является синтез пуриновых оснований, разработанный Тоддом. Как уже упоминалось при описании синтеза пиримидинов, для химии нуклеотидов особенно существенно, чтобы все стадии синтеза проходили в максимально мягких условиях, и поэтому усилия исследователей были направлены на максимальное смягчение условий синтеза. Метод Тодда на примере синтеза аденина изображается схемой



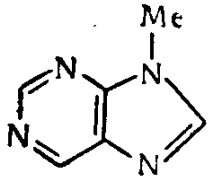
Нужное производное пиримидина — 4,6-диаминопиримидин получается при конденсации формамидина с малононитрилом, что представляет собою частный случай описанного ранее (стр. 180) метода синтеза пиримидинов. Важное изменение в схеме Траубе было сделано при получении 4,5,6-триаминопиримидина. Вместо нитрозирования, предложенного Траубе, была использована реакция азосочетания активных дизониевых солей, из которых наилучшие результаты дал хлористый 2,4-дихлорфенилдиазоний. Азосочетание шло при этом по наиболее активному месту ядра — по четвертому углеродному атому. Восстановительным расщеплением полученного азосоединения (XLII) был получен 4,5,6-триаминопиримидин (XLIII). Второе видоизменение, сделанное Тоддом, касается заключительной стадии циклизации, при которой замыкается имидазольное кольцо пурина. Для этого, чтобы осуществлять эту стадию в мягких условиях, вместо обычно употребляемой для этой цели муравьиной кислоты была использована дитиомуравьиная кислота. При конденсации ее натровой соли с замещенным 4,5-диаминопиримидином, например с (XLIII), происходит образование тиоформильного производного (XLIV), которое затем в очень мягких условиях при нагревании в пиридине или в спирте в присутствии небольших количеств алкоголята гладко замыкается с образованием пуринового ядра, например, аденина (VI). Таким образом, все стадии синтеза проходят в мягких условиях. Единственным недостатком метода, если не учитывать его многостадийность, свойственную синтезам по схеме Траубе, является возможность образования двух изомерных пуринов. Ясно что при тиоформилировании замещенного 4,5-диаминопиримидина, реакция может направляться по той или иной аминогруппе ($N_{(4)}$ или $N_{(5)}$); в том случае, когда обе они не замещены, из обоих возможных тиоформильных производных образуется один и тот же пурин. Однако, если одна из аминогрупп ($N_{(4)}$ или $N_{(5)}$) замещена, например, проалкилирована, то циклизация даст различный результат в зависимости от того, по какой группе проходило тиоформилирование.

Из химических свойств пуриновых оснований, представляющих особый интерес для химии нуклеотидов, нужно отметить те же, которые указаны выше при рассмотрении свойств производных пиримидина. Окси- и аминозамещенным пуринам свойственна, хотя и в меньшей степени, двойственная реакционная способность и образование двух рядов производных окси- (соответственно амино-) и оксо- (соответственно имино-) форм за счет перераспределенной связи в пиримидиновой части молекулы. Кроме того, при работе с пурином возникает дополнительная возможность образования двух рядов производных и в имидизольном ядре молекулы, так как при алкилировании могут образоваться продукты замещения как по $N_{(7)}$, так и по $N_{(9)}$, причем и этот случай ранее объяснялся наличием таутомерного превращения,



что в свете современных представлений едва ли можно допустить.

Пурин и его окси- и аминозамещенные дают также металлические производные, которые построены по типу азот — металл и имеют, вероятно, строение (XLV).



XLV

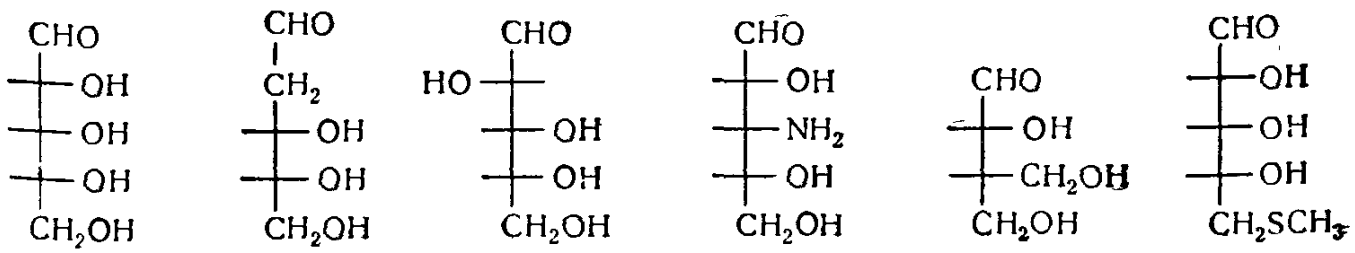
Эти металлические производные имеют выдающееся значение в синтетической химии нуклеотидов, так как способны к реакциям алкилирования и открывают путь к получению N-замещенных пуринов.

Пуриновое ядро обладает характерным поглощением в ультрафиолетовой области, причем характер кривой заметно меняется в зависимости от природы заместителей и их места в ядре; поэтому спектроскопия играет весьма существенную роль при идентификации пуриновых оснований и широко применяется также, как и при исследованиях пиримидиновых производных.

МОНОСАХАРИДЫ

В молекуле нуклеотида гетероциклическое основание связано с остатком моносахарида, N-гликозидом которого является мононуклеотид. Моносахарид, входящий в состав мононуклеотида, освобождается при гидролизе и может быть выделен и идентифицирован.

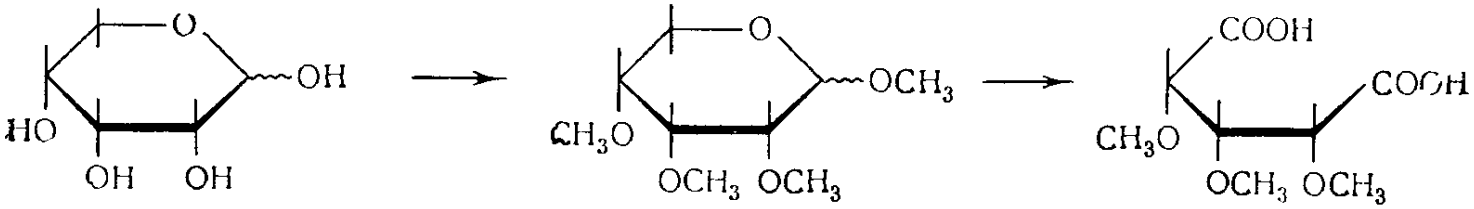
Нуклеотиды, выделенные при гидролизе нуклеиновых кислот, содержат только один моносахарид, которым в РНК является D-рибоза (XLVI), а в ДНК — D-2-дезоксирибоза (XLVII).



XLVI XLVII XLVIII XLIX L LI

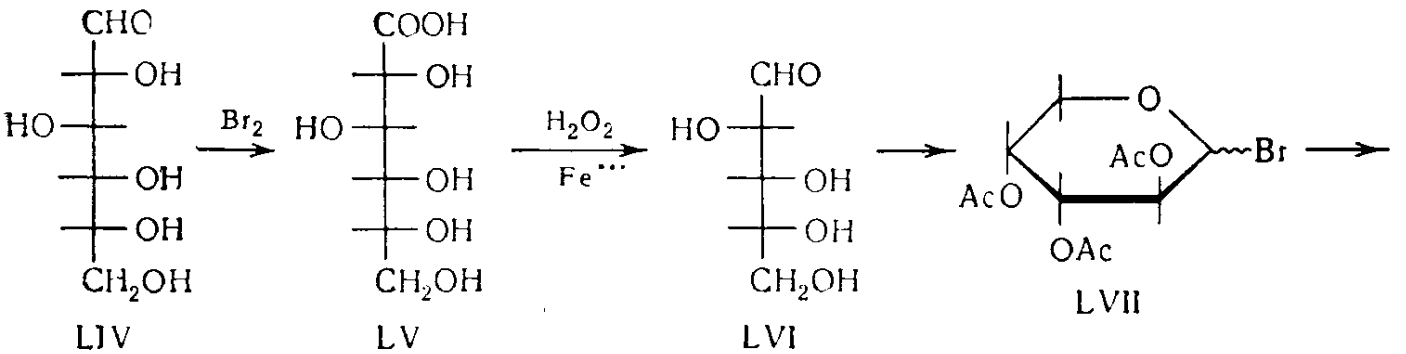
Насколько известно сегодня, никаких других моносахаридов в НК не содержится. Нуклеотиды, являющиеся составной частью нуклеотидных ферментов, содержат в качестве моносахарида только рибозу. Что касается мононуклеотидов, не являющихся продуктами распада нуклеиновых кислот, то здесь состав моносахаридов более разнообразен. В этих редких соединениях, биологическое значение которых часто еще неизвестно, найдены D-арабиноза (XLVIII) в спонготимидине, D-глюкоза в вицине и конвицине, 3-дезокси-3-амино-D-рибоза (XLIX) в пуромицине. Встречаются и более редкие моносахариды, которые обнаружены только в этих нуклеотидах, как, например, кордиосепоза (L) в кордиосепине или 5-дезокси-5-метилтио-D-рибоза (LI) в нуклеотиде, выделенном из дрожжей.

Рибоза была выделена и идентифицирована из продуктов гидролиза мононуклеотидов Левиным, и им же было установлено ее строение. Строение рибозы установлено на основании обычных рассмотренных ранее в разделе химии углеводов, принципов, по которым устанавливают строение моносахаридов. Рибоза давала озазон, идентичный озазону арабинозы, строение которой было хорошо известно, но ее бензилфенилгидразон отличался от бензилфенилгидразона арабинозы. Из этого следует, что различие между рибозой и арабинозой сводится только к различию конфигурации у $C_{(2)}$ и, следовательно, рибоза является эпимером арабинозы и имеет строение (XLVI). Это заключение было подтверждено метилированием рибозы и окислением полученного метилтриметилрибозида (LII), в результате чего была получена оптически неактивная триметоксиглутаровая кислота (LIII).

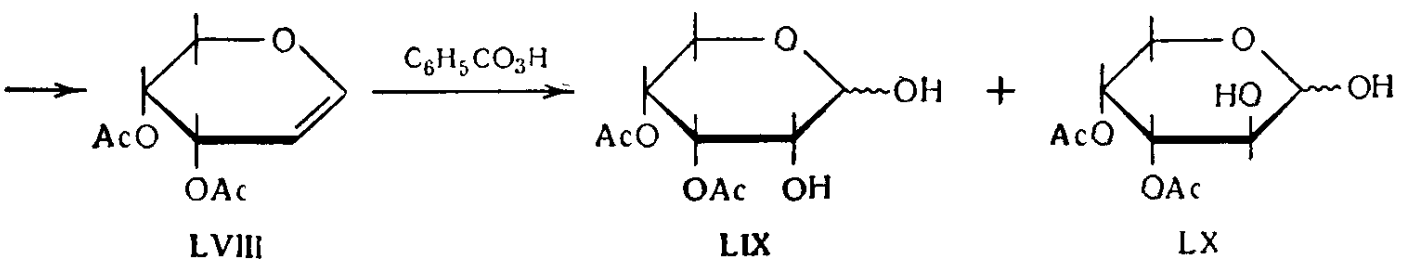


XLVI LII LIII

В настоящее время известно несколько методов синтеза рибозы, с помощью которых было окончательно доказано строение этого чрезвычайно важного в биологическом отношении моносахарида. Кроме того, был разработан препаративный метод ее синтеза, так как получение рибозы из природных источников, которыми чаще всего служат нуклеиновые кислоты, не может покрыть все возрастающую потребность в этом



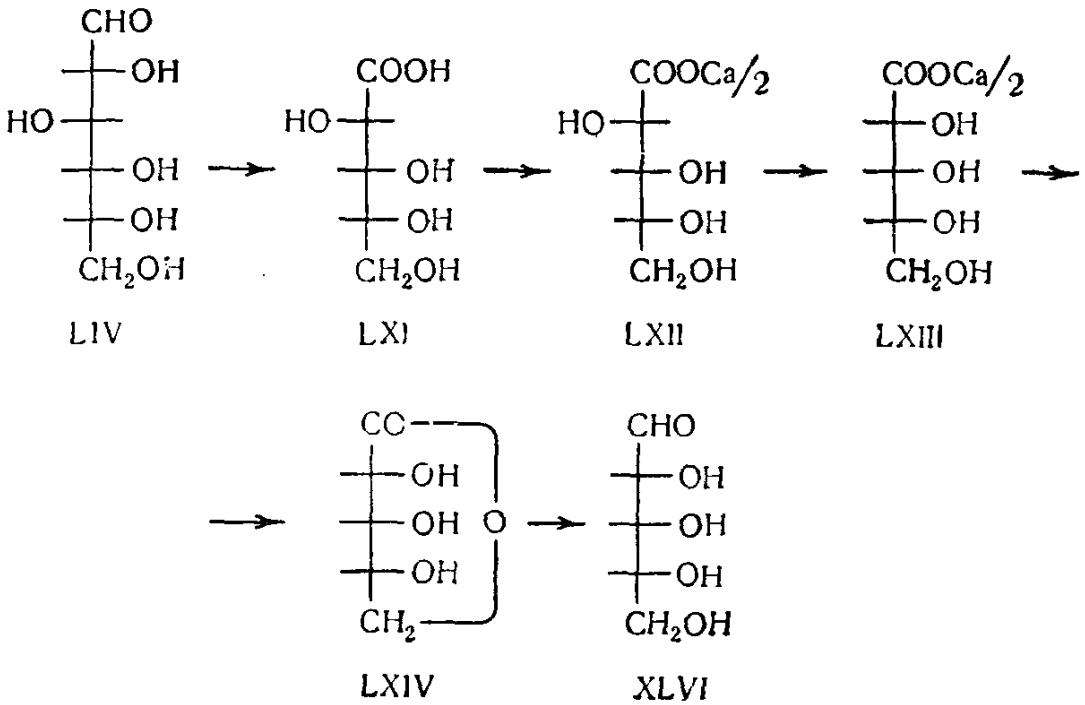
LIV LV LVI LVII



LVIII LIX LX

моносахариде. Наиболее удобные методы синтеза рибозы сводятся к получению ее из глюкозы через арабинозу. Старый вариант синтеза изображается схемой (см. стр. 186).

Глюкоза (LIV) при окислении бромом дает глюконовую кислоту (LV), которая подвергается распаду по Руффу. Образовавшаяся при этом арабиноза (LVI) переводится через 2.3,4-триацетиларабинозилбромид (LVII) в арабиналь (LVIII); окисление последнего надбензойной кислотой дает смесь диацетатов рибозы (LIX) и арабинозы (LX). Удобнее новый вариант синтеза рибозы из глюкозы, служащий в настоящее время для ее промышленного получения. Этот вариант изображается схемой:



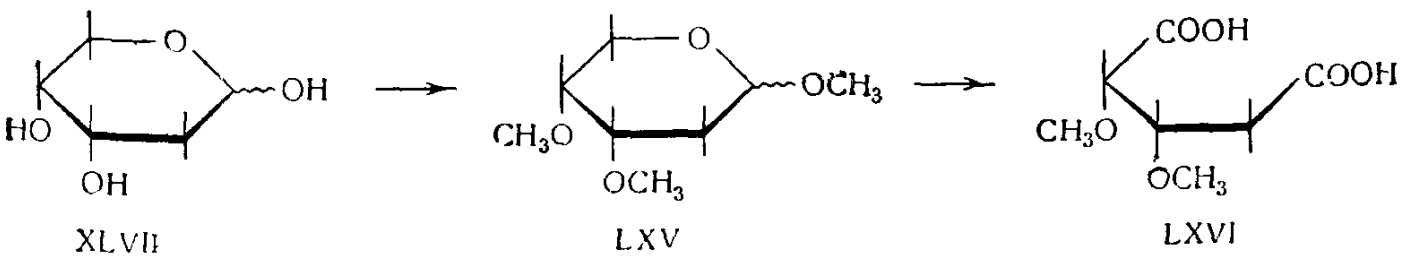
LIV LXI LXII LXIII

LXIV XLVI

Глюкоза (LIV) окислением кислородом воздуха в щелочной среде под давлением переводится в арабоновую кислоту (LXI). Последняя в виде своей кальциевой соли (LXII) эпимеризуется при нагревании ее водного раствора под давлением до 130—140°. Полученная при этом кальциевая соль рибоновой кислоты (LXIII) превращается одним из обычных способов в лактон (LXIV), восстановление которого амальгамой натрия дает рибозу (XLVI).

Дезоксирибоза. Выделение и идентификация дезоксирибозы как компонента ДНК были значительно более трудной задачей, ввиду большой неустойчивости этого моносахарида, которая характерна вообще для всех 2-дезоксисахаров. При первоначальных попытках выделить моносахарид из ДНК посредством гидролиза получали только левулиновую кислоту, в которую превращалась дезоксирибоза. Лишь в 1930 г. Левину удалось, подвергая индивидуальные нуклеотиды, выделенные из ДНК, кислотному гидролизу в очень мягких условиях (0,01 N кислота в течение 10 мин.), выделить кристаллическую дезоксирибозу. Позднее она была получена также в виде дибензилмеркапталя при меркаптолизе ДНК действием дибензилмеркаптана.

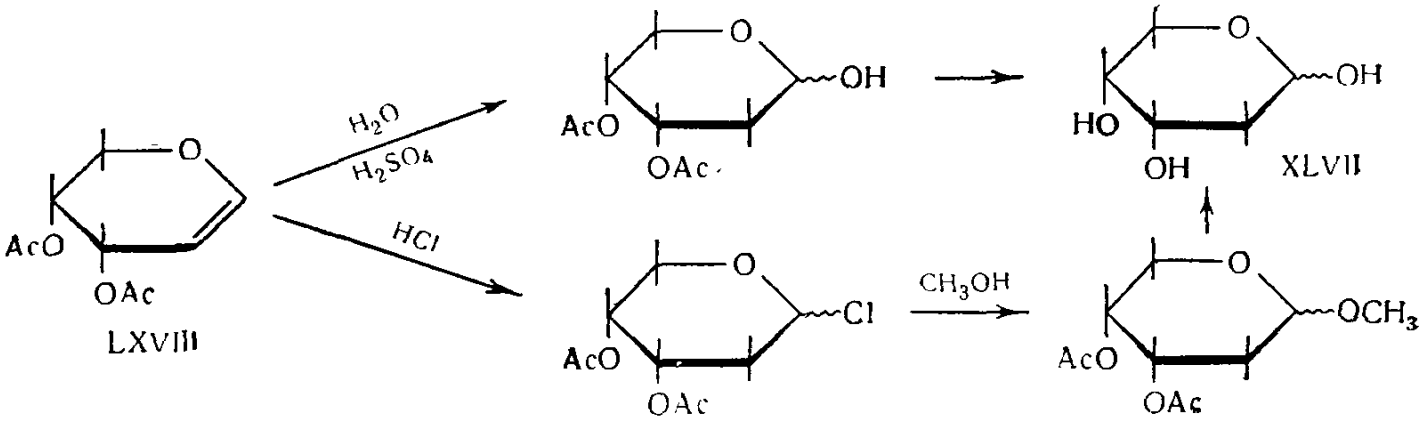
Строение дезоксирибозы было доказано методом метилирования:



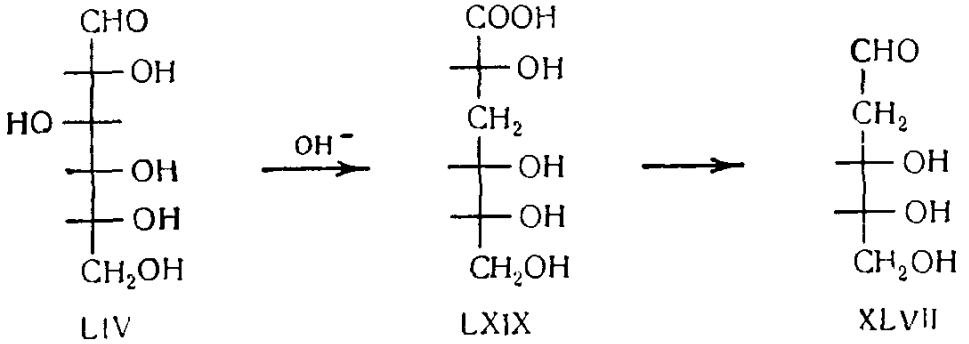
XLVII LXV LXVI

Метилирование дезоксирибозы по Пурди и последующее окисление триметилдезоксирибозы (LXV) дает диметоксиглутаровую кислоту (LXVI), что доказывает и структуру, и конфигурацию дезоксисахара.

Первоначальный синтез 2-дезоксирибозы (XLVII) и ее метилгликозида, проведенный для подтверждения ее строения, был осуществлен из диацетата арабиналя (LXVIII) и полностью ясен из схемы.

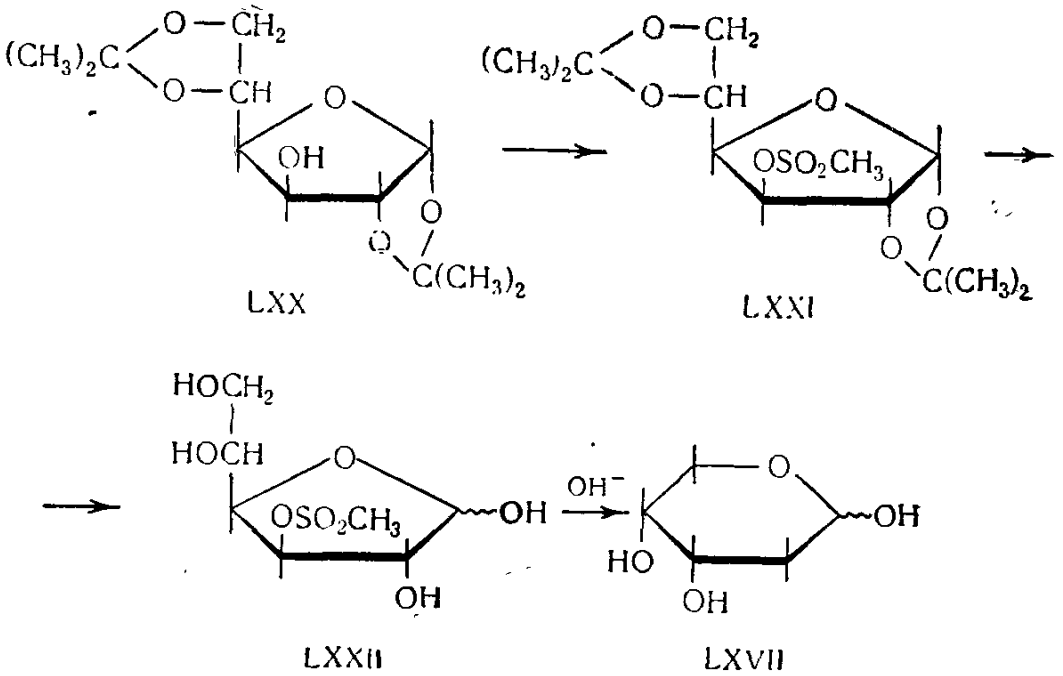


Этот метод неудобен для получения значительных количеств дезоксирибозы, и поэтому долгое время для ее лабораторного получения служил метод, принцип которого изображается схемой



Глюкозу подвергают сахариновой перегруппировке действием щелочи; получающаяся при этом метасахариновая кислота (LXIX) подвергается распаду по Руффу и дает 2-дезоксирибозу (XLVII).

Недавно разработан новый метод синтеза 2-дезоксирибозы, который, несмотря на большее число стадий, имеет серьезные преимущества, так как дает более чистый дезоксисахар с лучшим суммарным выходом. Синтез изображается схемой



Диацетонглюкоза (LXX) после обработки хлорангидридом метансульфокислоты в пиридине и обработки полученного мезильного производного (LXXI) кислотой дает 3-мезилат глюкозы (LXXII). Последний при обработке щелочью испытывает сложное превращение, которое приводит сразу с хорошим выходом к дезоксирибозе. Механизм этой интересной реакции еще не вполне ясен, но связан, очевидно, с сахариновой перегруппировкой мезилата.

ЛИТЕРАТУРА

Гетероциклические соединения. Москва, Издатинлит, 1960, VI, 195.
E. Chargaff, J. Davidson. Nucleic acids, I. New York, 1955, pp. 81—136.
E. Chargaff, J. Davidson. Nucleic acids, I. New York, 1955, pp. 9—65.
R. Jeanloz, H. Fletcher. The chemistry of ribose. Adv. carbohydrate chemistry, 1951, 6, 135.
M. Stacey. Carbohydrates of nucleic acids, IV Inter. congr. biochemistry, 1958, I, 107.

Глава 2

НУКЛЕОЗИДЫ

Как уже упоминалось, нуклеозидами называются соединения, получающиеся при частичном гидролизе мононуклеотидов и содержащие гетероциклическое основание и остаток моносахарида. Установление строения нуклеозидов и их синтез был первым этапом в познании нуклеиновых кислот и других нуклеотидов. В зависимости от того, содержат ли нуклеозиды в качестве углеводной компоненты рибозу или дезоксирибозу их называют рибонуклеозидами и дезоксирибонуклеозидами.

Нуклеозиды могут быть получены прямым гидролизом нуклеиновых кислот, минуя стадию выделения мононуклеотидов и именно этим методом они обычно получаются в препаративных целях. Для этого нуклеиновые кислоты подвергаются химическому или ферментативному гидролизу. Обычно их нагревают с концентрированным аммиаком 3—3,5 часа при 175—180°. Ферментативный гидролиз НК вызывают специальные ферменты, называемые нуклеазами. Ввиду неустойчивости дезоксирибозы и дезоксирибозидов при препаративном гидролизе ДНК, с целью получения нуклеозидов успеха можно достигнуть только при ферментативном гидролизе.

Нуклеозиды могут быть получены при ферментативном гидролизе мононуклеотидов, проходящем под действием фосфатаз.

До недавнего времени очень сложной задачей являлось разделение смеси полученных при гидролизе нуклеозидов на индивидуальные вещества. В настоящее время этот вопрос удовлетворительно решается с помощью хроматографии этой смеси на ионообменных смолах, которая была детально разработана Коном. Услугу в этой сложной операции может оказать и использование противоточного распределения.

Для качественного определения индивидуальных соединений и их идентификации в настоящее время применяется исключительно бумажная хроматография; в качестве подвижной фазы используются нейтральные, кислотные или щелочные системы. Обнаружение пятна на хроматограмме производится просвечиванием в ультрафиолетовых лучах, причем в настоящее время разработан метод количественной оценки на хроматограмме.

СТРОЕНИЕ НУКЛЕОЗИДОВ

При установлении строения нуклеозидов необходимо решить следующие вопросы:

1) природа гетероциклического основания;
2) природа моносахарида;
3) место замещения остатком сахара в гетероциклическом основании;
4) размеры окисного кольца в моносахариде;

5) конфигурация гликозидного центра.

Первые два вопроса решаются кислотным гидролизом и идентификацией основания и моносахарида обычными методами. Основание может быть выделено как таковое в кристаллическом виде или (при малых количествах) идентифицировано хроматографически. Для идентификации моносахарида целесообразнее всего пользоваться бумажной хроматографией, позволяющей достаточно просто идентифицировать большинство из известных моносахаридов.

Место связи сахара с основанием. Как пуриновые, так и пиримидиновые нуклеозиды при обработке кислотами подвергаются гидролизу и распадаются на гетероциклические основания и углевод. Это исключает возможность существования углерод-углеродной связи между гетероциклическим ядром и остатком углевода *. Вместе с тем гидролиз, особенно пиримидиновых нуклеозидов, требует довольно жестких условий, в частности высокой температуры, что заставляет отбросить предположение, что нуклеозиды являются О-гликозидами пуриновых или пиримидиновых оснований. Таким образом, остается допустить, что связь гетероциклического кольца с сахаром осуществляется через один из атомов азота и нуклеозиды являются N-гликозидами соответствующих оснований.

Вопрос о том, с каким именно атомом азота в гетероцикле связан остаток сахара, решается по-разному для пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов.

Нуклеозид аденина аденозин (I) и нуклеозид гуанина гуанозин (II) при обработке их азотистой кислотой подвергаются дезаминированию, не теряя при этом остатка углевода, и переходят в новые нуклеозиды — инозин (III) и ксантозин (IV), которые не содержатся в природных продуктах, но были выделены при гидролизе НК в результате одновременно протекающей реакции дезаминирования (см. стр. 192).

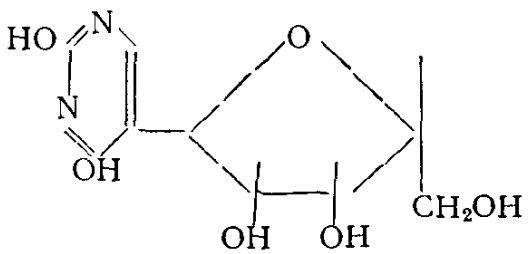
Образование (III) и (IV), протекающее с сохранением связи гетероциклическое ядро — сахар, исключает присоединение углеводного остатка через незамещенную аминогруппу аденозина или гуанозина.

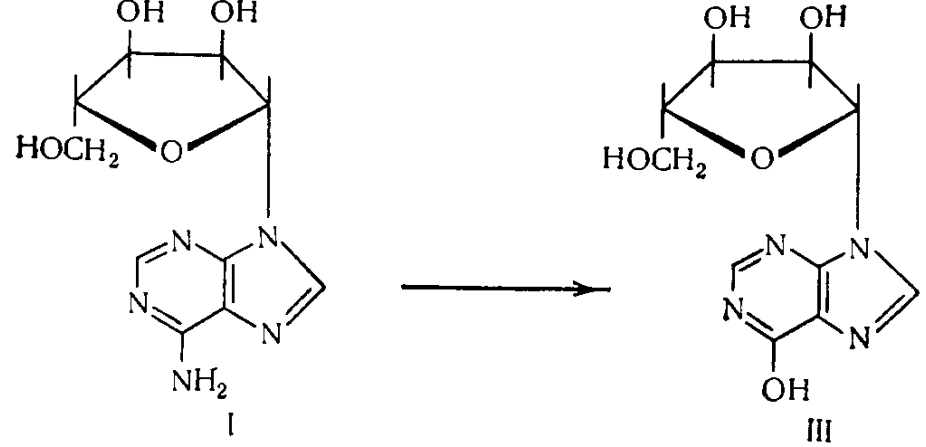
Далее ксантозин (IV) при метилировании иодистым метилом дает также с сохранением остатка сахара 1,3-диметилксантозин (V), что исключает связь углеводного радикала через атомы азота пиримидинового кольца пурина $N_{(1)}$ и $N_{(3)}$ (см. стр. 192).

Таким образом, в пуриновых нуклеозидах остаток сахара может быть связан с ядром только через атомы азота имидазольной части молекулы, т. е. через $N_{(7)}$ или $N_{(9)}$. Выбор между этими двумя возможностями был сделан на основании сравнения спектров поглощения в ультрафиолетовой области синтетических образцов 7-метиладенина и 9-метиладенина с природным аденозином. Оказалось, что по спектру аденозин близок к 9-метиладенину и отличен от 7-метилзамещенного. На основании этого было сделано заключение, что в природном аденозине остаток углевода связан с пуриновым ядром через $N_{(9)}$. В дальнейшем этот вывод был подтвержден полным синтезом аденозина (см. стр. 202).

---

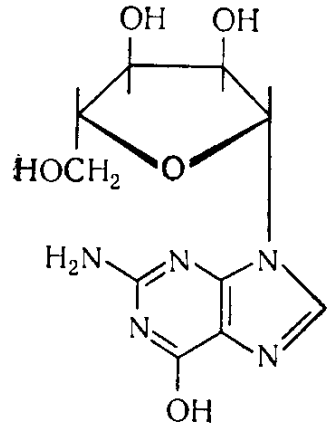
* В последнее время показано присутствие в гидролизатах РНК нуклеозида, в котором углевод присоединен к гетероциклическому основанию С—С связью—5-рибозилурацила:



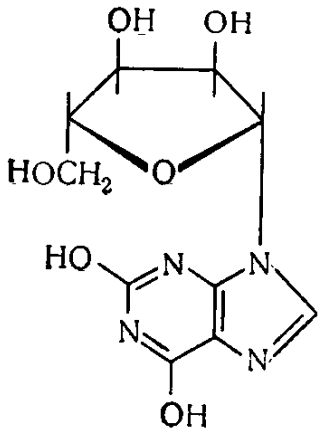


I

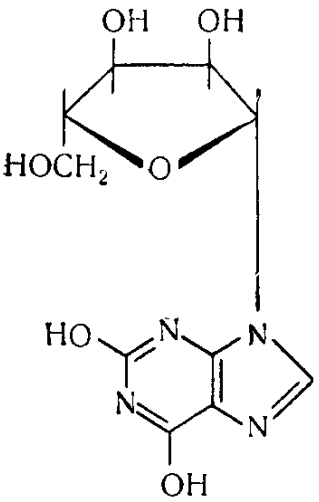
III



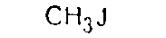
II

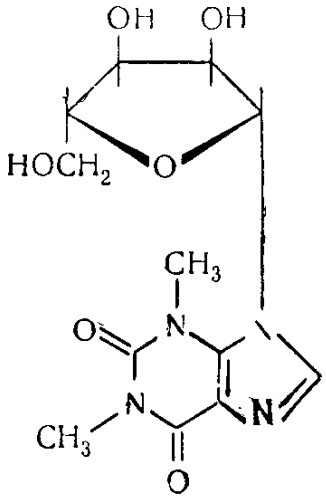


IV



IV



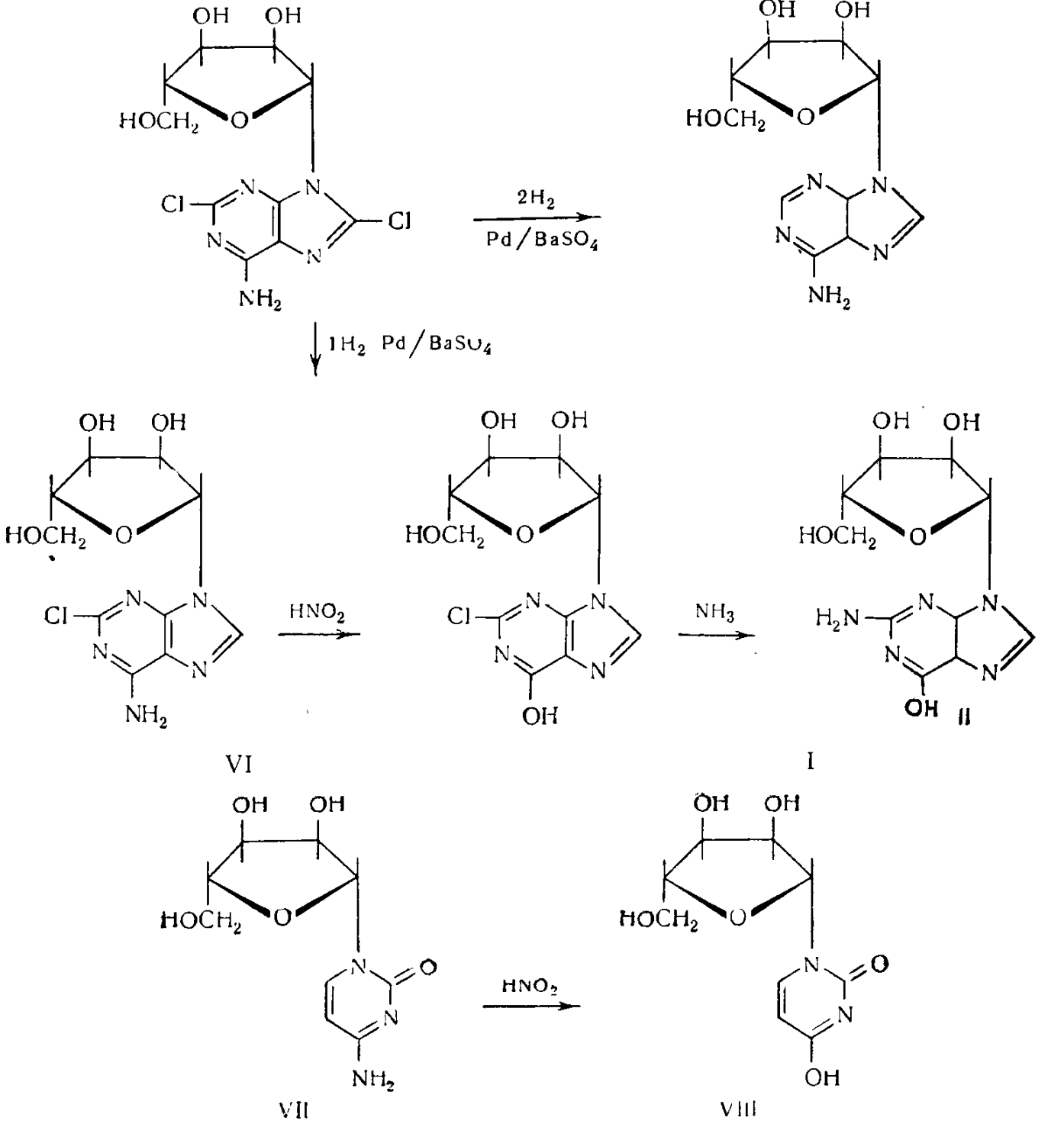


V

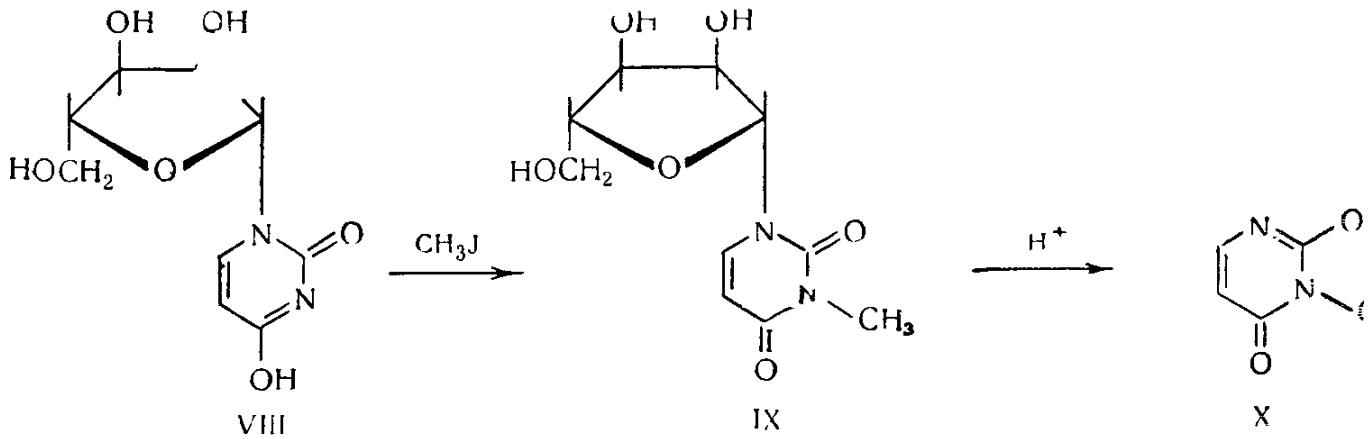
Аденозин и гуанозин могут быть синтезированы из одного и того же исходного вещества — 9-N-рибозил-2,8-дихлор-6-аминопурина (VI) (см. стр. 193).

Из этого следует, что у гуанозина связь углеводного остатка с ядром также осуществляется через $N_{(9)}$. Далее поскольку инозин (III) и ксантозин (IV) могут быть получены из аденозина и гуанозина (см. стр. 191), то, очевидно, и для этих получающихся в процессе распада НК нуклеозидов следует принять связь с остатком сахара у $N_{(9)}$.

У пиримидиновых нуклеозидов остаток моносахарида может быть привязан через атом ядра $N_{(1)}$ или $N_{(3)}$ и, кроме того, у цитидина (нуклеозид цитозина) через свободную аминогруппу. Последняя возможность была исключена на основании того, что цитидин (VII) при обработке азотистой кислотой дезаминируется без отщепления моносахарида, превращаясь в уридин (VIII).



Таким образом, место связи остатка сахара в уридине и цитидине одинаково. Это местоположение было доказано для уридина следующим образом. Уридин (VIII) подвергался метилированию действием иодистого метила и полученное N-метильное производное (IX) гидролизовалось действием кислоты. Поскольку в результате этой операции был выделен 1-метилурацил (X), то ясно, что атом азота был в исходном нуклеозиде

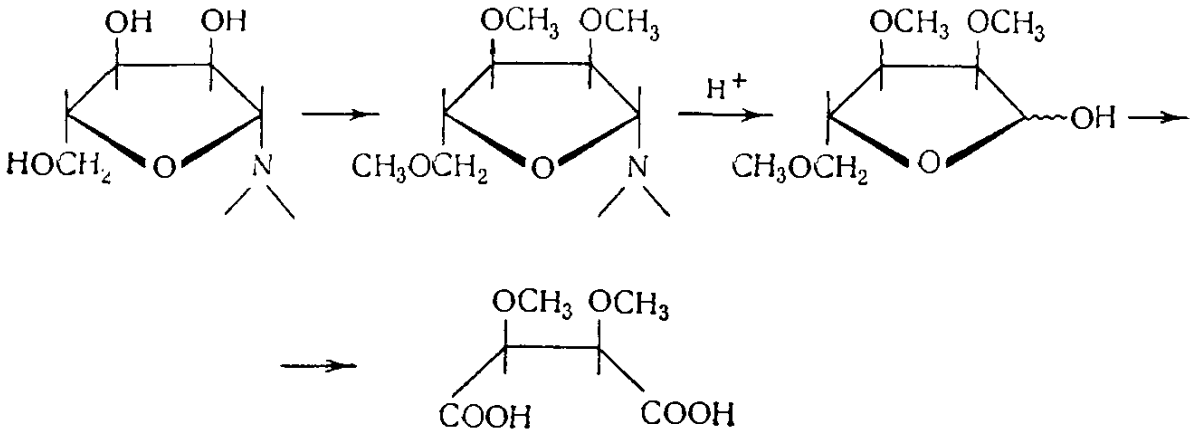


свободен и связь с остатком моносахарида в уридине осуществляется через $N_{(3)}$; другими словами, уридин имеет строение (VIII) и соответственно цитидин — (VII), как показано на стр. 193.

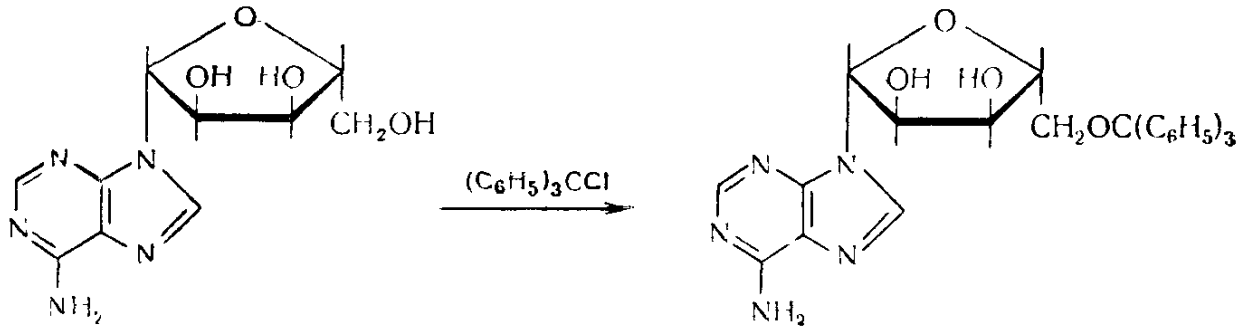
Тем же путем было доказано аналогичное строение рибонуклеозида тимина — тимидина. Оказалось, что во всех известных природных пиримидиновых нуклеотидах связь с углеводом осуществляется через атом азота $N_{(3)}$. Единственным исключением является, по-видимому, вицин, выделенный из *Vicia sativa*, который по имеющимся данным является О-гликозидом *.

Размер окисного кольца моносахарида. Этот вопрос строения нуклеотидов решался обычными методами химии углеводов, подробно рассмотренными в другом разделе этой книги (стр. 33 и далее). Для решения этого вопроса нуклеозид метилировался, метильное производное (XI) подвергалось гидролизу и выделенный после гидролиза метилированный моносахарид (XII) окисляли.

Для рибозидов такая последовательность реакций может быть изображена схемой



Выделение при этом диметоксиянтарной кислоты свидетельствует о том, что в нуклеозиде рибоза имела γ-окисное пятичленное кольцо. Подтверждением этого служит реакция нуклеозидов с трифенилхлорметаном, которая приводит к образованию важных для синтетической химии тритильных производных нуклеозидов, например:



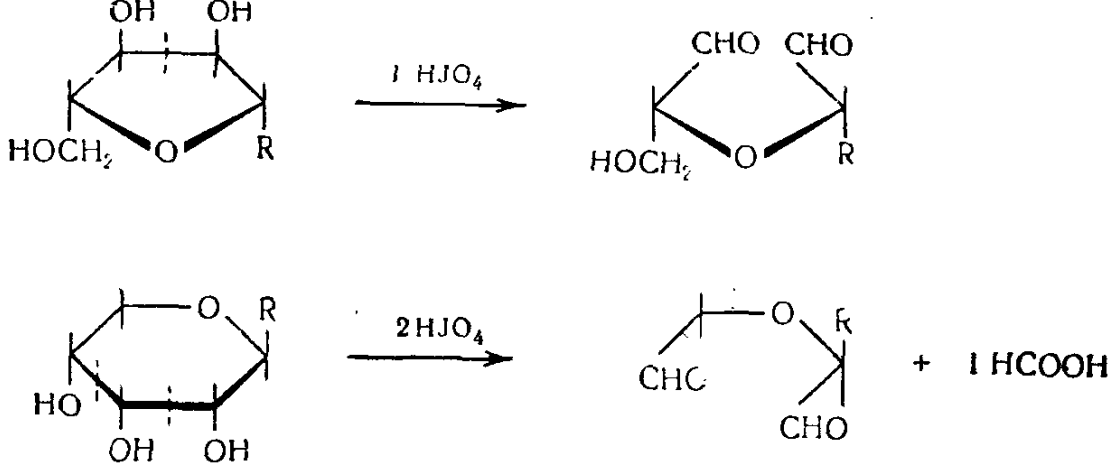
Эти производные, как известно, образуются только из углеводов, имеющих свободную первичноспиртовую группу: последняя в рибозном остатке может быть лишь тогда, когда он имеет фуранозное кольцо.

Наиболее просто вопрос о размерах окисного кольца сахара решается с помощью окисления иодной кислотой, и именно этим методом почти исключительно пользуются в настоящее время.

Совершенно ясно, что как число молей поглотившейся иодной кислоты, так и получающиеся при этом продукты окисления будут различаться в зависимости от того, имеется ли в рибозном остатке пиранозное или фуранозное кольцо, как это видно из схемы.

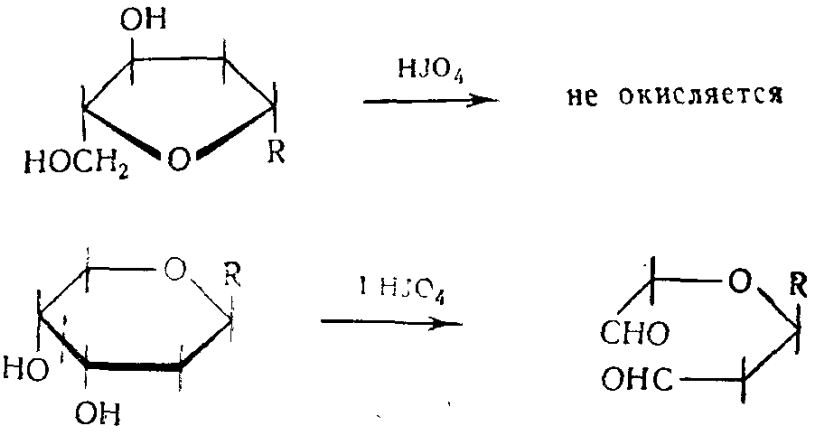
---

* См. также примечание к стр 191.



Фактически при окислении природных рибонуклеозидов затрачивается 1 моль HJO_4, и муравьиной кислоты в продуктах реакции не обнаруживается. Это доказывает, что рибозный остаток имеет фуранозную структуру.

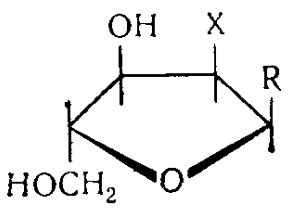
Столь же просто решается вопрос и о размере кольца в дезоксирибонуклеозидах. Последние будут реагировать с иодной кислотой лишь в том случае, если в них имеется пиранозное кольцо; если же остаток дезоксирибозы находится в фуранозной форме, то из-за отсутствия в нем α-гликольной группировки окисления происходить не будет.



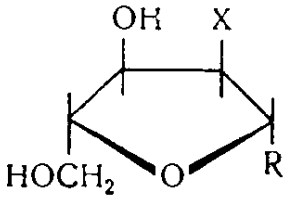
В действительности природные дезоксирибонуклеозиды не окисляются HJO_4, что доказывает их фуранозную структуру. Исследования, проведенные указанными методами, показали, что все природные рибо- и дезоксирибонуклеозиды, как выделенные из нуклеиновых кислот, так и входящие в состав нуклеотидных коферментов, имеют фуранозное кольцо. Напротив, синтетические нуклеозиды, получающиеся обычными путями, почти всегда являются пиранозидами, так как при их синтезе обычно исходят из ацилгликозилгалогенидов пиранозной структуры. Некоторые из природных нуклеозидов, выделенных из растительных объектов, также являются пиранозидами.

Конфигурация гликозидного центра. Наиболее сложным вопросом структурной химии нуклеозидов является выяснение конфигурации гликозидного центра. Как и любой N-гликозид, нуклеозиды могут иметь одну из двух возможных конфигураций у гликозидного атома и относиться к α или β-ряду. Возможность, что их строение соответствует структуре анила открытой альдегидной формы сахара, в данном случае исключается, поскольку, как указывалось выше, во всех природных нуклеозидах связь гетероциклического ядра с моносахаридом осуществляется через атом азота, стоящий в цикле; другими словами, все нуклеозиды являются N-гликозидами вторичных аминов, для которых структуры типа шиффовых оснований невозможны.

Таким образом, при выяснении строения рибонуклеозидов и дезоксирибонуклеозидов — наиболее важного типа нуклеозидов, к которым относится подавляющее большинство природных соединений этого типа, вопрос сводится к выбору между конфигурациями α-гликозида (XIII) или β-гликозида (XIV).



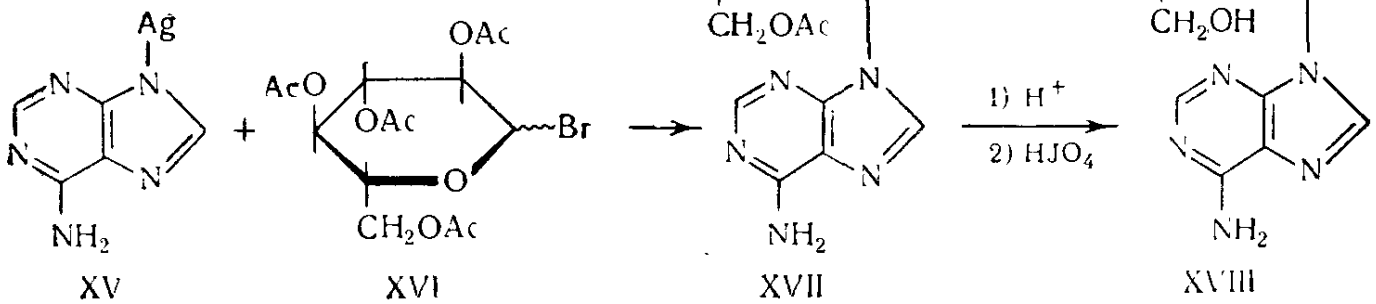
XIII



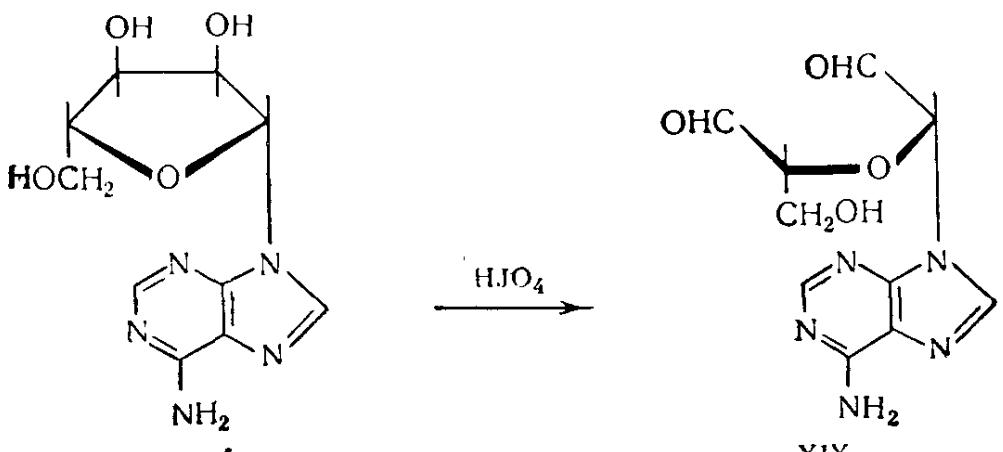
XIV

где R — гетероциклическое основание;
X=OH — рибозиды;
X=H — дезоксирибозиды.

Первое непрямое доказательство β-конфигурации (XIV) природных рибозидов было приведено А. Тоддом. Оно заключается в следующем. Одним из методов синтеза нуклеозидов (которые будут подробно описаны в следующем подразделе), а именно конденсацией серебряной соли аденина (XV) с тетраацетилглюкозилбромидом (XVI) был получен 9-D глюкозиладенин (XVII). Последний подвергался омылению и окислению иодной кислотой, в результате чего был получен нормальный продукт окисления диальдегид (XVIII). Параллельно с этим окислению иодной кислотой подвергался природный аденозин (I), который дал также продукт нормального окисления диальдегид (XIX). Сравнение обоих диальдегидов — (XVIII) и (XIX) — показало, что они идентичны, в том числе и по величине и знаку вращения плоскости поляризации.



XV XVI XVII XVIII



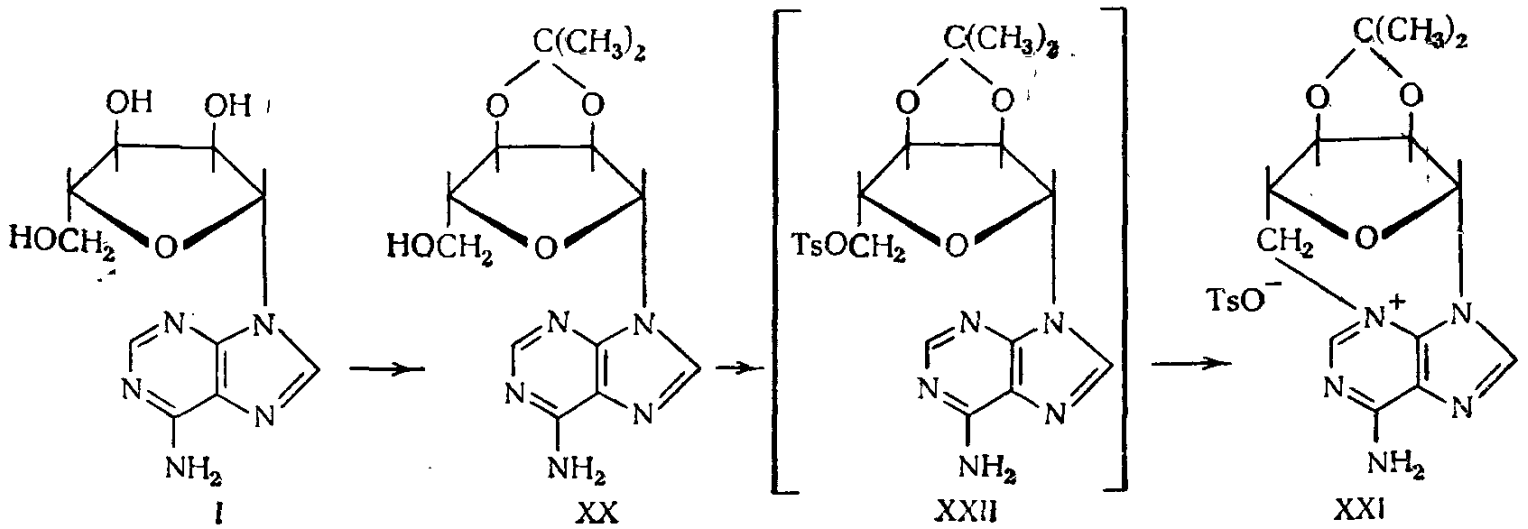
I XIX

Отсюда следует, что конфигурация обоих асимметрических центров, оставшихся в (XVIII) и (XIX), также идентичны. Один из этих центров, естественно, идентичен, так как природные нуклеозиды содержат остаток D-рибозы, а синтетический нуклеозид (XVII) был получен, исходя из D-глюкозы, а оба сахара имеют у атома $C_{(5)}$ и соответственно у $C_{(4)}$ одну и ту же конфигурацию. Однако идентичность (XVIII) и (XIX) указывает на то, что и конфигурация гликозидного центра в природном аденозине (I) и синтетическом нуклеозиде (XVII) также одинакова. Вместе с тем конфигурация гликозидного центра (XVII) должна быть хорошо известна из его синтеза. В разделе, посвященном химии углеводов, подробно рассмотрена закономерность, определяющая конфигурацию гликозида, получающегося при синтезе Кенигса — Кнорра (см. стр. 86), разновидностью которого является описанный выше синтез (XVII). В соответствии с этой закономерностью конфигурация гликозида определяется конфигурацией у $C_{(2)}$-атома исходного ацилгликозилгалогенида. В рассматриваемом здесь случае получающийся нуклеозид (XVII) будет иметь β-конфигурацию. как все глюкозиды, получающиеся по Кенигсу — Кнорру (стр. 86). Однако, поскольку природный аденозин (I) имеет ту же конфигурацию, что и синтетический нуклеозид (XVII) то, следовательно, в аденозине также налицо β-конфигурация у гликозидного центра. Вполне аналогичный цикл переходов был проведен для цитидина и уридина, которые также, как было доказано, имеют β-конфигурацию гликозидного центра.

Как видно из изложенного, это первое доказательство конфигурации природного нуклеозида не является достаточно полным. Строго говоря, доказывается только идентичность природного и синтетического нуклеозидов и, поскольку конфигурация последнего принята лишь по аналогии с образованием О-гликозидов, это несколько условно. Однако этот прием доказательства представляет не только чисто исторический интерес, но и может быть использован, как метод, который позволяет просто сравнивать конфигурацию двух различных нуклеозидов.

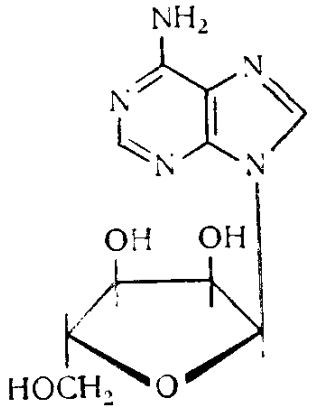
Совершенно однозначное доказательство конфигурации гликозидного центра нуклеозидов было недавно приведено Тоддом; оно основано на образовании продуктов циклизации нуклеозидов (так называемых циклонуклеозидов).

В аденозине (I) предварительно защищают две вторичные гидроксильные группы рибозного остатка образованием изопропилиденового производного (XX). Соединения этого типа, как будет видно из дальнейшего изложения, играют весьма важную роль в синтетической химии нуклеозидов. При обработке (XX) *n*-толуолсульфохлоридом в пиридине, т. е. в обычных условиях тозилирования, происходит замыкание



цикла и образуется циклонуклеозид (XXI). Несомненно, эта реакция проходит через промежуточное получение тозилата (XXII), который легко образуется как тозилат первичного спирта и далее, немедленно вступая в реакцию с третичным атомом азота, дает четвертичную соль (XXI); эта реакция известна как общая реакция тозилатов (см. стр. 197).

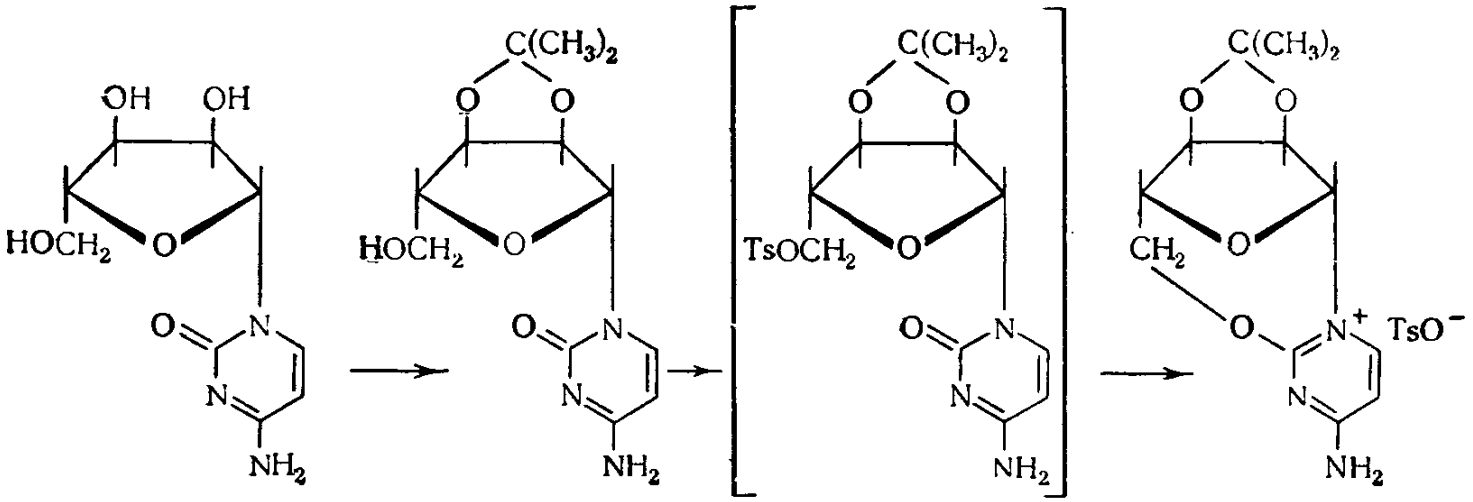
Однако совершенно ясно, что для осуществления такой реакции образования четвертичной соли должны быть соблюдены совершенно определенные чисто геометрические условия, т. е. тозильная группа в (XXII), или иными словами группа CH_2OH в аденозине, должна быть расположена достаточно близко к атому азота $N_{(3)}$ в пиримидиновой части пуринового ядра; только в этом случае может образоваться новая ковалентная связь в (XXI). Если сопоставить аденозин, имеющий как это представлено в формуле (I) β-конфигурацию, с его аномером, имеющим α-конфигурацию (XXIII), то ясно видно, что в этом последнем случае CH_2OH-группировка рибозного остатка в защищенном изопропилиденовой группировкой аденозине и все пуриновое ядро, т. е. все атомы азота, за счет которых может пойти циклизация, находятся на таком расстоянии, что циклонуклеозид не может образоваться.



XXIII

Таким образом, образование циклонуклеозида (XXI) возможно только в том случае, когда нуклеозид имеет β-конфигурацию гликозидного центра.

На том же принципе циклизации основано доказательство конфигурации гликозидного центра пиримидиновых нуклеозидов; для этого была осуществлена реакция, также приводящая к получению циклонуклеозида.



VII XXIV XXV XXVI

Для доказательства конфигурации цитидина (VII) его переводили в его изопропилиденовое производное (XXIV). При обработке последнего *п*-толуолсульфохлоридом в пиридине был получен (вероятно, через промежуточное образование тозилата (XXV) циклонуклеозид (XXVI). Эта реакция отличается от предыдущей лишь тем, что в данном случае цикл замыкается через кислородный атом, для чего пиримидиновый цикл должен перейти в свою оксиформу, а атом азота, с которым связан остаток сахара, сделаться четвертичным. Однако независимо от этого и в данном случае цикл может замкнуться лишь при условии геометрической близости CH_2OH-группировки рибозного остатка и пиримидинового цикла, что опять-таки соблюдается только при β-гликозидной связи.

Приведенные доказательства конфигурации гликозидного центра в природных нуклеозидах являются совершенно надежными и однозначными, как и любые доказательства строения или конфигурации, основанные на рассмотрении молекулы с чисто геометрической точки зрения.

СИНТЕЗ НУКЛЕОЗИДОВ

Работы по синтезу нуклеозидов являлись первым этапом развития синтетической химии нуклеотидов, ознаменовавшегося к настоящему времени крупными успехами. Этими работами было окончательно подтверждено строение нуклеозидов; вместе с тем некоторые из предложенных методов синтеза получили препаративное значение и используются в настоящее время для лабораторного получения нуклеозидов. Эти методы применяют при приготовлении некоторых труднодоступных природных нуклеозидов, но особенно широко они используются для получения синтетических аналогов природных нуклеозидов, отличающихся как своим гетероциклическим ядром, так и связанным с ним остатком сахара. Как упоминалось ранее, такого рода синтетические препараты привлекают сейчас внимание в связи с поисками лечебных средств для борьбы с инфекционными заболеваниями и злокачественными новообразованиями. Не меньшее значение они имеют при решении некоторых теоретических проблем биологии, например вопросов генетики.

В последнее время синтетические методы получения нуклеозидов используют и для получения соединений с меткой в различных частях молекулы; меченые нуклеозиды в свою очередь находят широкое применение для выяснения механизмов реакций и других вопросов теоретической биохимии.

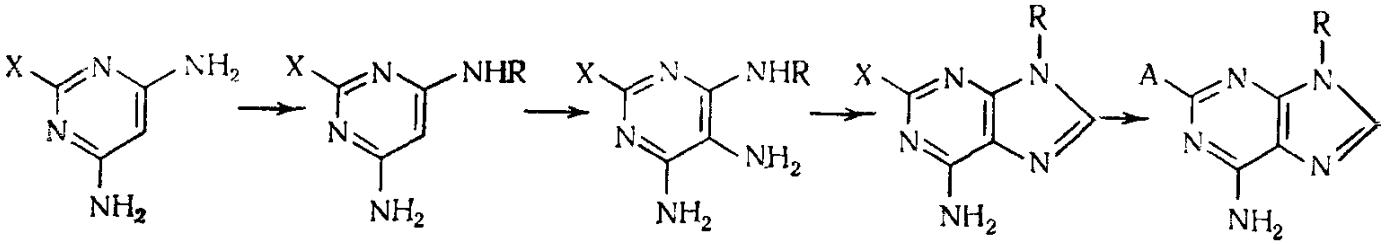
Методы синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов различны в силу различия химических свойств самих гетероциклических систем, поэтому эти методы целесообразно рассматривать отдельно.

Синтез пуриновых нуклеозидов

Все синтезы пуриновых нуклеозидов могут быть разделены на три группы, отличающиеся принципом построения молекулы нуклеозида: 1) синтезы, связанные с введением остатка моносахарида в готовое пуриновое ядро; 2) синтезы, сводящиеся к достройке имидазольного кольца; 3) синтезы, основанные на достройке пиримидинового кольца.

Значение каждой из групп различно. С препаративной точки зрения наиболее важны и исключительно применяются в настоящее время методы первой группы. Однако с исторической и принципиальной точки зрения важным этапом в развитии химии нуклеозидов была разработка и использование методов второй группы. Именно этим путем около 10 лет назад был осуществлен первый полный синтез пуринового нуклеозида.

Общая идея этого синтеза, осуществленного А. Тоддом может быть представлена схемой

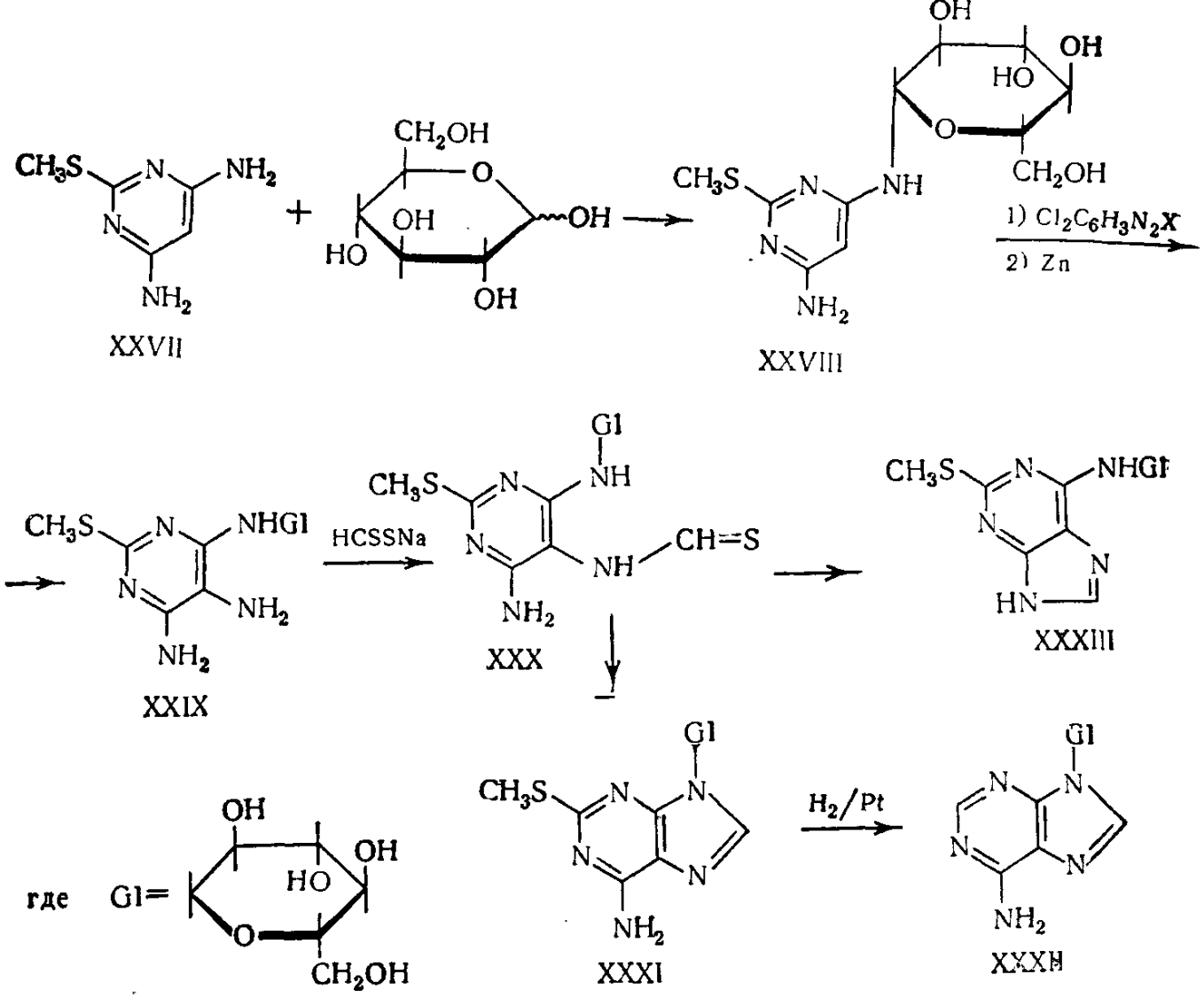


где R – остаток моносахарида

Для того чтобы использовать эту схему для синтеза природных пуриновых нуклеозидов, необходимо разрешить следующие вопросы. Прежде всего, нужно иметь в распоряжении достаточно удобный метод наращивания имидазольного кольца с тем, чтобы синтез проходил в мягких условиях, не затрагивающих лабильного остатка сахара. Этот вопрос был решен разработкой видоизменения синтеза Траубе (стр. 184). Вторая трудность в осуществлении синтеза связана с необходимостью иметь в пиримидиновом ядре заместитель X, который должен быть неспособным к таутомерному превращению, так как в этом случае пиримидиновый цикл может реагировать в своей окси- (или имино-) форме, что приведет к наращиванию второго гетероциклического кольца в другом направлении, а именно через $N_{(3)}$. Вместе с тем заместитель X должен на последней стадии синтеза в мягких условиях замещаться на водород, гидроксильную группу или аминогруппу, которые находятся в природных пуриновых нуклеотидах. Этот вопрос разрешили, применяя в качестве заместителя X метилтиогруппу (SCH_3), удовлетворяющую обоим вышеприведенным требованиям. Наконец, поскольку все природные рибонуклеозиды имеют фуранозное кольцо, необходимо при осуществлении синтеза исходить из соответствующего производного рибозы. Первые синтезы нуклеозидов, выполненные этим путем, привели к получению нуклеозидов с пиранозным кольцом в остатке моносахарида. Примером такого рода синтеза является синтез 9-N-β-глюкозиладенина (см. стр. 201).

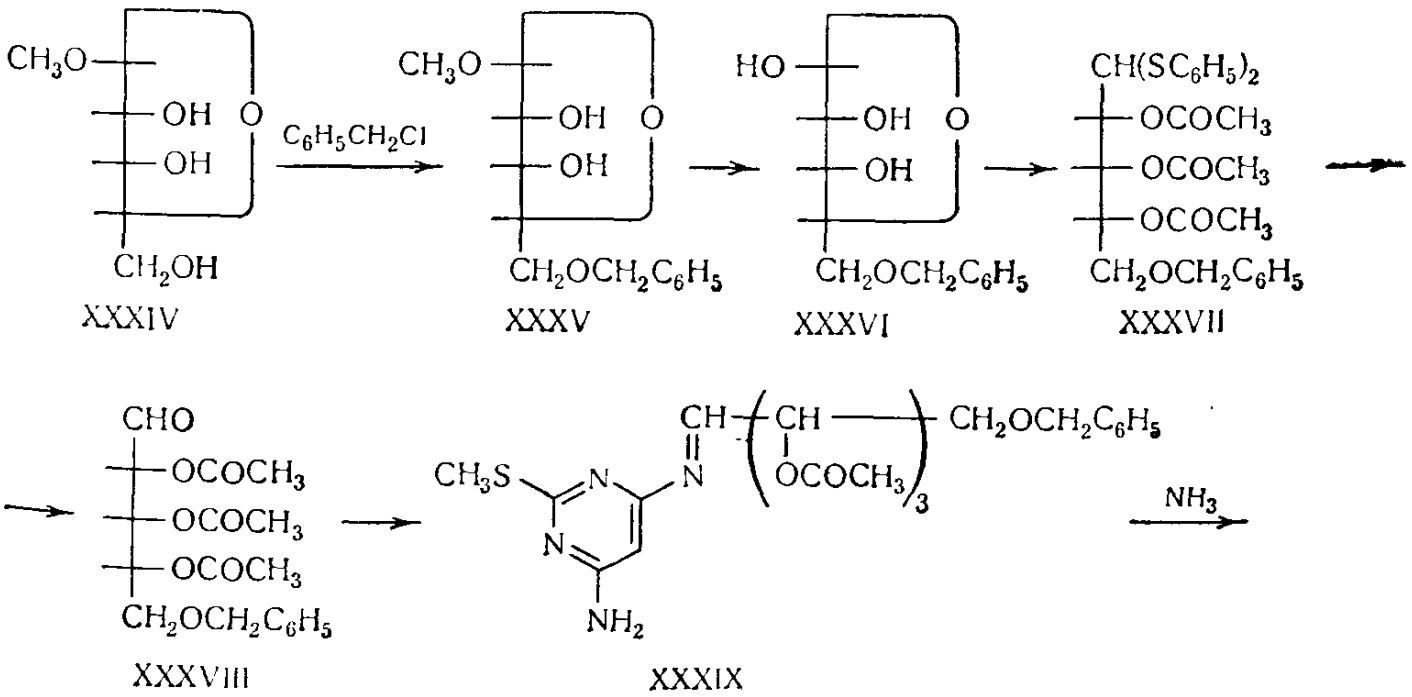
Исходным соединением для синтеза является 2-метилтио-4,6-диаминопиримидин (XXVII). Взаимодействием его с глюкозой был получен 2-метилтио-4-глюкозиламино-6-аминопиримидин (XXVIII), который далее по методу, упомянутому выше (стр. 184), сочетанием с хлористым дихлорфенилдиазонием и восстановлением азосоединения, превращался в триаминопиримидин (XXIX). Последний также по методу, разработанному ранее, через тиоформильное производное (XXX) превращался в 2-метилтио-9-N-β-глюкопиранозиладенин (XXXI), гидрированием которого над скелетным никелем получался сам 9-N-β-глюкопиранозиладенин (XXXII). На стадии циклизации синтез шел неоднозначно и замыкание кольца тиоформильного производного (XXX) давало одновременно с (XXXI) и 2-метилтио-6-N-глюкопиранозиламинопурин (XXXIII), строение которого было строго доказано обычными методами.

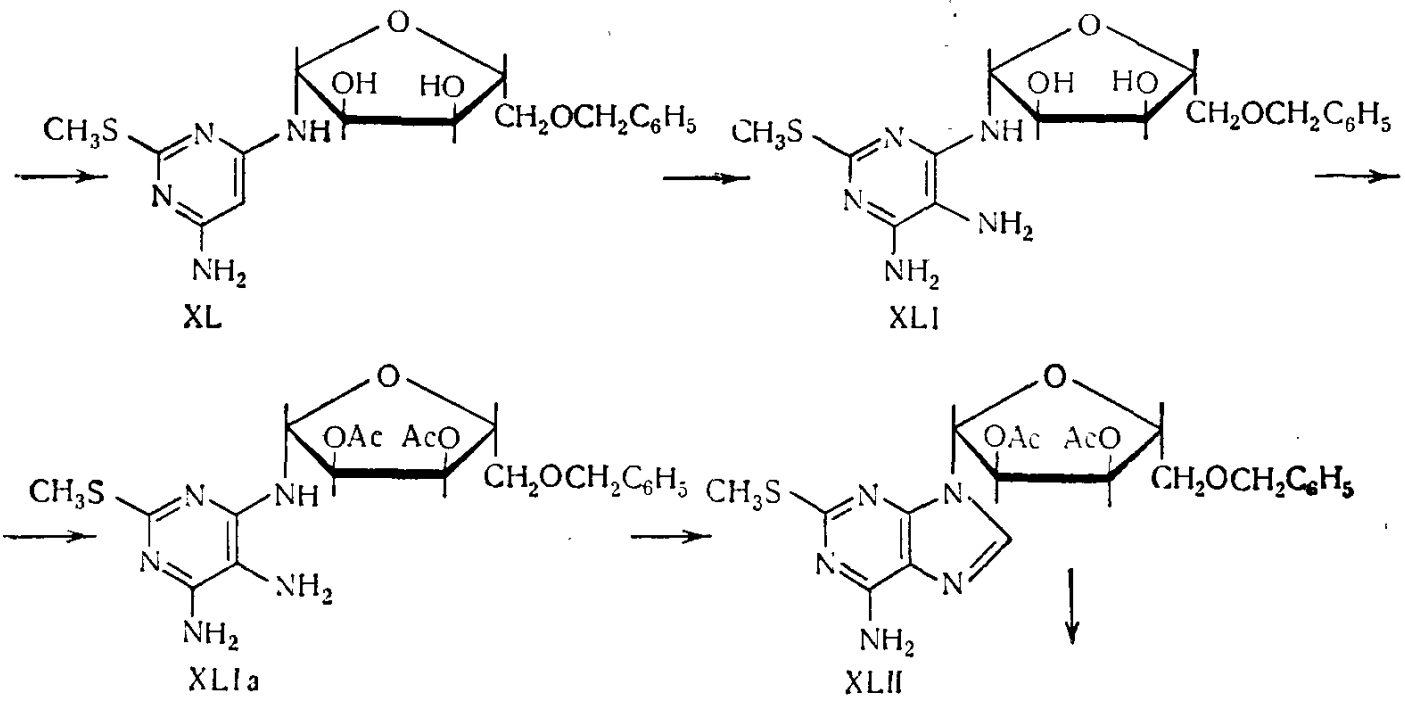
Нужно добавить, что, помимо отмеченной уже неоднозначности синтеза на стадии циклизации тиоформильного производного (XXXI), при самом тиоформилировании реакция также, возможно, пойдет неоднозначно, так как в реакцию может вступить одна из трех аминогрупп, вследствие чего далее могут образоваться изомерные пурины. Тем не менее этот метод синтеза оказался достаточно удобным и совершенно тем же путем получены аналоги (XXXII) содержащие вместо остатка глюкозы остаток рибозы, ксилозы и маннозы, однако все эти производные имели пиранозное кольцо.

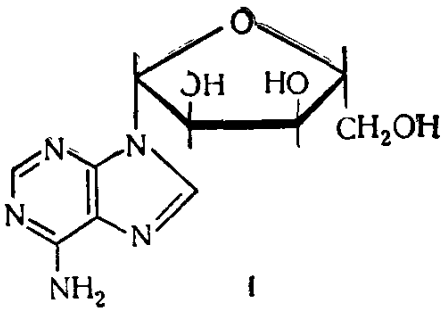


При попытке использовать этот путь для синтеза природных рибонуклеозидов с фуранозным кольцом сахара встретились трудности так как конденсация (XXVII) с 2,3,5-триацетилрибофуранозилгалогенидом шла с ничтожным выходом.

Для того чтобы обойти эту трудность, синтез был проведен длинным обходным путем по схеме.





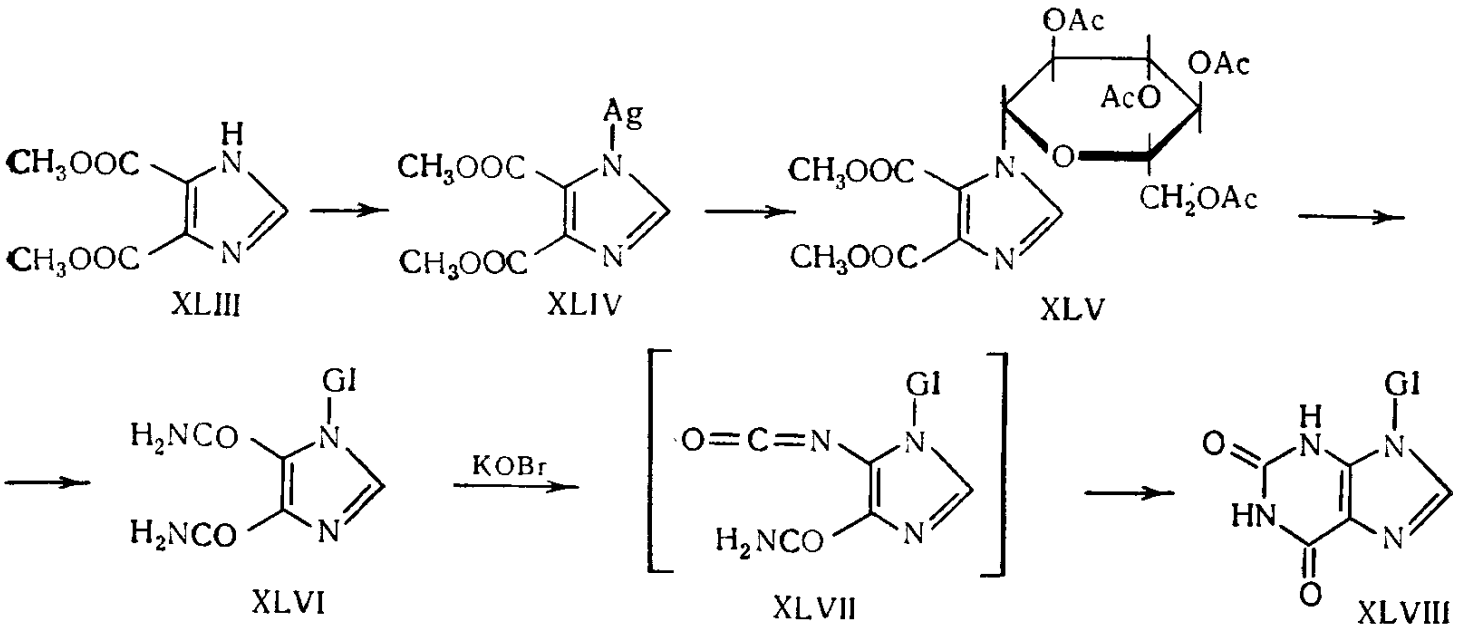


Метилрибофуранозид (XXXIV) бензилировался хлористым бензилом, бензильное производное (XXXV) после гидролиза дало 5-бензилрибозу (XXXVI), которая может существовать только в фуранозной форме. Последовательной обработкой тиофенолом в кислой среде и уксусным ангидридом (XXXVI) превращалось в меркапталь ацетилированного сахара (XXXVII), из которого был получен ацетат альдегидной формы 5-бензилрибозы (XXXVIII). Этот последний и послужил исходным производным рибозы для синтеза природных нуклеозидов. Главная особенность вещества (XXXVIII) состоит в том, что это производное, благодаря блокировке гидроксила у $C_{(5)}$, может замыкать только фуранозное кольцо. Конденсацией (XXXVIII) с 2-метилтио-4,6-диаминопиримидином было получено шиффово основание (XXXIX), при обработке которого аммиаком снимаются ацетильные группы, и оно немедленно переходит в циклический N-рибозид (XL), который может существовать только в фуранозной форме. Далее (XL) по обычному пути, описанному выше, т. е. через триаминопиримидин (XLI), его ацетат (XLIa), полученный для временной защиты оксигрупп рибозного остатка, превращался в пуриновый рибозид (XLII). Заключительной стадией синтеза было снятие всех защищающих групп, для чего (XLII) подвергался обработке аммиаком с целью гидролиза ацетильных групп, а гидрогенолизом над скелетным никелем удалялась бензильная группа из рибозного остатка и метилтиогруппировка из пуринового ядра. Этим путем был осуществлен первый синтез природного нуклеозида — аденозина (I) и тем самым было окончательно подтверждено его строение.

Этот путь использован также и для синтеза некоторых других производных аденина, однако в настоящее время благодаря тому, что позднее были разработаны более удобные методы синтеза, этот метод в препаративной практике не используется.

Другой тип синтеза пуриновых нуклеозидов основанный на достройке гетероциклического ядра у имеющего моносахаридный остаток промежуточного соединения, основан на использовании готового N-гликозида

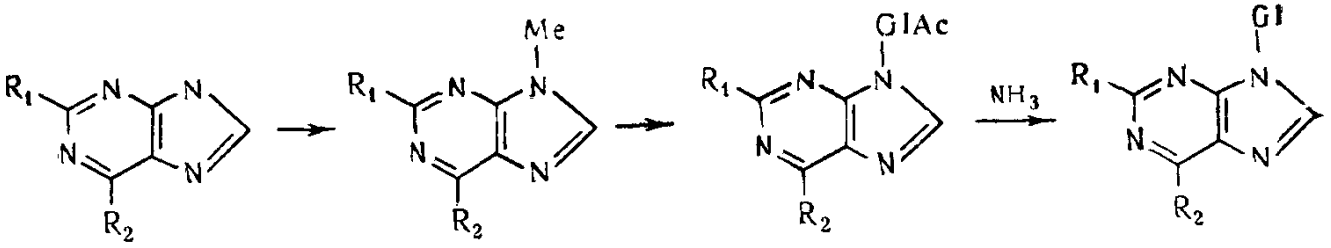
имидазольного ряда, к которому достраивается пиримидиновая часть молекулы. Этот метод синтеза, развитый Спрингом, может быть проиллюстрирован синтезом глюкозида ксантина.



Метиловый эфир имидазол-4,5-дикарбоновой кислоты (XLIII) в виде своей серебряной соли (XLIV) конденсацией с ацетилглюкозилгалогенидом превращается в N-гликозид (XLV). В последнем при обработке аммиаком, помимо гидролиза ацетильных групп, происходит также аммонолиз карбометоксильных групп ядра. Полученный таким образом диамид (XLVI) подвергается воздействию бромноватистой кислоты в условиях перегруппировки Гофмана; при этом замыкается пиримидиновое ядро и получается 9-N-глюкозид ксантина (XLVIII). Очевидно, эта реакция идет как гофмановская перегруппировка, таким образом, что вначале одна из карбоксамидных групп превращается в изоцианатную, и полученный промежуточный продукт (XLVII) тут же циклизуется с образованием пиримидинового кольца. Этим же путем можно получить и соответствующий фуранозид, хотя практически этого сделано не было. Этот путь синтеза пуриновых нуклеозидов не имеет никакого препаративного значения и описан только для нескольких соединений. Однако, этот синтез чрезвычайно интересен тем, что, как выяснено в настоящее время, он весьма близок к тому биогенетическому пути, который используется организмом для синтеза пуринового ядра нуклеозидов. В частности, показано, что важнейшим ключевым промежуточным продуктом на пути биогенеза пуриновых нуклеозидов является 5-аминоимидазолкарбоксамид-4; предполагается, что соответствующий изоцианат получается в качестве промежуточного продукта при синтезе Спринга.

Бесспорно, важнейшими методами синтеза пуриновых нуклеотидов являются синтезы, основанные на введении углеводного остатка в готовое пуриновое ядро. Во всяком случае первенствующее препаративное значение этих методов видно из того, что в лабораторной практике используется в настоящее время исключительно этот путь синтеза.

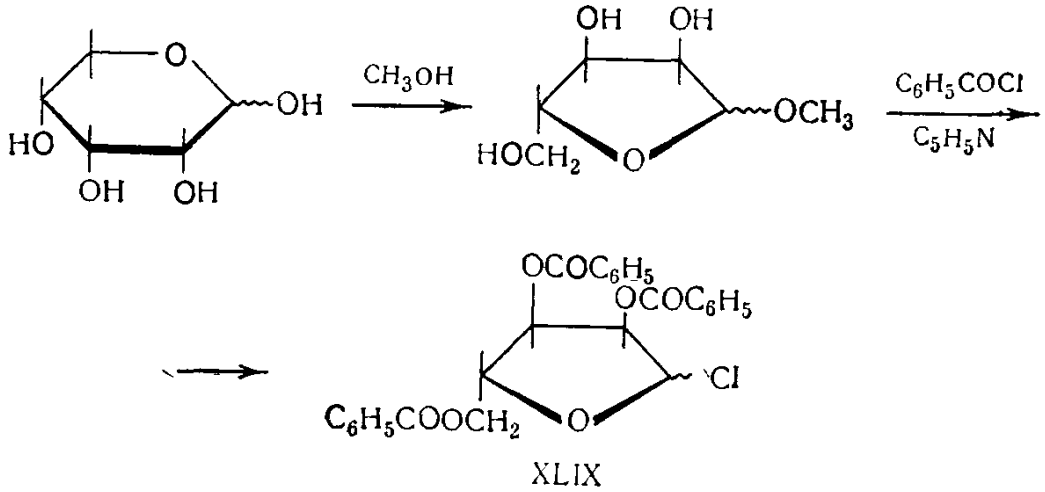
Первые синтезы N-гликозидов пуринового ряда, не относящихся к природным нуклеозидам, были осуществлены еще Э. Фишером, которому удалось получить некоторые гликозиды теофилина и теобромина конденсацией серебряных солей этих алкалоидов с ацилгликозилгалогенидами. Позднее этот метод подвергался подробному исследованию, и в настоящее время является общим методом синтеза пуриновых нуклеозидов. Схема синтеза может быть представлена уравнением



где GlAc – остаток ацилированного моносахарида Gl – остаток моносахарида

В качестве металлических производных, вместо серебряных солей в настоящее время применяются исключительно ртутные производные типы RHgX, которые легко получаются взаимодействием соответствующего пуринового основания с солями ртути. При конденсациях пуриновых производных, имеющих свободные аминогруппы, например, аденина, последние должны быть предварительно защищены. Обычно для этой цели аминогруппу ацилируют, чаще всего хлористым бензоилом; по окончании синтеза бензамидную группировку разрушают мягким гидролизом, регенерируя свободную аминогруппу.

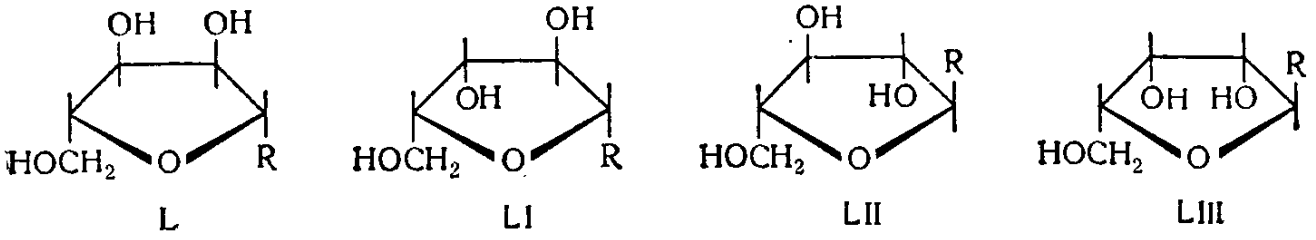
Этим путем могут быть получены как пиранозиды, так и фуранозиды, в зависимости от строения исходного ацилгликозилгалогенида. Поскольку конденсация последнего с металлическим производным проходит в безводном растворителе и в нейтральной среде, раскрытие кольца моносахарида и перегруппировка фуранозида в пиранозид исключаются. В качестве исходных соединений для синтеза природных рибофуранозидов ранее применялись триацетилрибофуранозилбромиды; однако в настоящее время предпочитают пользоваться более удобными в работе и легче очищаемыми бензоильными производными, причем слишком энергичные в реакциях конденсации бромиды часто замещают менее активными, но достаточно удобными хлоридами. Синтез исходного 2,3,5-трибензоилрибофуранозилхлорида (XLIX) в настоящее время очень хорошо разработан и проводится по схеме



XLIX

Весьма существенным обстоятельством, которое ограничивает возможности этого метода и с которым необходимо считаться, является стереохимическое течение реакции конденсации ртутного производного с галогенидом. Поскольку этот метод синтеза нуклеозидов является, в сущности, разновидностью синтеза Кенигса — Кнорра, то все закономерности, установленные для последнего, имеют силу и в данном случае. Как подробнее рассматривалось в разделе химии углеводов (стр. 86), получающийся в процессе конденсации Кенигса — Кнорра гликозид **всегда имеет** транс-расположение у $C_{(1)}$ — $C_{(2)}$-моносахаридного остатка, независимо от конфигурации гликозидного центра у исходного галоге-

нида. Если учесть эту закономерность строения природных рибофуранозидов и их наиболее близких аналогов, содержащих остатки пентоз, указанным методом могут быть получены только нуклеозиды строго определенной конфигурации, а именно для рибозидов (L) и ксилозидов (LI), это всегда только β-гликозиды, и для арабинозидов (LII) и ликсозидов (LIII), напротив, только α-гликозиды.

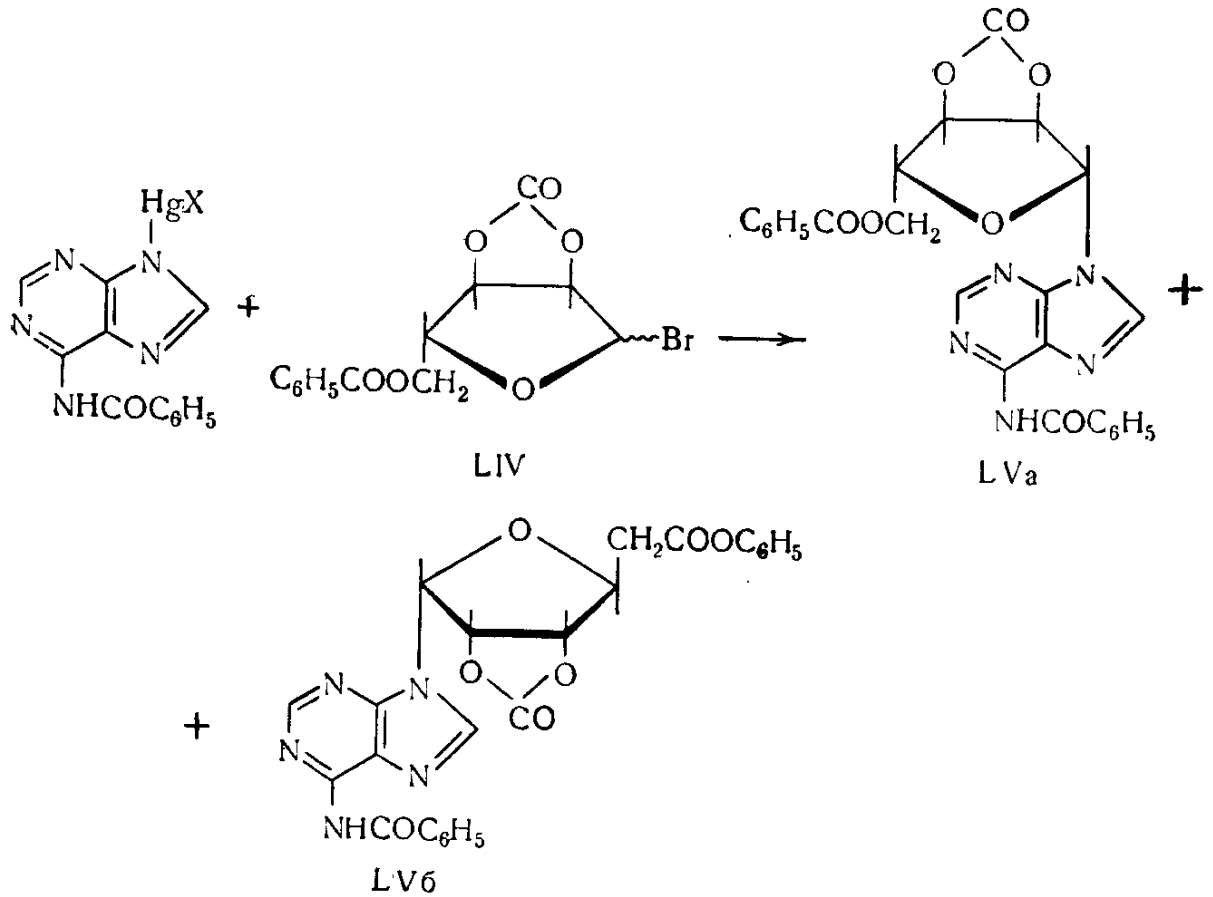


L LI LII LIII

R – гетероциклическое основание

Эта закономерность распространяется и на производные, содержащие остатки гексоз.

Однако указанные ограничения метода, видимо, можно хотя бы частично обойти варьированием защищающих групп в ацилгликозилгалогениде. Хотя этот вопрос почти не исследован, однако недавно было показано, что если вместо обычных ацетильных или бензоильных производных галоидсахара применять циклические карбонаты, то получается смесь обоих эпимерных N-гликозидов. Так, например, при конденсации (LIV) с ртутным производным $N_{(6)}$-бензоиладенина получается смесь α- и β-рибофуранозидов (LV а и б).



LIV LVa LVб

Несмотря на указанные ограничения, этот метод, называемый иногда методом ртутных солей, является наиболее удобным для синтеза пуриновых нуклеозидов. С его помощью были получены все природные рибонуклеозиды, а в настоящее время он очень широко используется для получения их многочисленных синтетических аналогов.

Синтез пиримидиновых нуклеозидов

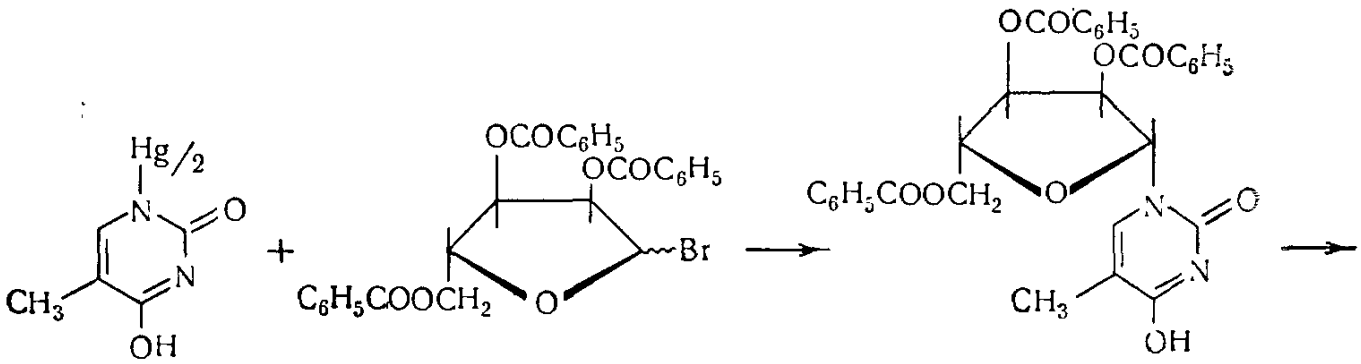
Возможности синтетического получения пиримидиновых нуклеозидов представляются на сегодня несколько более ограниченными. В настоящее время известны следующие методы: 1) конденсация металлических производных с ацилгликозилгалогенидами (метод ртутных солей); 2) метод Хильберта — Джонсона и 3) метод Шоу.

Два первых метода основаны на введении углеводного остатка в готовое пиримидиновое ядро; метод Шоу сводится к построению пиримидинового ядра из соединений, в которых уже содержится остаток моносахарида.

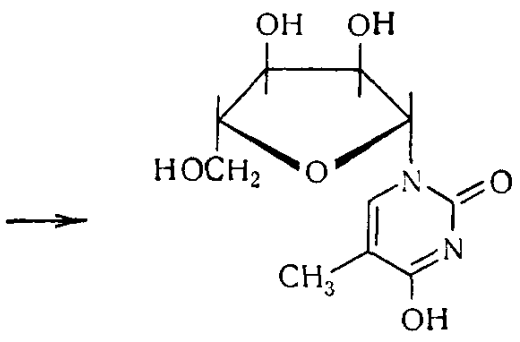
Метод ртутных солей, лишь недавно примененный Фоксом для синтеза нуклеотидов пиримидинового ряда, в данном случае страдает рядом слабостей, которые при дальнейшем его уточнении, по всей вероятности, могут быть устранены. Это связано главным образом с тем, что строение и даже состав ртутных производных пиримидинового ряда, в отличие от их аналогов в пуриновом ряду, не всегда ясны. В некоторых случаях гетероциклическое основание и ртуть находятся в соединениях и отношениях 2 : 1 и тогда это, очевидно, ртутноорганические производные типа R_2Hg, в других случаях это соединения с соотношением гетероциклическое основание: ртуть 1 : 1, что скорее всего говорит о строении RHgX, однако такое строение не согласуется со свойствами этих веществ.

Различие в составе и строении этих ртутных производных сказывается на результатах их реакции с ацилгликозилгалогенидами, и поэтому при синтезе нуклеозидов пиримидинового ряда этот метод не имеет еще общего значения.

Тем не менее он уже в своем настоящем виде очень удобен для получения некоторых пиримидиновых нуклеозидов. Примером может служить синтез природного тимидина.



LVI LVII

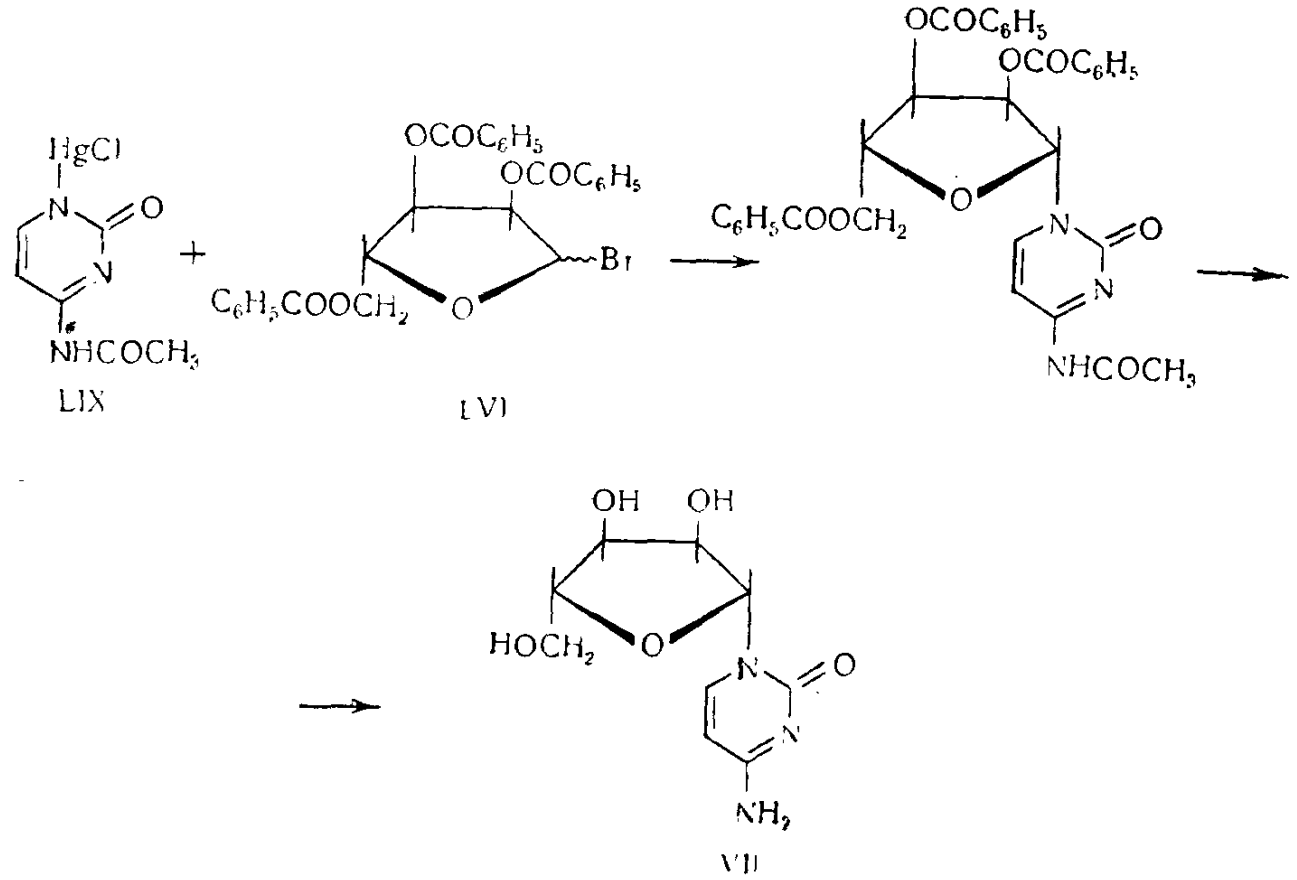


LVIII

Для этого ртутное производное тимина, построенное по типу R_2Hg, конденсируется с трибензоилрибофуранозилгалогенидом (LVI) и полученный продукт конденсации (LVII) после обработки спиртовым хлористым водородом дает тимидин (LVIII).

Аналогичным образом получены другие нуклеозиды тимина содержащие пиранозное или фуранозное кольцо.

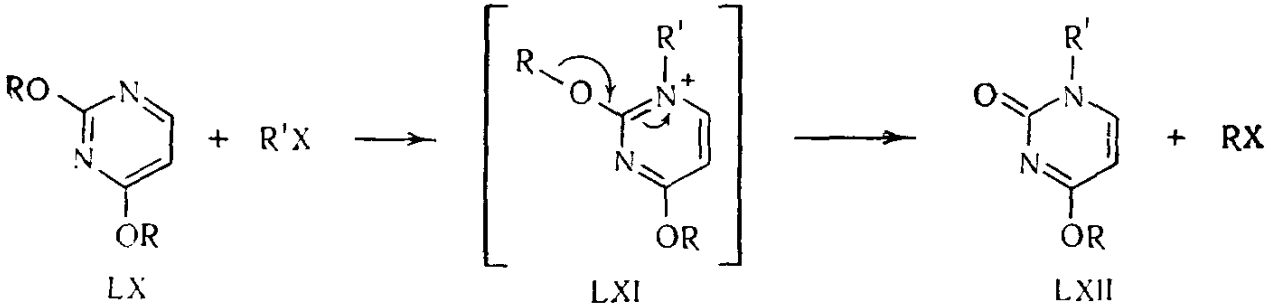
Хотя строение ртутного производного цитозина до сих пор остается еще недостаточно ясным (условно его можно принять за LIX), тем не менее его удалось использовать для синтеза природного цитидина (VII), который протекает по схеме:



LIX LVI VII

Что касается стереохимического направления реакции ртутно-органических производных с ацилгликозилгалогенидами, то здесь справедливы совершенно те же рассмотренные выше (стр. 204) закономерности, которые свойственны этой реакции и для случая пуриновых нуклеозидов.

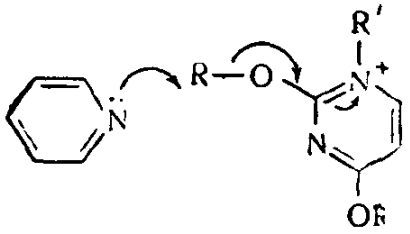
Наиболее старым методом синтеза пиримидиновых нуклеозидов является метод, предложенный Хильбертом и Джонсоном. Он основан на реакции 2,6-диалкоксипиримидина (LX) с галоидными алкилами, которая протекает по схеме:



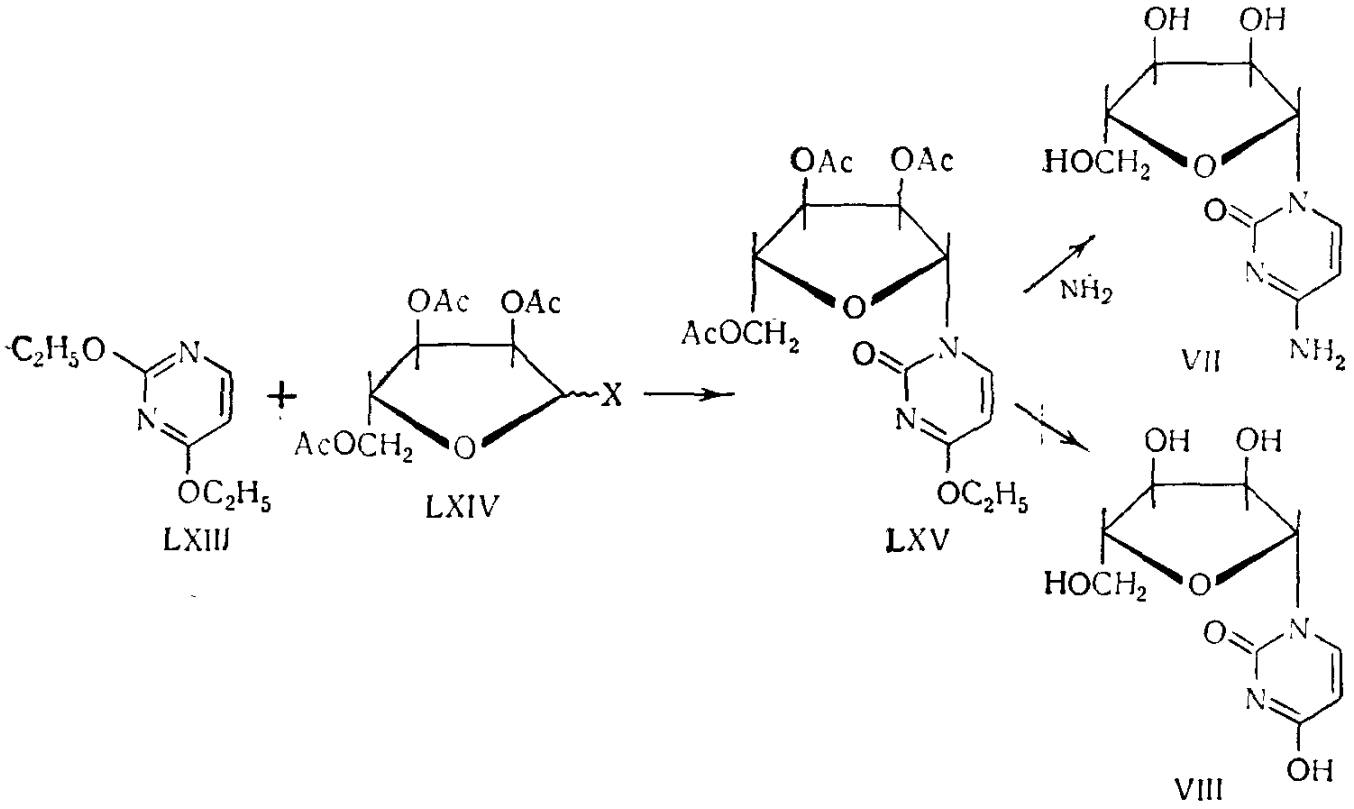
LX LXI LXII

По всей вероятности, в результате реакции вначале образуется промежуточная четвертичная соль (LXI), которая затем распадается с отщеплением нового галоидного алкила в соответствии со схемой и дает N-алкилпроизводное пиримидина (LXII). Такое течение реакции подтверждается тем, что она проходит легче в присутствии оснований, на-

пример пиридина; это можно объяснить участием электронной пары азота основания, облегчающим процесс элиминации галоидного алкила от (LXI), как это видно из схемы:



Эта реакция проводится обычно при нагревании диалкоксипиримидина (LX) с галоидным алкилом, лучше в вакууме. Если в качестве галоидного алкила в реакцию ввести ацилгликозилгалогенид, то можно получить нуклеозид. В качестве примера можно привести синтез природных уридина (VIII) и цитидина (VII), протекающий по схеме:



2,6-Диэтоксипиримидин (LXIII), который обычно употребляется в синтезах Хильберта — Джонсона, при нагревании с 2, 3, 5-триацилрибофуранозилгалогенидом (LXIV) образует ацилнуклеозид (LXV). Алкоксигруппа в этом соединении легко подвергается реакции обмена; при обработке (LXV) аммиаком получается цитидин (VII), при обработке разбавленной соляной кислотой — уридин (VIII).

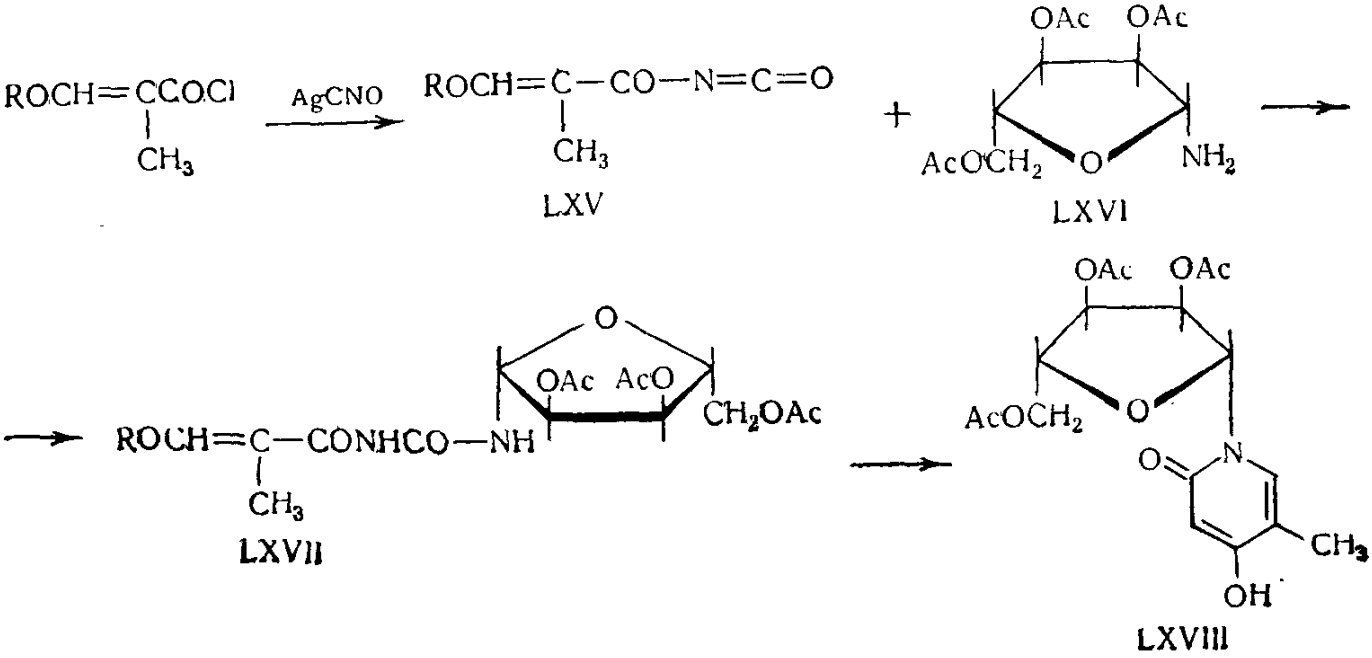
Поскольку полученные этим путем нуклеозиды оказались идентичными природным, ясно, что метод Хильберта — Джонсона дает нуклеозиды с β-конфигурацией гликозидного центра. Такой результат неудивителен, так как четвертичная соль из (LXIII) и ацилгликозилгалогенида образуется как результат нуклеофильного замещения у гликозидного центра. По существу механизм этой реакции аналогичен механизму конденсации Кенигса — Кнорра и, следовательно, должен подчиняться тем же закономерностям; отсюда ясно, что результат обоих реакций со стереохимической точки зрения должен быть одинаковым.

Первоначальный метод Хильберта — Джонсона давал довольно низкие выходы, не превышающие 20—40%. Недавно было предложено про-

водить эту реакцию в пиридине и употреблять хлориды ацилированных сахаров вместо бромидов. Это позволило поднять выходы в реакции до 50%. В отдельных случаях реакция приводит к образованию О-гликозида вместо нуклеозида или наряду с ним. Это легко обнаружить, так как О-гликозиды, в отличие от устойчивых N-гликозидов, легко расщепляются при гидролизе.

Этим же путем можно отделить нуклеозид от сопутствующего ему О-гликозида

Недавно Шоу, разработавший синтез пиримидиновых оснований (см. стр. 181), применил его для получения пиримидиновых нуклеозидов. Метод Шоу отличается от предыдущих тем, что в данном случае пиримидиновое ядро не берется готовым, а настраивается к имеющемуся моносахариду. Для иллюстрации можно привести синтез тимидина:

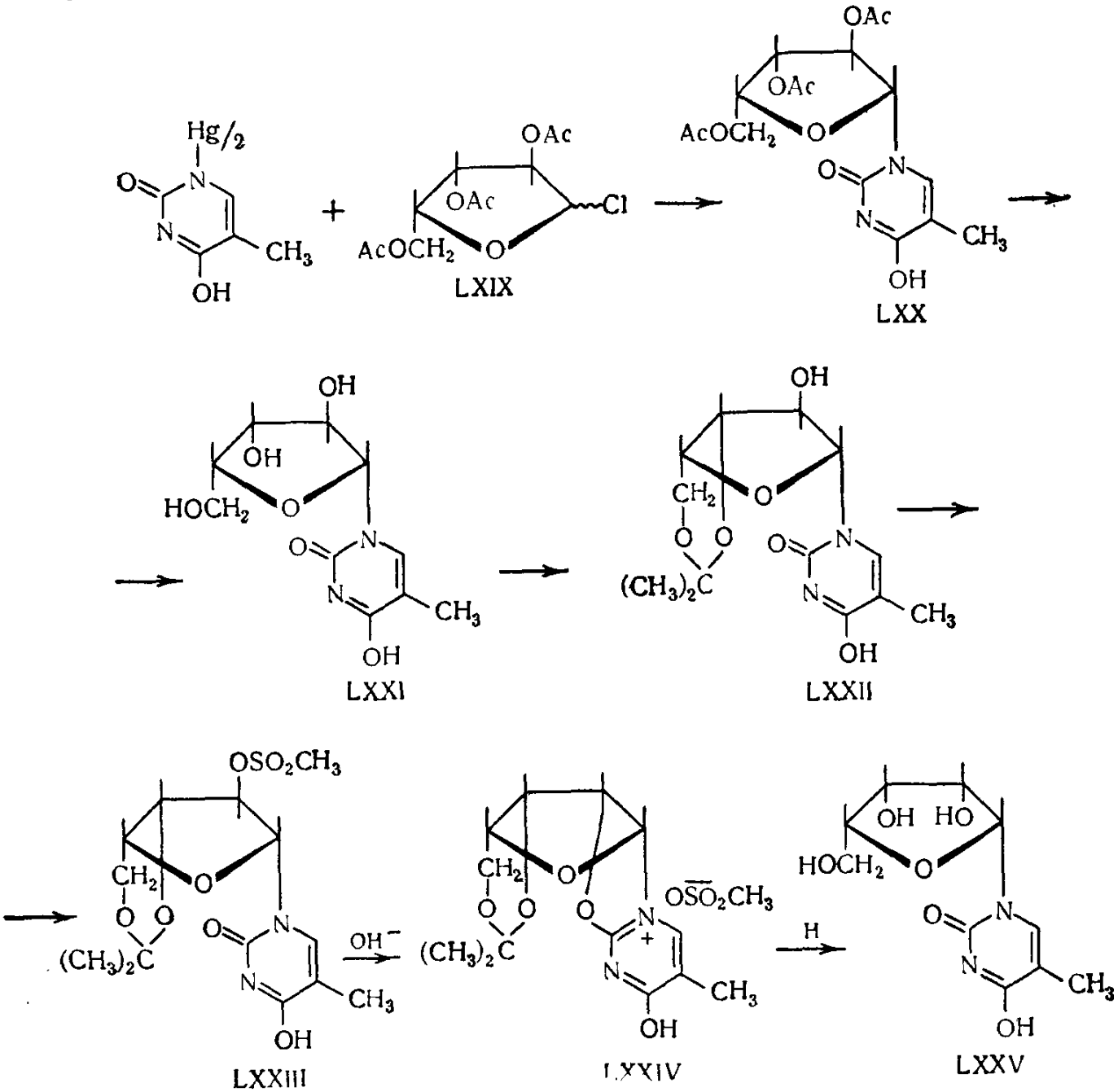


Если в синтезе пиримидиновых оснований по Шоу на ацилизоцианат (LXV) действовать в качестве амина ацилированным рибофуранозиламином (LXVI),то образуется сложный N-гликозид (LXVII), который затем может быть в обычных условиях замкнут в производное пиримидина, в данном случае производное тимина (LXVIII). Необходимые для синтеза гликозиламины (LXVI) могут быть получены восстановлением гликозилазидов, как это описано в разделе химии углеводов (стр. 132).

Этот новый синтез пиримидиновых нуклеозидов едва ли будет широко использоваться в препаративных целях, однако он представляет несомненный интерес для синтеза нуклеозидов, получение которых иным путем недоступно.

Все указанные методы синтеза пиримидиновых и пуриновых нуклеозидов ограничены в том смысле, что позволяют получать лишь такие производные, которые имеют транс-расположение у $C_{(1)}$—$C_{(2)}$в углеводном остатке. Это обстоятельство, связанное с особенностями замещения у гликозидного центра галоидпроизводных ацилированных моносахаридов, рассматривалось ранее. Отсюда становится ясным, что для каждого моносахарида можно получить только один из эпимерных нуклеозидов, а именно тот, который имеет транс-конфигурацию у $C_{(1)}$—$C_{(2)}$. Эту трудность можно обойти, если разработать метод эпимеризации у $C_{(2)}$ углеводного остатка в готовом нуклеозиде, которая проходила бы в мягких условиях. Недавно это удалось сделать лишь для пиримидиновых нуклеозидов, используя образование циклонуклеозидов с последующим раскрытием их цикла.

Для пояснения сказанного приведем синтез 3-N-β-ксилозида тимина, который идет обычным путем, и превращение его в ликсозид, получение которого иным путем невозможно.



3-N-β-ксилозид тимина (LXXI), полученный обычным путем из ртутноорганического производного тимина и 2,4,5-триацилксилофуранозилхлорида (LXIX) через промежуточный ацетилированный нуклеозид (LXX), подвергался взаимодействию с ацетоном, в результате чего был получен 3-N-β(3′,5′-изопропилиденксилофуранозил-)-тимин (LXXII). Единственная свободная гидроксильная группа нуклеозида (LXXII) мезилировалась действием метансульфохлорида в пиридине и полученное мезильное производное (LXXIII) при обработке щелочью давало циклонуклеозид (LXXIV); замыкание кольца проходило с обращением конфигурации у $C_{(2)}$ (в остатке ксилозы, как это всегда бывает при реакциях замещения тозилатов и мезилатов сахаров (см. стр. 75), поэтому полученный циклонуклеозид (LXXIV) относился уже не к ряду ксилозы, а к ряду ликсозы. При кислом гидролизе (LXXIV) кольцо разрывалось с сохранением конфигурации у $C_{(2)}$углеводного остатка и снималась изопропилиденовая защита, в результате чего образовывался 3-N-β-ликсофуранозид тимина (LXXV).

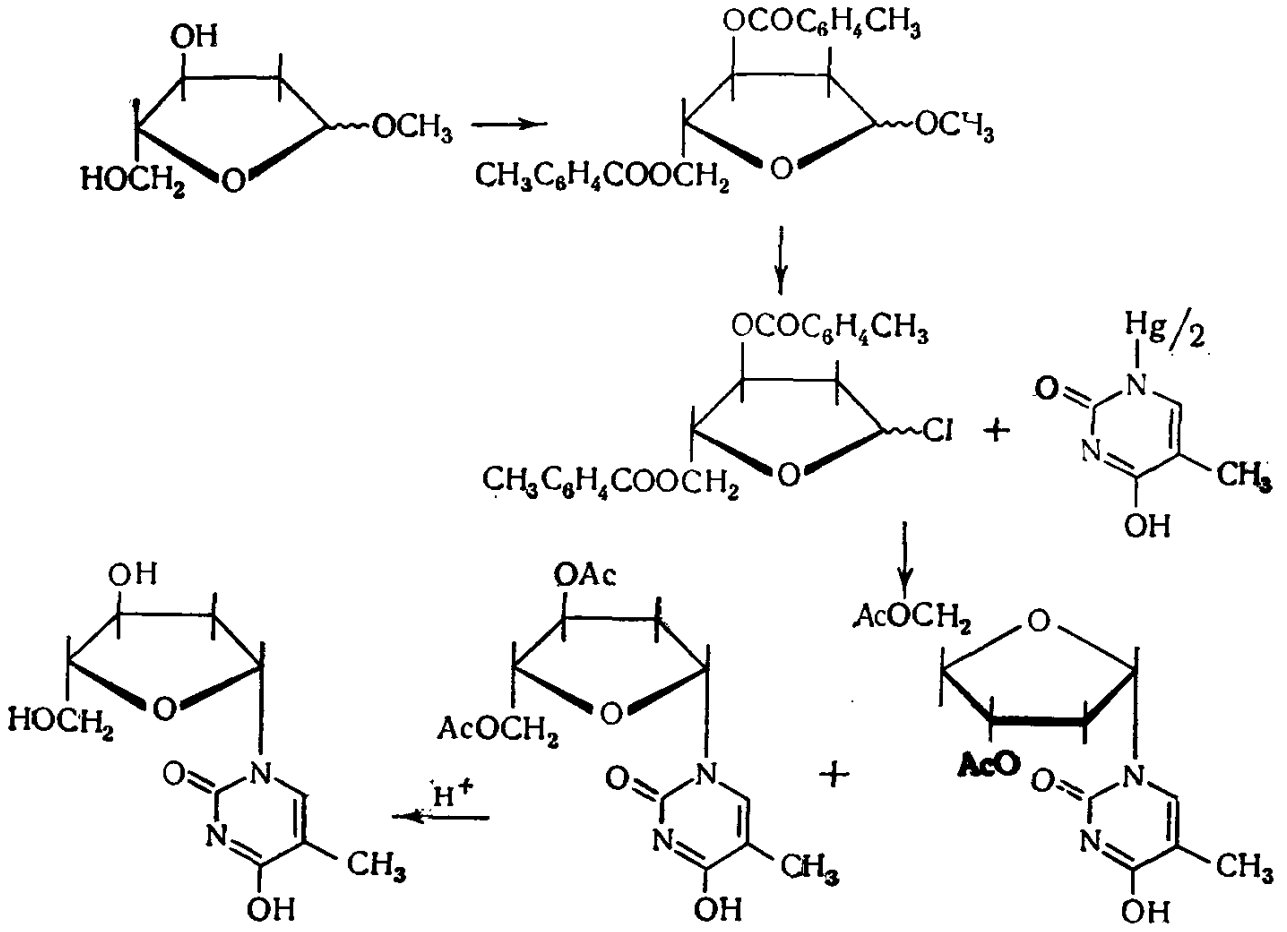
Совершенно аналогичным путем из соответствующего рибозида был получен арабинозид урацила.

Синтез дезоксирибозидов

Более трудную проблему представляет собою синтез дезоксирибозидов. Трудности связаны главным образом с особенностями химического поведения 2-дезоксисахаров. Как указывалось в разделе, посвященном химии углеводов, 2-дезоксисахара отличаются пониженной устойчивостью сравнительно с обычными моносахаридами; эта меньшая устойчивость особенно сильно сказывается на соответствующих ацилгликозилгалогенидах, которые до самого последнего времени вообще не были получены в чистом виде. Дополнительная трудность синтеза дезоксирибозидов связана с отсутствием функциональной группы у $C_{(2)}$ в дезоксисахаре. Это неизбежно должно привести при конденсации производных этих сахаров к образованию смеси аномерных N-гликозидов, так как направляющая стереохимический ход замещения ацетоксигруппа у $C_{(2)}$ в данном случае отсутствует.

Особенности химического поведения дезоксисахаров и относительно малая их доступность (дезоксирибоза до последних лет также была мало доступна) привели в тому, что синтез дезоксирибозидов удалось осуществить совсем недавно. Только в 1959 г. появились два кратких сообщения, которые послужат, вероятно, основой для создания общих методов синтеза дезоксирибозидов.

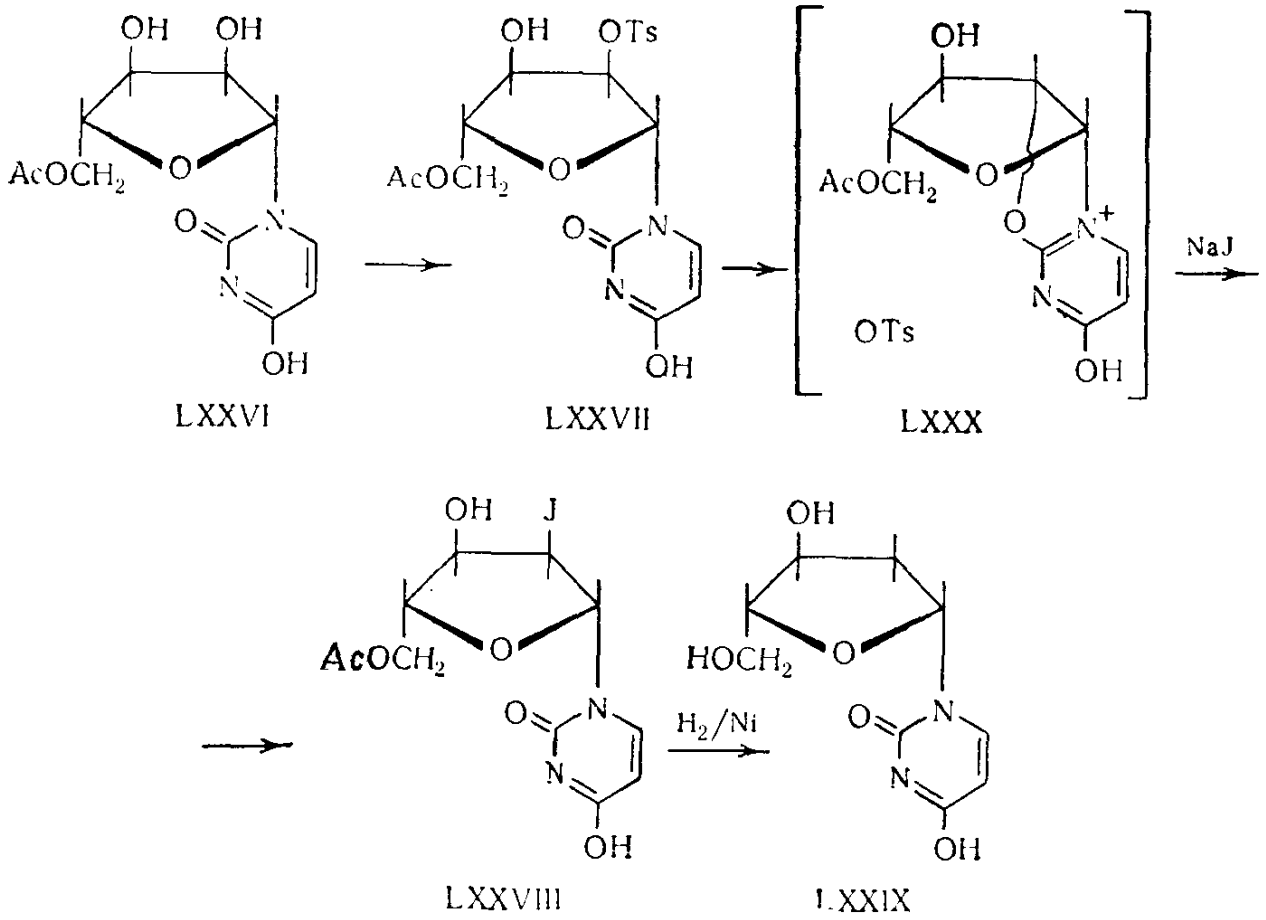
Один из них является перенесением метода ртутных солей, описанного выше (стр. 204), на синтез дезоксипроизводных. Как отмечалось, главная трудность, которую нужно было преодолеть, состояла в получении достаточно устойчивых ацилгликозилгалогенидов, пригодных для конденсации с ртутными производными гетероциклических оснований. Однако оказалось, что такими производными являются 3,5-ди-*n*-толуил-2-дезоксирибофуранозилхлорид и 3,5-ди-*n*- хлорбензоилрибофуранозилхлорид. Эти соединения гладко вступают в конденсацию с ртутноорганическими производными и образуется смесь α- и β-эпимерных нуклеозидов, которые удалось разделить. В качестве примера можно привести осуществленный этим путем синтез природного тимидина:



Следует ожидать, что этот путь окажется достаточно общим, хотя пока он описан только для пиримидиновых нуклеозидов.

Принципиально иным подходом к синтезу природных дезоксирибозидов является получение их из рибозидов посредством удаления в последних гидроксильной группы, находящейся в положении 2 рибозного остатка:

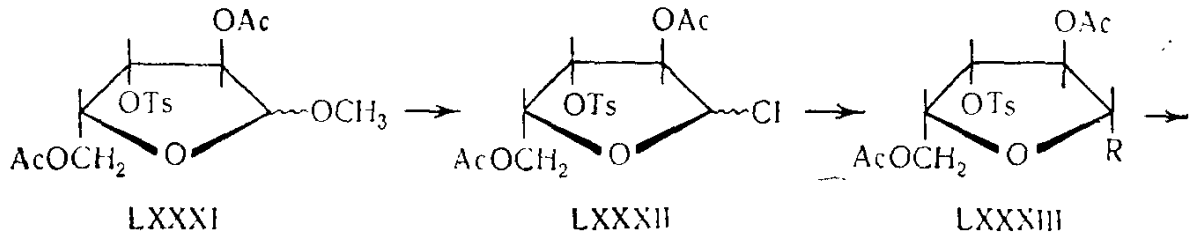
Первым примером такого синтеза был синтез дезоксиуридина и тимидина, осуществленный в 1957 г. Тоддом и явившийся первой удачной попыткой синтеза природного дезоксинуклеозида. Он может быть представлен схемой



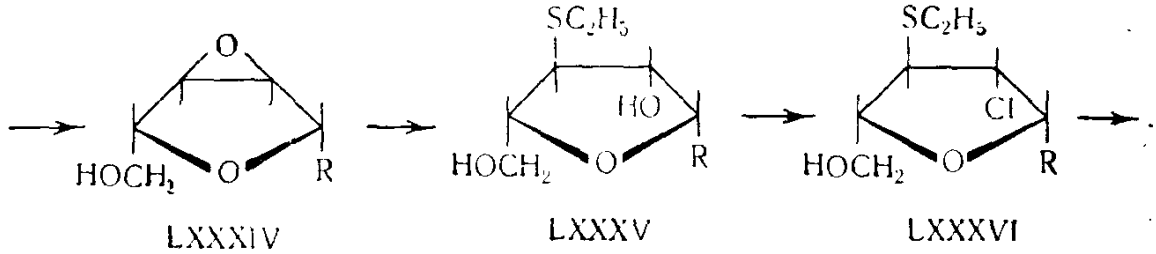
5-Ацетилуридин (LXXVI тозилируют действием п-толуолсульфохлорида в пиридине: из полученной смеси изомерных тозилатов выделяют 2′-тозил-5′-ацетилуридин (LXXVII), который при нагревании с иодистым натрием в ацетилацетоне дает 2′-дезокси-2′иод-5′-ацетилуридин (LXXVIII); последний при гидрировании над скелетным никелем и гидролизе дает 2′-дезоксиуридин (LXXIX). К сожалению, этот простой метод не является общим. Наиболее интересную его стадию представляет реакция вторичного тозилата с обменом тозильной группы на атом галоида, которая не имеет аналогий, так как тозилаты вторичных спиртов в подобную реакцию обычно не вступают (см. стр. 74—75). Более детальное исследование показало, что в действительности эта замена идет через стадию циклонуклеозида (LXXX), образующегося при нуклеофильной атаке тозильной группы J^--ионом, с последующим раскрытием кольца в (LXXX). Поэтому указанный переход от рибозидов к дезоксирибозидам осуществим только в том случае, когда в ходе реакции может замкнуться циклонуклеозид, т. е. когда в гетероциклическом ядре имеется кислородная функция в ортоположении к атому азота, связанному с углеводной частью. Таким образом, этот метод не может быть использован для синтеза пуриновых дезоксирибозидов. Тем же недостатком страдает близкий по схеме, но менее удобный синтез, осуще-

ствленный Шоу, где для получения циклического тионуклеозида используется синтетически полученный тиоаналог тимидина.

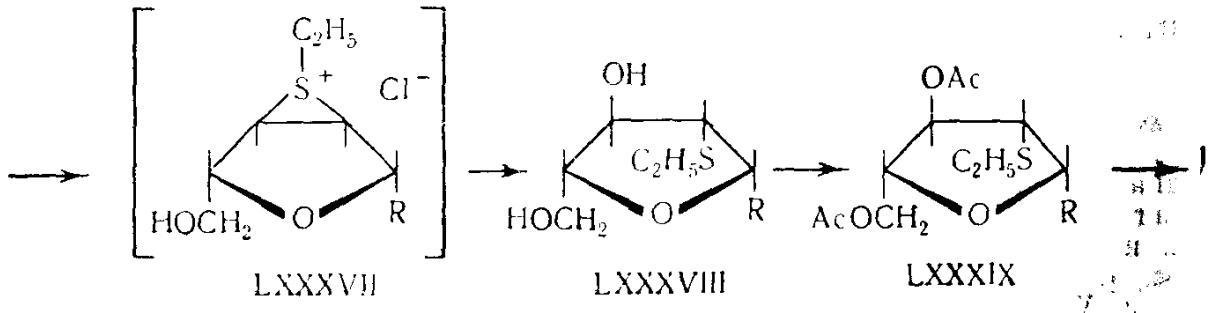
Более общим методом перехода от производных рибозидов к дезоксирибозидам, пригодным, по-видимому, для синтеза многих дезоксирибозидов, является метод, разработанный в 1959 г. Бэкером, осуществившим таким путем пока только синтез 2′-дезоксиаденозина по схеме



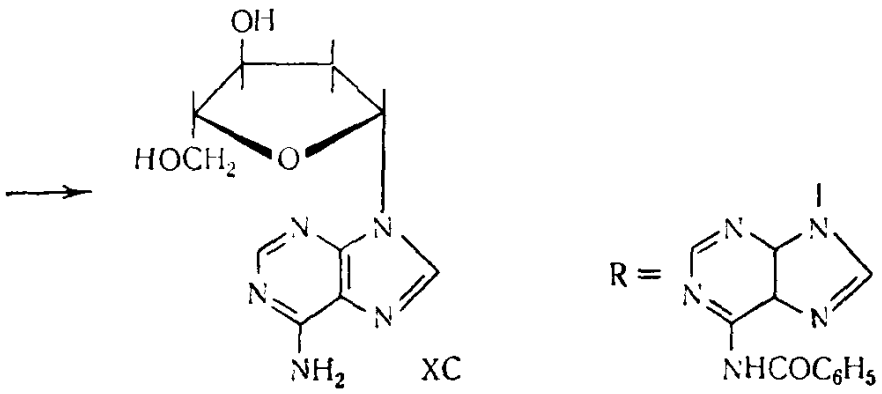
LXXXI LXXXII LXXXIII



LXXXIV LXXXV LXXXVI



LXXXVII LXXXVIII LXXXIX



XC

Взаимодействием ртутного производного бензоиладенина с 2,5-диацил-3-тозилксилофуранозилхлоридом (LXXXII), полученным из ксилозида (LXXXI), образуется избирательно замещенный нуклеозид (LXXXIII), относящийся к производным ксилозы. При обработке (LXXXIII) спиртовым раствором алкоголята по реакции, хорошо известной для моносахаридов (стр. 75), происходит отщепление соседней с тозильной группой сложноэфирной группировки, замыкание α-окисного кольца и образуется ангидронуклеозид (LXXXIV). При взаимодействии последнего с этилмеркаптаном происходит размыкание окисного кольца, которое идет исключительно в сторону образования 3′-этилмеркаптопроизводного (LXXXV). Это соединение непригодно для непосредственного перевода

в природные дезоксирибонуклеозиды, так как последние являются, как указывалось, 2′-дезоксипроизводными. Для превращения (LXXXV) в нужный изомер, имеющий алкилмеркаптогруппу у $C_{(2)}$ рибозного остатка, (LXXXV) обрабатывают хлористым тионилом; полученный хлорид (LXXXVI) при обработке ацетатом натрия, вероятно, через промежуточную стадию образования эписульфиновой соли (LXXXVII), дает 2′-этилмеркаптопроизводное (LXXXVIII); при этом особенно существенно, что в процессе всех переходов у $C_{(3)}$ сохраняется нужная конфигурация, соответствующая дезоксирибозе. Последней стадией синтеза является гидрогенолиз меркаптогруппы. Для этого (LXXXVIII) сначала переводится в ацетильное производное (LXXXIX), которое после гидрогенолиза над скелетным никелем и гидролиза приводит к получению природного дезоксиаденозина (XC). Промежуточное 3′-этилмеркаптопроизводное (LXXXV) может быть использовано для синтеза 3′-дезоксинуклеозидов. Как видно, приведенный синтез дезоксинуклеозида по своей схеме очень близок синтезу дезоксисахаров по Рейхштейну (стр. 118). Однако, в отличие от последнего метода, в данном случае раскрытие α-окисного кольца проходит однозначно.

Описанный синтез в своем настоящем виде слишком громоздок для препаративного использования; однако он является первым синтезом дезоксирибонуклеозидов из рибонуклеозидов, который не связан с участием в превращениях гетероциклического ядра. Все приведенные методы синтеза дезоксинуклеозидов развиты лишь в самое последнее время и объективная их оценка, особенно с препаративной стороны, еще невозможна.

ЛИТЕРАТУРА

З. А. Шабарова, Усп. химии, 1959, 28, № 4, 369.
E. Chargaff, J. Davidson. Nucleic acids, I. New York, 1955, pp. 137—188.
J. Fox и др. Simple synthesis of pyrimidine 2'-deoxyribonucleosides. J. Amer. Chem. Soc., 1959, 81, 4112.
J. Fox, J. Wempen. Pyrimidine nucleosides. Av. carbohydrate chemistry, 1959, 14, 283.
G. Kenner. Fortschritte Chemie org. Naturstoffe, 1951, 8, 96.
A. Todd и др. Synthesis of 2′-deoxyuridine and thymidine. J. Chem. Soc., 1958, 3035.

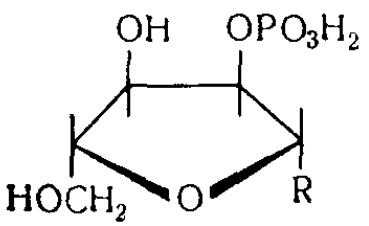
Глава 3

МОНОНУКЛЕОТИДЫ

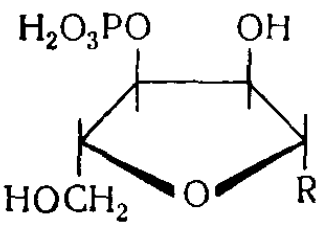
Мононуклеотидами называют монофосфорные эфиры нуклеозидов; они являются теми мономерными единицами, из которых непосредственно состоит полимерная цепь нуклеиновых кислот. Мононуклеотиды входят также в качестве непременной структурной единицы во все нуклеотидные коферменты.

Главным источником получения природных нуклеотидов являются нуклеиновые кислоты, при гидролизе которых образуются все важнейшие природные мононуклеотиды.

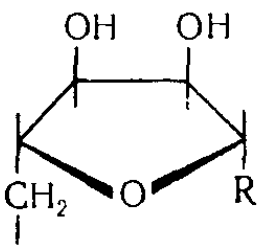
Поскольку при гидролизе мононуклеотидов кислотами можно выделить гетероциклическое основание и фосфат моносахарида, ясно, что в нуклеотиде остаток фосфорной кислоты связан с углеводной частью молекулы. Таким образом, для природных рибонуклеотидов возможно существование трех изомеров: 2′-фосфата (I), 3′-фосфата (II) и 5′-фосфата (III).



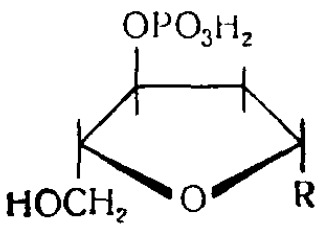
I



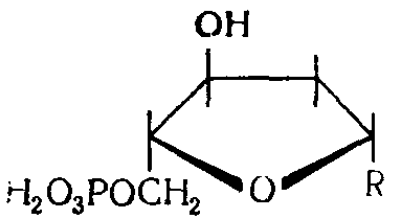
II



III



IV



V

R – гетероциклическое основание

Для природных дезоксирибонуклеотидов возможно существование двух изомеров — 3′-фосфата (IV) и 5′-фосфата (V).

Все перечисленные изомеры мононуклеотидов хорошо известны. Смесь 2′- и 3′-фосфатов образуется при гидролизе рибонуклеиновых кислот; наилучшим с препаративной точки зрения является щелочной гидролиз. Как будет подробно рассмотрено ниже, образование смеси 2′- и 3′-фосфатов является следствием механизма гидролиза нуклеиновых кислот, и поэтому принципиально невозможно направить этот процесс таким образом, чтобы получить только 2′- или только 3′-замещенные изомеры. Эти изомеры с чрезвычайной легкостью переходят один в другой, и их разделение стало возможным лишь в последнее время в связи с развитием техники ионообменной хроматографии.

Для выделения смеси 2′- и 3′- замещенных изомеров пиримидинового ряда часто используют кислотный гидролиз.

При ферментативном гидролизе РНК, происходящем под действием избирательных ферментов, рибонуклеаз образуются как 3′-, так и 5′-фосфаты. Последние получаются также при гидролизе нуклеиновых коферментов (см. стр. 232).

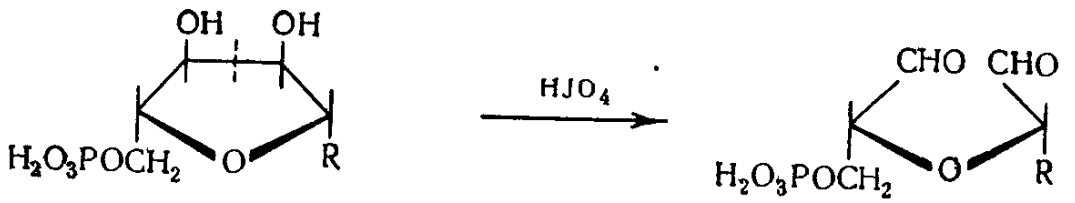
Дезоксинуклеотиды (IV и V) с очень малым выходом могут быть получены при гидролизе ДНК, причем при химическом гидролизе образуются 5′-замещенные фосфаты и 3′-, 5′-дифосфаты, а при ферментативном гидролизе могут быть получены любые монофосфаты. Для получения пиримидиновых дезоксинуклеотидов можно пользоваться и ферментативным, и химическим гидролизом, для получения производных пуринового ряда обычно только ферментативным.

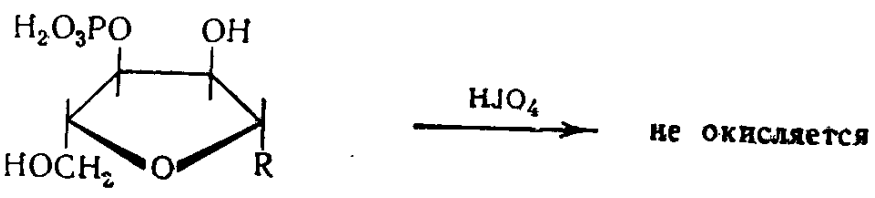
Выделение индивидуальных нуклеотидов из гидролизатов нуклеиновых кислот до недавнего прошлого представляло очень сложную задачу и требовало длительной кропотливой работы. Однако в настоящее время этот вопрос относительно просто решается применением хроматографии на ионообменных смолах, которая позволяет получать чистые индивидуальные нуклеотиды.

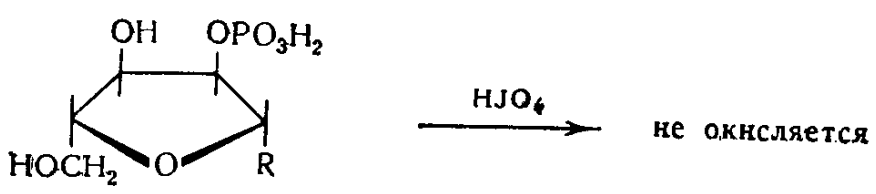
СТРОЕНИЕ НУКЛЕОТИДОВ

Если считать, что строение нуклеозидов уже установлено, то для выяснения строения нуклеотидов необходимо решить лишь один вопрос — местонахождение остатка фосфорной кислоты в молекуле. Действительно, при выяснении строения любого нуклеотида прежде всего можно путем гидролиза перейти к соответствующему нуклеозиду и тем самым решить вопрос о структуре основной части молекулы или, в том случае, если налицо какой-либо новый нуклеозид, устанавливать далее его строение методами, разобранными в предыдущей главе. Что касается установления места остатка фосфорной кислоты, то это может быть выполнено с применением чисто химических или ферментативных методов.

Химические методы. Простейшим приемом, позволяющим различать 5′-фосфаты, с одной стороны, от 2′- и 3′-фосфатов, с другой, является окисление иодной кислотой. В самом деле, совершенно ясно, что только в молекуле 5′-фосфатов содержится α-гликольная группировка, способная к окислению, тогда как 2′- или 3′-фосфаты такой группировки не имеют и поэтому инертны к действию иодной кислоты.







Однако в настоящее время однозначность этого метода подвергается сомнению. Кроме этого, наличие или отсутствие α-гликольной группировки в молекуле может быть определено по способности к образованию комплексов с борной кислотой, что также используется иногда при установлении строения.

Другой метод, который применялся, в частности, Левиным при установлении строения нуклеотидов, состоит в сопоставлении результатов, получаемых при окислении и восстановлении фосфорилированных сахаров, выделенных в результате кислого гидролиза нуклеотидов.

Если нуклеотид подвергнуть кислому гидролизу, то отщепляется гетероциклическое основание и удается выделить фосфорилированный моносахарид. При осуществлении кислого гидролиза миграция остатка фосфорной кислоты из положения 5′ в положении 2′ или 3′ не происходит, однако 2′-фосфаты и 3′-фосфаты в этих условиях превращаются один в другой. Поэтому, для того чтобы полученный при установлении строения выделенного фосфата рибозы результат мог быть полезным при суждении о строении исходного нуклеотида, необходимо исключить возможность миграции фосфатного радикала между 2′- и 3′-положениями.

В настоящее время доказано, что при гидролизе нуклеотидов на сульфосмолах такой миграции не происходит, и полученный при этом фосфат рибозы соответствует по строению исходному нуклеотиду. Таким образом, проводя гидролиз нуклеотидов в подходящих условиях и исследуя строение получающегося фосфата рибозы, мы можем достаточно строго установить положение фосфатного остатка в молекуле.

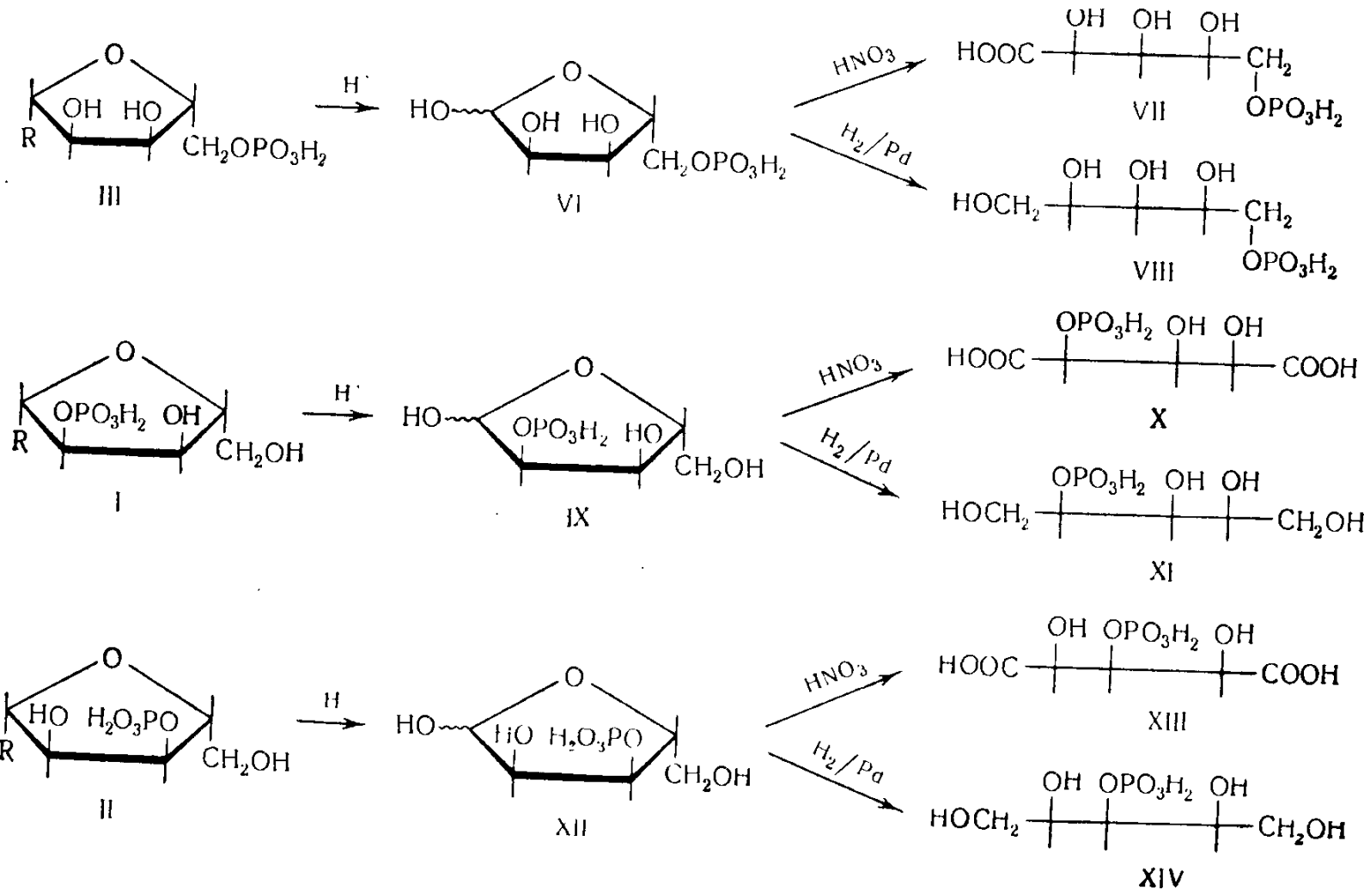
Окисление азотной кислотой и каталитическое восстановление полученных при гидролизе фосфатов рибозы приводят к различному результату для 2′, 3′ и 5′-фосфатов нуклеозидов, как это ясно из схемы (см. стр. 218).

Окисление азотной кислотой получаемого при гидролизе 5′-фосфата нуклеозида (III) фосфата рибозы (VI) приведет, очевидно, к 5′-фосфату одноосновной рибоновой кислоты (VII), тогда как при окислении продуктов гидролиза 2′ или 3′-фосфатов нуклеозидов — 2′ и 3′-фосфатов рибозы (IX) или (XII) получаются фосфаты двухосновной рибосахарной кислоты (X) или (XIII).

Таким образом, результат окисления легко позволит отличить 5′-фосфаты от 2′- и 3′-фосфатов.

С другой стороны, результат каталитического гидрирования для всех трех продуктов гидролиза — (VI), (IX) и (XII) также будет различен, так как получаются изомерные монофосфаты рибита. Соединение (VI) дает в этом случае 1-фосфат (VIII), являющийся фосфатом первичного спирта, а (IX) и (XII) дают фосфаты вторичных спиртов (XI) и (XIV). Наконец, (XI) и (XIV) также легко различить между собою, так как только первый из них — является оптически активным, второй же не активен благодаря внутренней компенсации, что позволяет отличить (IX) от (XII) и в конечном счете 2′-фосфаты нуклеозидов (I) от 3′-фосфатов (II). Легко видеть, что по этому же принципу может быть установлено и строение дезоксинуклеотидов, однако фактически это не делается, так как для этой цели используются только ферментативные методы.

Все приведенные здесь чисто химические методы установления положения фосфатного остатка представляют, главным образом, исторический интерес, так как они использовались лишь в первый период работ с нуклеотидами; в настоящее время им предпочитают значительно более простые ферментативные методы.


O
OH HO
R
CH2OPO3H2
III
H
HO
OH HO
CH2OPO3H2
VI
HNO3
H2/Pd
HOOC
OH OH OH
CH2
OPO3H2
VII
HOCH2
OH OH OH
CH2
OPO3H2
VIII
OPO3H2 OH
CH2OH
I
IX
OPO3H2 HO
X
XI
HO H2O3PO
II
XII
HiO H2O3PO
OH OPO3H2 OH
COOH
XIII
XIV

Ферментативные методы. В настоящее время известны ферменты, для которых достаточно четко различается скорость гидролиза 2′- или 3′-фосфатов от скорости гидролиза 5′-фосфатов. Успехи современной энзимологии позволяют подобрать высокоспецифические рибонуклеазы, избирательно расщепляющие либо только 5′-фосфаты, либо 2′- и 3′-фосфаты. Наиболее часто в аналитических целях используется высокоспецифическая 5′-нуклеотидаза змеиного яда, расщепляющая только 5′-фосфатную связь. Применение этого фермента позволяет чрезвычайно просто решить вопрос о месте фосфорного остатка: если нуклеотид расщепляется нуклеотидазой змеиного яда, то он может быть только 5′-фосфатом; если, напротив, он остается неизменным в этих условиях, то он является 2′- или 3′-фосфатом. Ферментативными методами возможно также определить различие между 2′- и 3′-фосфатной связью.

Для установления строения дезоксинуклеотидов в настоящее время также применяются исключительно ферментативные методы, построенные на строго избирательном действии специфических ферментов.

СИНТЕЗ НУКЛЕОТИДОВ

Синтез нуклеотидов связан с решением двух проблем — подбора подходящего метода фосфорилирования, т. е. метода, позволяющего вводить остаток фосфорной кислоты в молекулу, и разработкой метода избирательной защиты отдельных гидроксильных групп в молекуле нуклеозида. Последнее связано с тем, что различие в реакционной способности отдельных гидроксильных групп рибозного остатка в нуклеозиде недостаточно для того, чтобы осуществить избирательное фосфорилирование. Хотя первичная спиртовая группа, находящаяся у $C_{(5)}$, отличается более высокой реакционной способностью, однако отличие ее от гидроксилов, стоящих у $C_{(2)}$ и $C_{(3)}$, недостаточно. Что касается этих двух последних гидроксилов, то они практически совершенно одинаковы по своей реакционной способности.

Методы фосфорилирования. Для введения остатка фосфорной кислоты в молекулу нуклеозида в принципе могут применяться те же методы, которые используются для фосфорилирования сахаров и были рассмотрены в соответствующем разделе этой книги (стр. 77). Однако вследствие большой сложности и особенно лабильности молекулы нуклеозида удовлетворительные результаты могут быть получены только если синтез проходит в достаточно мягких условиях.

В связи с этим фосфорилирование нуклеозидов хлорокисью фосфора, примененное Левиным, проводится очень редко и лишь в тех случаях, когда нельзя по каким-либо причинам пользоваться другими методами.

В связи с поисками путей синтеза нуклеотидов Тоддом были разработаны более мягкие методы фосфорилирования.

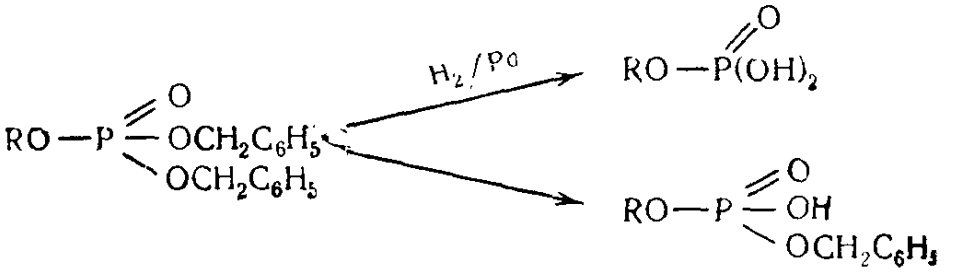
Из них нужно отметить, прежде всего, фосфорилирование дибензилхлорфосфатом (XV), который получается при хлорировании дибензилфосфита (XVI) хлористым сульфурилом или хлором в присутствии карбоната свинца при пониженной температуре.

$$(C_6H_5CH_2O)_2P{-}OH \underset{XVI}{\rightleftarrows} (C_6H_5CH_2O)_2P\begin{matrix}\diagup O\\ \diagdown H\end{matrix} \rightarrow \underset{XV}{(C_6H_5CH_2O)_2P}\begin{matrix}\diagup O\\ \diagdown Cl\end{matrix}$$

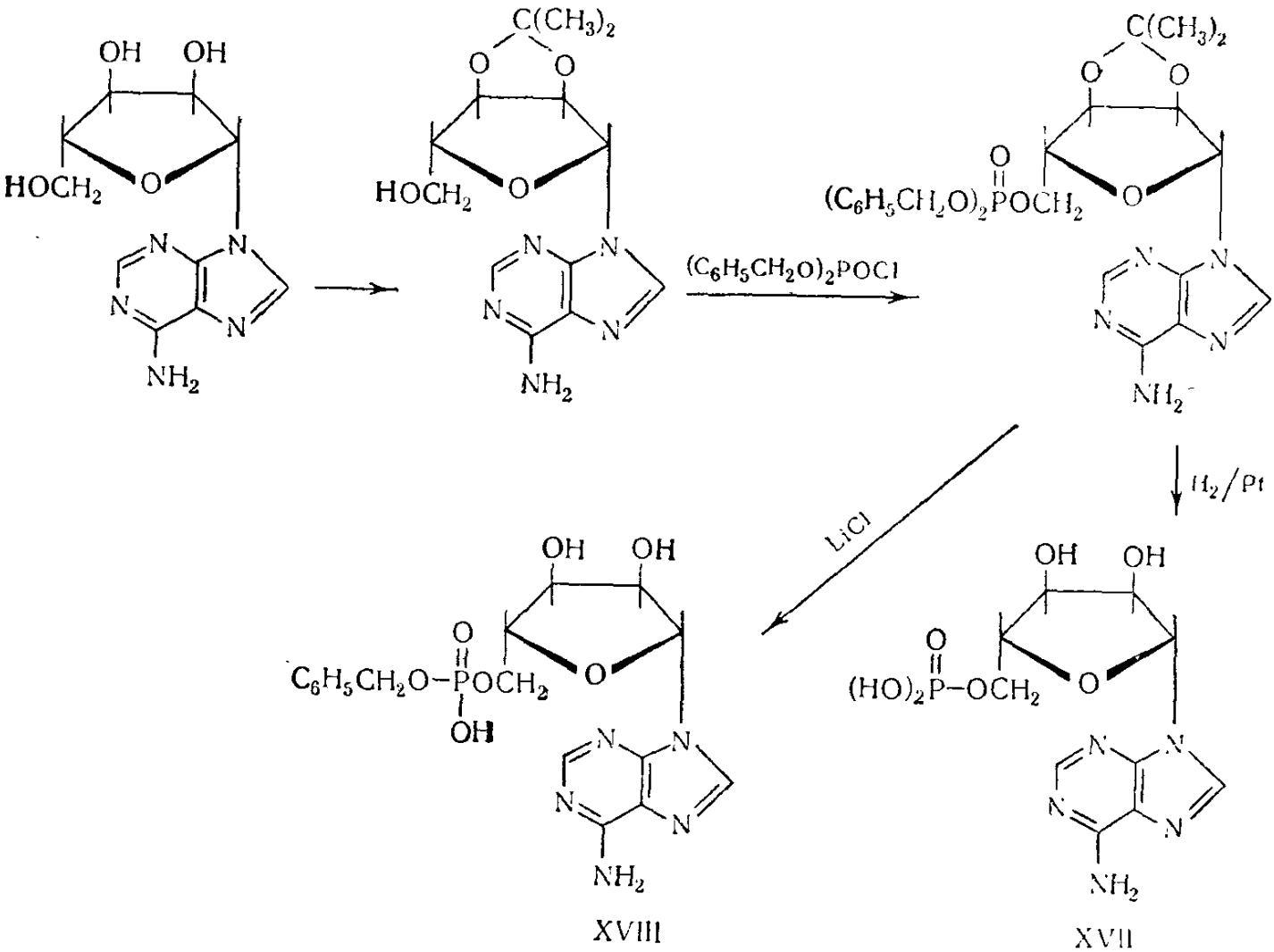
Дибензилхлорфосфат устойчив только при пониженной температуре, что сильно затрудняет его использование. Фосфорилирование им прово-

дят в присутствии какого-либо вещества, связывающего выделяющийся хлористый водород, обычно в присутствии органического основания.

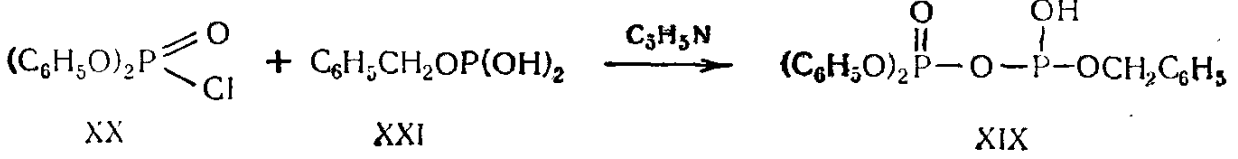
Полученный дибензиловый эфир нуклеотида может быть далее либо полностью дебензилирован каталитическим гидрированием, либо превращен в монобензиловый эфир частичным дебензилированием. Эта важная для синтетической химии нуклеотидов операция осуществляется лучше всего нагреванием с хлористым литием или хлоргидратом амина или, по последним данным, каталитическим гидрированием в присутствии органического основания.



В качестве примера использования этого метода фосфорилирования можно привести синтез 5′-фосфата аденозина (XVII) и его монобензилового эфира (XVIII), который ясен из схемы

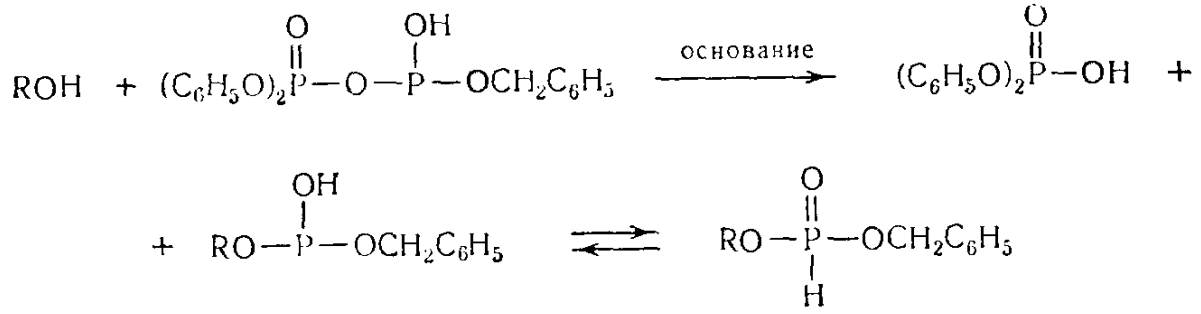


Еще большее значение в синтетической химии нуклеотидов сыграл более мягкий метод фосфорилирования, специально разработанный для синтеза нуклеотидов и используемый только в этой области. Фосфорилирующим агентом служит смешанный ангидрид дифенилфосфорной и монобензилфосфористой кислот (XIX), получающийся взаимодействием дифенилхлорфосфата (XX) с бензилфосфористой кислотой (XXI) в присутствии основания.

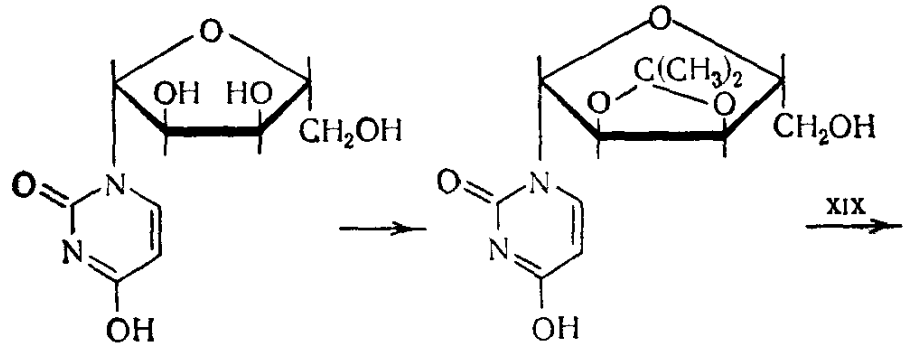


XX XXI XIX

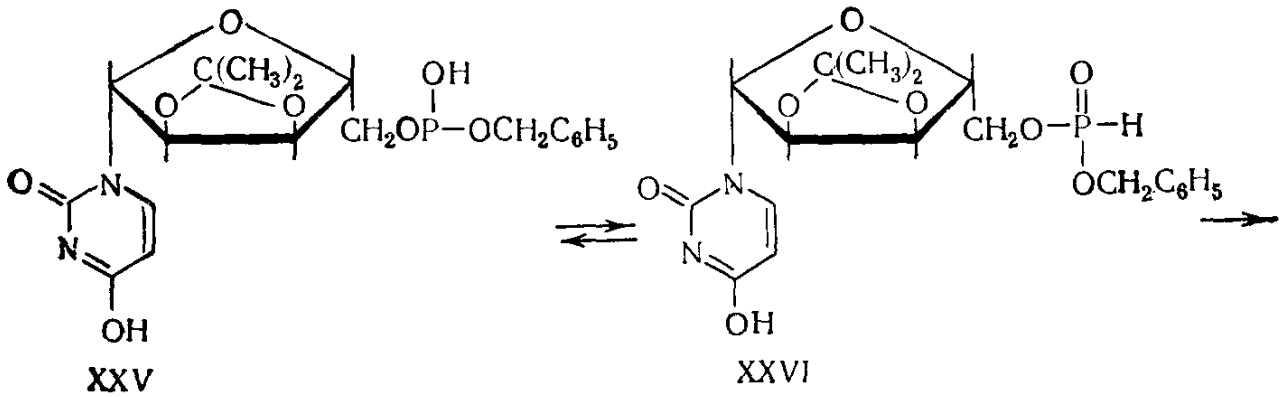
Соединение (XIX) при взаимодействии со спиртом в присутствии основания распадается как все смешанные ангидриды таким образом, что образуется сложный эфир спирта и более слабой кислоты, входящей в смешанный ангидрид, с освобождением более сильной кислоты. Так как дифенилфосфорная кислота является более сильной, то это приводит к образованию эфира монобензилфосфита (XXII).



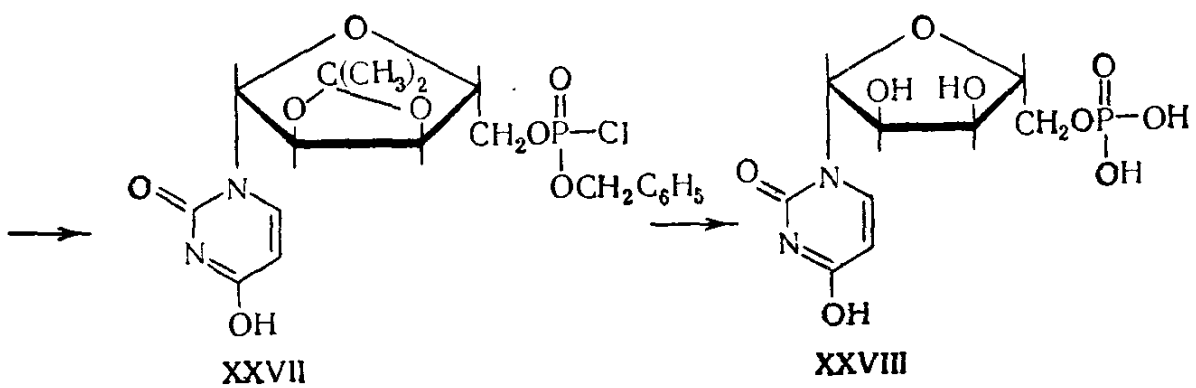
Получаемые таким образом монобензилфосфиты нуклеозидов могут быть переведены далее в производные фосфорной кислоты, т. е. в нуклеотиды. Серьезным преимуществом этого метода фосфорилирования является то, что он проходит в очень мягких условиях и может поэтому



XXIII XXIV



XXV XXVI



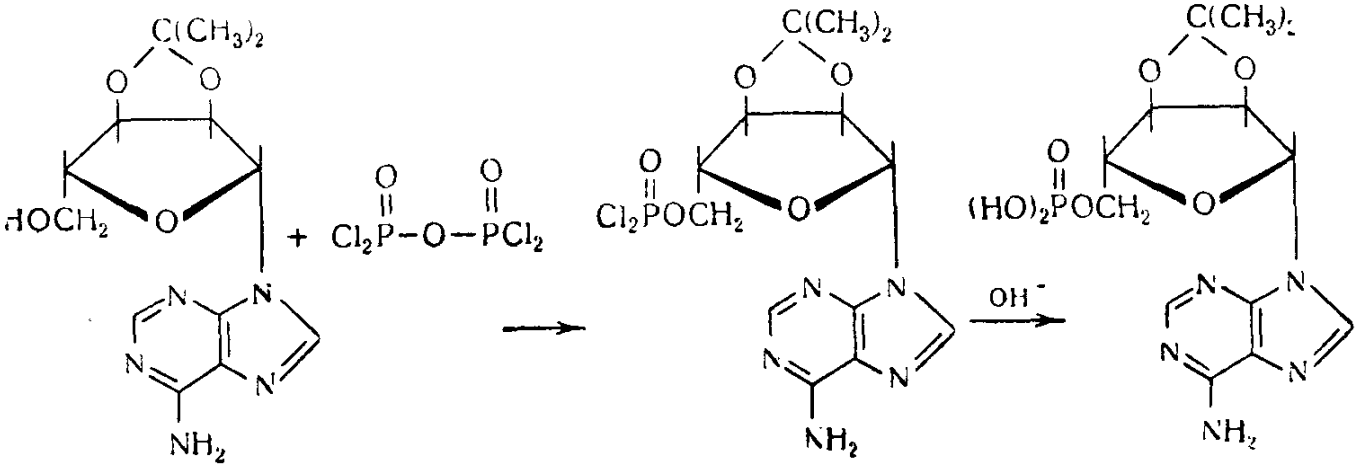
XXVII XXVIII

применяться в наиболее тонких случаях. Из многочисленных примеров использования этого метода можно привести синтез производных уридин-5′-фосфата (см. стр. 221).

Уридин (XXIII) взаимодействием с ацетоном переводится в изопропилиденовое производное (XXIV), которое подвергается фосфорилированию смешанным ангидридом (XIX). Полученный монобензиловый эфир уридин-5′-фосфита (XXV) в виде своей таутомерной формы (XXVI) подвергается действию хлорсукцинимида; в результате этой реакции образуется хлорангидрид монобензилового эфира уридин-5′-фосфата (XXVII), являющийся уже производным нуклеотида, который можно последующим гидролизом и гидрогенолизом перевести в природный нуклеотид — уридин-5′-фосфат (XXVIII). Особенно существенно, что этим путем можно получить хлорангидриды полностью защищенных нуклеотидов, таких, как (XXVII), которые очень широко используются в синтетической химии нуклеотидов. Наконец, таким образом могут быть получены и фосфористые эфиры нуклеозидов, не найденные в природе.

Разнообразные возможности использования первоначальных продуктов фосфорилирования (типа XXVI) придают особую ценность этому методу.

Совсем недавно появилось сообщение о применении для синтеза нуклеотидов нового фосфорилирующего агента — хлорангидрида пирофосфорной кислоты, что позволяет получить нуклеотиды, например, аденина с высоким выходом.



Однако о перспективах этого метода еще трудно сказать что-либо определенное.

Избирательная защита гидроксильных групп в нуклеозидах. Вопрос о способах избирательной защиты гидроксильных групп в углеводном остатке нуклеозидов является одним из центральных вопросов химии нуклеозидов, так как именно этим часто определяется успех при разрешении различных синтетических проблем в этой области.

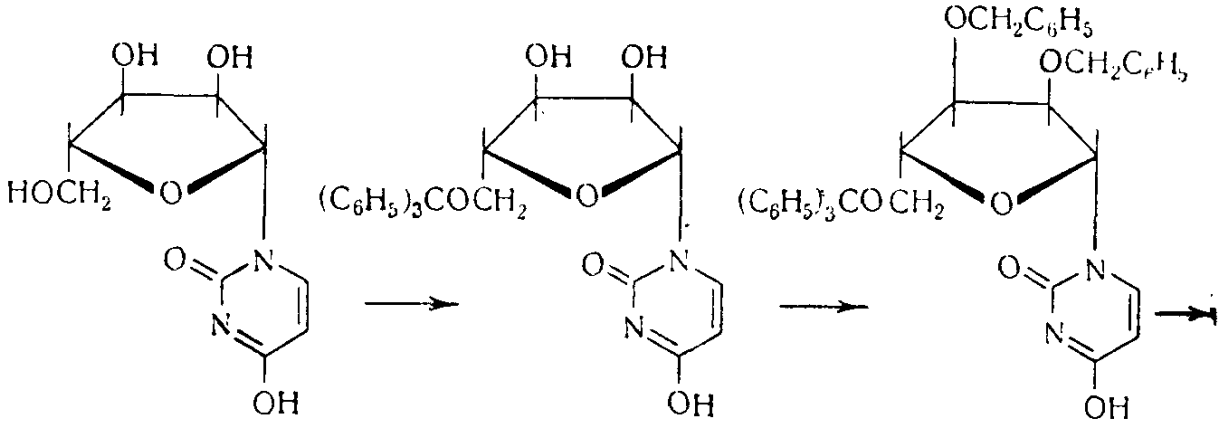
Естественно, решение этого вопроса очень важно и для получения различных изомеров фосфатов нуклеозидов. Вопрос о синтезе 5′-фосфатов решается просто; в этом случае фосфорилированию должны подвергаться нуклеозиды с защищенными гидроксилами у $C_{(2)}$ и $C_{(3)}$ Для этих целей пользуются почти исключительно изопропилиденовыми производными нуклеозидов, которые образуются всегда с участием двух соседних гидроксильных групп у $C_{(2)}$ и $C_{(3)}$, оставляя свободным гидроксил у $C_{(5)}$.

Пример дальнейшего использования такого производного в синтезе приведен выше (стр. 219—220) при рассмотрении синтеза аденозин-5′-фосфата.

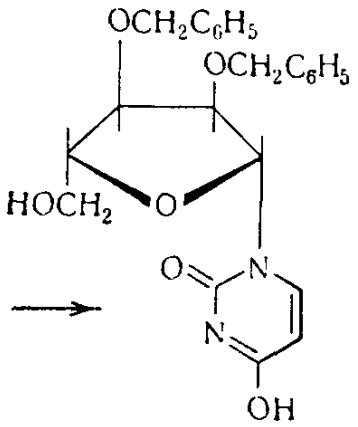
2′-3′-изопропилиденовые производные нуклеозидов легко получаются в обычных условиях, т. е. при взаимодействии нуклеозидов с ацетоном в присутствии кислот. Продукты конденсации нуклеозидов с другими карбонильными производными обычно не используются. Изопропилиденовая группировка легко может быть разрушена при кислом гидролизе, чем пользуются на заключительных стадиях синтеза, когда нужно перейти к незащищенному нуклеотиду.

В тех случаях, когда гидроксилы $C_{(2)}$ и $C_{(3)}$ нуждаются в более прочной защите, прибегают к получению других производных, например бензиловых эфиров, которые удобны тем, чтобы бензильные группы могут быть затем сняты в строго нейтральных условиях каталитическим гидрированием.

Как пример получения такого производного можно привести синтез 2′, 3′-дибензилуридина.



XXIX XXX XXXI



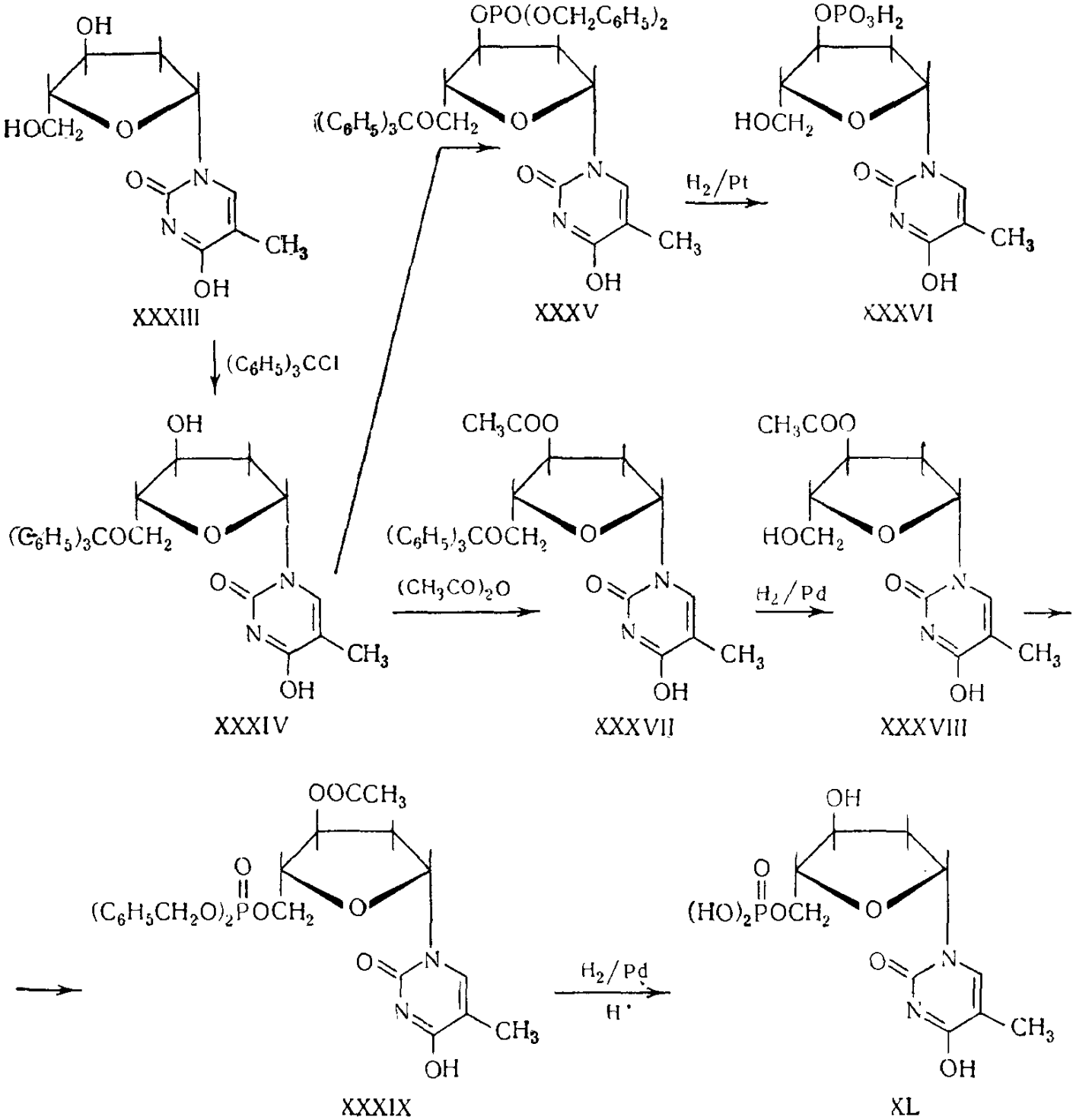
XXXII

Уридин (XXIX) при взаимодействии с трифенилхлорметаном дает 5′-тритилуридин (XXX), в котором защищена оксигруппа у $C_{(5)}$. Соединение (XXX) обрабатывается хлористым бензилом в инертном растворителе в присутствии щелочи, в результате чего образуется 2′, 3′-дибензил-5′-тритилуридин (XXXI). При нагревании (XXXI) с уксусной кислотой тритильная группировка отщепляется и образуется 2′, 3′-дибензилуридин (XXXII).

В приведенном синтезе мы находим также пример избирательной защиты гидроксильной группы у $C_{(5)}$, которая достигается взаимодействием нуклеозида с трифенилхлор- или трифенилбромметаном. Как и в ряду углеводов и их более простых производных, тритилированию

подвергается, как правило, только первичная спиртовая группа и поэтому указанная реакция служит для избирательной защиты гидроксильной группы у $C_{(5)}$ во всех природных рибонуклеозидах и дезоксирибонуклеозидах.

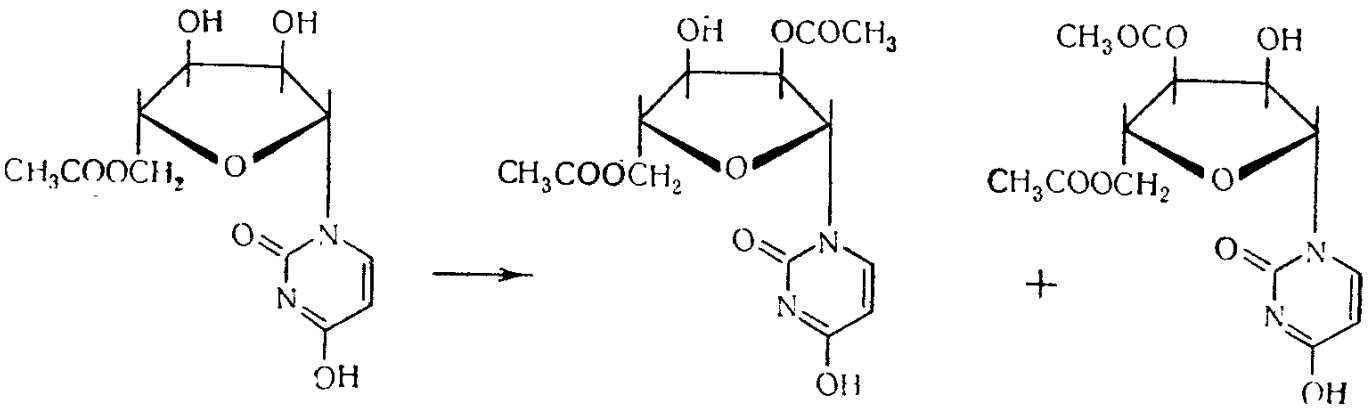
Применение реакции с трифенилхлорметаном в ряду дезоксирибонуклеотидов позволяет получить производные, избирательно защищенные у $C_{(5)}'$ и $C_{(3)}'$, и далее осуществить синтез обоих изомерных дезоксирибонуклеотидов. Это можно видеть из следующей схемы синтеза обоих тимидинфосфатов



Тимидин (XXXIII) тритилируется; фосфорилирование тритилтимидина (XXXIV) одним из разобранных выше методов, например, дибензилхлорфосфатом и последующая обработка продукта фосфорилирования (XXXV) с целью удаления защищающих групп, в том числе и тритильного остатка, приводят к тимидин-3′-фосфату (XXXVI). С другой стороны, ацетилирование тритилтимидина (XXXIV) позволяет получить ацетильное производное (XXXVII); гидрирование последнего дает 3′-ацетилтимидин (XXXVIII), т. е. производное дезоксирибонуклеозида, изби-

рательно защищенное у $C_{(3)}$; фосфорилирование (XXXVIII) и снятие защиты в продукте фосфорилирования (XXXIX) приводит к тимидин-5′-фосфату (XL).

Наиболее трудной, до сих пор не решенной удовлетворительно проблемой является избирательная защита гидроксилов у $C_{(2)}$ и $C_{(3)}$ в молекуле рибонуклеозида. Дело в том, что указанные гидроксильные группы в рибозном остатке настолько близки по своему химическому поведению, что найти реакцию, которая проходила бы с участием только одного из этих гидроксилов, не затрагивая другого, весьма трудно. В лучшем случае можно найти реакцию, которая идет с различной скоростью и дает смесь производных с преобладанием одного из изомеров, как например, при ацетилировании 5′-ацетилуридина (XLI) образуется 20% 3′,5′-диацетильного производного (XLII) и 80% 2′5′-диацетильного производного (XLIII).

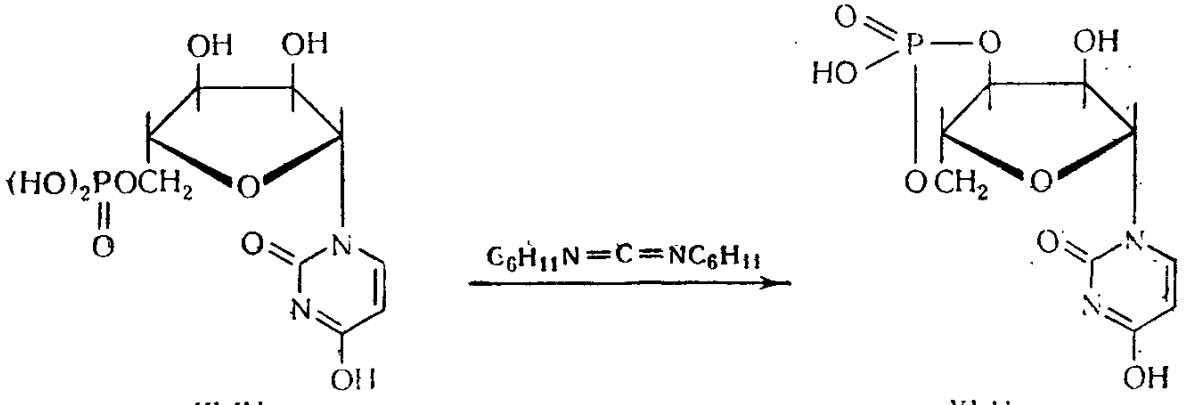


XLI XLIII XLII

Подобные смеси могут быть разделены современными методами (например, с применением противоточного распределения), однако препаративно это не всегда удобно.

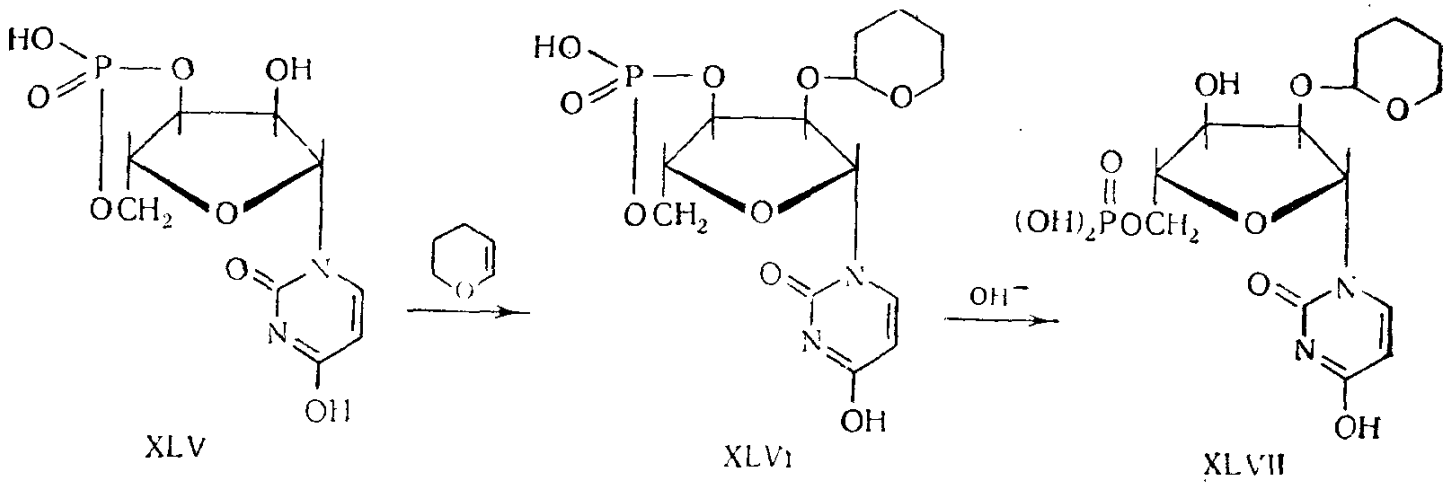
Синтез соединений с избирательной защитой у $C_{(2)}$ и $C_{(3)}$ осложняется еще и тем, что некоторые группировки, находящиеся у одного из этих атомов, чрезвычайно легко и в мягких условиях мигрируют от $C_{(2)}$ к $C_{(3)}$ и обратно, как это часто наблюдается у производных цис-α-гликольной системы. Эта легкая перегруппировка связана, по-видимому, с тем, что она проходит через циклический промежуточный ион.

Тем не менее в 1959 г. появилось краткое сообщение, в котором указывается на возможность получения производных нуклеозидов, избирательно защищенных у $C_{(5)}$ и $C_{(3)}$ и имеющих свободный гидроксил у $C_{(2)}$. При взаимодействии уридин-5′-фосфата (XLIV) с дициклогексилкарбодиимидом в условиях большого разведения происходит внутримолекулярное взаимодействие фосфатного остатка с гидроксильной группой у $C_{(3)}$ и образуется циклический фосфат (XLV).



XLIV XLV

Этот принцип позволит, вероятно, развить более широкое получение производных нуклеозидов, избирательно защищенных у $C_{(2)}$ и $C_{(3)}$. В частности, этим путем можно получить и соединения, защищенные у $C_{(5)}$ и $C_{(2)}$ со свободной гидроксильной группой у $C_{(3)}$ как, например,



XLV XLVI XLVII

При взаимодействии циклического фосфата (XLV) с дигидропираном образуется тетрагидропираноловый эфир (XLVI); взаимодействие последнего со щелочью раскрывает циклический фосфат, в результате чего образуется 2′-пиранольный эфир уридин-5′-фосфата, содержащий свободный гидроксил у $C_{(3)}$ (XLVII).

Этим единственным примером пока исчерпываются случаи, когда удалось получить избирательно защищенные у $C_{(2)}$ и $C_{(3)}$ производные нуклеозидов, и в настоящее время еще трудно сказать, насколько широко применим описанный выше новый метод.

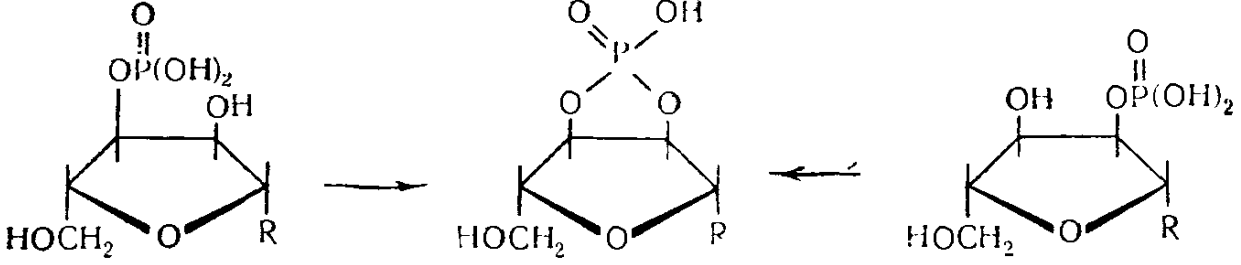
Нуклеотиды обладают всеми свойствами, присущими фосфорным эфирам. Будучи монофосфатами и имея два кислых водорода, они являются сильными кислотами, которые дают соли с легкими и тяжелыми металлами. Особенно интересными с практической точки зрения являются кальциевые и бариевые соли нуклеотидов, не растворимые в большинстве органических растворителей и используемые для выделения и очистки нуклеотидов. Соли нуклеотидов с третичными аминами, особенно с аминами, имеющими тяжелые радикалы, напротив, в той или иной степени хорошо растворимы в неполярных растворителях, что находит широкое использование в синтезе.

Гидроксильные группы остатка фосфорной кислоты, содержащиеся в нуклеотиде, могут этерифицироваться, образуя ди- и тризамещенные эфиры. Эта важная реакция лежит в основе перехода от мононуклеотидов к нуклеиновым кислотам, являющимся с этой точки зрения двухзамещенными эфирами фосфорной кислоты, в которых один остаток последней этерифицирует два соседних в полимерной цепи нуклеозида.

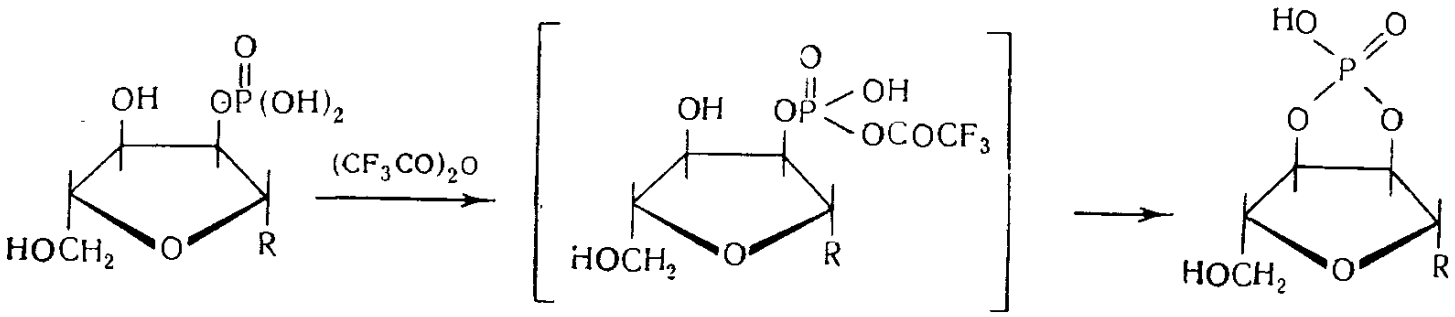
Фосфорный остаток нуклеотида способен этерифицировать и свободные гидроксильные группы, содержащиеся в той же молекуле нуклеотида. В случае такой внутримолекулярной этерификации образуются циклические фосфаты, играющие видную роль при превращениях и синтезах нуклеотидов.

Редкий пример образования такого циклического 3′,5′-фосфата (XLV) был только что приведен (стр. 225). Гораздо более обычными и не менее важными являются циклические фосфаты нуклеозидов, образованные с участием гидроксильных групп, находящихся у $C_{(2)}$ и $C_{(3)}$ рибозного остатка.

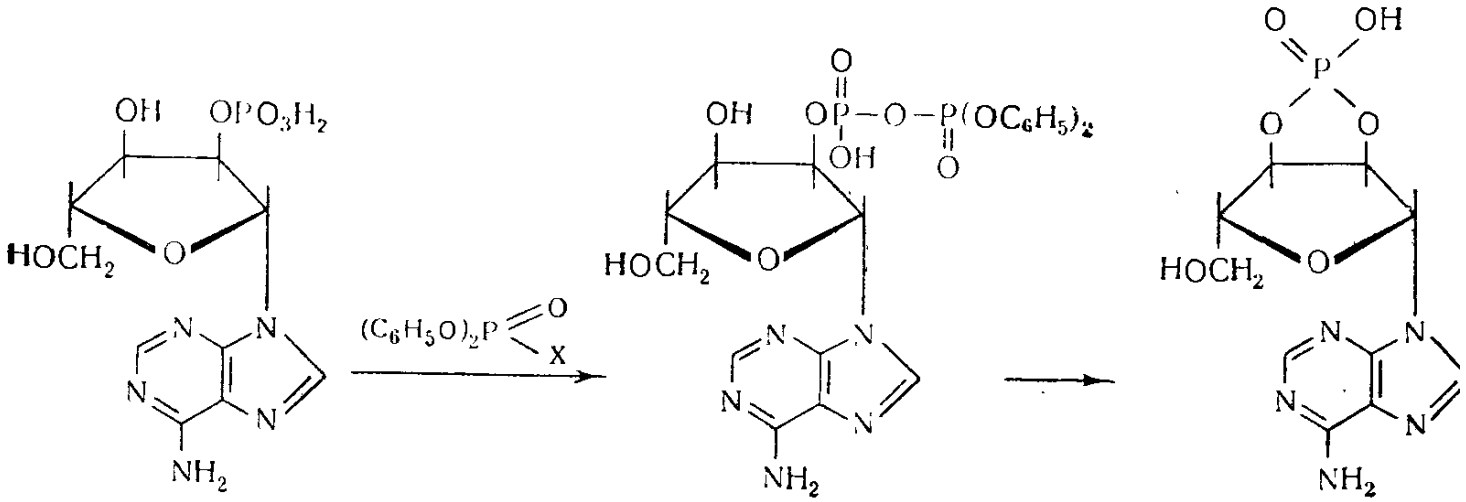
Такие циклические фосфаты легко получаются при взаимодействии 2′- или 3′-фосфатов нуклеозидов с дициклогексилкарбодиимидом.



Другой, менее распространенный метод их синтеза состоит в обработке 2′- или 3′-монофосфата нуклеозида ангидридом трифторуксусной кислоты. По всей вероятности, эта реакция проходит через образование смешанного ангидрида замещенной фосфорной и трифторуксусной кислот и может быть изображена схемой:



Большой интерес приобретает разработанный недавно метод получения циклических фосфатов действием дифенилхлорфосфата или тетрафенилпирофосфата на соли 2′- или 3′-фосфатов нуклеозидов. Эта реакция идет через образование смешанного ангидрида (XLVIII), который и фосфорилирует соседнюю гидроксильную группу, замыкая цикл, например



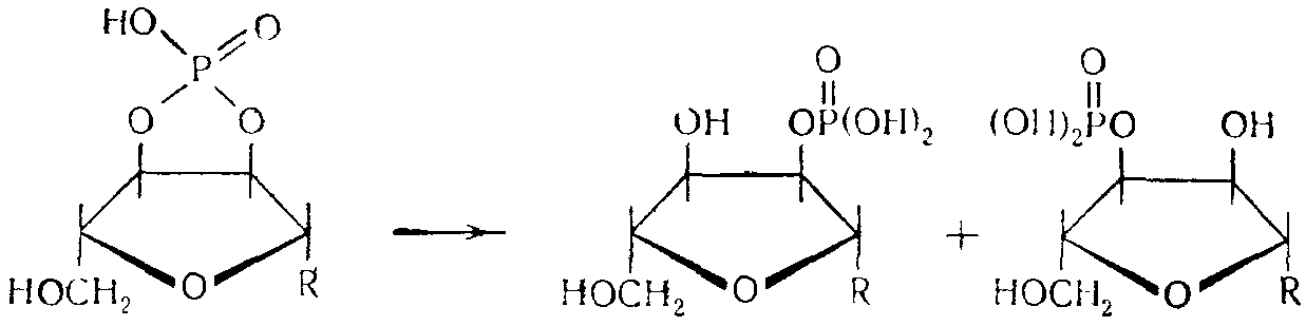
XLVIII

X = Cl или $OP(OC_6H_5)_2$
||
O

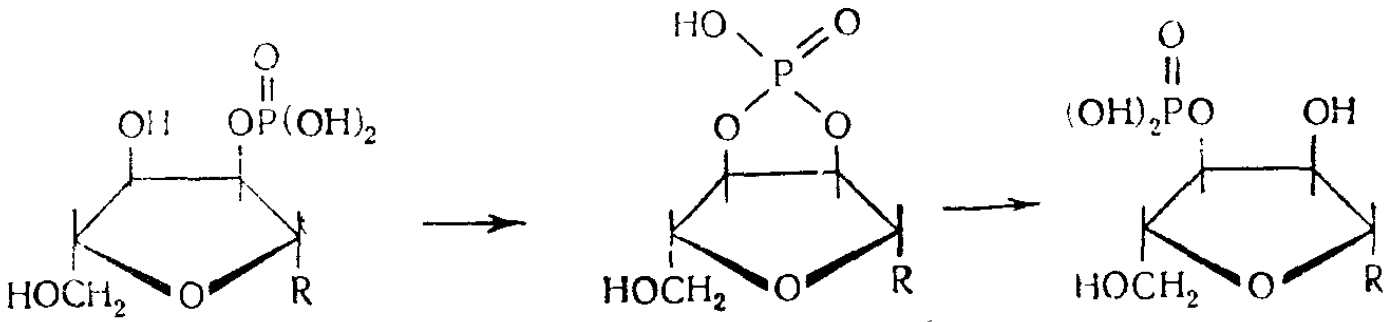
Интересно, что такая реакция происходит только при употреблении 1 моля конденсирующего средства. Если последнее брать в избытке, то наступает полимеризация нуклеотида (см. стр. 251).

О том, что полученные приведенными методами соединения являются действительно циклическими фосфатами, говорит их одноосновность и бо́льшая подвижность при хроматографировании на бумаге. Особый

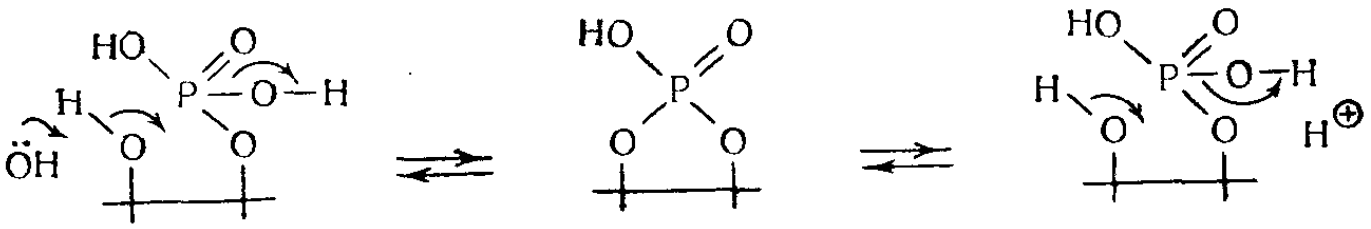
интерес представляет гидролиз циклических фосфатов, приводящий к образованию смеси 2′- и 3′-фосфатов нуклеозидов.



Этот результат делает понятной крайнюю легкость взаимной перегруппировки, характерную для 2′- и 3′-фосфатов. Эта перегруппировка проходит через образование циклического фосфата.



Перегруппировка протекает как под действием кислот, так и под действием оснований, что легко объясняется механизмом образования циклического фосфата, катализируемого и H^+ и OH^--ионами и выраженного схемой.



Образование и гидролиз циклических фосфатов является важной ступенью при гидролизе нуклеиновых кислот (см. стр. 249).

ЛИТЕРАТУРА

E. Chargaff, J. Davidson. Nucleic acids, I. New York, 1955, 137—188.
G. Kenner. Fortschritte Chemie org. Naturstoffe. 1951, 8, 96.
J. Henderson, G. Le Page. Naturally occuring acid soluble nucleotides. Chem. Revs., 1958, 58, 645.

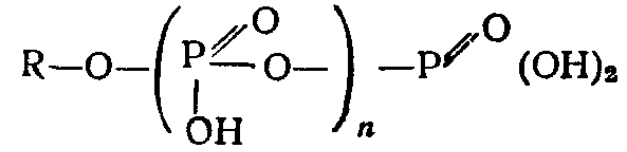
Глава 4

НУКЛЕОТИДНЫЕ КОФЕРМЕНТЫ

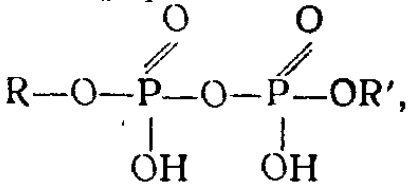
Нуклеотиды в виде своих более или менее сложных производных составляют основу большой и важной группы коферментов. Как хорошо известно, ферментные системы состоят из белковой части, которая обеспечивает фиксацию субстрата и специфичность фермента и носит обычно название апофермента и кофермента, который с белком-носителем и обеспечивает протекание самой катализируемой ферментом реакции.

Одну из самых обширных групп коферментов составляют соединения, содержащие в качестве фрагмента нуклеотид. Как уже указывалось во введении, к этой группе нуклеотидных коферментов относятся и соединения, которые не являются коферментами в указанном выше смысле этого слова. Сюда относятся соединения, которые выполняют функции важнейших промежуточных продуктов в ряде биохимических циклов, не будучи непосредственно связанными с белком-носителем. Первостепенная роль в биохимических процессах этих соединений, наиболее важным из которых является аденозинтрифосфат (АТФ) и их функция, по существу аналогичная функциям ферментов, позволяет, хотя и несколько условно, рассматривать их вместе с истинными коферментами.

По химическому строению все известные нуклеотидные коферменты можно разбить на две группы. Одна группа объединяет соединения, которым соответствует структура



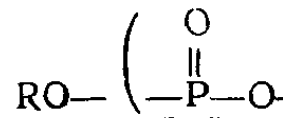
(где R — остаток нуклеозида) и которые могут быть названы нуклеозидполифосфатами. Другой тип коферментов — это несимметричные пирофосфаты общей формулы



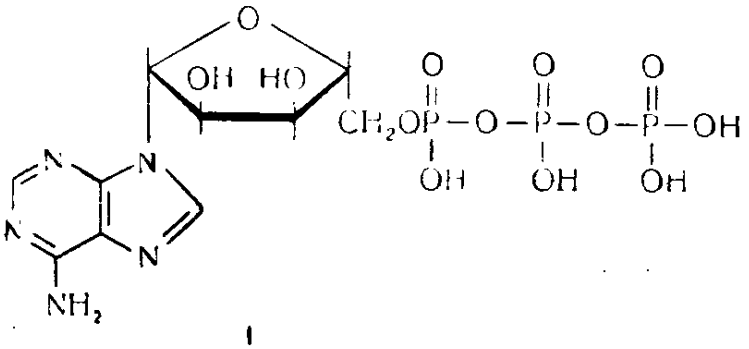
где R — остаток нуклеозида, R′— ненуклеозидный радикал.

Обе группы коферментов по свойствам и по методам синтеза значительно отличаются одна от другой, что позволяет рассматривать их отдельно.

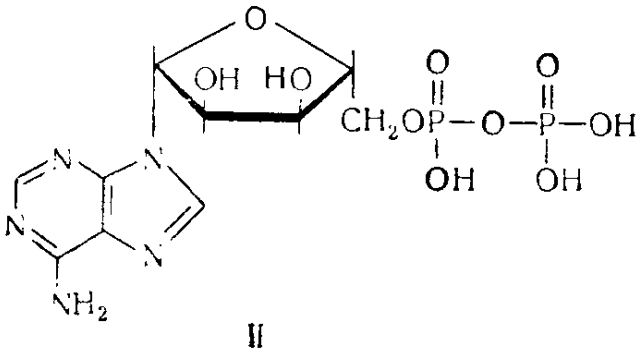
ПОЛИФОСФАТЫ НУКЛЕОЗИДОВ

Коферменты типа  очень распространены в организме и выполняют весьма ответственную роль во многих

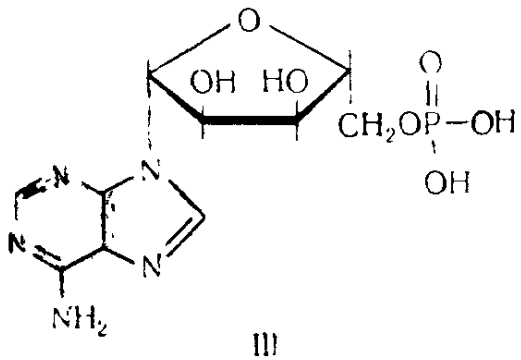
биохимических процессах. Наиболее известными и важными представителями этой группы являются производные аденозина аденозинтрифосфат (АТФ) (I), аденозиндифосфат (АДФ) (II) и аденозинмонофосфат (АМФ) (III); последний хорошо известен так же, как мононуклеотид, входящий в состав рибонуклеиновых кислот. Полифосфаты аденозина служат в организме передатчиками остатков фосфорной кислоты (так называемая реакция перефосфорилирования или трансфосфорилирования), чем одновременно осуществляется и передача энергии.



I



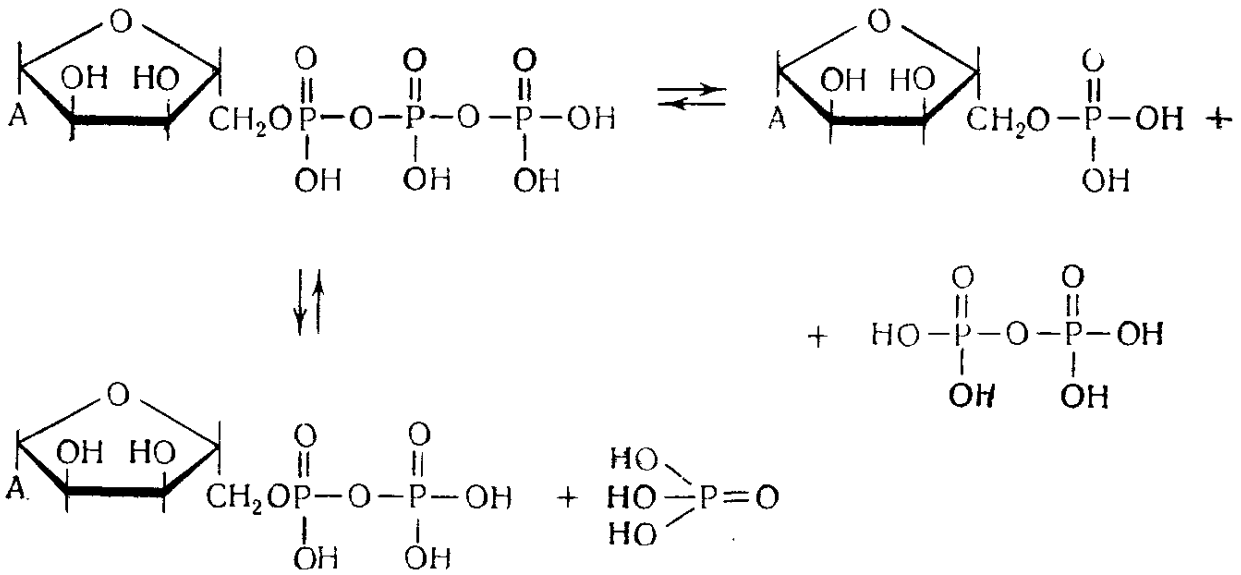
II



III

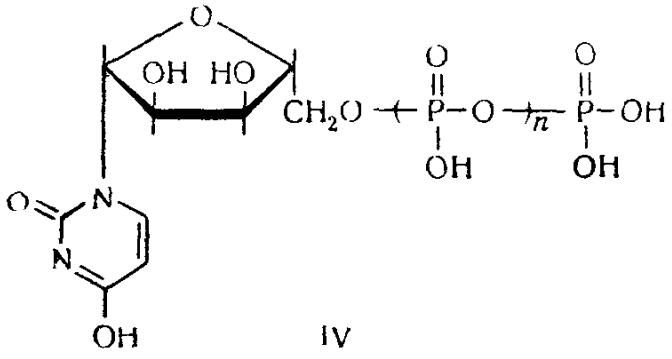
Если вспомнить, насколько важен обмен фосфора и связанный с ним синтез и распад биогенных фосфатов для самых различных процессов, протекающих в живом организме, и учесть решающую роль энергообмена для процессов жизнедеятельности, то роль коферментов группы аденозинполифосфатов становится совершенно ясной.

Не имея возможности обсуждать здесь подробности биохимической роли этой группы коферментов, хорошо известной из курсов биохимии, укажем только, что их главная функция сводится к осуществлению одного из обратимых циклов, связанных с отщеплением или переносом фосфата и пирофосфата при переходе к моно- или дифосфату, и обратного синтеза АТФ, который происходит с участием фосфорилирующего агента в подходящих условиях

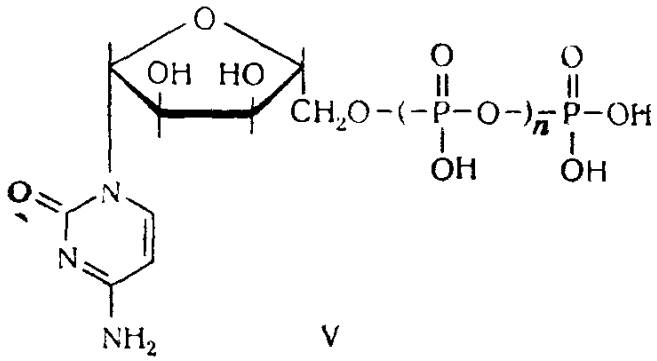


где A – остаток аденина

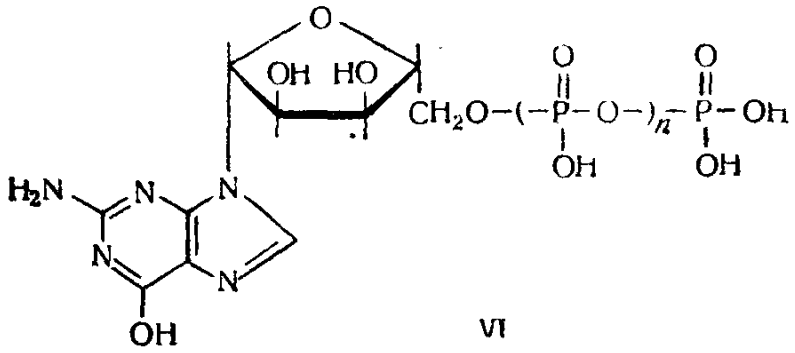
Именно этими циклами обеспечивается перенос фосфатной группы с одного субстрата на другой и вместе с этим энергообмен. Наряду с группой аденозинполифосфатов в организме распространены, хотя и в меньшей степени, аналогичные соединения, в основе которых лежат другие нуклеозиды, а именно полифосфаты уридина (IV), цитидина (V) и гуанозина (VI). Биологическая функция этих коферментов еще в некоторых случаях недостаточно ясна, однако известно, что они обеспечивают более частные, хотя и не менее важные биохимические процессы, и не имеют поэтому такого широкого распространения *.



IV



V



VI

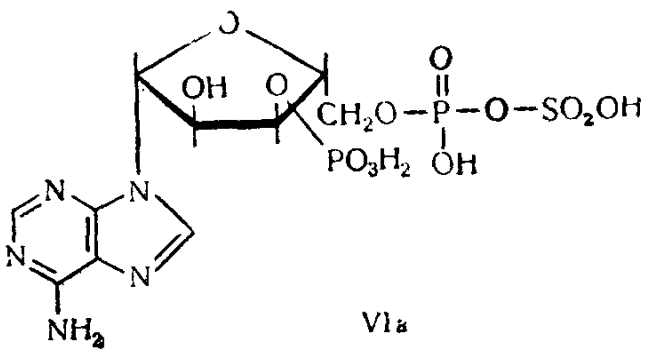
В настоящее время достаточно хорошо разработаны методы установления строения коферментов этого типа, методы их синтеза.

Поскольку принципы и методы, которыми пользовались исследователи при установлении строения, одинаковы для различных коферментов этой группы, то целесообразно рассмотреть этот вопрос на примере наиболее важного из них — аденозинтрифосфата, помня при этом, что установление строения и синтеза других веществ этой группы были проведены аналогичным путем.

Суждение о строении аденозинтрифосфата (АТФ) основано на следующих данных. При гидролизе АТФ в присутствии минеральных кислот он распадается на аденин, рибозу и фосфорную кислоту (3 моля).

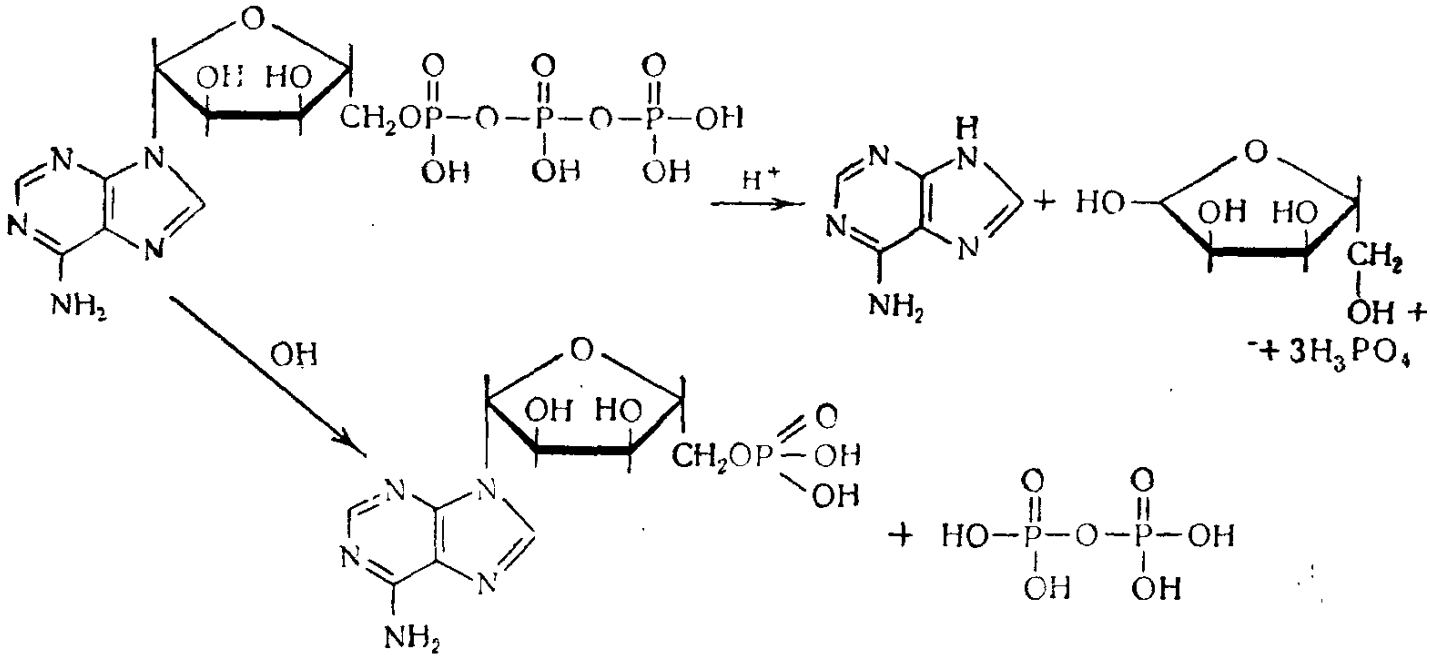
---

* Кроме того, недавно стали известны нуклеотидные конферменты, в которых остаток нуклеотида связан с остатком минеральной кислоты. Они, видимо, оказывают влияние на солевой обмен и являются переносчиками сульфогруппы. Примером такого рода соединений, участвующих в биохимических процессах, может служить так называемый активный сульфат (VIa), выделенный в 1955 г. Липпманом и синтезированный в 1959 г. Бэддили.

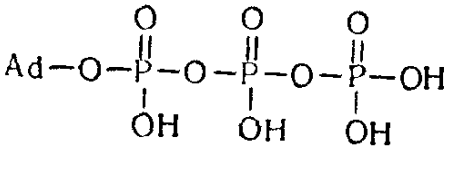


VIa

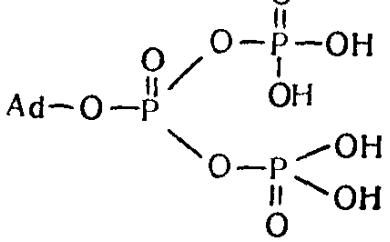
С другой стороны, щелочной гидролиз АТФ дает аденозин-5′-фосфат и пирофосфат.



Выделение при гидролизе аденозин-5′-фосфата, а также результаты, полученные при окислении АТФ иодной кислотой, и образование им комплекса с борной кислотой указывало на то, что гидроксильные группы у $C_{(2)}$ и $C_{(3)}$ в остатке рибозы свободны и фосфатная группа АТФ находится только у $C_{(5)}$-атома рибозного остатка. Из этих данных вытекает, что АТФ является производным аденозина, у которого к пятому углеродному атому в рибозном остатке привязана цепь, построенная из трех остатков фосфорной кислоты. Иными словами, АТФ является полифосфатом аденозина. Для полного установления строения этого соединения остается только решить вопрос о том, является ли полифосфатная цепь в АТФ линейной или разветвленной, т. е. сделать выбор между структурами (VII) и (VIII).



VII



VIII

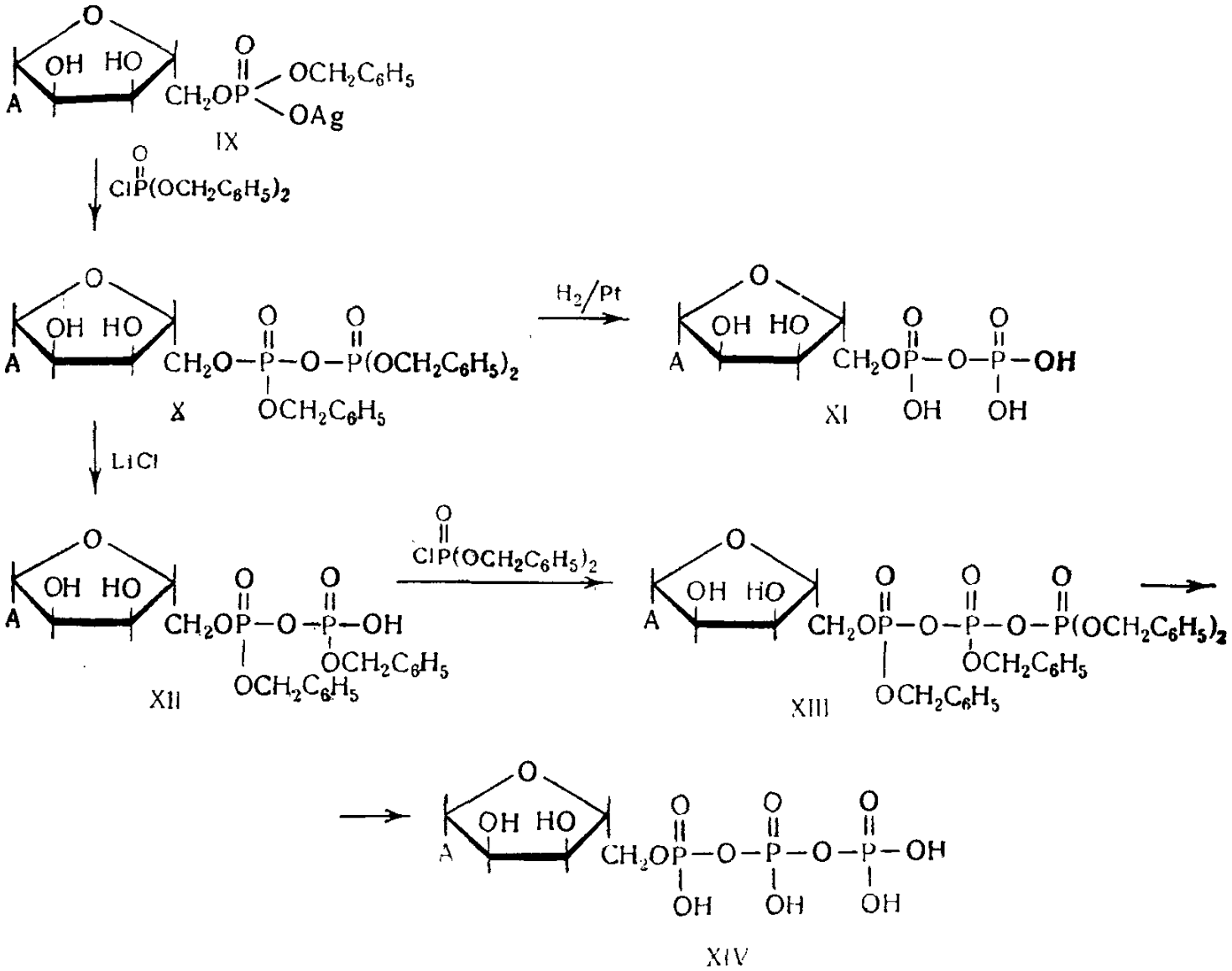
где Ad – остаток аденозина

Этот выбор был сделан на основании результатов титрования АТФ, позволившего установить природу гидроксильных групп фосфатных остатков. Титрование АТФ показало наличие в нем трех первичных и одного вторичного гидроксилов *, что соответствует линейному трифосфату (VII), тогда как в соединении (VIII) должно содержаться два первичных и два вторичных гидроксила. Как уже отмечалось, строение остальных коферментов, относящихся к группе полифосфатов нуклеозидов, устанавливалось теми же путями. В настоящее время строение соединений

* Здесь и в дальнейшем используется принятая в этой области терминология, согласно которой первичными называются те гидроксилы в остатке фосфорной кислоты, которые диссоциируют как сильная кислота (pK 1—2), вторичными — гидроксилы фосфорной кислоты, диссоциирующие как слабая кислота (pK 6).

этого класса подтверждено их полным синтезом. Так же, как и при установлении строения, разработанные здесь пути синтеза являются общими для всех соединений этой группы и могут быть рассмотрены на примере синтеза аденозинтрифосфата.

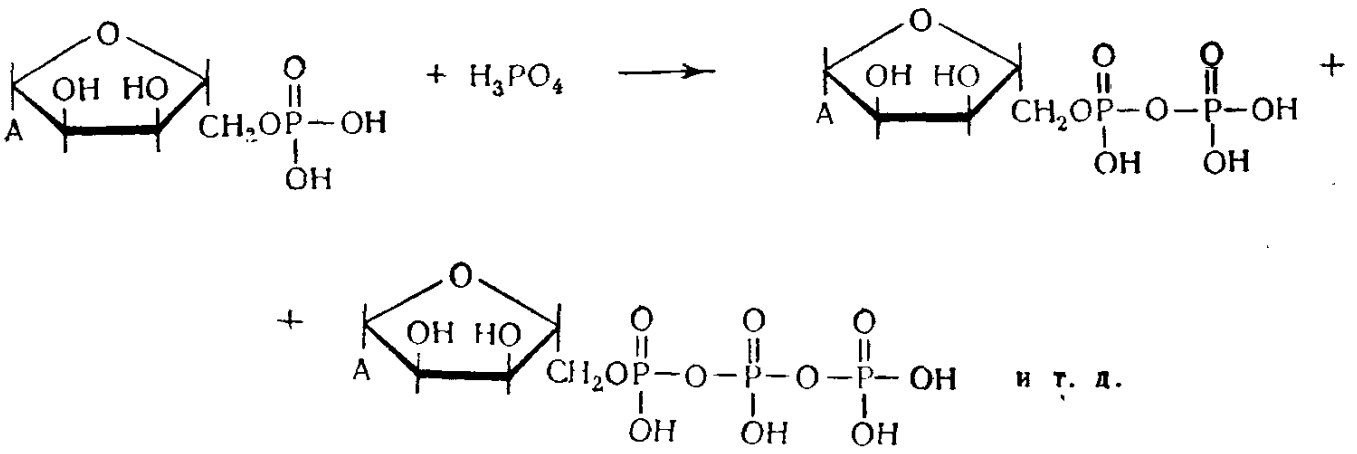
Известны два метода синтеза соединений этого типа. Первый метод синтеза АДФ и АТФ, осуществленный Тоддом в 1949 г. и впервые подтвердивший строение обоих коферментов, в настоящее время уже не используется в препаративных целях. Он может быть представлен схемой



При взаимодействии серебряной соли монобензилового эфира аденозин-5′-фосфата (IX) с дибензилхлорфосфатом был получен трибензиловый эфир АДФ (X), при гидрировании которого над платиной отщепляются бензильные группы и образуется АДФ (XI). Если (X) подвергнуть частичному дебензилированию действием хлористого лития (стр. 219), то отщепляется только одна бензильная группа, связанная с вторичной гидроксильной группой, и образуется дибензиловый эфир АДФ (XII). Повторным фосфорилированием его и последующим гидрогенолизом полученного тетрабензилового эфира АТФ (XIII) был получен сам кофермент (XIV).

Новый синтез АДФ, АТФ и их аналогов, предложенный в 1954 г. Хораной, значительно удобнее с препаративной точки зрения, хотя едва ли пригоден для подтверждения строения нуклеозидполифосфатов. Хорана нашел, что полифосфаты легко получаются при взаимодействии монофосфатов с фосфорной кислотой в присутствии дициклогексилкарбодиимида, причем образуется смесь полифосфатов с различной сте-

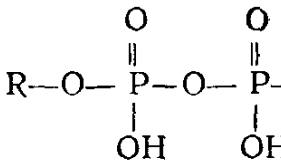
пенью полимеризации. Так например, при взаимодействии аденозин — 5′-фосфата с фосфорной кислотой в присутствии карбодиимида* получается смесь АДФ и АТФ с примесью некоторого количества тетра- и пентафосфатов аденозина.



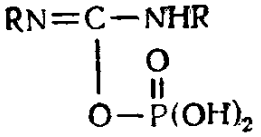
Простота и удобство метода очевидны. Его единственным слабым местом является образование смеси полифосфатов, для разделения которых применяют ионообменную хроматографию. Соотношение получающихся полифосфатов в некоторой степени можно регулировать условиями реакции. Неудобством метода с препаративной точки зрения является необходимость работать в гетерогенной среде; реакцию ведут в водном пиридине, в котором компоненты полностью не растворяются. В настоящее время этот метод модифицирован и позволяет направить синтез в сторону преимущественного образования АТФ. Для этого взаимодействие аденозин-5′-монофосфата с фосфорной кислотой и карбодиимидом проводят в присутствии третичного амина (обычно трибутиламина). В этих условиях реакция проходит в гомогенной среде и дает с выходом 60—70% АТФ в смеси с небольшим количеством АДФ и высших полифосфатов.

Этот простой путь синтеза нуклеозидполифосфатов использован в настоящее время и для синтеза аналогов АТФ с другими гетероциклическими ядрами [уридинтрифосфат (УТФ) и др.]. Простота метода сделала его удобным, и он применяется сейчас и для препаративного синтеза соединений этого типа.

НЕСИММЕТРИЧНЫЕ ПИРОФОСФАТЫ

Несимметричные пирофосфаты типа  представляют собою обширную группу коферментов, функция которых в организме весьма разнообразна. Ферментные системы, включающие эти кофермен-

---

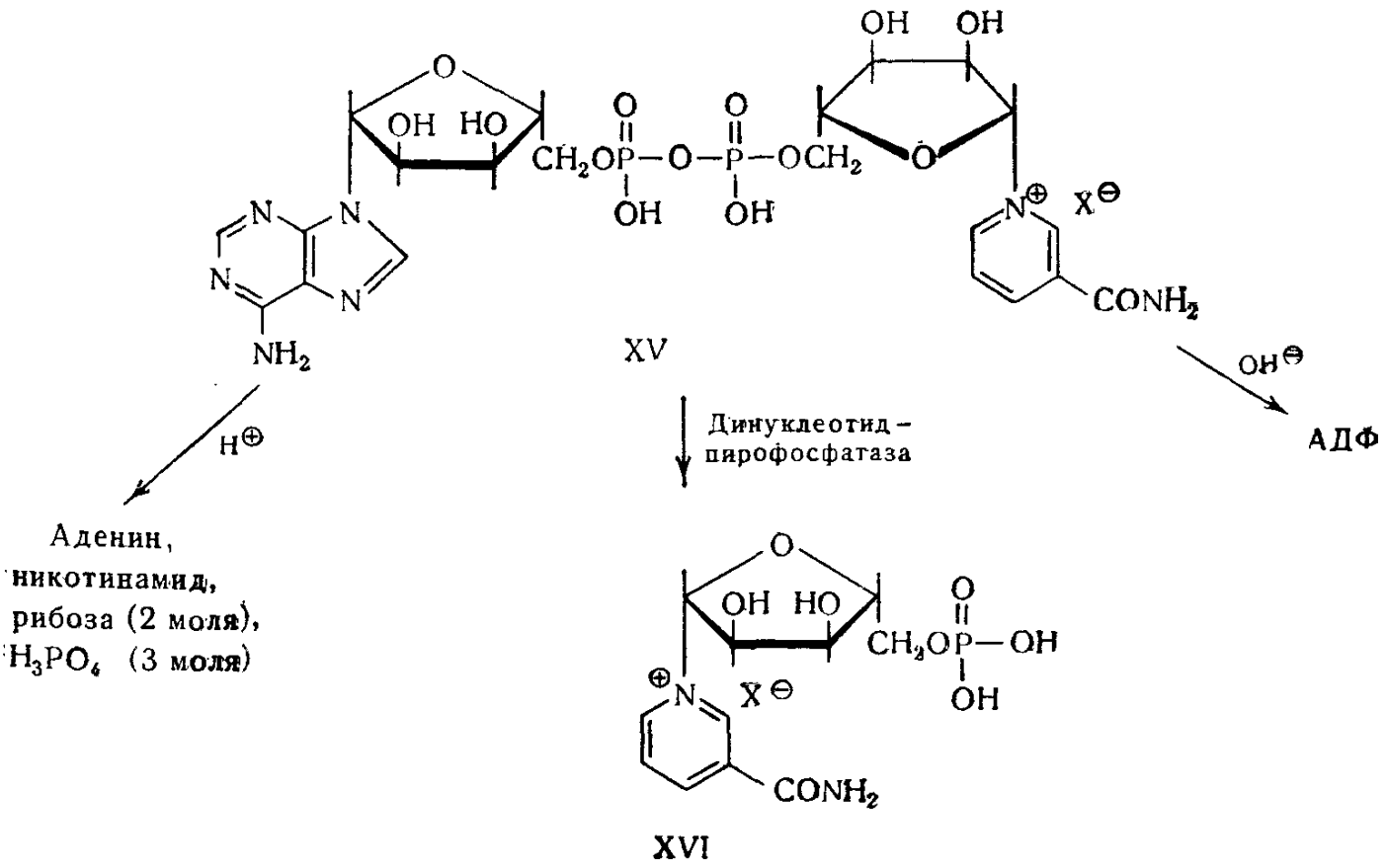
* Такое специфическое действие карбодиимида связывают в настоящее время с образованием промежуточного соединения типа  которое, будучи эфиром енола, является сильным ацилирующим, в данном случае фосфоридирующим, средством.

ты, регулируют окислительно-восстановительные процессы, биологическое переацилирование, метаболизм углеводов и другие важнейшие процессы. Все коферменты этого типа содержат в качестве одного из радикалов нуклеозид, тогда как другой радикал не является нуклеозидом. К настоящему времени доказано строение и выполнен синтез всех важнейших известных коферментов этого типа.

Общий прием, которым пользовались при установлении строения, состоял в полном гидролизе кофермента и частичном его гидролизе по пирофосфатной связи с последующим установлением строения получающихся при этом осколков молекулы. В дальнейшем будет рассмотрено строение важнейших коферментов, относящихся к этой группе.

Коэнзим I (козимаза) — кофермент важнейшей ферментной системы, обеспечивающей окислительно-восстановительные процессы в организме. Он был выделен Гарднером и Янгом в 1905 г. и является одним из первых коферментов, выделенных в индивидуальном состоянии. Исследование показало, что коэнзим I представляет собою смесь двух очень близких по строению соединений, называемых дифосфопиридиннуклеотидом (ДПН) и трифосфопиридиннуклеотидом (ТПН).

Строение ДПН было установлено Г. Эйлером в 1935 г. на основании данных гидролиза, проведенного в различных условиях. Полученные при этом результаты могут быть представлены схемой:

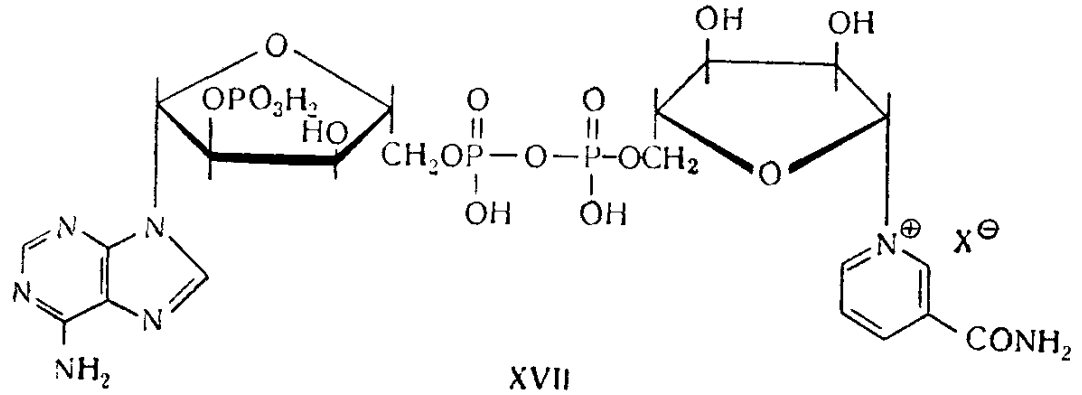


XVI

При кислотном гидролизе ДПН (XV) происходит полный распад его молекулы и образуются аденин, никотинамид, 2 моля рибозы и 2 моля фосфорной кислоты; отсюда вытекает суммарный состав кофермента. При ферментативном гидролизе (XV) была получена четвертичная соль (XVI) и, наконец, щелочной гидролиз (XV) дал АДФ. Из этих данных следует, что ДПН представляет собою несимметричный пирофосфат, с одной стороны этерифицированный аденозином. Для установления строения второго радикала, связанного с пирофосфатной системой, нужно выяснить строение одного из продуктов распада ДПН — (XVI).

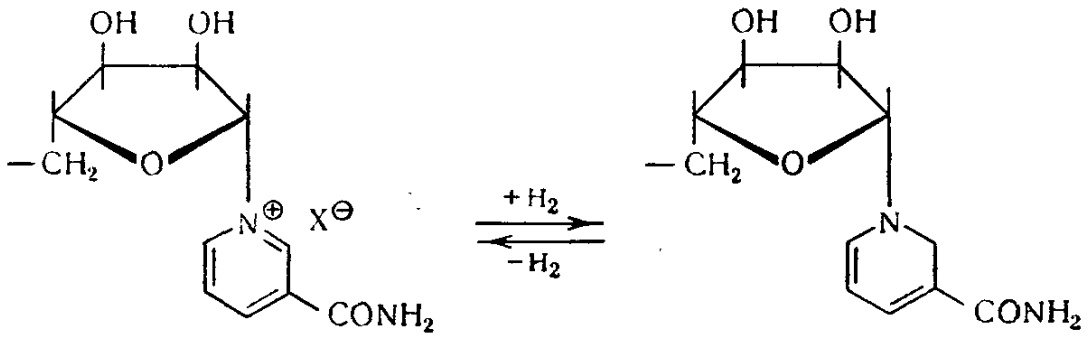
Из продуктов полного распада ДПН ясно, что фрагмент, связанный с пирофосфатной системой, содержит никотинамид и одну молекулу рибозы. Ультрафиолетовый спектр продукта ферментативного гидролиза (XVI) ясно указывает на то, что последний является четвертичной пиридиниевой солью, а его распад под действием кислот на никотинамид. рибозу и фосфорную кислоту свидетельствует о том, что он является N-гликозидом. Отсюда следует, что этот фрагмент представляет собой фосфат (-3-карбоксамидопиридил) рибозида. Место связи остатка фосфорной кислоты в (XVI) было доказано наличием в нем свободной α-гликольной системы, чем полностью подтверждалось строение (XVI), а тем самым и ДФПН, которому на основе этих данных может соответствовать только формула (XV). Единственный оставшийся невыясненным вопрос о конфигурации гликозидного центра в рибозном остатке, связанном с никотинамидом, был решен прямым синтезом (XVI) (см. ниже).

Второй компонент козимазы — трифосфопиридиннуклеотид (ТПН) чрезвычайно близок по структуре к ДПН. Кислый и щелочной гидролиз ТПН дает результаты, указывающие на то, что структура этого соединения соответствует ДПН, в молекуле которого находится один дополнительный остаток фосфорной кислоты. Для определения положения этого остатка ТПН подвергался ферментативному гидролизу, который привел к образованию дифосфата аденозина, не являющегося АДФ. Гидролиз этого дифосфата в присутствии нуклеотидазы змеиного яда дает аденозин-2-фосфат. Отсюда следует, что дополнительная фосфатная группа ТПН находится у $C_{(2)}$ — рибозного остатка аденозина и строение ТПН выражается формулой (XVII).



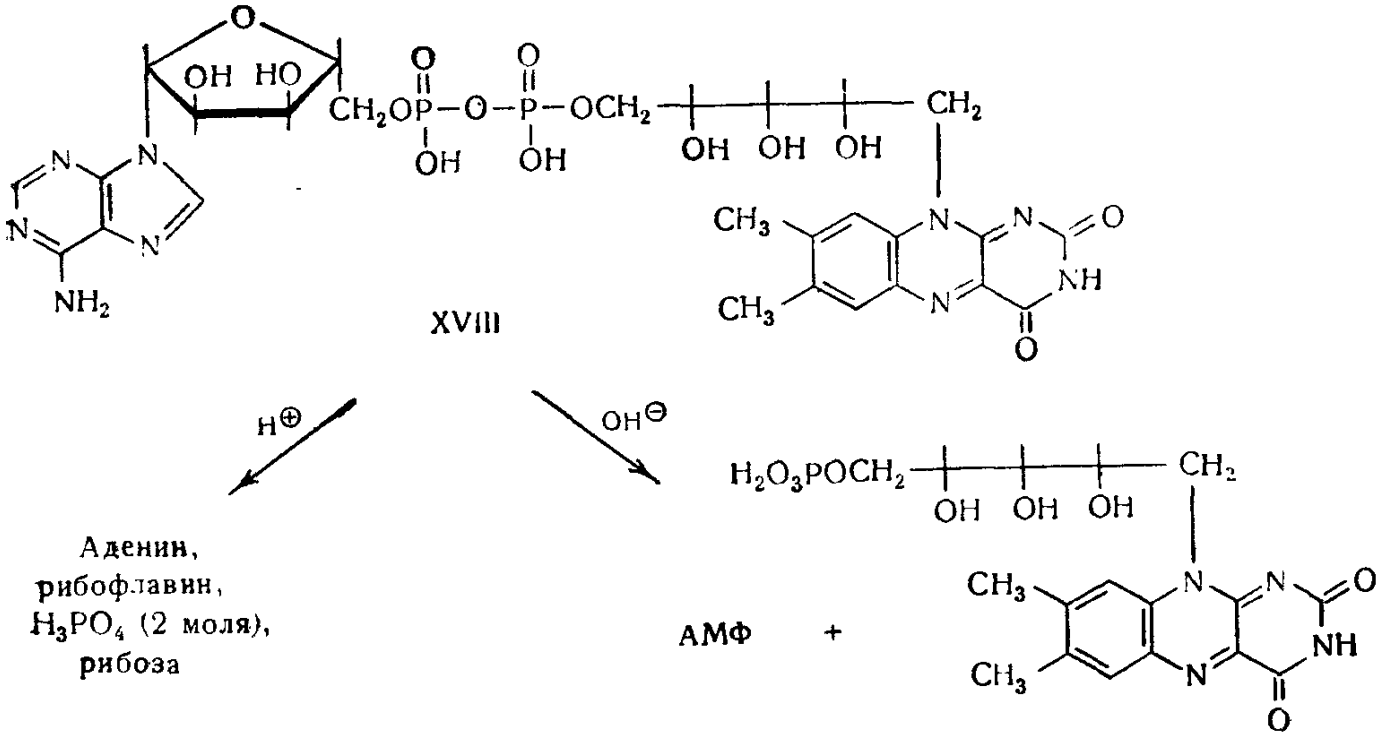
XVII

Биохимическая функция ДПН и ТПН как кофермента, регулирующего окислительно-восстановительные процессы, состоит в перенесении водорода посредством обратимого окисления — восстановления пиридинового ядра коферменту:



Флавинадениндинуклеотид (ФАД) — фермент, также регулирующий окислительно-восстановительные процессы на более высокой биологической ступени. ФАД был выделен Варбургом в 1938 г., строение

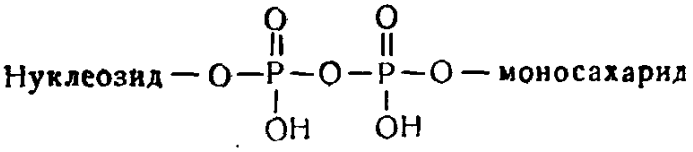
его было установлено Куном и Варбургом. Так же, как и в предыдущем случае, строение ФАД устанавливалось на основании данных гидролиза, проведенного в различных условиях, и видно из схемы:



Из данных кислотного гидролиза ясен общий состав кофермента. Щелочной гидролиз говорит о том, что одна половина фермента состоит из остатка аденозин-5-фосфата. Выделение рибофлавина (строение которого уже было известно) и его 5-фосфата демонстрирует структуру второй половины молекулы. Единственным нерешенным вопросом остается вопрос о связи этих двух половин молекулы кофермента между собою. Поскольку при титровании ФАД было показано, что он содержит два первичных кислотных гидроксила, то ясно, что обе фосфатных группировки связаны с двумя радикалами, и, следовательно, они могут представлять только пирофосфатную систему, из чего для ФАД следует строение (XVIII), подтвержденное позднее полным синтезом.

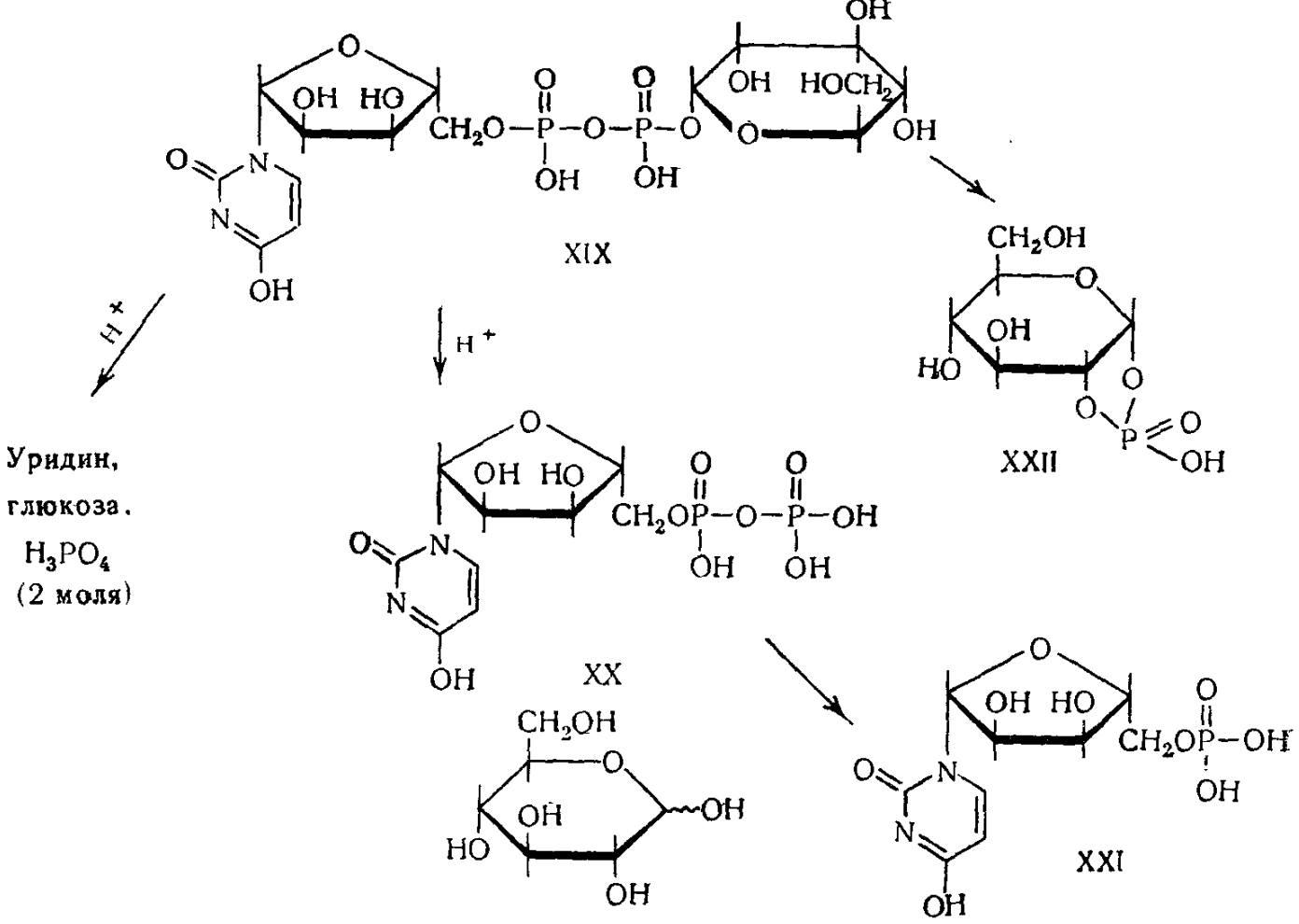
Уридиндифосфатглюкоза и родственные коферменты. Первым и важнейшим представителем этой новой и быстро разрастающейся группы коферментов была уридиндифосфатглюкоза (УДФГ), выделение и установление строения которой было выполнено в 1950 г. Лелуаром.

В дальнейшем были выделены другие родственные по строению ферменты, структура которых может быть представлена общей формулой



Было показано, что соединения этой группы принимают участие в сложном процессе обмена углеводов. Строение уридиндифосфатглюкозы было установлено также прежде всего на основании данных гидролиза (см. стр. 238).

При полном гидролизе УДФГ (XIX) кислотой получен уридин, глюкоза и 2 моля фосфорной кислоты. Кислотный гидролиз, проведенный в более мягких условиях, дал глюкозу и уридиндифосфат (XX); последний



при дальнейшем гидролизе дал уридин-5′-монофосфат (XXI). Этим самым было установлено строение нуклеотидной половины молекулы. Поскольку титрование УДФГ показывает наличие в кофермента двух первичных гидроксилов *, ясно, что два остатка фосфорной кислоты составляют пирофосфатную систему; из данных гидролиза кислотами следует, что второй конец пирофосфатной группировки связан с молекулой глюкозы и для полного выяснения строения УДФГ необходимо установить характер этой связи. Так как УДФГ не обладает восстанавливающими свойствами, остаток глюкозы может быть привязан только своим глюкозидным гидроксилом. Наконец, поскольку при щелочном гидролизе УДФГ наряду с (XXI) образует циклический 1,2-фосфат глюкозы (XXII), совершенно ясно, что гликозидный гидроксил и гидроксильная группа $C_{(2)}$ глюкозного остатка в УДФГ находились в цис-положении и, следовательно, в этом соединении остаток глюкозы связан с пирофосфатной системой α-глюкозидной связью. Этим полностью доказывается строение УДФГ, которому соответствует формула (XIX). Любопытно отметить, что все это довольно сложное доказательство было выполнено Лелуаром только посредством бумажной хроматографии, при помощи которой, без выделения в чистом виде, идентифицировались все продукты распада УДФГ.

Совершенно аналогичным путем устанавливалось строение других коферментов этого типа, из которых до настоящего времени выделены уридиндифосфат-глюкуроновая кислота, гуанозиндифосфат-манноза, уридиндифосфат-галактоза, гуанозиндифосфат-фукоза, уридиндифосфат-арабиноза, уридиндифосфат-N-ацетилгалактозамин и другие.

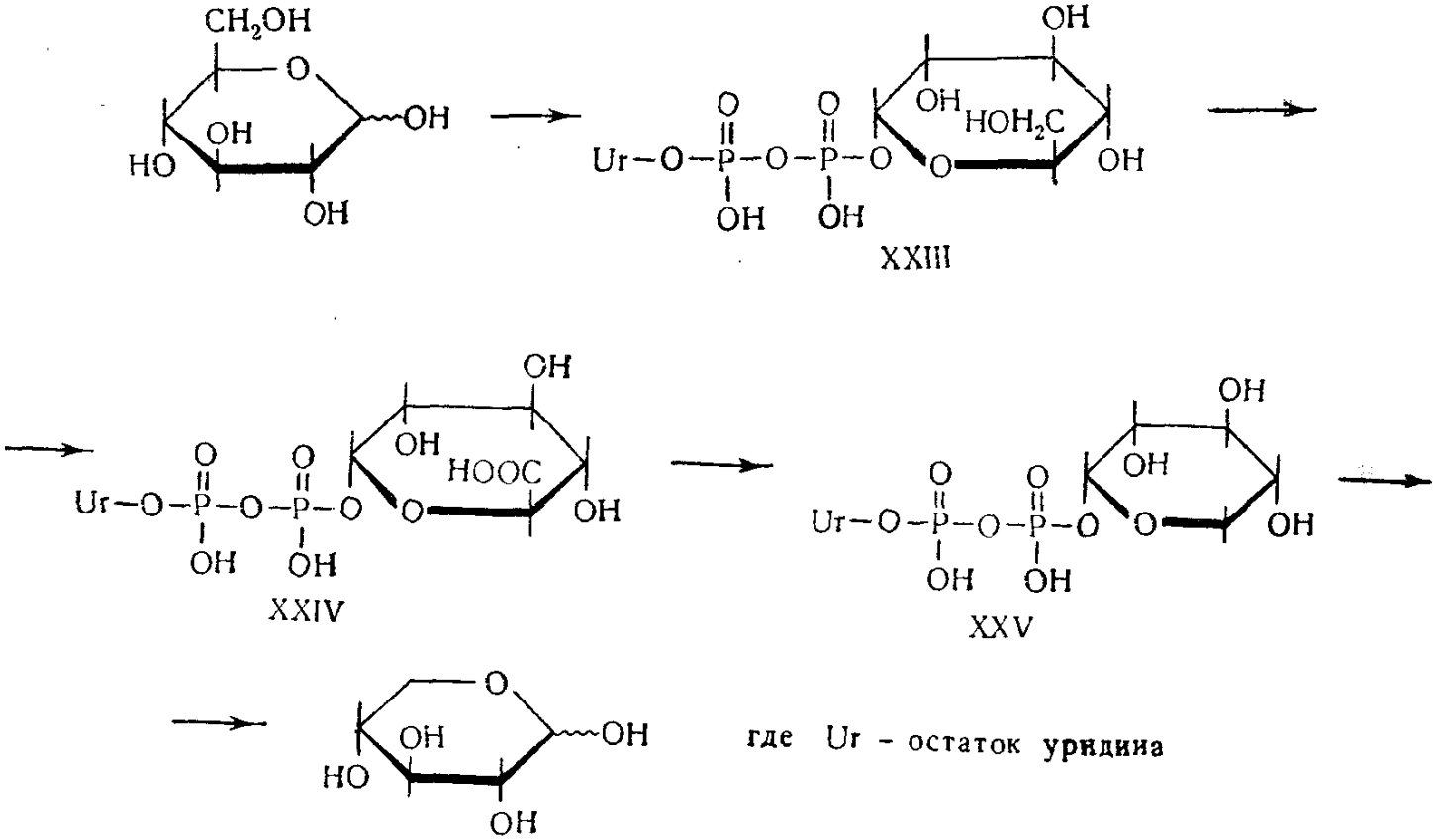
---

* Термин *первичный* гидроксил здесь употреблен в том же смысле, что на стр. 232.

Коферменты этой группы, как уже отмечалось, играют важную роль в метаболизме углеводов. По-видимому, они являются теми соединениями, через которые в организме осуществляются различные взаимные переходы углеводов. Так, например, уридиндифосфатглюкоза (УДФГ) участвует в важном для организма превращении глюкозы в галактозу. При этом сама УДФГ переходит в уридиндифосфатгалактозу, также найденную в организме. Очевидно, глюкоза, которая должна подвергнуться подобному превращению, вначале переходит в УДФГ, последняя превращается в уридиндифосфатгалактозу (УДФГал) и, наконец, этот кофермент расщепляется, выделяя галактозу.

Глюкоза → УДФГ → УДФГал → Галактоза

В числе других процессов обмена углеводов, по всей вероятности идущих с участием веществ этой группы, можно назвать переход от гексоз к пентозам, который происходит, видимо, по схеме

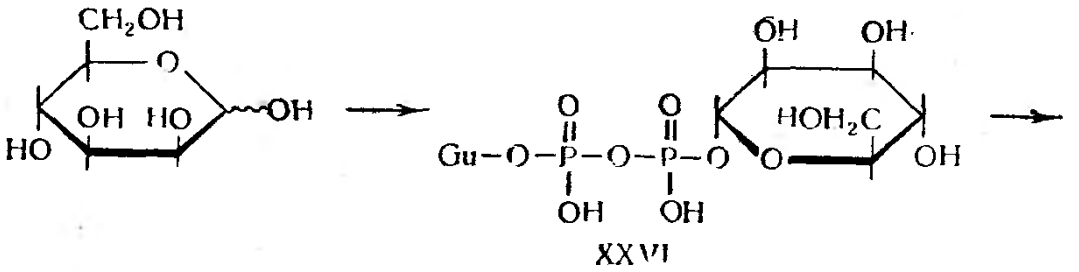


где Ur – остаток уридина

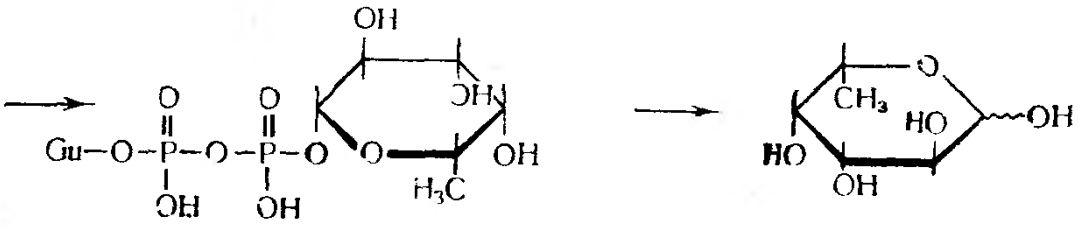
УДФГ (XXIII) превращается сначала в уридиндифосфатглюкуроновую кислоту (XXIV), а последняя декарбоксилируется в уридиндифосфатксилозу (XXV), которая распадается с отщеплением ксилозы. Это превращение не идет просто через соответствующие фосфаты, так как последние в тех же условиях не испытывают указанного перехода. Очевидно, для протекания этого процесса необходимо предварительное образование смешанного пирофосфата с нуклеозидной частью. В чем причина такой именно необходимости, пока трудно сказать.

Другим превращением, которое проходит через соединения этого типа, является переход маннозы в фукозу и, вероятно, последующий синтез полифукозанов (см. стр. 240).

Манноза превращается в гуанозиндифосфатманнозу (XXVI); последняя — в гуанозиндифосфатфукозу (XXVII), далее выделяется фукоза. Так, как (XXVII) выделена из продуктов жизнедеятельности одного из микроорганизмов, который продуцирует также один из полисахаридов, содержащих фукозу, то весьма вероятно, что (XXVII) далее принимает участие и в процессе образования этого полимера.



XXVI

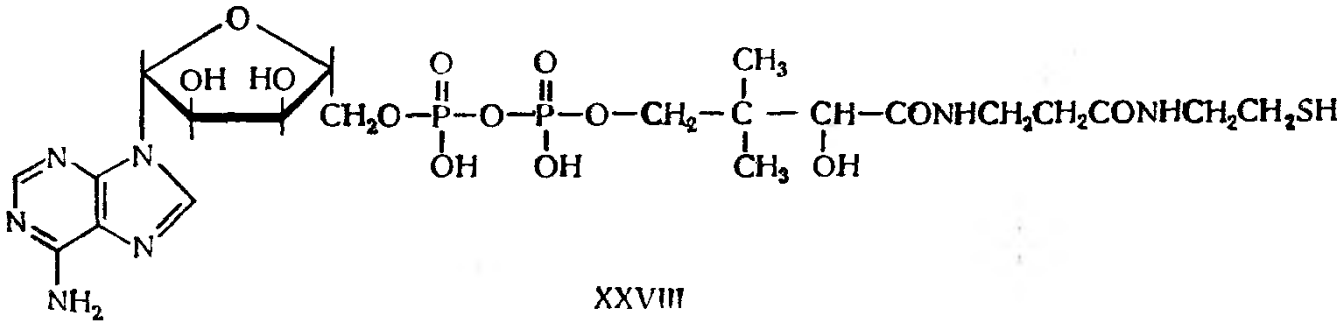


XXVII

где Gu - остаток гуанозина

Коэнзим А. Этот важный кофермент входит в ферментную систему, обеспечивающую процесс переноса ацетильных групп (переацетилирование, трансацетилирование).

Коэнзим А был открыт Липманом и для него было установлено строение (XXVIII). При установлении строения коэнзима А был использован тот же прием полного и частичного гидролиза в различных условиях, который привел к АДФ, пантотеновой кислоте, β-аланину, β-меркаптоэтиламину и их различным комбинациям, на основании чего и было установлено строение кофермента, в самое последнее время подтвержденное его полным синтезом.



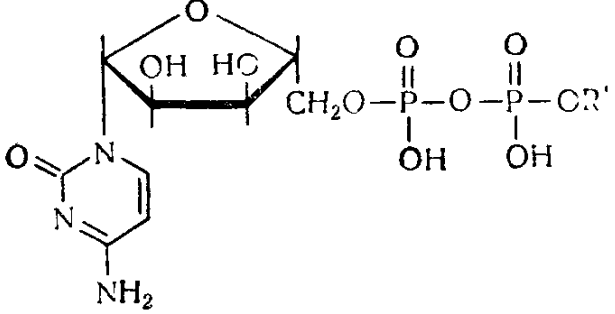
XXVIII

Другие типы нуклеотидных коферментов — несимметричных пирофосфатов

В последние годы из различных природных источников выделены и другие представители нуклеотидных коферментов этого типа. Было найдено, что нуклеотидный остаток может быть соединен не только с сахарами, как в УДФГ, но и с пептидами. Строение этих нуклеотидных коэнзимов установлено, в основном, теми же приемами, что и строение УДФГ. Строение большинства из них подтверждено химическим синтезом.

Так же, как соединения фосфатов уридина и гуанозина с сахарами, определяют метаболизм сахаров, очень важное значение для обмена липидов в организме имеют производные цитидиндифосфата.

Кеннеди в 1955 г. выделил ЦДФ-холин (XXIIIа) и ЦДФ-этаноламин (XXVIIIб). Бэддили в 1956 г. получил ЦДФ-глицерин (XXVIIIв) и ЦДФ-рибит (XXVIIIг).



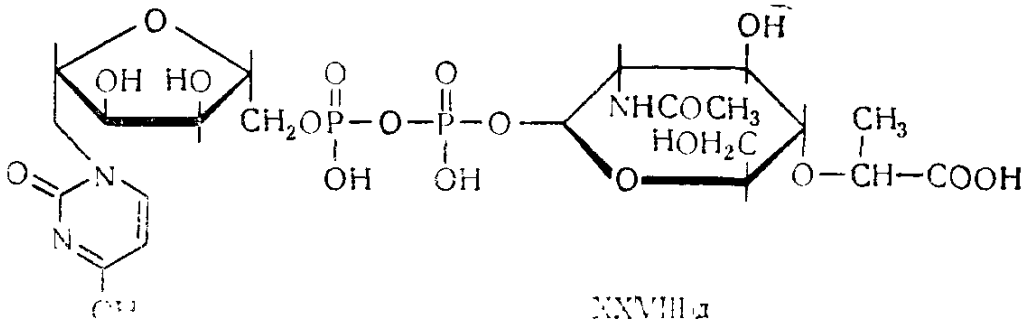
$R=CH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3OH^-$ (XXVIII а)

$CH_2CH_2NH_2$ (XXVIII б)

$CH_2CHOHCH_2OH$ (XXVIII в)

$CH_2(CHOH)_4CH_2OH$ (XXVIII г)

Установлено, что первые два соединения участвуют в биосинтезе липидов типа лецитинов. Из нуклеотидных коферментов, содержащих аминокислоты, наиболее изученными являются производные так называемой мурамовой кислоты — уридиндифосфат N-ацетил-3-О-α-карбоксиэтилглюкозамина (XXVIIIд).



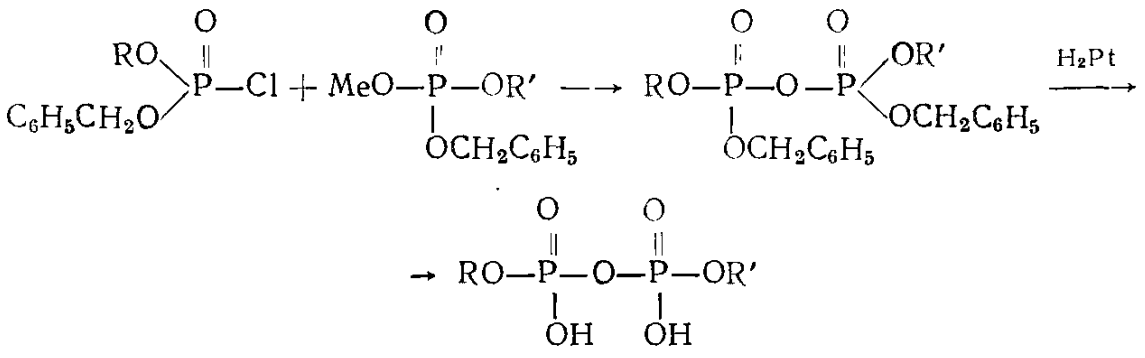
XXVIIIд

К свободной карбоксильной группе (XXVIIIд) присоединяется пептид, состоящий из 6—8 остатков аминокислот. Такого рода нуклеотиды накапливаются в стенках клеток определенных бактерий (например, *Staphylococcus aureus*) и создают у бактерии специфическую белковую защитную стенку.

Синтез нуклеотидных коферментов, относящихся к группе несимметричных пирофосфатов

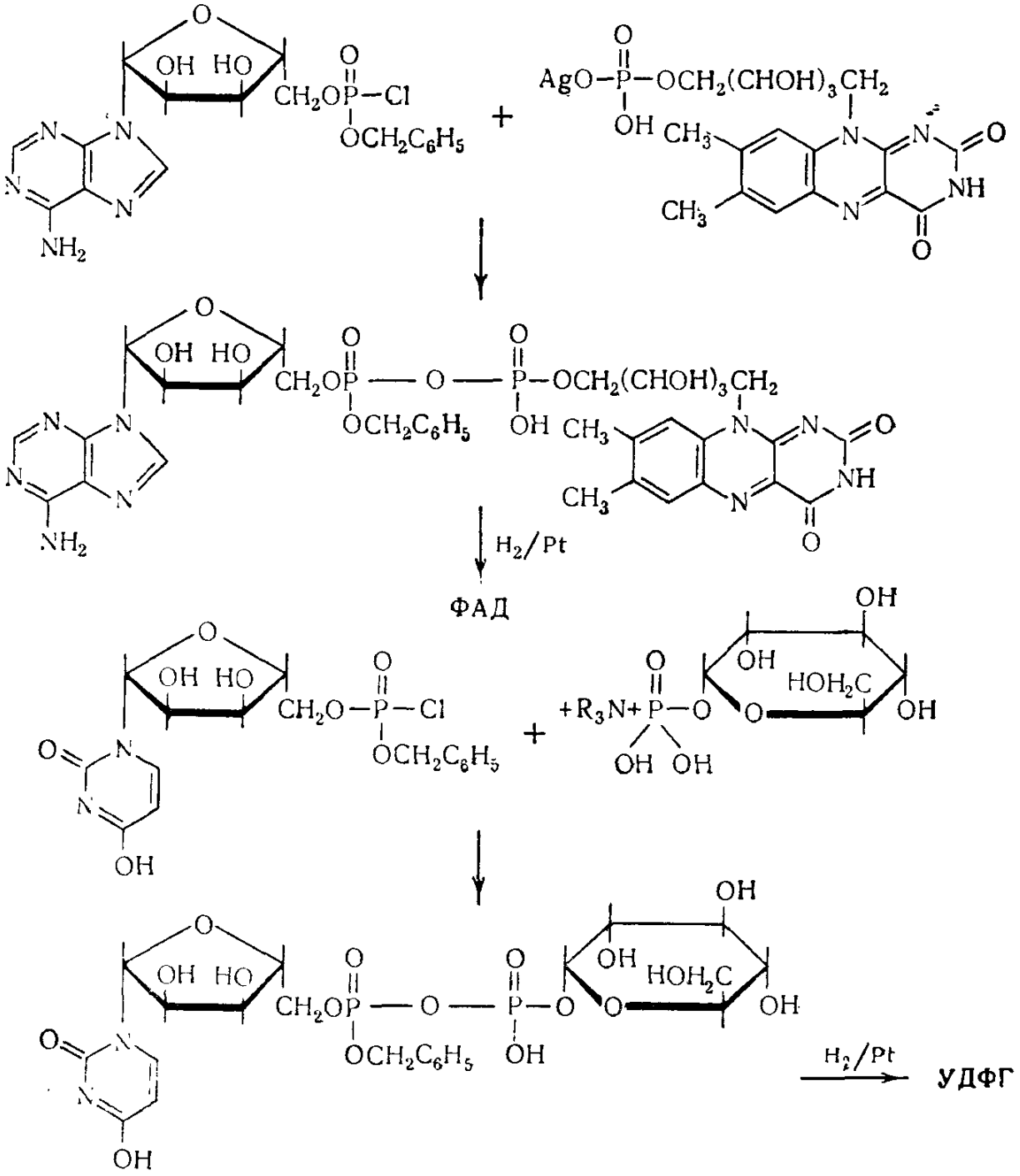
Главная задача, которая должна быть решена при осуществлении полного синтеза коферментов этой группы, сводится к разработке методов синтеза несимметричных пирофосфатов. В настоящее время имеется три таких метода, каждый из которых нашел применение в синтезе природных коферментов.

Первый метод, разработанный в 1950 г. Тоддом, состоит в получении несимметричного пирофосфата конденсацией производных двух различных монозамещенных фосфатов, из которых один берется в виде соли, а второй — в виде хлорангидрида.

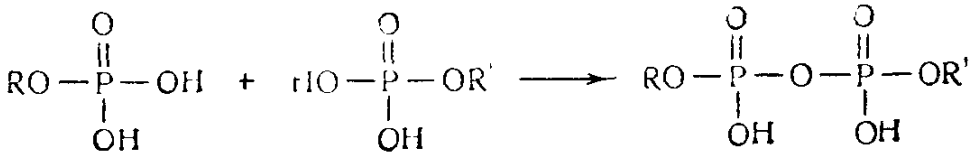


После осуществления конденсации бензильные группы, защищающие свободные гидроксилы фосфатных остатков, снимаются гидрогенолизом. Первоначально применялись соли тяжелых металлов (серебро, однова-

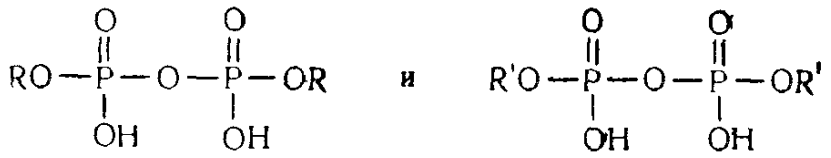
лентный таллий); однако вследствие их нерастворимости в неполярных растворителях, в которых ведется конденсация, реакцию приходится вести в гетерогенной среде. Поэтому позднее стали применять соли третичных аминов с тяжелыми радикалами, например трибутил- или триоктиламина, которые растворимы в бензоле, что обеспечивает гомогенную среду. Монохлорангидриды замещенных фосфатов, в виде которых берется обычно нуклеотидная часть кофермента, получают путем, описанным выше (стр. 221). Недостатком этого метода являются относительно низкие выходы и сложность изготовления исходных веществ. В качестве примеров использования этого пути можно привести синтез флавинадениндинуклеотида (ФАД) и уридиндифосфатглюкозы (УДФГ), осуществленные этим методом, которые ясны из схемы.



Второй метод синтеза несимметричных пирофосфатов, предложенный в 1954 г. Тоддом и Хораной, состоит в конденсации двух фосфатов под действием дициклогексилкарбодиимида.



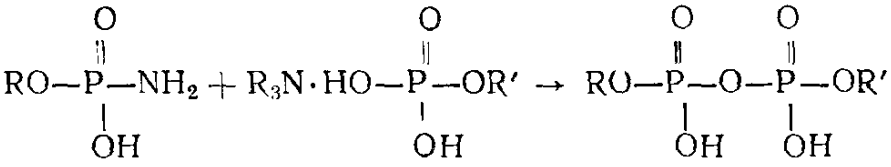
Главное преимущество этого метода состоит в возможности работать с моноэфирами фосфорной кислоты, не содержащими никаких защищающих групп. Это делает метод очень простым, а исходные вещества — доступными. Однако он страдает крупным недостатком, состоящим в том, что при конденсации наряду с нужным несимметричным пирофосфатом образуются два симметричных пирофосфата,



вследствие чего для выделения нужного продукта реакции приходится проводить очень трудоемкое разделение смеси пирофосфатов. Однако простота метода и мягкость условий протекания конденсации позволили применять его для синтеза одного из самых сложных коферментов этой группы — дифосфопиридиннуклеотида, который был получен именно этим путем (см. стр. 244).

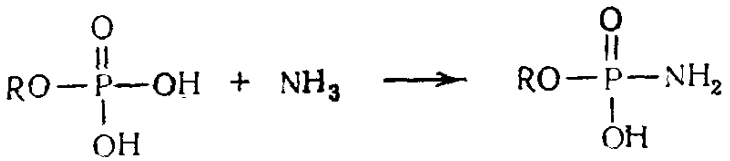
Конденсацией никотинамида (XXVIII) с 2,3,5,-трибензоилрибофуранозилхлоридом (XXIX) была получена четвертичная соль (XXX), в которой при обработке кислотой снимались бензоильные группы и получался N-пиридилрибофуранозид (XXXI). Последовательным фосфорилированием хлорокисью фосфора, обработкой щелочью и кислотой получен 5′-фосфат N-пиридилрибофуранозида (XXXII) — один из фрагментов ДПН. Естественно, что четвертичная пиридиниевая соль (XXX) при обработке щелочью переходит в гидроокись, поэтому необходимо последующее действие кислоты. Конденсация (XXXII) с аденозин-5′-фосфатом в присутствии карбодиимида дает смесь трех пирофосфатов, содержащих и ДПН (XXXIV). Наиболее трудоемкой частью синтеза было выделение (XXXIV) из этой сложной смеси.

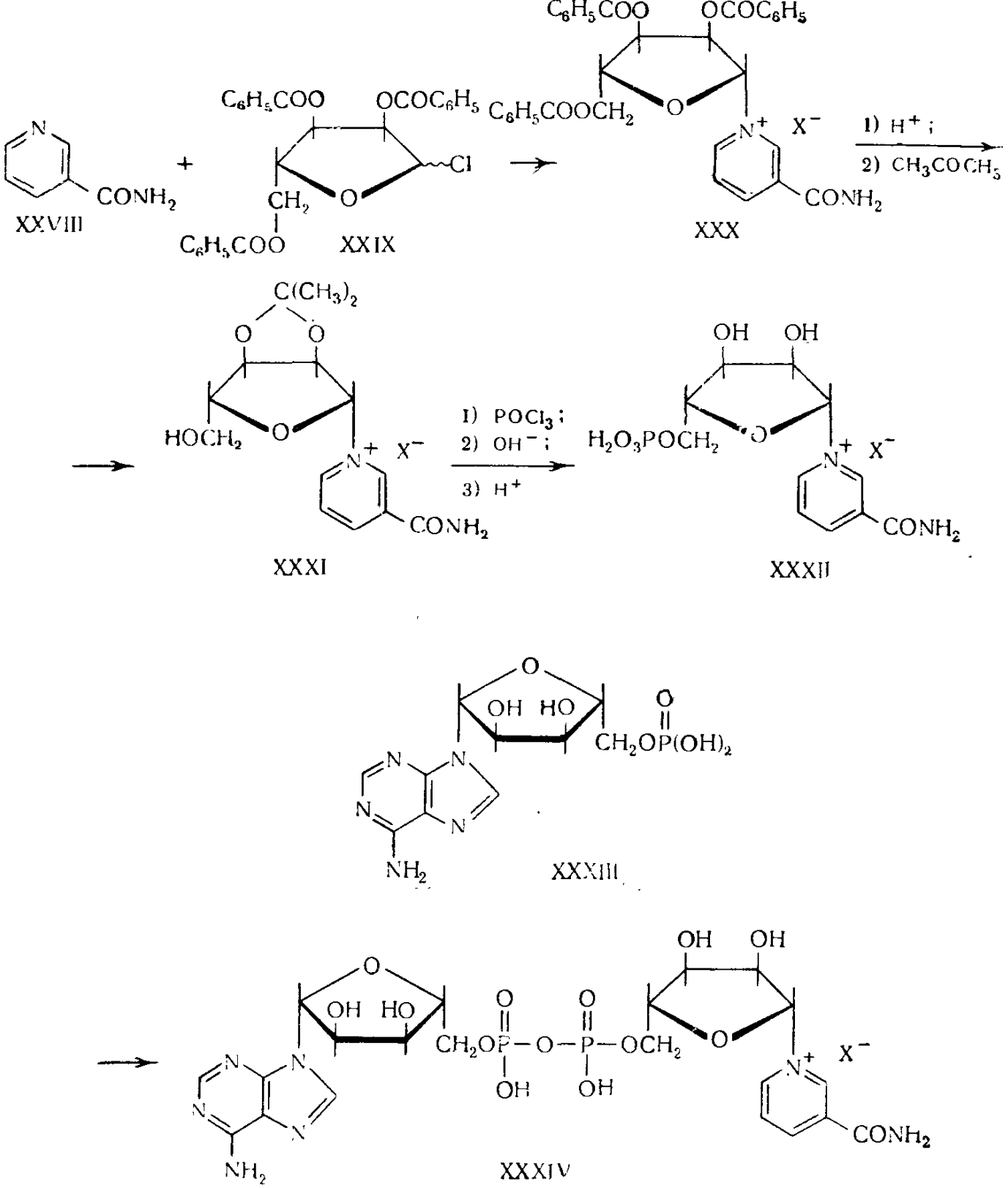
Главный недостаток этого второго метода синтеза несимметричных пирофосфатов был устранен Хораной, который в 1958 г. предложил новый метод синтеза несимметричных пирофосфатов конденсацией амидов монозамещенных фосфатов с аммонийными солями однозамещенных фосфатов.



Этот путь синтеза был предложен после подробного исследования механизма конденсирующего действия карбодиимидов; оказалось, что если смесь двух фосфатов заменить смесью фосфата с фосфамидом или еще лучше с фосфоморфолидом, то конденсация идет без конденсирующего средства и избирательно, причем вместо смеси трех пирофосфатов образуется только один несимметричный пирофосфат.

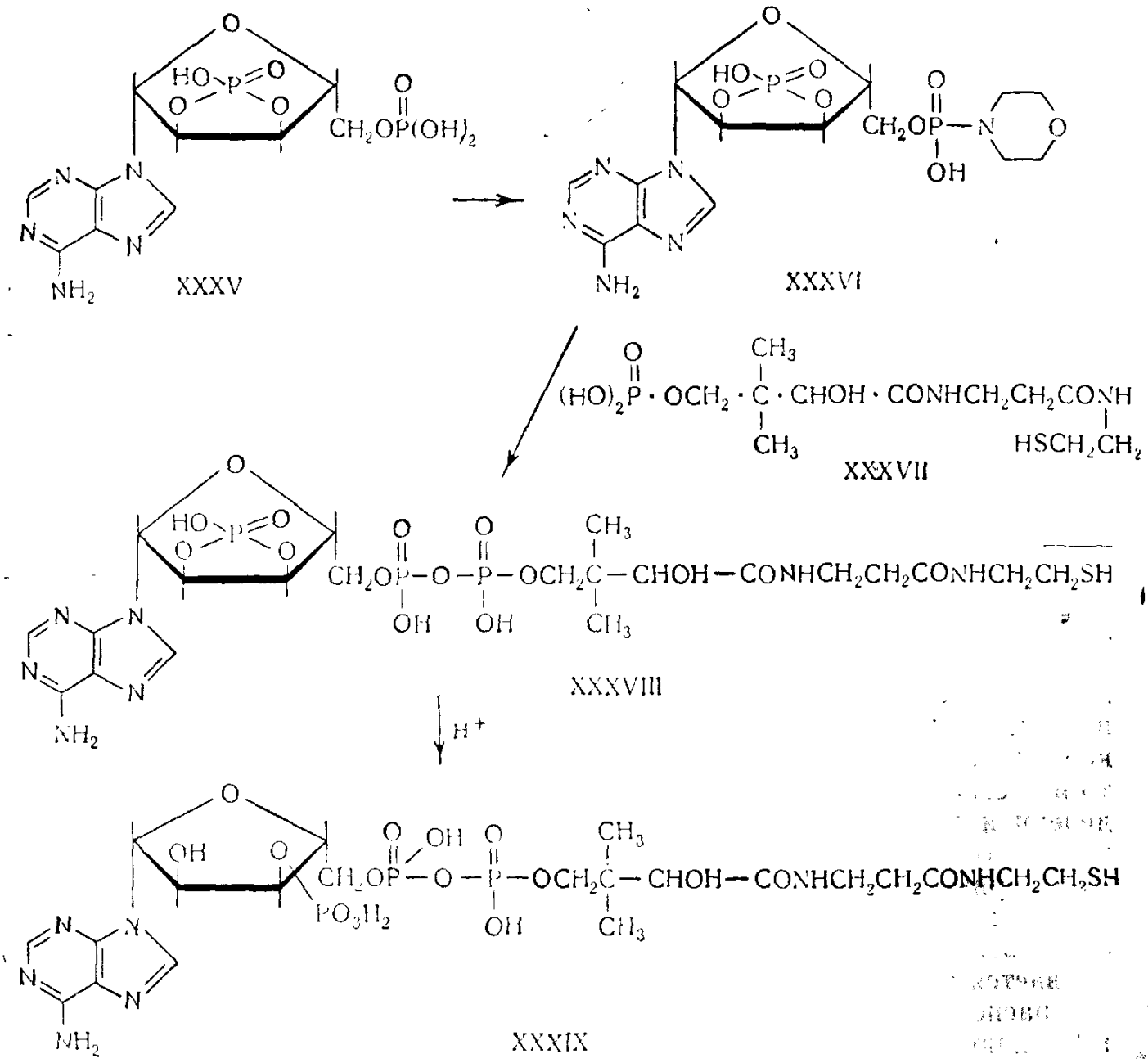
Реакция проводится в пиридине и дает высокие выходы (40—60%). Исходные амиды монозамещенных фосфатов получаются при обработке самих фосфатов аммиаком или аминами в присутствии карбодиимида и таким образом вполне доступны.





Этим путем с высокими выходами были получены УДФГ и ФАД. Наивысшим достижением можно считать синтез коэнзима А, который осуществлен этим методом в 1959 г. (см. стр. 245).

Исходным веществом для синтеза коэнзима А служит циклический дифосфат аденозина (XXXV). При обработке его морфолином в присутствии дициклогексилкарбодиимида в реакцию вступает только фосфорная группа в положении 5′, а циклический фосфат не затрагивается и получается морфолид (XXXVI). При конденсации его с пантотеин-4′-фосфатом (XXXVII) образуется аналог коэнзима А, содержащий циклическую фосфатную группировку (XXXVIII); после гидролиза в кислой среде эта группировка раскрывает и дает смесь двух фосфатов, один из которых является коэнзимом А (XXVIII), а другой его изомером, содержащим фосфатную группу в положении 2′-аденозиновой части молекулы. Смесь



обоих изомеров была разделена хроматографией на целлюлозе, в результате чего был выделен синтетический коэнзим А, полностью идентичный природному продукту.

ЛИТЕРАТУРА

А. В. Котельникова. Успехи современной биологии, 1957, **43**, 133.

Лелуар. Уридиновые коферменты. Современные проблемы биохимии. ИЛ., 1957, стр. 380.

J. Baddiley, J. Buchanan. Recent developments in the biochemistry nucleotide coenzymes. Quart. Rev. 1958, XII, 152.

G. Huges, G. Kenner, A. Todd. Synthesis of diphosphopyridine nucleotides (DPN). J. Chem. Soc., 1957, 3733.

H. Khorana, J. Moffat. The total synthesis of coenzyme A. J. Amer. Chem. Soc., 1959, **81**, 1265.

J. Moffat, H. Khorana. New and improved synthesis UDPG and FAD. J. Am. Chem. Soc., 1958, **80**, 3756.

Глава 5

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Исключительное биологическое значение полинуклеотидов, известных обычно под именем нуклеиновых кислот, уже было отмечено во введении к этому разделу книги. Вполне естественно поэтому стремление выяснить максимально полно строение этих высокомолекулярных веществ, являющихся, наряду с белками и полисахаридами, важнейшим типом биогенных полимеров.

Здесь термин «строение», как и по отношению к другим высокомолекулярным соединениям, следует понимать в том смысле, который ему придают в химии высокомолекулярных веществ. Поскольку любое высокомолекулярное вещество представляет собой смесь полимергомологов, то под строением в данном случае понимают не структуру какой-то определенной молекулы, а строение усредненной молекулы полимера и, в первую очередь, если известно строение мономера, основной тип связи мономерных единиц между собой. Структура возникающих в результате ассоциации полимерных цепей агрегатов представляет собою следующую ступень понятия и «строение высокополимера». В этом случае рассматривается уже не расположение ковалентных связей и атомов, а взаимное расположение полимерных цепей в пространстве, их конформация и возникающие между ними межмолекулярные силы.

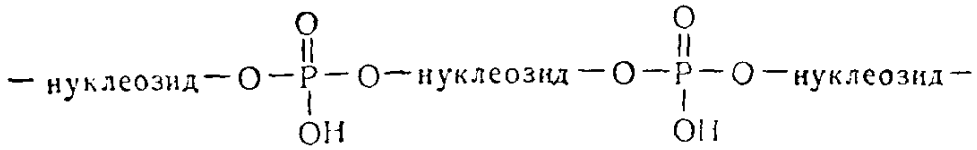
В последующем изложении мы вначале уделим внимание вопросам структуры нуклеиновых кислот в понимании химика-органика, после чего коснемся второй стороны дела и связанного с ней вопроса о биологической функции НК. Нужно иметь в виду, что макромолекулярная структура и конформация полимерной цепи оказывают чрезвычайно существенное влияние на биологическую функцию НК, как и на биологические функции всех биогенных полимеров.

Как было указано ранее, нуклеиновые кислоты делятся на дезоксирибонуклеиновые (ДНК), являющиеся полимерами (а точнее продуктами поликонденсации) дезоксирибонуклеотидов, и рибонуклеиновые (РНК) — полимеры рибонуклеотидов. Строение, а также физико-химическая характеристика и биологическая функция ДНК и РНК различны, и поэтому эти вопросы будут рассматриваться отдельно для каждого вида полимера.

СТРОЕНИЕ ПОЛИМЕРНОЙ ЦЕПИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

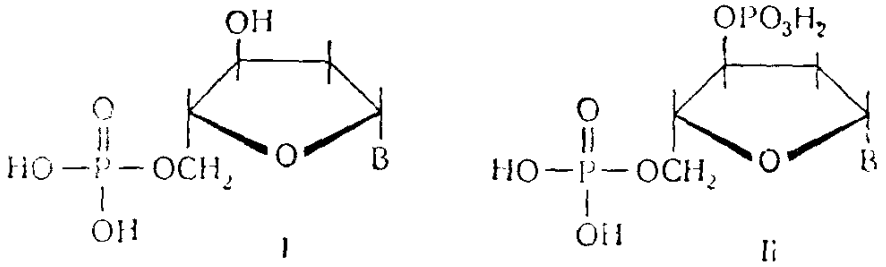
Строение ДНК как продуктов поликонденсации дезоксирибонуклеотидов вытекает из того, что при их гидролизе единственным продуктом реакции оказываются дезоксирибонуклеотиды. Огромный молекулярный вес ДНК говорит о высокой степени полимеризации этого биогенного полимера.

Общий характер построения полимерной цепи ДНК явствует из следующих экспериментально установленных фактов. ДНК имеет кислый характер, и данные титрования показывают присутствие только первичных гидроксилов фосфорной кислоты. Таким образом, они содержат структурную единицу дизамещенного эфира фосфорной кислоты. Вместе с тем было показано, что пирофосфатная или тем более полифосфатная связь в них отсутствует. Из этих данных следует, что полимерная цепь ДНК может быть построена только по типу:



Для окончательного решения вопроса о строении полимера необходимо выяснить характер связи фосфатных остатков с нуклеозидами, т. е., другими словами, место связи остатка фосфорной кислоты с рибозной частью нуклеозида.

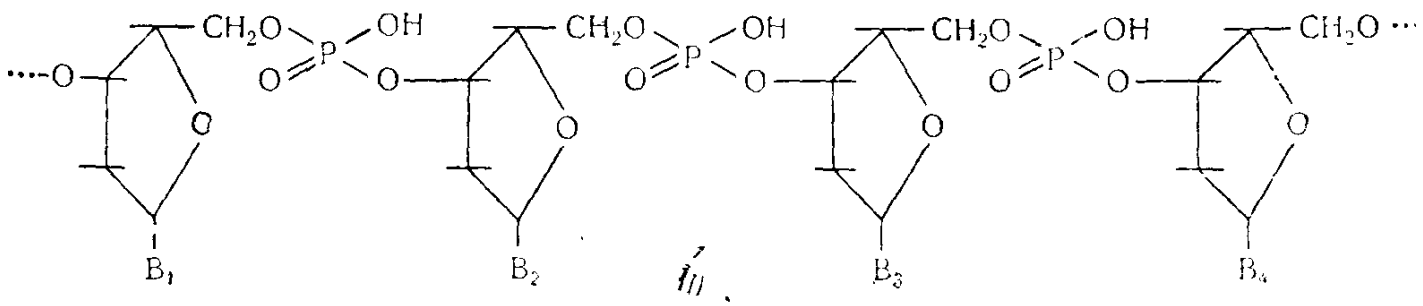
Это было достигнуто изучением гидролиза ДНК в различных условиях. Ферментативный гидролиз ДНК в присутствии фосфодиэстеразы змеиного яда дает 5′-фосфаты дезоксинуклеозидов (I). Напротив, при кислотном гидролизе ДНК удалось выделить 3′,5′-дифосфаты пиримидинзедоксинуклеозидов (II).



где B – остаток основания

Из этого достаточно ясно, что связь нуклеозидных остатков в полимере осуществляется фосфатной группой таким образом, что один нуклеозид этерифицирован своим гидроксилом у $C'_{(3)}$, а другой — гидроксилом у $C'_{(5)}$. Другими словами, основной связью в полимере является $C'_{(3)}$ — $C'_{(5)}$-связь между дезоксирибозными остатками, осуществляемая фосфатными группами.

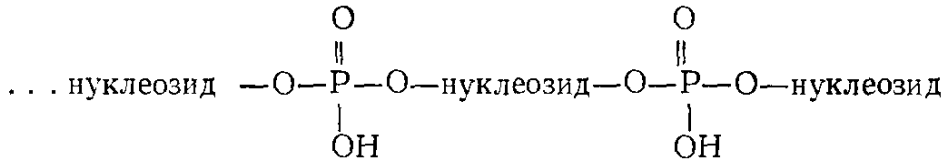
Таким образом, общее строение полимерной цепи ДНК можно представить как (III).



Предположение о возможности иного строения полимера с регулярно или нерегулярно перемежающимися связями нуклеозидных остатков по типу 3′ — 3′ и 5′ — 5′ должно быть отвергнуто, так как оно не удовлетворяет всем экспериментальным данным. В частности, полимер такого типа не должен был бы полностью деполимеризоваться под действием фер-

мента змеиного яда, избирательно разрывающего только связь фосфатной группы, находящейся у $C'_{(5)}$-атома дезоксирибозного остатка.

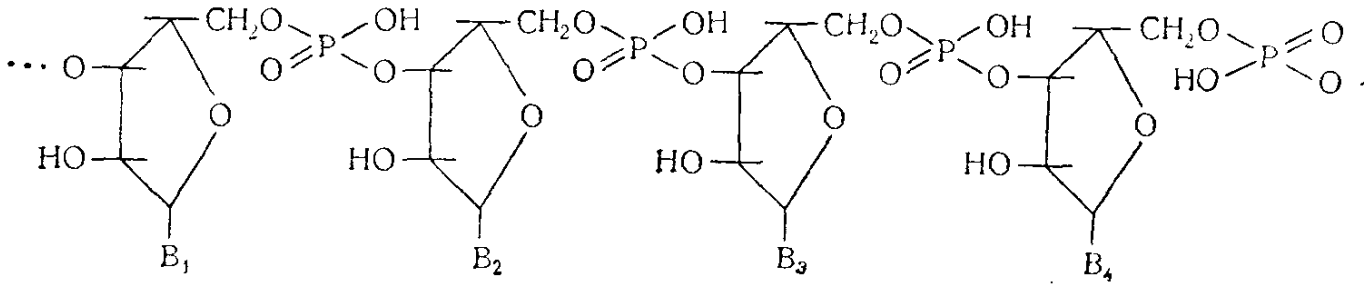
Более сложным оказался вопрос о строении полимерной цепи в рибонуклеиновых кислотах. РНК также являются высокомолекулярными соединениями, цепь которых состоит из рибонуклеозидов. Полимер при гидролизе распадается на соответствующие мономеры — рибонуклеотиды и, следовательно, РНК являются, подобно белкам и полисахаридам, продуктами поликонденсации мономеров, происходящей с отщеплением воды. Молекулярный вес РНК ниже молекулярного веса ДНК и колеблется в значительных пределах, достигая 1 000 000. РНК, будучи кислотами, при титровании показывают присутствие только первичного кислотного гидроксила. Так как известно, что пирофосфатная связь в них также отсутствует, то единственным возможным типом построения полимерной цепи является тип:



Далее необходимо, как при установлении строения ДНК, решить вопрос о том, через какие гидроксильные группы рибозных остатков связаны между собою соседние в полимерной цепи нуклеозиды. Для этого, как и в предыдущем случае, были привлечены данные, полученные при гидролизе РНК. Ферментативный гидролиз РНК дает 5′-фосфаты нуклеозидов, тогда как при щелочном гидролизе образуется смесь 2′- и 3′-фосфатов нуклеозидов. При этом весьма существенным обстоятельством, как будет видно далее, является то, что РНК легко гидролизуются в щелочной среде, тогда как ДНК в этих условиях совершенно устойчивы.

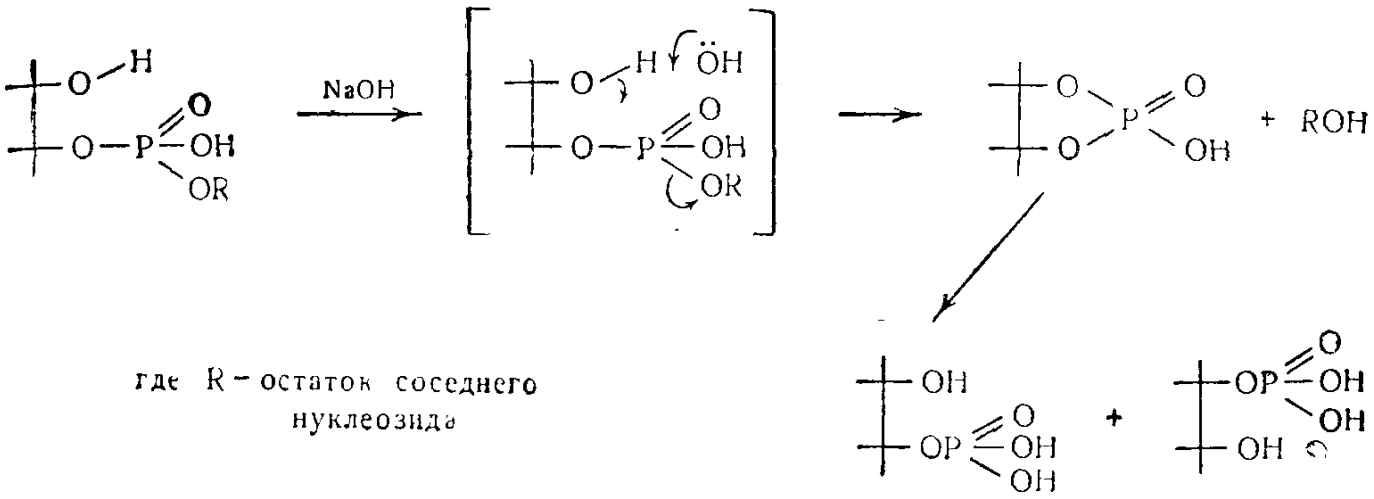
Из данных, полученных при гидролизе, ясно, что полимерная цепь РНК может быть построена либо по типу 3′-5′-связи, либо по типу 2′-5′-связи между соседними нуклеозидами. Возможен, наконец, и смешанный тип регулярно или нерегулярно перемежающейся 3′-5′ и 2′-5′-связи.

Выбор между этими возможностями удалось сделать после того, как были найдены специфические ферменты, гидролитически отщепляющие остаток фосфорной кислоты только от третьего углеродного атома рибозного остатка и не затрагивающие эту группировку, если она связана с $C_{(2)}$. Указанная специфичность ферментов была проверена путем дефосфорилирования 2′-фосфатов и 3′-фосфатов нуклеозидов, из которых только вторые расщеплялись. Оказывалось, что эти ферменты — панкреатическая рибонуклеаза для пиримидиновых нуклеотидов и нуклеаза селезенки для пуриновых — легко гидролизуют рибонуклеиновые кислоты, полностью расщепляя их до мононуклеозидов. Это ясно показывает, что в РНК имеется налицо только 3′-5′-связь, так как только эта связь может подвергаться действию указанных специфических ферментов. Общая структура РНК может быть представлена в виде (IV).



Возникает вопрос, почему в таком случае гидролиз РНК щелочью дает вместо 3′-фосфатов нуклеотидов смесь 2′- и 3′-нуклеотидов. Более того, неясно, почему вообще РНК неустойчивы к действию щелочи, тогда как другие диэфиры фосфорной кислоты, в том числе и ДНК, устойчивы в этих условиях.

Эта долгое время непонятная особенность РНК была разъяснена Тоддом и Брауном, предложившим следующий механизм гидролиза РНК:



где R – остаток соседнего нуклеозида

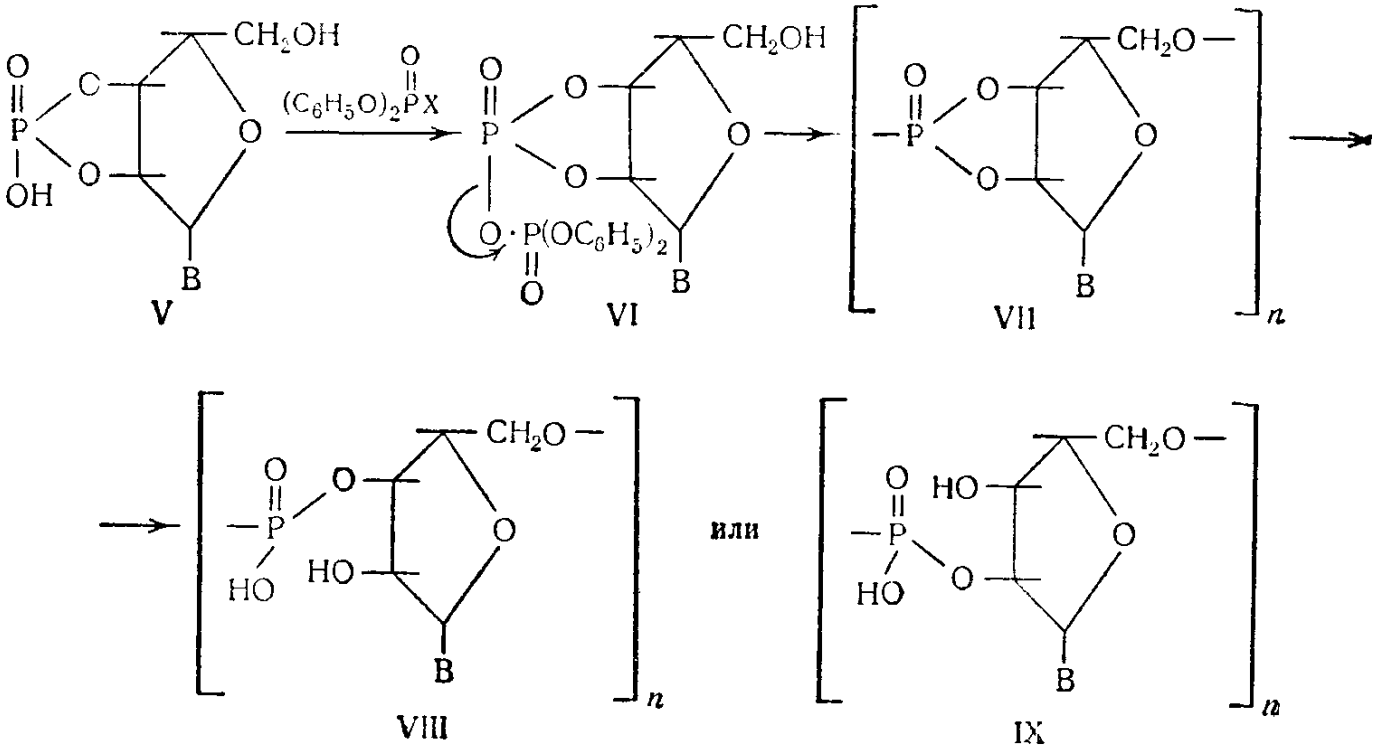
Как показывает схема, существенную роль в гидролизе фосфорноэфирной связи, которая является главной связью полимерной цепи, играет свободная гидроксильная группа, находящаяся у соседнего углеводного атома $C_{(2)}$. Ее взаимодействие с атакующим анионом OH^- и соседней фосфатной группой приводит к замыканию циклического фосфата, который возникает как промежуточный продукт гидролиза. Далее сам циклический фосфат распадается в этих условиях, образуя смесь 2′- и 3′-фосфатов. При рассмотрении этого механизма становятся понятными обе отмеченные выше особенности — образование смеси изомерных нуклеотидов и неустойчивость РНК к щелочам. В самом деле, смесь изомерных нуклеотидов неизбежно должна образоваться, если реакция проходит через стадию циклического фосфата, который, как указывалось ранее (стр. 227), всегда дает смеси этих изомеров. Ясна также и роль соседнего гидроксила, который делает связь кислород — фосфор чувствительной по отношению к щелочам. Понятно, что обычные диэфиры фосфорной кислоты или ДНК, где соседние гидроксильные группы отсутствуют, будут иметь нормальную устойчивость к щелочам. Соседняя гидроксильная группа в монофосфатах α-гликольной системы облегчает гидролиз и других соединений, например липоидов.

Приведенный выше механизм щелочного гидролиза РНК был подтвержден экспериментально, как кинетическими измерениями, так и выделением из продуктов реакции циклических фосфатов нуклеозидов.

Таким образом, общий характер построения полимерной цепи нуклеиновых кислот (как ДНК, так и РНК) в настоящее время можно считать окончательно выясненным. Он подтверждается не только приведенными данными о деструкции полимерной цепи, но и различными физико-химическими измерениями, в особенности данными рентгеноструктурного анализа НК.

В самое последнее время были сделаны первые удачные попытки искусственного получения полинуклеотидов посредством поликонденсации мононуклеотидов чисто химическими методами. Биохимическая полимеризация мононуклеотидов под действием некоторых специфических ферментов стала известна несколько ранее и не будет рассматриваться в этой книге.

В 1958—1959 гг. Майклсону удалось найти метод полимеризации мононуклеотидов, который приводит к получению полимеров, являющихся олигонуклеотидами со степенью полимеризации 5—20 и близко напоминающих природные олигонуклеотиды, получающиеся при частичном гидролизе природных РНК. Если циклические 2′, 3′-фосфаты нуклеотидов подвергать действию дифенилхлорфосфата и тетрафенилпирофосфата, то происходит быстрая полимеризация и образуются олигонуклеотиды. Можно избежать выделения циклического фосфата и подвергать действию одного из указанных конденсирующих средств непосредственно 2′- или 3′-фосфаты нуклеозидов, которые вначале в этих условиях превращаются в циклические фосфаты (см. стр. 227). Механизм полимеризации фосфатов может быть представлен следующим образом:



Согласно этому предположению, циклический фосфат (V) вначале образует при действии конденсирующего средства смешанный ангидрид с дифенилфосфорной кислотой (VI), последний при фосфорилировании гидроксила, находящегося у $C_{(5)}$ другого нуклеотида, дает полимер, содержащий группировку циклического фосфата (VII), которая далее разрывается, образуя полимер с 3′-5′ (VIII), 2′-5′ (IX) или смешанными связями.

Полученные полимеры по своим свойствам напоминают природные олигонуклеотиды: под действием кислот и щелочей они распадаются с образованием смеси 2′- и 3′-фосфатов нуклеозидов, под действием фермента змеиного яда дают 5′-фосфаты нуклеозидов. Однако их отношение к панкреатической рибонуклеазе, избирательно расщепляющей только 3′-фосфаты, отличает их от природных РНК. Этот фермент, как уже указывалось выше (стр. 249), полностью расщепляет природный полимер; синтетические полимеры, напротив, расщепляются лишь частично и разбиваются на олигонуклеотиды с меньшей степенью полимеризации, уже не способные к расщеплению указанным ферментом, но подвергающиеся кислому и щелочному гидролизу. Этот результат вполне естествен и подтверждает, что в синтетическом полимере, в отличие от природных РНК, наряду с 3′-5′-связью (VIII) имеется и 2′-5′-связь (IX), не расщепляющаяся панкреатической рибонуклеазой. Образование последней происходит при раскрытии полимерного циклического фосфата (VII) наряду с полимером, характеризующимся 3′-5′-связью.

Присутствие 2′-5′-связи является главным принципиальным отличием синтетических полинуклеотидов от природных РНК, что, впрочем, мало сказывается на их физических свойствах.

По разработанному Майклсоном методу были получены как гомополимеры, содержащие лишь один мономер (например, полиаденилова кислота из аденозинфосфата и полиуридиловая кислота из уридинфосфата), так и гетерополимеры, содержащие два различных мономера (например, смешанный полимер, содержащий гуанин и аденозин). Наконец, при полимеризации смеси всех природных нуклеотидов, выделенных из РНК, т. е. фосфатов аденозина, гуанина, цитидина и уридина, был получен синтетический аналог природных РНК.

Естественно, в смешанных полимерах, в том числе и в «синтетической РНК», помимо наличия 2′-5′-связи, отсутствующей в природном полимере, порядок связи мономерных единиц совершенно случаен и не может соответствовать строго определенному порядку этих связей в природных РНК. Это наиболее важное отличие характерно для всех синтетических гетерополимеров, так как существующие методы полимеризации еще не позволяют осуществить направленный синтез гетерополимера с любым заданным чередованием очень близких по химическому строению, но все же различных мономерных единиц. Поэтому метод получения полинуклеотидов, предложенный Майклсоном, нельзя использовать для получения полинуклеотидов специфического строения, и он может быть назван лишь методом неизбирательной полимеризации. Пока еще нельзя предложить путь получения специфических полимерных нуклеотидов чисто химическими методами.

О ТОНКОЙ СТРУКТУРЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Из предыдущего подраздела этой главы следует, что в настоящее время общий характер построения полимерной цепи нуклеиновых кислот и главная форма связи в ней достаточно выяснены и косвенно подтверждены неспецифическим синтезом полимера. Иными словами, в химии нуклеотидов достигнут тот уровень, который в химии белка и пептидов знаменовался установлением пептидной связи как главной формы связи в белке. Однако в настоящее время химия пептидов пошла в своем развитии гораздо дальше, так как были развиты методы, позволяющие устанавливать последовательность отдельных мономеров (аминокислот) в гетерополимерной молекуле пептида. Эти методы, основанные на ступенчатой деструкции пептидов, позволили, как известно, установить строение многих простых и более сложных пептидов (в том смысле, в каком понимается термин «строение» в классической органической химии).

Химия нуклеотидов в настоящее время только подходит к решению важнейшего вопроса об установлении строения полинуклеотидов в органохимическом смысле этого слова, которое мы в дальнейшем будем называть тонким строением полинуклеотидов.

Исключительная важность этого вопроса для решения биологических проблем очевидна, так как именно последовательность связи отдельных мономерных единиц в любом биогенном полимере и определяет его специфичность. Такие определяющие жизнедеятельность процессы, как передача наследственных признаков и биосинтез белка, естественно, целиком основаны на высокой специфичности нуклеиновых кислот, а стало быть без установления тонкой структуры индивидуальных ДНК и РНК, т. е. без установления в них последовательности мономерных единиц, не могут быть должным образом решены и эти проблемы естествознания. Для установления последовательности мономерных единиц

в НК очевидно, должны быть развиты методы строго специфического разрыва полимерной цепи и последовательной деструкции этой цепи, начиная с отщепления терминальных мононуклеотидов, подобно тому, как это делается в настоящее время для пептидов.

В отличие от пептидов, набор мономеров в НК невелик и ограничивается по существу четырьмя главными мононуклеотидами, а очень незначительное количество редких мононуклеотидов можно вначале не принимать в расчет. Это делает задачу более легкой по сравнению с установлением строения пептидов. Однако, с другой стороны, строение мононуклеотидов значительно более сложно, чем строение аминокислот, и их высокая лабильность необычайно усложняет эту задачу. Вследствие этого удовлетворительного решения этой задачи еще нет, хотя эта проблема и является главнейшей проблемой химии нуклеотидов сегодняшнего дня.

Далее будут изложены результаты первых попыток последовательной деструкции полимерной цепи, которые были сделаны исследователями в самые последние годы. Несмотря на то, что эти попытки не привели еще к полноценному решению вопроса, некоторые из приведенных работ открывают большие перспективы и вселяют уверенность, что задача будет удовлетворительно решена в ближайшем будущем.

Главная трудность при поисках метода последовательной деструкции полимерной цепи нуклеиновых кислот заключается в том, что при гидролизе полимерная цепь нуклеиновой кислоты разрушается одновременно по всем фосфорноэфирным связям, так как специфичность гетероциклического основания не сказывается в достаточной мере на прочности этой связи. Последнее понятно, так как основание не связано непосредственно с фосфатной группой, а находящийся между ними остаток моносахарида не содержит кратных связей или каких-либо иных «электропроводных» группировок.

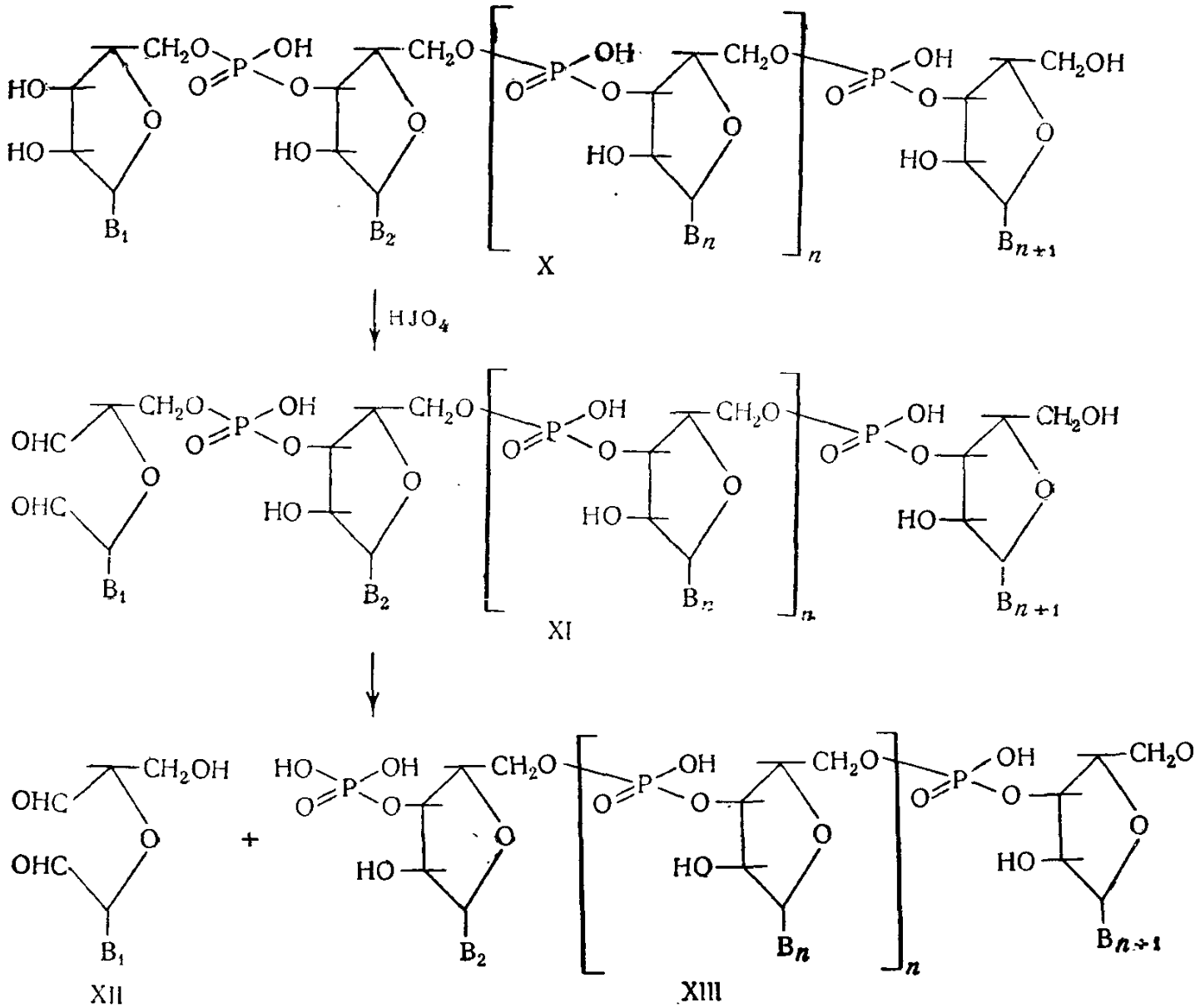
Единственно, что удалось сделать в настоящее время,— это найти пути избирательного отщепления пиримидиновых или пурновых оснований с разрывом N-гликозидных связей и сохранением полимерной цепи.

Так, при действии минеральных кислот или меркаптоуксусной кислоты получается так называемая апуриновая кислота, а при действии гидразина — апиримидиновая кислота. Естественно, что эти продукты деструкции, в цепи которых имеются моносахаридные остатки, содержащие свободный гликозидный гидроксил, могут далее быть расщеплены каким-либо известным в химии углеводов способом по местам таких освобожденных от оснований остатков моносахаридов. Однако достигаемая таким способом деструкция полимерной цепи НК недостаточно специфична, так как приводит к разрыву около 50% всех связей в полимере. Очевидно следует найти другие методы, позволяющие более избирательно разрывать связи в полимерной цепи.

Другой подход к решению задачи об установлении последовательности мономеров в НК связан с развитием методов последовательного отщепления мономеров с одного из концов полимерной цепи. Хотя трудно представить, чтобы этим путем можно было осуществить деструкцию полимера, содержащего тысячу и более мономерных единиц, что имеет место в природных НК, однако значение этого пути несомненно хотя бы для установления строения олигонуклеотидов, получающихся при частичном разрыве полимерной цепи. В настоящее время известны подходы к решению этой задачи как для полирибонуклеотидов, так и для полидезоксирибонуклеотидов.

Тодд и Браун предложили для осуществления последовательного расщепления полимерной цепи РНК использовать следующий принцип. В РНК с одного конца цепи находится нуклеотид, имеющий свободные

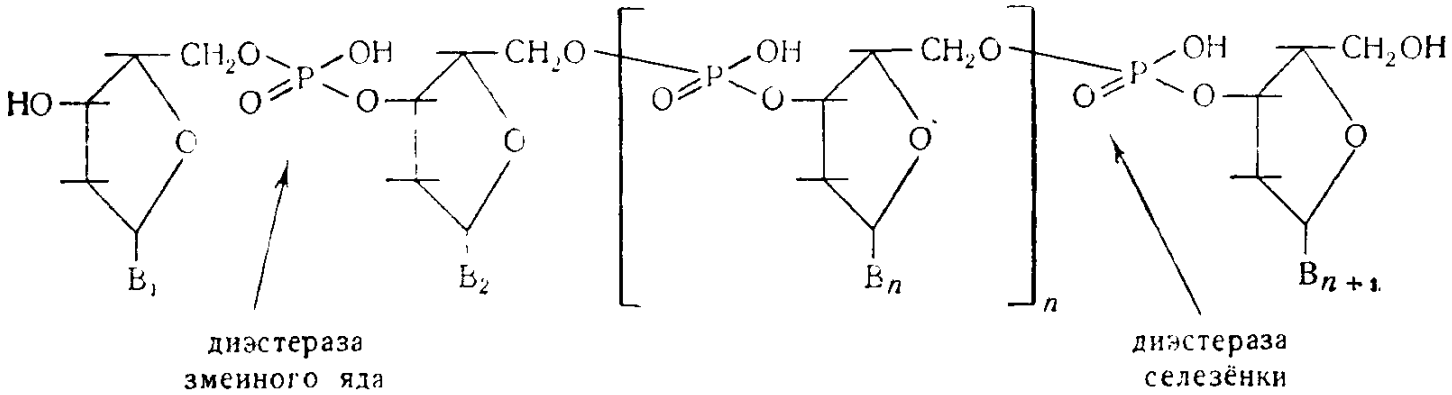
гидроксилы у $C'_{(2)}$ и $C'_{(3)}$-атомов; терминальный нуклеозид другого конца цепи имеет фосфатную группу у $C'_{(5)}$-атома рибозного остатка. Гидроксильные группы у $C'_{(2)}$ и $C_{(3)}$-атомов в этом последнем свободном и образуют α-гликольную систему, которая является *единственной* α-гликольной структурой во всей полимерной цепи. Если такой полимер (X) подвергать окислению иодной кислотой, то указанная α-гликольная группировка терминального нуклеотида окислится в диальдегид (XI), а вся остальная цепь сохранится. В (XI) сложноэфирная фосфатная группа у $C'_{(5)}$ находится в β-положении к альдегидной группе и потому должна очень легко элиминироваться с отщеплением (XII), как всякая спиртовая группа или ее производное в β-оксиальдегиде. Таким образом, можно, и это действительно удалось сделать, подобрать условия, в которых отщеплению подвергается только этот терминальный окисленный мононуклеотид, чем и достигается избирательность при его отщеплении.



Далее в полученном новом полимере (XIII) можно, подвергнув его действию специфического фермента, отщепить обнаруживающуюся новую 3′-фосфатную группу, не затрагивая всей полимерной цепи. При этом в следующем нуклеотиде снова обнажается α-гликольная группировка и, повторив весь цикл, снова можно отщепить следующий нуклеотид и т. д. Этот метод представляет несомненный интерес, хотя до сих пор он и не нашел серьезного применения в практике, что связано, скорее всего, с его относительной сложностью и многостадийностью.

Прием, предложенный Тоддом и Брауном для деструкции полирибонуклеотидов, естественно, непригоден для деструкции полидезоксирибонуклеотидов, так как последние не содержат α-гликольной группировки, хотя принципы, примененные в первом случае, могут быть использованы для деструкции цепи ДНК *.

В 1958 г. Хорана предложил для последовательной деструкции полидезоксирибонуклеотидов использовать избирательный ферментативный гидролиз. Были найдены два специфических фермента, которые избирательно расщепляли 3′-5′-связь дизамещенного эфира по месту связи $C_{(3)}$—O или $C'_{(3)}$—$C'_{(5)}$ — O. Фосфодиэстераза селезенки расщепляла эту связь по месту $C_{(5)}$—O, оставляя $C'_{(3)}$-фосфат, диэстераза змеиного яда — связь $C'_{(3)}$ —O, оставляя $C'_{(5)}$-фосфат. Так как в полимерной цепи ДНК или соответствующего олигонуклеотида с одного края всегда находится нуклеотид со свободной $C'_{(3)}$-гидроксильной группой, а с другой стороны цепь заканчивается нуклеотидом со свободным $C'_{(5)}$-гидроксилом, то, очевидно, можно, действуя тем или иным ферментом, последовательно разрушать цепь с одного из ее концов, идентифицируя отщепляющиеся мононуклеотиды с помощью бумажной хроматографии.



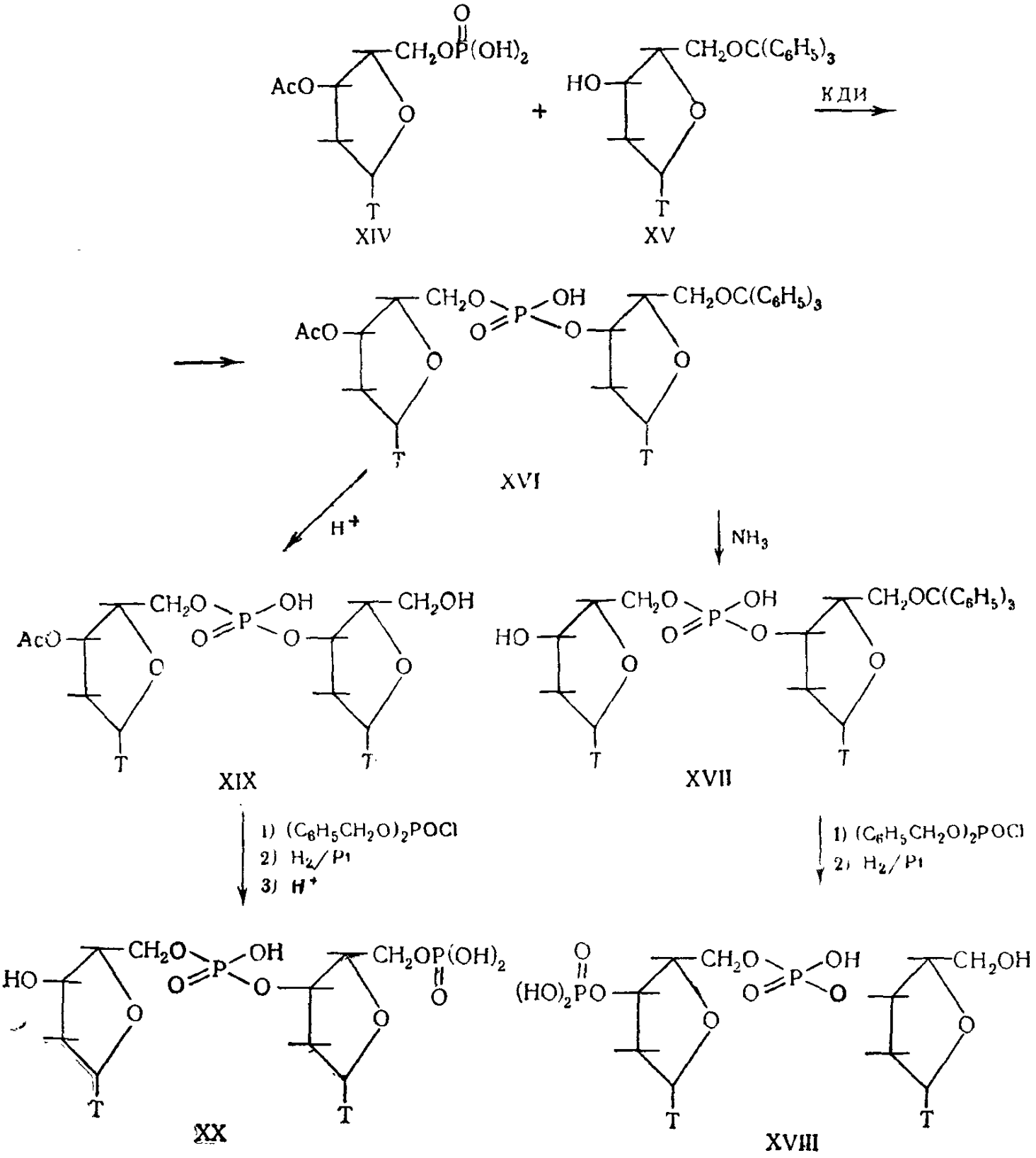
Этот прием кажется весьма удобным с практической точки зрения, хотя пока кратко сообщалось только об использовании его при изучении распада синтетического гомополимера — политимидиловой кислоты, и поэтому о его реальном значении трудно еще судить.

Как всегда при выяснении строения сложного органического соединения, в том числе и специфического полимера, можно идти и синтетическим путем, т. е. получать соединения с заранее заданным строением, и, сравнивая их с веществами природного происхождения, выносить суждение о строении последних. При определении строения полинуклеотидов речь должна идти о синтезе специфических олигонуклеотидов, т. е. таких, в которых имеется совершенно определенная заданная последовательность мононуклеотидных звеньев. Рассмотренный выше метод неспецифической полимеризации мононуклеотидов (стр. 251) для этой цели непригоден, так как необходимо иметь метод, который позволил бы создать цепь постепенно, наращивая мононуклеотидные звенья в нужном порядке.

Эти задачи сводятся в сущности к последовательному фосфорилированию нуклеозидов, причем фосфорилирующим агентом должен служить нуклеотид, который тем самым займет соседнее место в создающейся полинуклеотидной цепи. Поскольку методы фосфорилирования в настоящее время развиты достаточно хорошо, то главной задачей при разработке методов синтеза полинуклеотидов является осуществление изби-

* В 1960 г. Тоддом найдена реакция, которая может оказаться полезной для последовательной деструкции ДНК. Каталитическим окислением CH_2OH-группы дезоксинуклеотида получается кислота, в которой COOH-группа находится в β-положении к фосфорноэфирной связи, вследствие чего последняя может избирательно расщепляться.

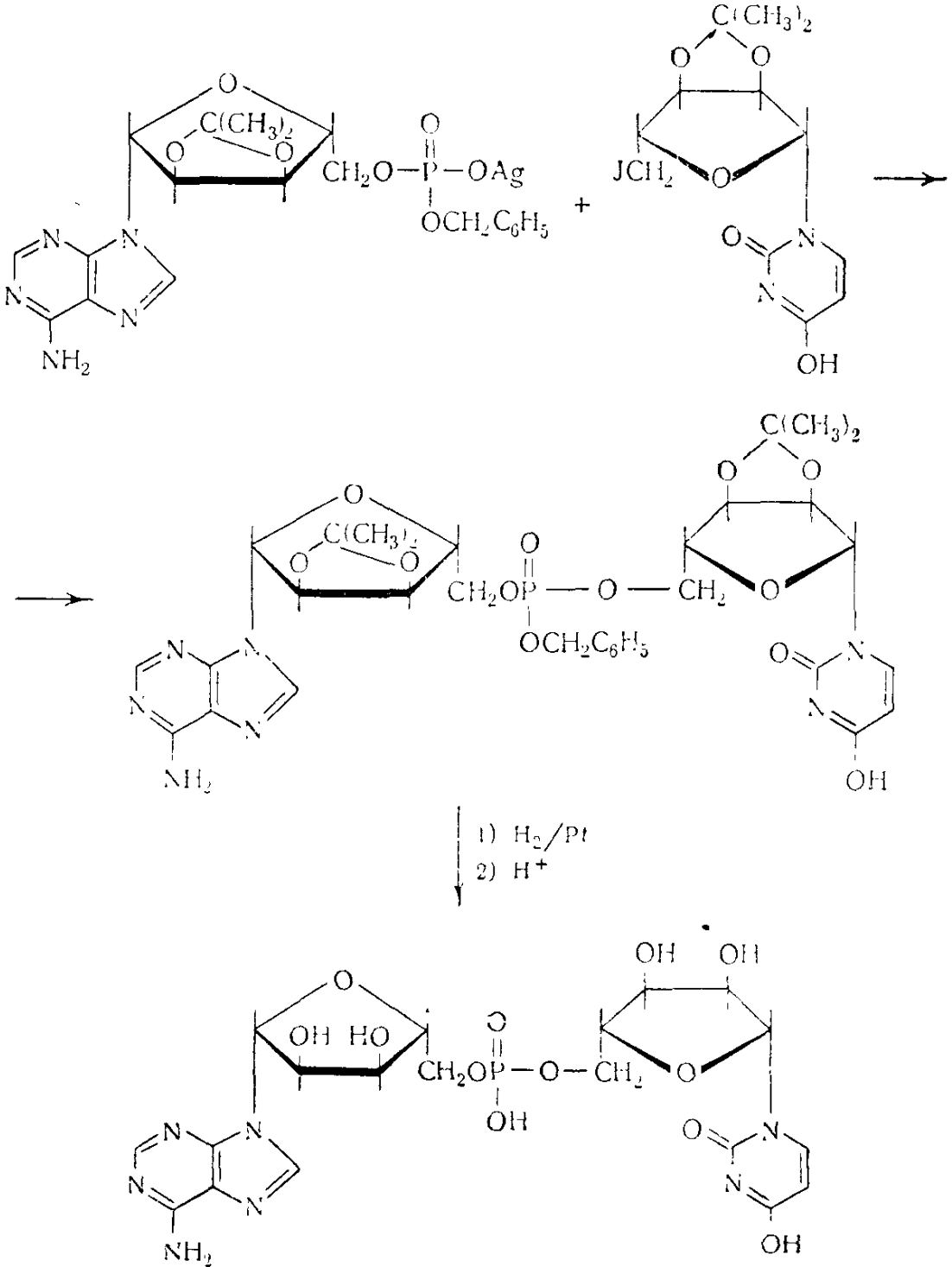
рательной защиты нужных гидроксильных групп в подлежащих конденсации нуклеотидах. На специфические трудности этой задачи уже указывалось ранее (стр. 224). Очевидно, эта проблема значительно проще решается для дезоксирибонуклеотидов, не имеющих гидроксильной группы у $C'_{(2)}$-атома. Путь синтеза олигодезоксинуклеотидов, пока, правда, осуществленный только для динуклеотидов, но имеющий более общее значение, был предложен в 1958 г. Хораной. На примере синтеза дитимидина, содержащего 3′—5′-связь и аналогичного тем самым природному нуклеотиду, этот путь может быть изображен схемой:



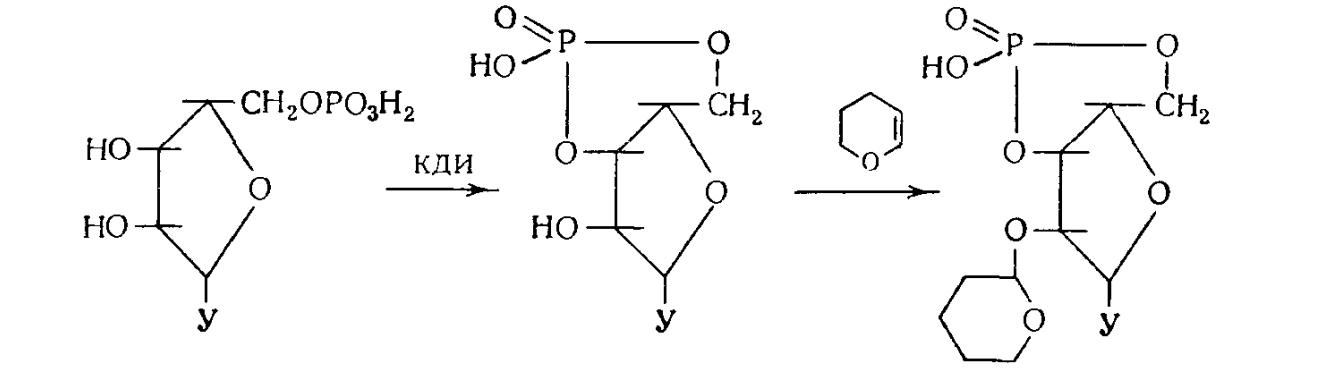
КДИ — дициклогексилкарбодиимид, Т — остаток тимина. 3′-Ацетилтимидин-5′-фосфат (XIV) при конденсации с 5′-тритилтимидином (XV), которая протекает в присутствии карбодиимида или толуолсульфохлорида в пиридине, дает вещество (XVI), гидроксильные группы которого полностью, но специфично замещены. Вещество (XVI) является ключевым

исходным соединением для синтеза обоих изомерных динуклеотидов. Так, снятием ацетильной группы действием аммиака получаются (XVII) с защищенным гидроксилом у $C'_{(5)}$, фосфорилирование которого дибензилхлорфосфатом дает дитимидин (XVIII), содержащий фосфатную группу у $C'_{(3)}$. Напротив, если (XVI) подвергнуть обработке кислотой, то снимается тритильная защита и в образующемся соединении (XIX) свободная гидроксильная группа у $C'_{(5)}$ может быть тем же методом профосфорилирована; после снятия защиты получается другой изомер дитимидина, который содержит фосфатную группу у $C'_{(5)}$ (XX).

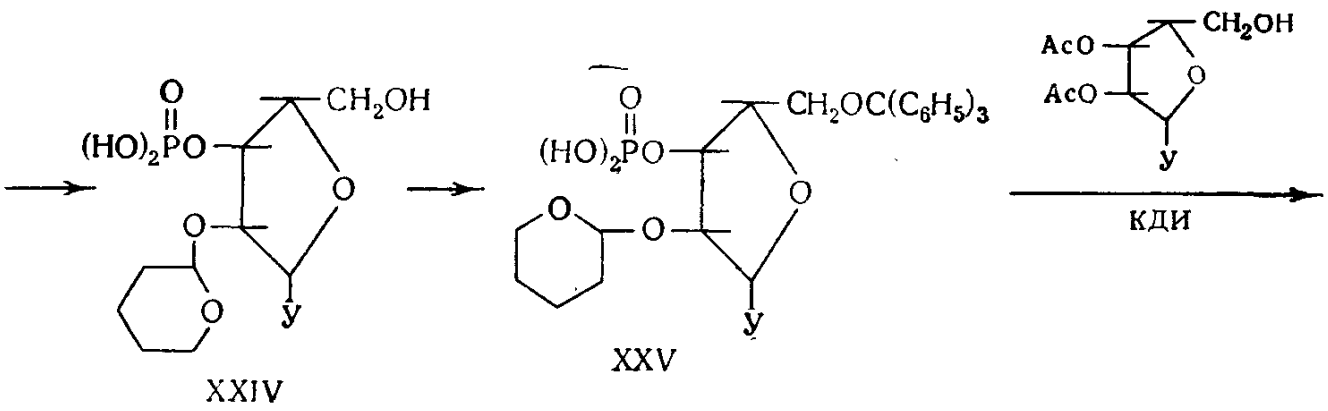
Очевидно, что этот подход можно было бы использовать для синтеза полирибонуклеотидов лишь в том случае, если создать методы специфической защиты гидроксильной группы у $C'_{(2)}$, при которых не затрагивался бы $C'_{(3)}$-гидроксил. Как указывалось ранее, до самого последнего времени таких методов защиты не существовало, и поэтому первыми синтезами дирибонуклеотидов были синтезы соединений, содержащих не 3′-5′-связь, имеющуюся в природных веществах, а их изомеры. Примером такого синтеза может служить синтез динуклеотида из аденозина и уридина, связанных 5′-5′ связью, который осуществлен Тоддом несколько лет назад; принцип такого синтеза ясен из схемы



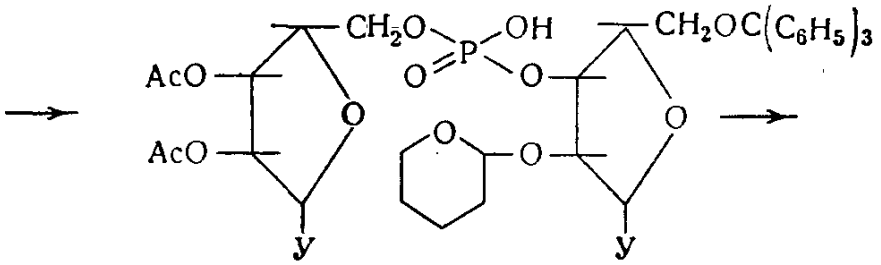
Лишь в середине 1959 г. появилось сообщение Хораны, которое открывает путь к простому и изящному синтезу полирибонуклеотидов, содержащих нужную 3′-5′-связь. Возможность такого синтеза вскрылась после того, как удалось установить, что 5′-фосфаты нуклеотидов при взаимодействии с карбодиимидом в условиях большого разведения дают циклические 3′-5′-фосфаты, как, например, (XXII). В соединениях этого типа имеется единственная свободная гидроксильная группа, которая может быть защищена подходящим образом, чем будет разрешена главная проблема синтеза — создание специфической защиты $C_{(2)}$′-гидроксила. Предложенный Хораной путь ясно виден на примере осуществленного им синтеза диуридилфосфата.



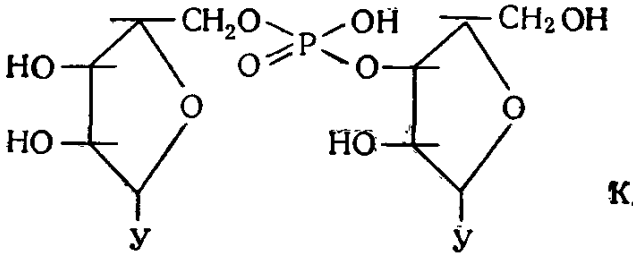
XXI XXII XXIII



XXIV XXV



XXVI



XXVII

КДИ – дициклогексилкарбодиимид

У – остаток урацила

Уридин-5′-фосфат (XXI) при действии дициклогексилкарбодиимида в условиях высокого разведения дает циклический 3,5′-дифосфат

(XXII), свободная гидроксильная группа которого защищается получением тетрагидропиранольного производного (XXIII). При обработке последнего щелочью образуются нуклеотид (XXIV) и его изомер, имеющий фосфатную группу у $C_{5'}$. Соединение (XXIV) тритилируется и тритильное производное (XXV) конденсируется в присутствии карбодиимида с 2′,3′-диацетилуридином. Полученный продукт конденсации (XXVI) после соответствующей обработки дает уридил-5′-3′-уридин (XXVII).

Приведенный синтез диуридилфосфата, а так же синтез дитимидина (стр. 256), являются первыми примерами синтеза динуклеотидов с 3′-5′-связью, характерной для природных полинуклеотидов. Очевидно, в самое ближайшее время можно ждать крупных успехов в этой области.

МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОЕ СТРОЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ *

После того как была в общих чертах выяснена химическая структура нуклеиновых кислот, большое внимание стали уделять проблеме конформации их макромолекул.

Современные представления о макромолекулярной структуре нуклеиновых кислот основываются преимущественно на данных рентгеноструктурного анализа. Большая часть рентгеноструктурных исследований была проделана на солях ДНК, которые удается получать в кристаллической волокнистой форме. Более лабильную РНК выделить в нативном виде, за исключением нескольких случаев, не удавалось. В связи с этим в настоящее время макромолекулярную структуру можно считать твердо установленной лишь для ДНК.

Первые рентгеноструктурные исследования, осуществленные в 1938 г. Астбери и Беллом, привели их к опровергнутому впоследствии заключению о том, что молекула ДНК построена по типу молекулы политетрануклеотида. В дальнейших исследованиях, основанных главным образом на данных Фурберга о пространственной конфигурации нуклеозидов и нуклеотидов, Паулинг и Кори и почти одновременно с ними Уотсон и Крик в 1953 г. предложили модели спирального строения макромолекулы ДНК. Модель, представленная Паулингом и Кори, была по целому ряду соображений подвергнута критике, и наиболее признанной и подтвержденной в настоящее время структурной моделью макромолекулы ДНК является модель, предложенная Уотсоном и Криком.

Согласно их данным, макромолекула ДНК представляет собой две спиралеобразные цепи, закрученные правильными витками вокруг одной и той же, общей для них, оси. Каждая из этих двух полимерных цепей состоит из монодезоксинуклеозидных остатков, связанных между собою 3′ — 5′-связями, как это описано выше; при этом основания находятся внутри спирали, а фосфорные группы снаружи (рис. 2).

На каждые 3,4 Å вдоль главной оси отдельной цепи — спирали приходится один нуклеотидный остаток. Угол между смежными нуклеотидными остатками одной и той же цепи составляет 36°, так что структура повторяется через каждые 10 остатков данной цепи, т. е. через 34 Å. Принципиально новой и очень важной особенностью модели Уотсона и Крика является наличие взаимной связи обеих образующих макромолекулу спиральных цепей при помощи попарного взаимодействия каждого гетероциклического основания одной цепи с со-

* Этот подраздел главы написан кандидатом химических наук З. А. Шабаровой.

ответствующим основанием другой цепи. При этом должны строго соблюдаться следующие условия:

1) плоскости оснований перпендикулярны длинной оси молекулы;

2) два основания в одной плоскости — одно от одной цепи, другое от другой — образуют пару при помощи водородных связей;

3) пара образуется так, что эти два основания лежат бок о бок с их соответствующими Z-координатами;

4) водородная связь возникает лишь в том случае, если один из членов пары — пуриновое основание, а другой обязательно — пиримидиновое основание. Водородные связи образуются между соответствующими атомами пуринового и пиримидинового колец, как это видно на схеме. Из этого вытекает, что в молекуле ДНК могут образовываться только специфические пары оснований аденин — тимин (XXVIII) и гуанин — цитозин (XXIX) (см. стр. 260.

Это условие влечет за собою важное следствие. Последовательность оснований в какой-либо одной из двух цепей молекулы может быть любой. Что касается второй цепи макромолекулы, то последовательность расположения оснований в ней соответственно определяется расположением оснований в первой цепи, так как аденину первой цепи обязательно должен соответствовать тимин во второй цепи, тимину — аденин, гуанину — цитозин и цитозину — гуанин.

Представления Уотсона и Крика были подтверждены более поздними рентгеноструктурными исследованиями ДНК различного происхождения и различных состояний (в клетке в нативном виде, в нативном нуклеопротеиде); чем была показана общность закономерностей макромолекулярной структуры ДНК.

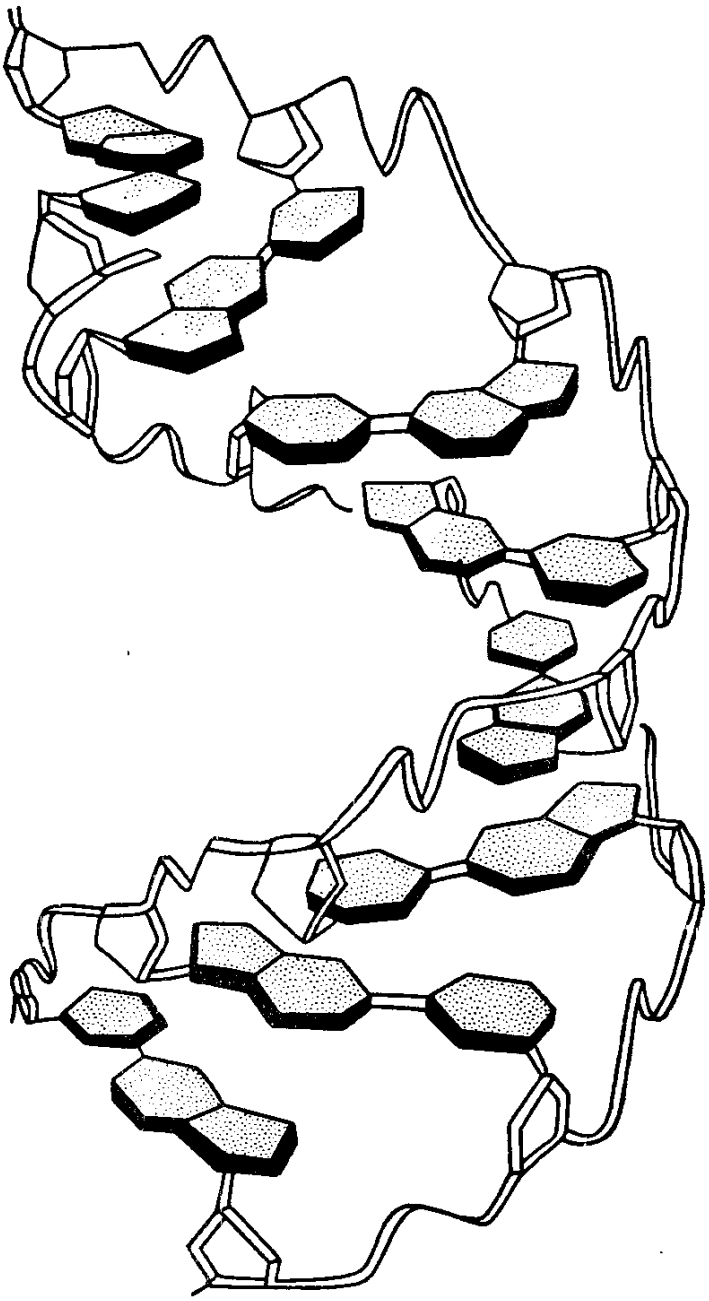
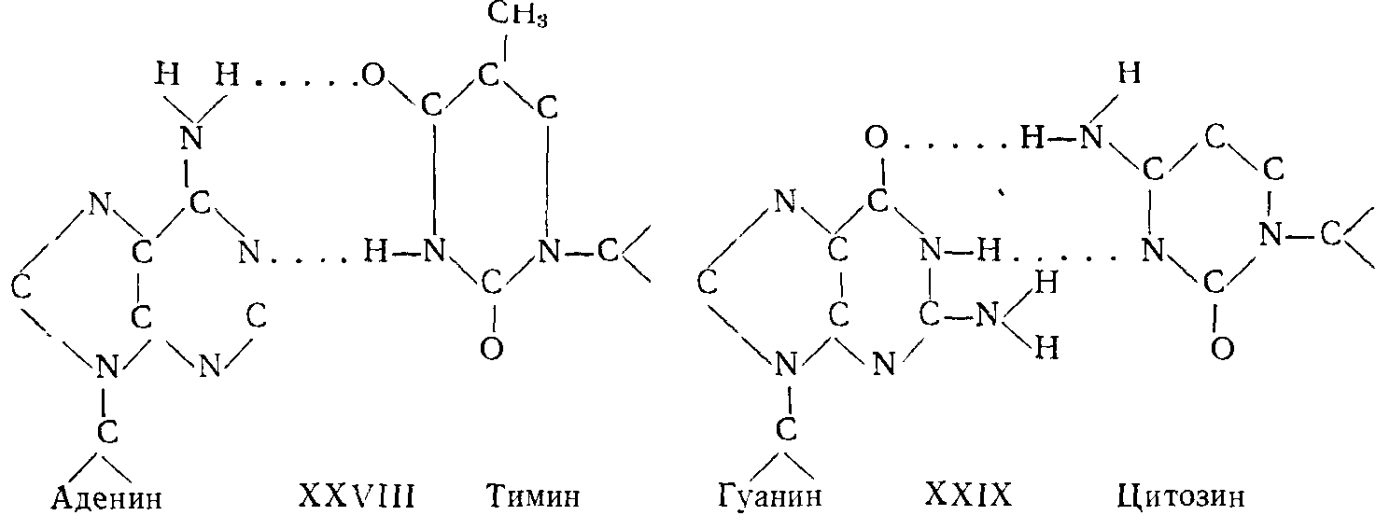


Рис. 2. Макромолекула дезоксирибонуклеиновой кислоты

Структурная модель ДНК, состоящая из двух цепочек, извитых в виде двойной спирали вокруг центральной оси. Молекулы углевода (пентозы) представлены белыми пятиугольниками, обведенными двойной линией. Фосфатные группы представлены в виде изгиба двойной линии, соединяющей молекулы углеводов. От каждой молекулы углевода отходит основание в виде покрытого точечной штриховкой пятиугольника или шестиугольника. Каждое основание связано с противолежащим на том же уровне другим основанием водородной связью. Эти поперечные связи между основаниями служат горизонтальными распорками, удерживающими двойную спиральную ось и связывающими обе ее цепи вместе.

Одним из наиболее убедительных аргументов в пользу приведенной структуры ДНК являются аналитические данные Чаргаффа, который, пользуясь методом хроматографического анализа в сочетании с



ультрафиолетовой спектрофотометрией, определил количественные соотношения пуриновых и пиримидиновых оснований в нативных препаратах ДНК из многочисленных биологических источников. При этом были установлены следующие закономерности:

1) сумма пуриннуклеотидов равна сумме пиримидиннуклеотидов;

2) молярные отношения аденина к тимину и гуанина к цитозину равны единице;

3) количество 6-аминогрупп равно количеству 6-оксогрупп, т. е. суммарное количество гуанина и тимина равно суммарному количеству аденина и цитозина.

Несмотря на суммарное равенство количеств пурин- и пиримидиннуклеотидов в различных ДНК, в пределах каждой из групп в зависимости от биологического источника наблюдаются сдвиги в сторону преобладания того или иного основания.

Так, например, ДНК, выделенные из организмов высших животных, имели явное преобладание аденина над гуанином и тимина над цитозином; напротив, ДНК, выделенные из микроорганизмов, вирусов и насекомых, содержали больше гуанина, чем аденина, и больше цитозина, чем тимина.

В соответствии с этим Чаргафф подразделяет все ДНК на два типа: АТ-тип (с преобладанием аденина и тимина) и ГЦ-тип (с преобладанием гуанина и цитозина). Наряду с этим иногда, например у ряда штаммов *E. coli* обнаруживается ДНК промежуточного типа, с эквимолярными соотношениями всех четырех оснований.

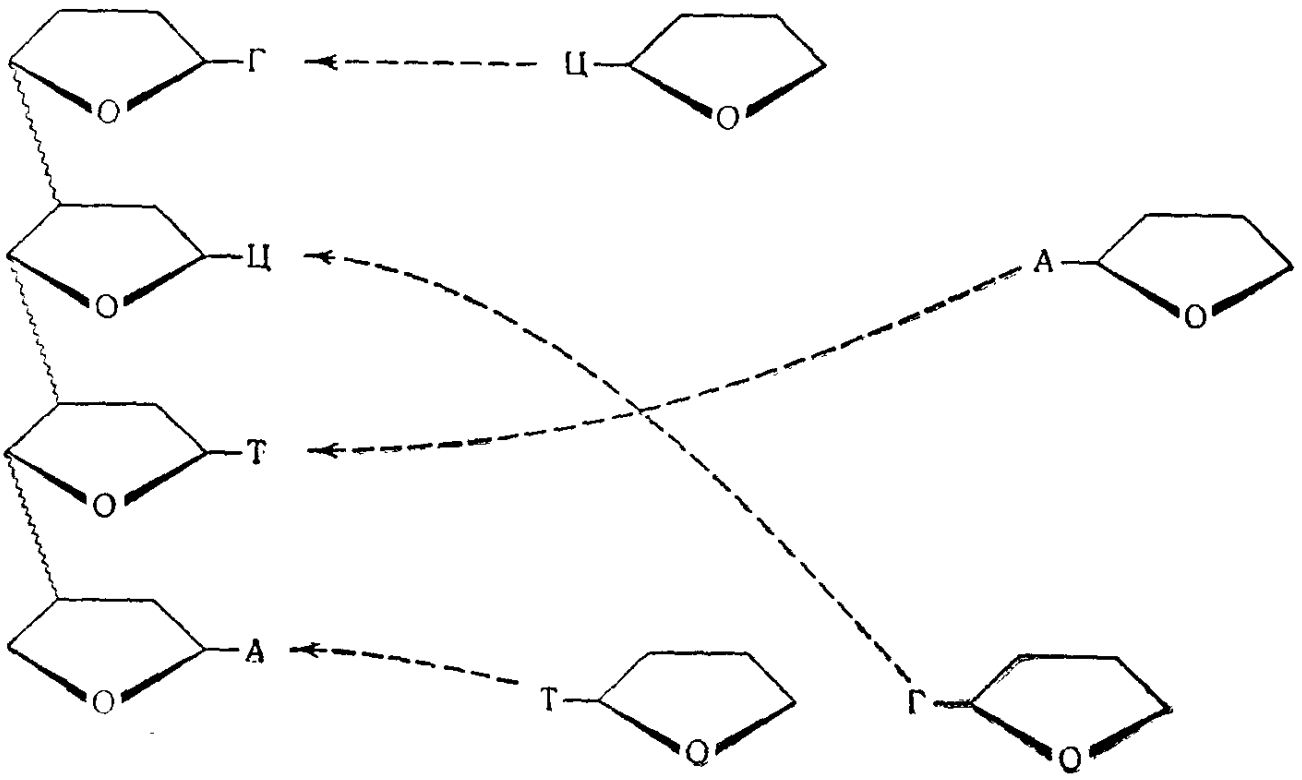
Очень важным выводом, вытекающим из этих исследований Чаргаффа, было выявление специфичности ДНК. Последняя зависит прежде всего от гетерогенности, т. е. неравномерности распределения нуклеотидов в молекуле полинуклеотида. Эта неравномерность может определяться как различным соотношением пуриновых и пиримидиновых оснований, так и различным распределением их вдоль цепи.

Сейчас на основании соотношений пиримидины: пурины установлена видовая специфичность ДНК; уточнение дальнейших деталей позволит, видимо, как это видно из исследований А. Н. Белозерского, выявить тканевую и органоидную специфичность этих соединений.

Однако для решения этого вопроса требуется накопить больше фактического материала, для чего необходимо прежде всего разработать методы, которые позволили бы определять последовательность нуклеотидов в полинуклеотидной цепи ДНК.

Исследования Уотсона и Крика, подтвержденные аналитическими данными Чаргаффа, открыли новую эру в области молекулярной биологии и сделали понятным значение ДНК для передачи наследственных

Если представить, что две спаренные нити-спирали ДНК отделяются одна от другой и попадают в среду, где происходит биосинтез полинуклеотидов из мононуклеотидов, то можно ожидать, что благодаря специфическому спариванию оснований около каждой полинуклеотидной цепи будет образовываться совершенно аналогичная ей вторая цепь, т. е., другими словами, воспроизведется исходная двойная спираль.



Следовательно, каждую цепь в этом случае можно рассматривать как своего рода шаблон (так называемый биологический код), обеспечивающий абсолютно точное воспроизведение данной специфической ДНК. Эти процессы, по всей вероятности, являются ключом к пониманию путей передачи наследственных признаков при делении клетки, так как ДНК являются типичными компонентами хромосом и вся клеточная ДНК, по-видимому, ассоциируется с ними.

На основании данных о структуре и конформации ДНК можно предполагать, что мутации могут возникать даже при замене одного единственного нуклеотидного остатка в цепи, так как эта «ошибка» повторится при копировании, в результате чего возникает уже новая ДНК.

Подобные искусственные мутации можно было бы использовать в химиотерапии вирусов, вводя в среду неприродные аналоги нуклеозидов. В самом деле, уже имеются данные об устойчивости к действию вирусов некоторых растений, которым привит синтетический аналог гуанина — азагуанин. Последний может внедряться в нуклеиновые кислоты живых организмов.

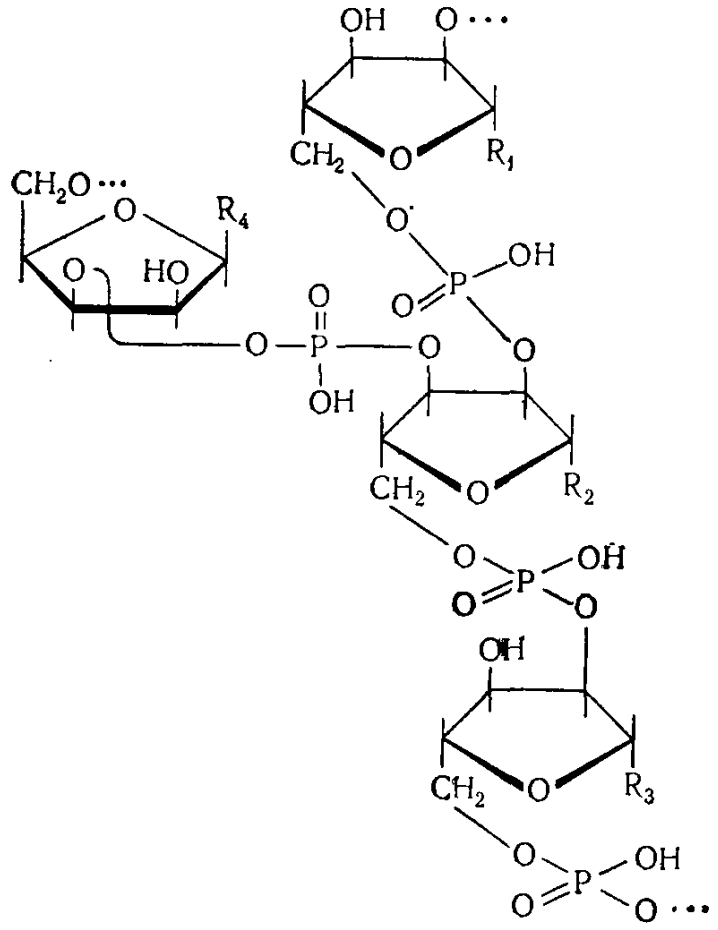
Передача установившихся шаблонов НК от клетки матери дочерней клетке, если это является важнейшей частью наследственной трансмиссии, вероятно, означает, что эти кислоты обладают ключевой функцией контроля синтетических процессов в клетке. Однако приписывать решающую роль в процессах передачи наследственных признаков только ДНК также нельзя, так как несомненно, что в этих процессах важную роль также играют полисахариды, липиды, белки. Приведенное выше описание механизма передачи наследственных признаков является очень упрощенным, и если он правилен в своей основе, то

совершенно еще не ясны подробности этого основного процесса жизнедеятельности.

Прежде чем перейти к функциям РНК, нужно рассмотреть вопрос о макромолекулярной структуре этого полимера и о его распространении.

Как уже упоминалось, до сих пор получить РНК, более лабильную, чем ДНК, в нативном состоянии не удалось *; исключением, может быть, являются некоторые РНК растительных вирусов. Поэтому о макромолекулярной структуре РНК сейчас еще ничего нельзя сказать.

По мнению Маркхэма, обычная РНК состоит из нескольких сравнительно коротких неразветвленных цепей варьирующего состава, причем даже для наименее деградированных РНК, например РНК из растительных вирусов, эти цепи состоят всего примерно из 50 нуклеотидных остатков. Некоторые авторы допускают возможность ветвистого строения молекул РНК, которые могут иметь два типа разветвлений.



Для первого типа ветвления можно предположить, что свободные гидроксильные группы рибозы у $C'_{(2)}$ связаны с остатком фосфорной кислоты, находящейся у $C'_{(3)}$ в другом нуклеозиде, т. е. образуется связь $C'_{(2)}—P—C'_{(3)}$. Дальнейшее наращивание боковой цепи может происходить путем последовательного присоединения нуклеотидных остатков к первому боковому нуклеотиду обычным образом, т. е. по типу $C_{(3)}—C_{(5)}$-связи (XXX).

Второй тип ветвления может состоять в присоединении бокового пиримидинового нуклеотида непосредственно к гидроксилу фосфатного остатка, связывающего нуклеотиды в главной цепи. В этом случае должен образоваться триэфир фосфорной кислоты. Этот тип ветвления маловероятен, так как синтетические триэфиры фосфорной кис-

* Выделение натриевых РНК удалось Литтадэру в 1959 г.

лоты очень неустойчивы даже в области почти нейтральных значений pH.

В настоящее время остается неясным, каким структурам РНК отдать предпочтение — неветвящимся или ветвистым. Не исключена возможность одновременного присутствия тех и других структур среди молекул РНК.

Нужно отметить, что если молекулярный вес ДНК доходит до нескольких миллионов, то молекулярный вес РНК колеблется от 10 000 до 300 000.

Что касается содержания в РНК пиримидиновых и пуриновых оснований, то, по данным Чаргаффа, для этого вида НК также имеются определенные закономерности:

1. В РНК имеется равное количество оснований, содержащих 6-оксо- и 6-аминогрупп, т. е.

$$Г + У = А + Ц.$$

В одних РНК могут превалировать гуанин и цитозин, и в других — аденин и урацил. Отсюда типы РНК — ГЦ и АУ. В пределах каждого типа также могут быть вариации.

2. Суммарное количество пуриновых оснований приблизительно равно суммарному количеству пиримидиновых оснований. Исключение составляют некоторые РНК, выделенные из растительных вирусов.

Вопрос о специфичности РНК так же, как вопрос о специфичности ДНК, может быть связан с различным чередованием нуклеотидов или с различным соотношением пиримидиновых и пуриновых оснований. При изучении соотношений оснований было обнаружено, что РНК из ядер и цитоплазмы различны, т. е. существует органоидная специфичность РНК.

Каковы же функции РНК? Прежде чем переходить к этому вопросу, следует отметить, что со времен Мишера, открывшего 90 лет назад нуклеиновые кислоты, исследователи обращали внимание на то, что РНК содержатся в изобилии в тех частях клетки, где особенно интенсивно идет биосинтез белка.

Еще большее количество РНК было обнаружено в растущих и в секретирующих органах.

В последние годы было твердо установлено, что процессы включения аминокислот в белок тесно связаны с наличием РНК в этих системах, и, следовательно, РНК участвует в процессе биосинтеза белка. Каким же образом 20 аминокислот, находящихся в клетке, соединяются пептидными связями в специфическую и генетически определенную последовательность?

Быстро возрастающий интерес к этой проблеме, помимо ее фундаментального значения, связан с тем, что лишь с недавнего времени промежуточные стадии биосинтеза белка стали доступны для химического изучения. Так, недавно было обнаружено, что системы, активирующие внедрение аминокислот, меченных C^{14}, в белок, могут быть разделены центрифугированием на две основные фракции — микросомы и растворимые энзимы.

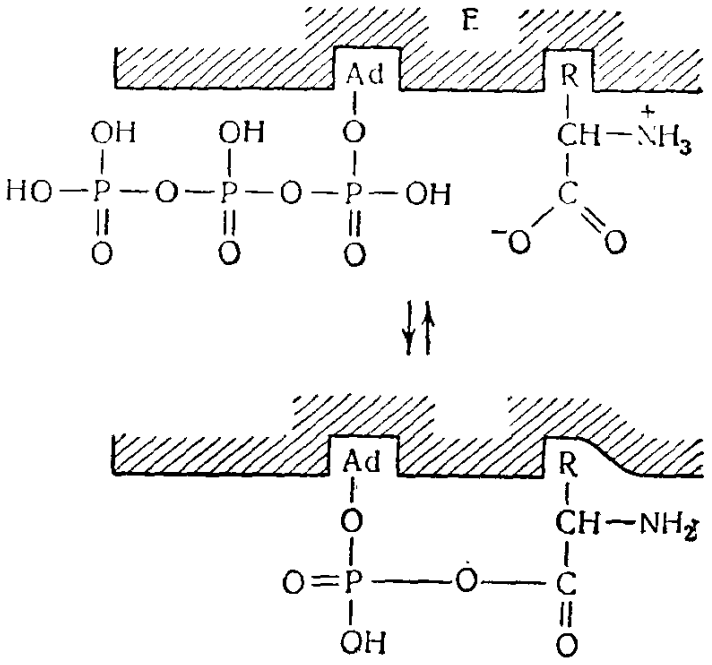
Хотя еще не пришло время для полного понимания механизма биосинтеза белка, однако уже сейчас на основании имеющегося экспериментального материала весь процесс можно разделить на три основных этапа:

1) активация аминокислот,

2) перенос аминокислот к так называемой растворимой РНК,

3) образование пептидов на поверхности микросомных высокополимерных РНК.

I этап — активация аминокислот (здесь и далее E — фермент).



В настоящее время твердо установлено, что реакция энзиматической активации α-аминокислот связана с участием АТФ и может быть выражена приводимой схемой. Имеются факты, подтверждающие эту схему, из которых можно привести следующие: 1) образование α-аминокарбогидроксамовых кислот при обработке ферментативного комплекса гидроксиламином, причем количество их эквивалентно количеству получающегося пирофосфата; 2) образование АТФ при инкубации синтетического аминоациладенилата и пирофосфата в присутствии активирующего фермента; 3) внедрение в АТФ меченых атомов C^{14} и O^{18} при инкубации аминоациладенилата с соответствующим образом мечеными аминокислотами.

В настоящее время проводятся работы по изолированию индивидуальных активирующих ферментов; уже удалось выделить ферменты, активирующие триптофан, метионин, серин, тирозин и аланин, и едва ли можно сомневаться, что все аминокислоты имеют свои активирующие ферменты. Имеются данные о том, что при активации аминокислот необходимо присутствие в системе витамина B_{12}.

Активирующие ферменты реагируют только с L-аминокислотами (отвергая D-аминокислоты), однако они способны активировать неприродные аналоги аминокислот и вводить их тем самым в белок. Таким образом, на этой стадии биосинтеза особая ферментативная специфичность не наблюдается.

II этап — перенос активированных аминокислот к растворимой РНК.

$$E\,(\text{АМФ}=\text{аминокислота}) + \text{РНК} \rightleftarrows E + \text{РНК—аминокислота} + \text{АМ}.$$

Вначале предполагалось, что активированные аминокислоты непосредственно переносятся к микросомным рибонуклеопротеидным частичкам для непосредственного построения полипептидной цепи. Однако выяснилось, что, прежде чем аминокислота оказывается в микросомах, она связывается так называемой растворимой РНК, которая обладает сходными свойствами и в животных и в бактериальных тканях и может быть выделена обработкой тканей фенолом. Ее молекулярный вес

10 000—40 000. Что касается формы связи растворимой РНК с аминокислотами, то этот вопрос еще далеко не ясен, однако известно, что оба компонента образуют ковалентную связь, причем одна молекула аминокислоты приходится приблизительно на 200 мононуклеотидных остатков. Способность связываться с аминокислотами присуща только растворимой РНК, которая вначале должна быть активирована обязательным присоединением к концу цепи остатков аденозина и цитидина, что происходит при взаимодействии растворимой РНК с АТФ и его цитидиловым аналогом. Процесс присоединения аминокислоты к РНК является обратимым и может быть представлен уравнением

$$\text{АТФ} + \text{аминокислота} + E \rightleftarrows E\,(\text{АМФ—аминокислота}) + \text{PP}$$

$$E\,(\text{АМФ=аминокислота}) + \text{РНК} \rightleftarrows \text{РНК=аминокислота} + E + \text{АМФ},$$

где PP — пирофосфат.

Связь РНК — аминокислота лабильна, она относительно устойчива к кислотам, но очень легко расщепляется в щелочной среде. Место присоединения аминокислотного остатка к РНК точно не установлено, однако полагают, что такая связь осуществляется через свободный гидроксил у $C'_{(2)}$ в терминальном рибозном остатке РНК; этим может быть объяснено то интересное обстоятельство, что РНК, обработанная иодной кислотой, не реагирует с аминокислотой; однако если такую РНК снова подвергнуть действию фосфомоноэстеразы, снимающей остаток фосфата и обнажающей новую α-гликольную группировку, то реакционная способность по отношению к α-аминокислоте снова появляется.

III этап — внедрение РНК-аминокислоты в структуру микросом. Внедрение аминокислот в микросомы проходит в присутствии гуанозинтрифосфата, роль которого пока совершенно неясна, и сопровождается внедрением в них растворимой РНК, что показано на препаратах РНК, меченных по пиримидиновому циклу. Меченая РНК, лишенная аминокислот, не внедряется в микросомы, причем с этой стадией реакции тесно связан процесс конденсации аминокислот в пептиды.

Исследователи, занимающиеся изучением этого важнейшего процесса, считают, что высокополимерная, линейная микросомная РНК является матрицей. На этой матрице аминокислоты располагаются в определенной последовательности, которая, по-видимому, определяется чередованием оснований в полимерной РНК, и затем из активированных аминокислот образуются пептиды. Возможно, что аминокислоты не переносятся на высокополимерную РНК, а остаются на растворимой, низкомолекулярной РНК, которая реагирует с линейным участком высокополимерной микросомной РНК, образуя водородные связи за счет оснований.

Следует сказать, что в настоящее время можно считать твердо установленными следующие этапы процесса биосинтеза белка. Аминокислоты активируются для синтеза белка через образование аминоациладенилатов, прочно связанных со специфическими ферментами, которые используют энергию АТФ. За этим процессом следует перенос аминокислоты к низкомолекулярному полинуклеотиду, который способен связывать аминокислоты. Наконец, эти промежуточные продукты (или их активные фрагменты) внедряются в микросомный рибонуклеопротеид, что зависит от другого нуклеотида — ГТФ.

Будущие исследования должны показать, насколько это действительно верно.

Коротко изложенные выше биологические функции нуклеиновых кислот, роль которых становится ясной только в последние годы, показывают, сколь велико значение этого важнейшего биогенного полимера для процессов жизнедеятельности.

ЛИТЕРАТУРА

А. Тодд. Перспективы развития органической химии. М., ИЛ, 1959, стр. 174.

J. Baddiley. Nucleotides and bacterial cell wall components. Proceding of chem. Soc., 1959, 2337.

P. Gilham, H. Khorana. Synthesis of deoxyribo-dinucleotides. J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 6212.

P. Gilham, H. Khorana. Stepwise synthesis of oligonucleotids. J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 4647.

H. Khorana. Approaches to the marking of the end groups in polynucleotides chain. J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 4657.

A. Michelson. Synthesis and properties of some polyribonucleotides. J. Chem. Soc., 1959, 1371.

A. Michelson. Homopolymers of cytydilic and pseudo uridilic acid, Copolymers with repeating units and the stepwise synthesis of polyribonucleotides. J. Chem. Soc., 1959, 3655.

W. Razzell, H. Khorana. The stepwise degradation of thymidine oligonucleotides by snake venom and spleen phosphodiesterases. J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 1770.

W. Smith, H. Khorana. Specific synthesis of C_5-C_3 uridinribonucleotide linkage. J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 2911.

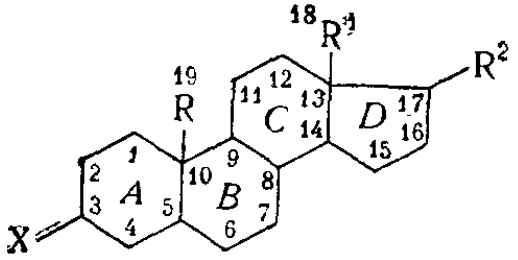
Раздел третий

СТЕРОИДЫ

Глава 1

ПОНЯТИЕ О СТЕРОИДАХ, КЛАССИФИКАЦИЯ, НОМЕНКЛАТУРА

Под понятием стероидов ныне объединяют большую группу соединений, имеющих скелет гидрированного 1,2-циклопентанофенантрена и построенных по общей схеме



где R, R^1 и R^2 могут быть углеродсодержащими заместителями, а X представляет гидроксильную или кетонную группу. В некоторых классах стероидов R может отсутствовать вообще, а R^2 быть гидроксильной или кетонной группой. Кроме указанных, могут быть другие кислородсодержащие заместители почти во всех местах молекулы.

Стероиды принадлежат к интереснейшему классу природных соединений. Их распространенность как в животном, так и в растительном мире и исключительно важная роль в обмене веществ вызвали интерес к ним еще во второй половине прошлого столетия. Однако необычайные трудности, встретившиеся при установлении строения этих сложных соединений, послужили причиной того, что химия стероидов начала развиваться сравнительно недавно, в сущности, с тридцатых годов XX столетия, когда было окончательно выяснено строение холестерина и холевой кислоты.

Интерес к изучению стероидов особенно возрос после того, как было установлено, что к ним принадлежат гормоны пола и коры надпочечников. Громадное физиологическое и лечебное значение стероидных гормонов сразу привлекло в эту область большие научные силы, и за последние 25 лет химия стероидов сделала поразительные успехи. Были выделены сотни новых стероидов, установлены их строение и взаимосвязь, осуществлены частичные и полные синтезы.

Успехи в этой области оказали значительное влияние и на развитие органической химии вообще. Так, данные о пространственных отношениях в ряду стероидов дали незаменимый и ценнейший материал для стереохимии. Когда в 1946 г. Бартон (Англия) выдвинул свою концепцию конформационного анализа, то он подтвердил ее главным образом на стероидных соединениях. Сложность и многофункциональность стероидов побудили разработать тонкие методы синтеза и ана-

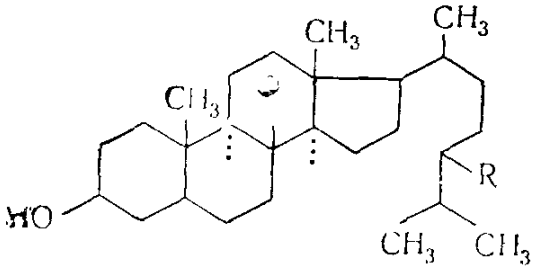
лиза и дали стимул к открытию химических реакций, казавшихся вначале необычными. Работы по полному синтезу стероидов являются большим достижением химической мысли и, несомненно, принадлежат к числу важнейших завоеваний органической химии.

Прежде чем перейти к классификации стероидов и их номенклатуре, отметим, что пространственное положение заместителей в молекуле принято обозначать греческими буквами α и β. Буква α обозначает транс-положение заместителя по отношению к ближайшей метильной группе, которую условно считают лежащей над основной плоскостью молекулы (в дальнейшем, при обсуждении вопроса об абсолютной конфигурации стероидов, мы увидим, что это соответствует действительности); буква β означает цис-положение заместителя по отношению к той же группе. Принятая сейчас классификация стероидов, с одной стороны, отражает их химические особенности, а с другой — их физиологическое действие.

Классификация

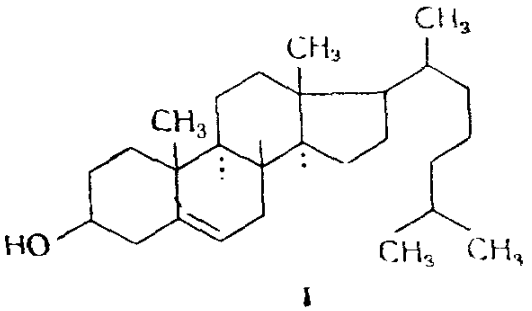
Классификация включает стерины, желчные кислоты, гормоны эстрогенные, андрогенные, гестагенные, коры надпочечников (кортикоиды), стероидные сапогенины, сердечные аглюконы, яды жаб (и аглюконы морского лука), стероидные алкалоиды.

Стерины отличаются наличием β-гидроксильной группы в положении 3, имеют две ангулярные метильные группы ($R=R'=CH_3$), боковую алифатическую цепь, содержащую 8, 9 или 10 углеродных атомов и часто одну или несколько двойных связей. Все они построены по общей формуле

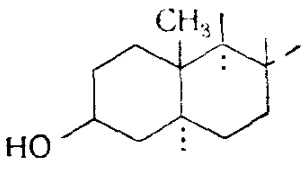


где $R=H,\ CH_3,\ C_2H_5,\ =CH_2,\ =CHCH_3$

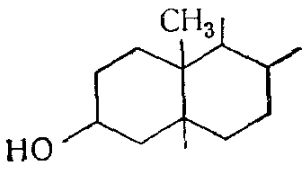
Наиболее важным стерином является холестерин (I), содержащийся во всех животных клетках (особенно много его в клетках нервной ткани). Близки к нему продукты его гидрирования — холестанол (II) и копростанол (III), представляющие продукты обмена холестерина.



I

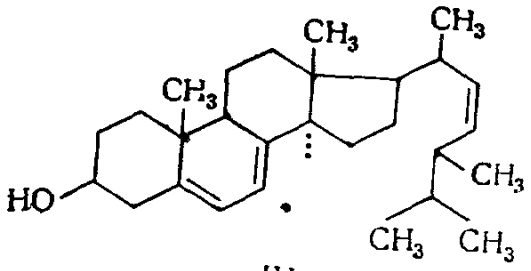


II

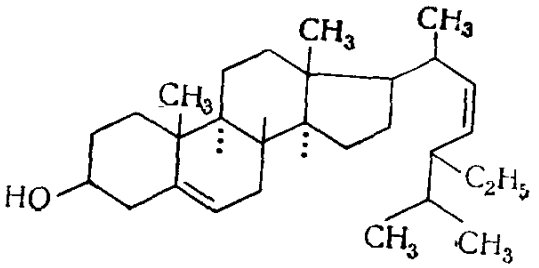


III

Среди стеринов растительного происхождения отметим эргостерин (IV) (содержится в дрожжах) и стигмастерин (V) (содержится в соевом масле), которые представляют интерес для частичных синтезов стероидных гормонов.

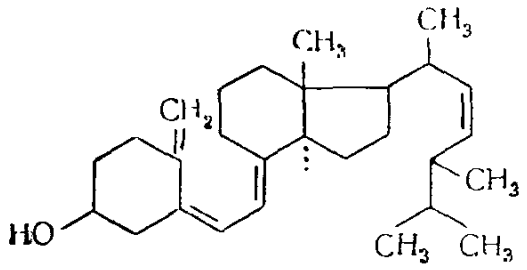


IV

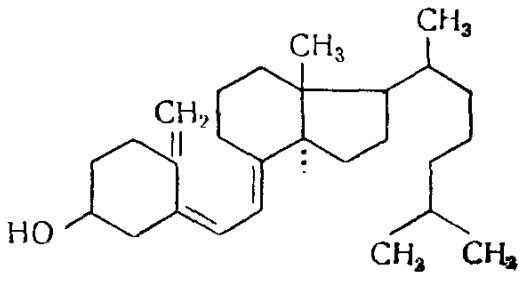


V

Близко к стеринам стоит также группа витамина D, не имеющего скелета циклопентанофенантрена, но генетически тесно связанного со стеринами и образующегося из них при облучении.



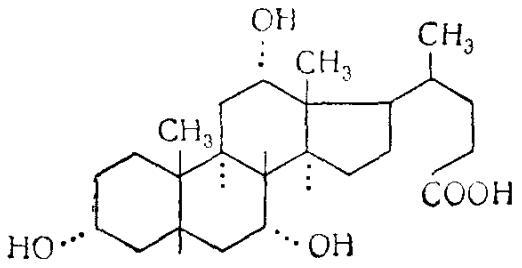
Витамин D_2



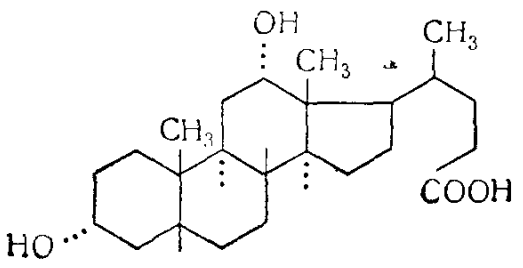
Витамин D_3

Желчные кислоты. Эти кислоты отличаются цис-сочетанием колец *A* и *B*, имеют 3α-ОН-группу, большинство — боковую цепь из пяти углеродных атомов с карбоксилом на конце и иногда дополнительные гидроксильные или кетогруппы в положениях 6, 7 и 12.

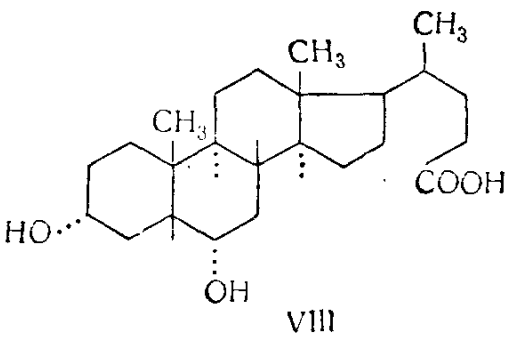
Важнейшей желчной кислотой является холевая (VI), иначе 3α, 7α, 12α-триоксихолановая кислота, находящаяся в желчи в виде амидов глицина и таурина. Близкая к ней по строению дезоксихолевая кислота (VII) также содержится в желчи (в количествах, в четыре раза меньших по сравнению с холевой кислотой).



VI



VII

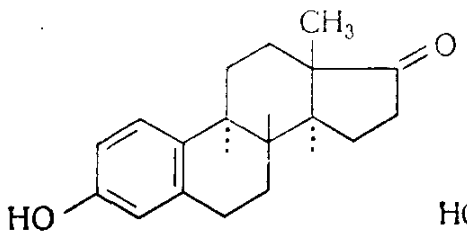


VIII

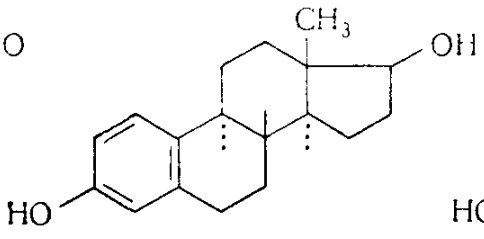
Желчные кислоты играют первостепенную роль в усвоении питательных веществ организмом. Они переводят в растворимое состояние жиры

и другие нерастворимые соединения и делают возможным абсорбцию липоидов слизистыми стенок кишечника. Из других желчных кислот упомянем гиодезоксихолевую кислоту (VIII) из желчи свиньи, имеющую некоторое практическое применение в синтезе.

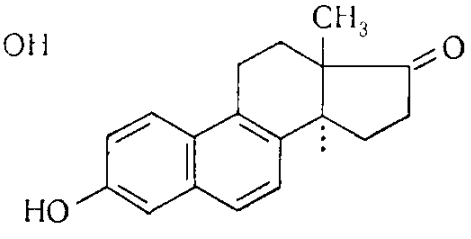
Эстрогенные гормоны. Эти соединения отличаются отсутствием 19-ангулярной метильной группы, наличием ароматического кольца *A*, 3-OH-группы и окси- или кетогруппы в положении 17. К ним относятся эстрон (IX), эстрадиол (X) и эквиленин (XI).



IX



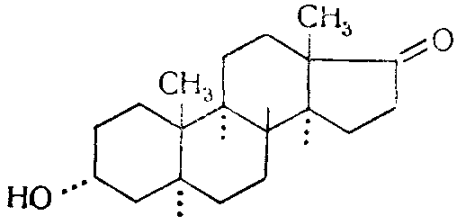
X



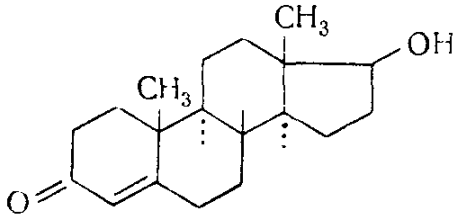
XI

Эстрон является главным женским половым гормоном, наличие которого обеспечивает развитие женских половых органов и нормальный половой цикл. Эквиленин (совместно с эстроном) играет ту же роль у кобыл.

Андрогенные гормоны. Для них характерно наличие OH- и кето-групп в положениях 3 и 17. Из них следует упомянуть андростерон (XII) и тестостерон (XIII).



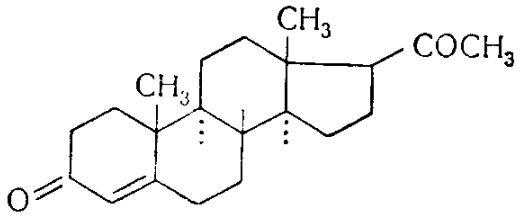
XII



XIII

Оба гормона обеспечивают нормальное развитие мужских половых органов и вторичных половых признаков. Они влияют также на белковый обмен.

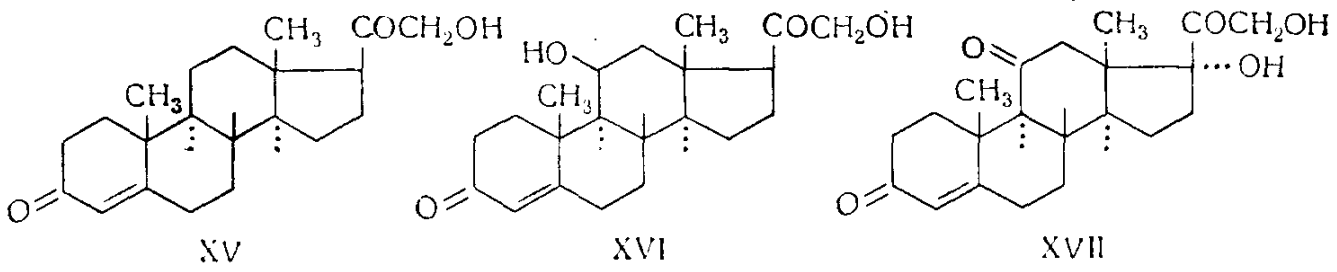
Гестагенные гормоны. К ним относятся прогестерон (XIV) и некоторые родственные соединения



XIV

Прогестерон необходим для зачатия и для нормального протекания беременности.

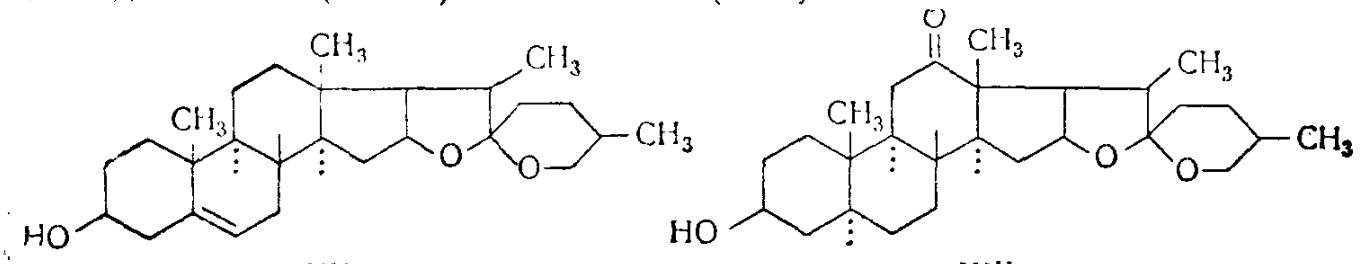
Гормоны коры надпочечников (кортикоиды). Для этих соединений характерно прежде всего наличие Δ^4-3-кетонной группировки и оксиацетоновой или диоксиацетоновой цепи в положении 17. Некоторые из них (причем наиболее активные) имеют также 11-OH- или кетогруппу. Из важнейших представителей назовем дезоксикортикостерон (XV), кортикостерон (XVI) и кортизон (XVII).



XV XVI XVII

Кортикоидные гормоны абсолютно необходимы для жизни высших животных. Они регулируют обмен электролитов, обмен углеводов и белков в печени и мускулах, обеспечивают правильную теплорегуляцию и т. д.

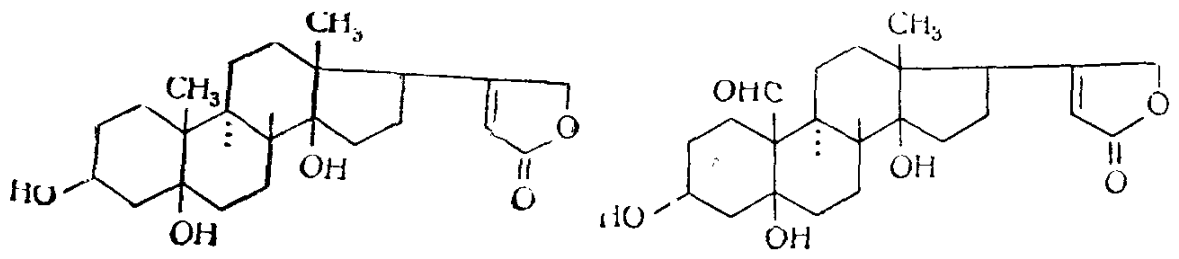
Стероидные сапогенины. Все сапогенины имеют 3-ОН-группу, кислородную функцию в положении 16 и иногда также в положении 1, 2 и 12. Большинство из них обладает спирокетальной группировкой за счет окисленной боковой цепи из восьми углеродных атомов и 16-ОН-группы. Наиболее интересными представителями, с которыми придется встретиться дальше при частичном синтезе гормонов, являются диосгенин (XVIII) и гекогенин (XIX).



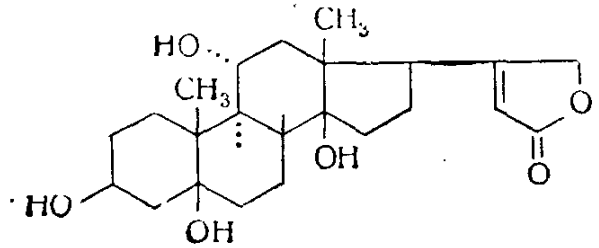
XVIII XIX

Глюкозиды сапогенинов (сапонины) распространены в растениях. Некоторые из них являются ядами для определенных классов животных (например, рыб). В химии стероидных соединений они имеют значение как дешевые исходные продукты для частичного синтеза.

Сердечные агликоны. Все сердечные агликоны (генины) содержат 3-ОН и 14-ОН-группы. У многих генинов имеется также 5-ОН-группа и кислородсодержащий заместитель при C_{10}. В отличие от прочих стероидов кольца *C* и *D* в генинах всегда сочленены в цис-положении. У некоторых представителей имеются гидроксильные группы в положениях 11 и 16. Характерным для всех генинов является наличие в положении 17 непредельного γ-лактонного кольца. Из важнейших представителей назовем периплогенин (XX), строфантидин (XXI) и сарментогенин (XXII).



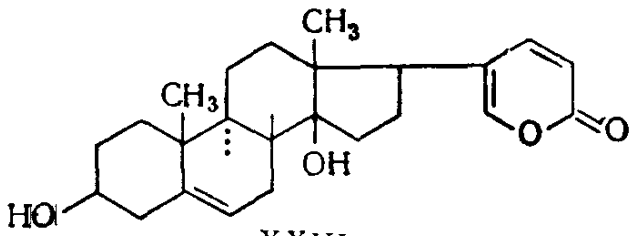
XX XXI



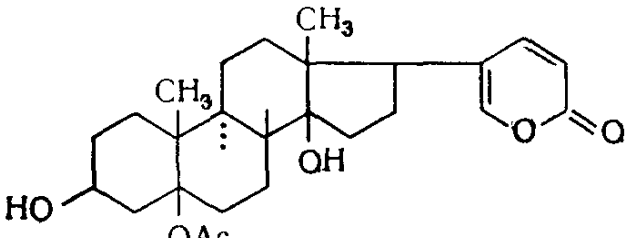
XXII

Сердечные агликоны встречаются в виде гликозидов в некоторых растениях. Эти гликозиды оказывают стимулирующее действие на сердечную мышцу и широко применяются в медицине. Сами генины являются ядами судорожного действия и не находят применения.

Яды жаб и агликоны морского лука. Эти соединения очень близки по строению к сердечным агликонам, но содержат в положении 17 не γ-а δ-лактонное кольцо. Для примера можно указать сциллареозидин (XXIII) (из морского лука) и буфоталин (XXIV) (из европейских жаб).



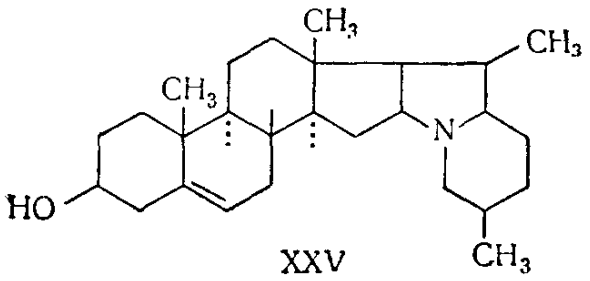
XXIII



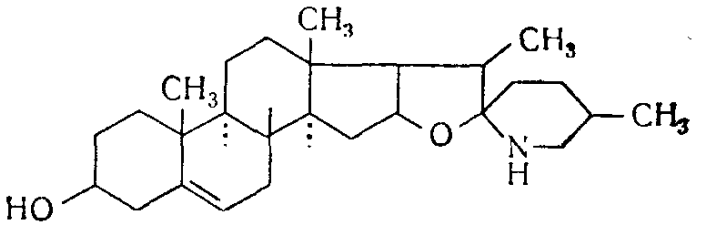
XXIV

Приведенные соединения обладают действием на сердечную мышцу и находят ограниченное применение.

Стероидные алкалоиды. Стероидные алкалоиды имеют в положении 3 OH-, амино- или диметиламиногруппу и боковую цепь из 8 углеродных атомов (как у холестерина), которая посредством атома азота или кислорода соединена с $C_{(16)}$-углеродным атомом. Характерными представителями этого класса являются соланидин (XXV) (из картофеля) и соласодин (XXVI) (из паслена птичьего).



XXV

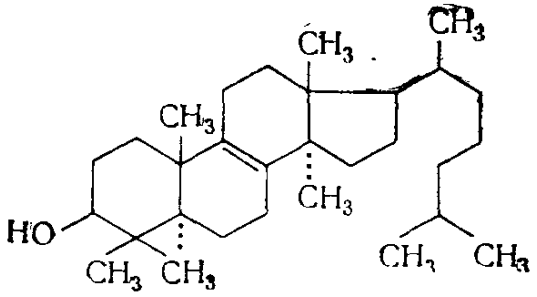


XXVI

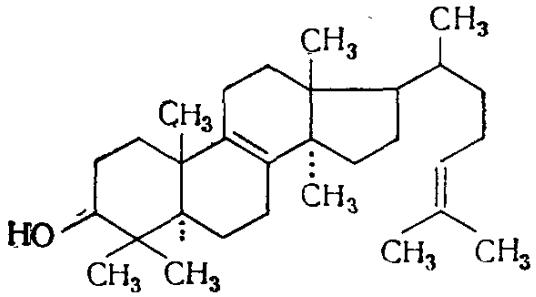
Соласодин представляет интерес как доступное сырье для частичного синтеза стероидов.

Следует сказать, что изучение стероидных алкалоидов еще только начато и в будущем могут быть открыты алкалоиды самого разнообразного строения.

В последнее время к классу стероидов причисляют иногда и тритерпеновые спирты, выделяемые из ланолина, именно ланостерин (ланостенол) (XXVII) и ланостадиенол (XXVIII).



XXVII

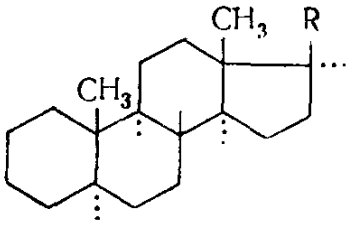


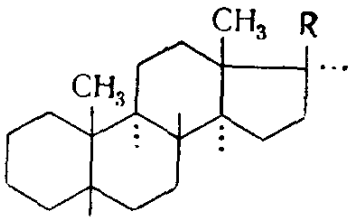
XXVIII

Вполне возможно, что по мере развития химии природных веществ класс стероидов будет обогащаться новыми группами соединений.

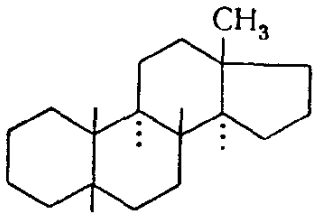
Номенклатура

Единой номенклатуры стероидов пока нет. Сложность и многообразие стероидных соединений вынудили химиков пользоваться многими тривиальными названиями и все предложения по номенклатуре сводились только к некоторому упорядочению уже существующих названий и устранению недоразумений. Часто одно и то же соединение имеет два, а то и три полурациональных названия. Более или менее общепринятыми являются названия перечисленных ниже ключевых углеводородов определенного пространственного строения; все отклонения от этого строения обозначают с помощью букв α и β или приставок.



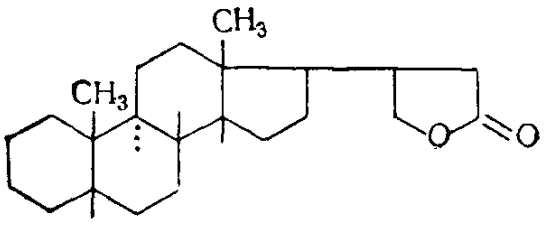


R = H	**Андростан**	Тестан (5β-андростан)
$R = C_2H_5$	**Аллопрегнан** (5α-прегнан)	Прегнан
$R = C_8H_{17}$	**Холестан**	Копростан (5β-холестан)

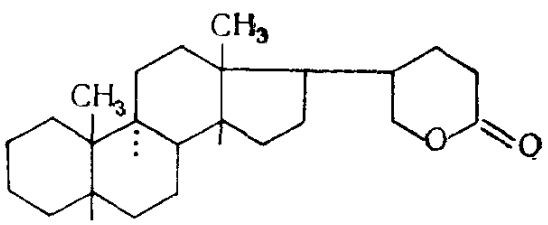


Эстран (19-нортестан)

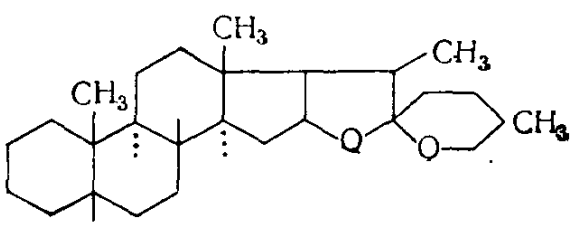
Для стероидных генинов и сапогенинов в качестве основных предложены следующие соединения:



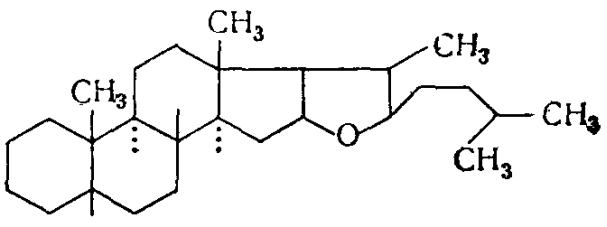
Карданолид



Буфанолид

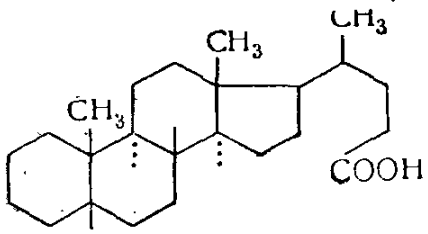


Спиростан

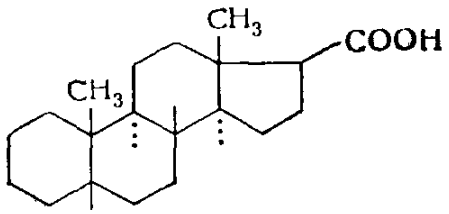


Фуростан

До сих пор прочно удерживаются тривиальные названия основных стероидных кислот.

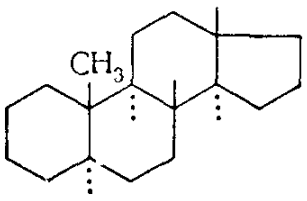


Холановая к-та

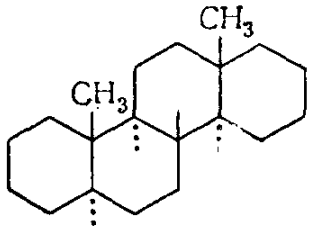


Этиановая к-та

Если скелет какого-либо соединения отличается от скелета одного из ключевых соединений отсутствием метильной или метиленовой групп, то его название получает приставку «нор», перед которой ставят номер отсутствующего атома или буквы, соответствующие данному кольцу. Наоборот, расширение кольца отмечается приставкой «гомо».

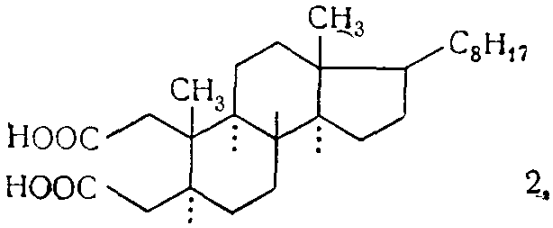


18-норандростан



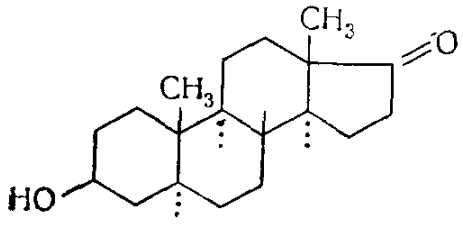
D-гомоандростан

В химии стероидов встречаются соединения, в которых одно из колец раскрыто. Чтобы не менять основного названия, перед ним ставят номер атомов и приставку «секо», например,

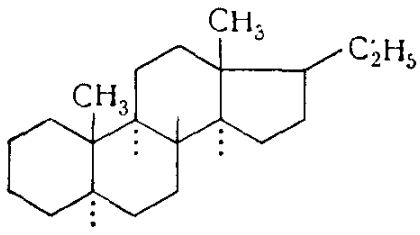


2,3-секохолестан-2,3-дикислота

До сих пор употребительны приставки «эпи» и «алло», означающие иную пространственную ориентацию 3-ОН-группы и водорода в положении 5, соответственно



Эпиандростерон
(3-эпимер андростерона)



Аллопрегнан
(5α-прегнан)

Приведенных данных достаточно, чтобы дать название практически любому до сих известному стероидному соединению, исключая стероидные алкалоиды, для которых (как, впрочем и для всех алкалоидов) прочно утвердились тривиальные названия.

ЛИТЕРАТУРА

И. Н. Назаров, Л. Д. Бергельсон. Химия стероидных гормонов. М., Изд-во АН СССР, 1955.

Л. Физер, М. Физер. Химия природных соединений фенантренового ряда. М., Госхимиздат, 1953.

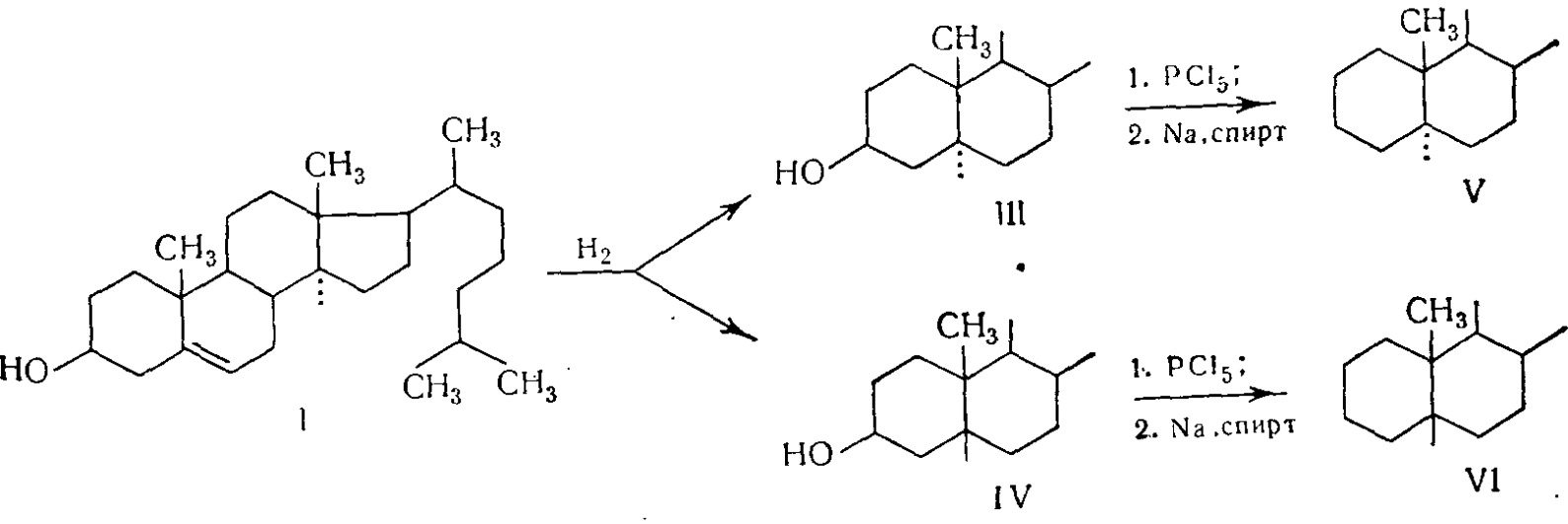
Comptes rendues de la XVIII Conference. Zürich, 1955, p. 190—207.

Глава 2

УСТАНОВЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ ОСНОВНЫХ СТЕРОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

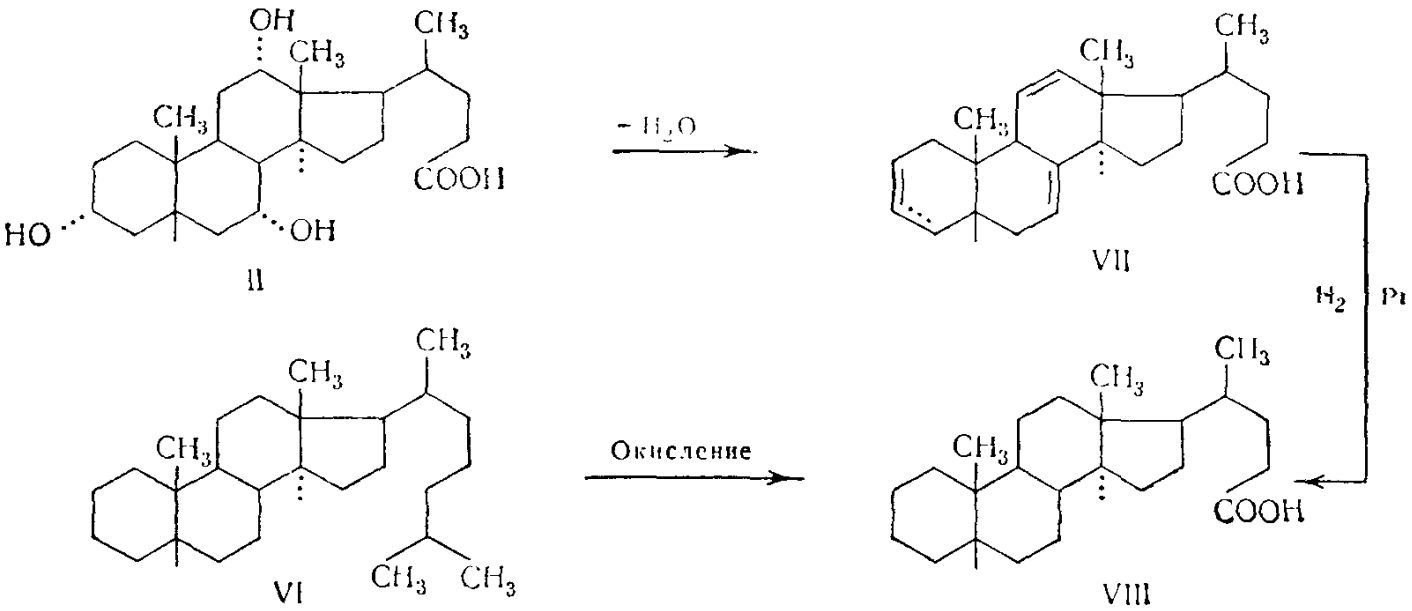
Установление строения основных и наиболее доступных стероидов — холестерина (I) и холевой кислоты (II) потребовало свыше столетия работы многих поколений химиков и было закончено лишь в 1934 г. Эти исследования представляют одну из самых ярких страниц в истории органической химии.

Однако невозможно строго придерживаться хронологического принципа в изложении работ, и поэтому целесообразно выбрать из огромного экспериментального материала лишь некоторые наиболее яркие иллюстрации, подтверждающие строение стероидов. Уже из аналитических данных о холестерине ($C_{27}H_{46}O$) и продукте его исчерпывающего гидрирования — холестаноле (III, $C_{27}H_{48}O$) вытекало, что оба эти соединения должны иметь тетрациклическую систему. В самом деле, холестанол подпадает под общую формулу $C\ H_{2n-6}O$, т. е. он при алифатическом строении должен обладать четырьмя двойными связями, что не соответствовало фактам. Холестерин мог иметь двойную связь в кольце или в боковой цепи. Поскольку в разных условиях гидрирования из холестерина получаются, кроме холестанола, еще его изомер — копростанол (IV), то положение двойной связи в цепи исключалось, а оба гидрированных спирта должны быть цис-транс-изомерами. Путем перевода последних в хлориды и их восстановления были получены изомерные углеводороды холестан (V) и копростан (VI).

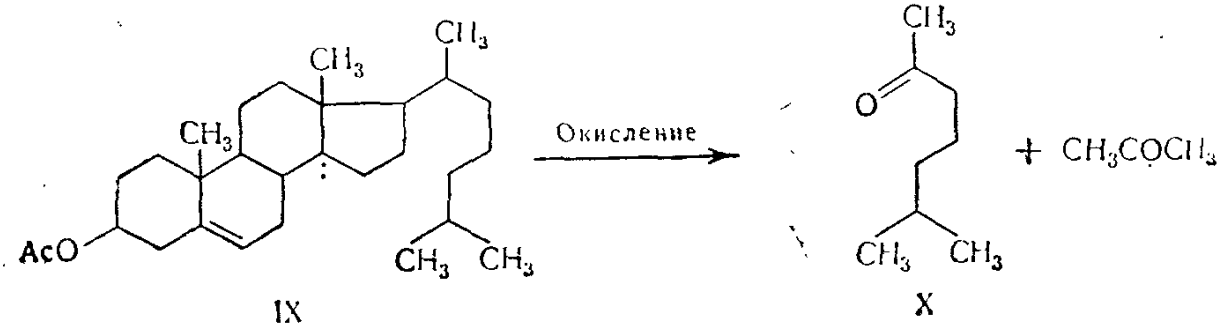


Очень скоро была установлена принципиальная идентичность скелетов холестерина и холевой кислоты. Последняя при дегидратации превращается в холатриеновую кислоту (VII), которая при гидрировании дает

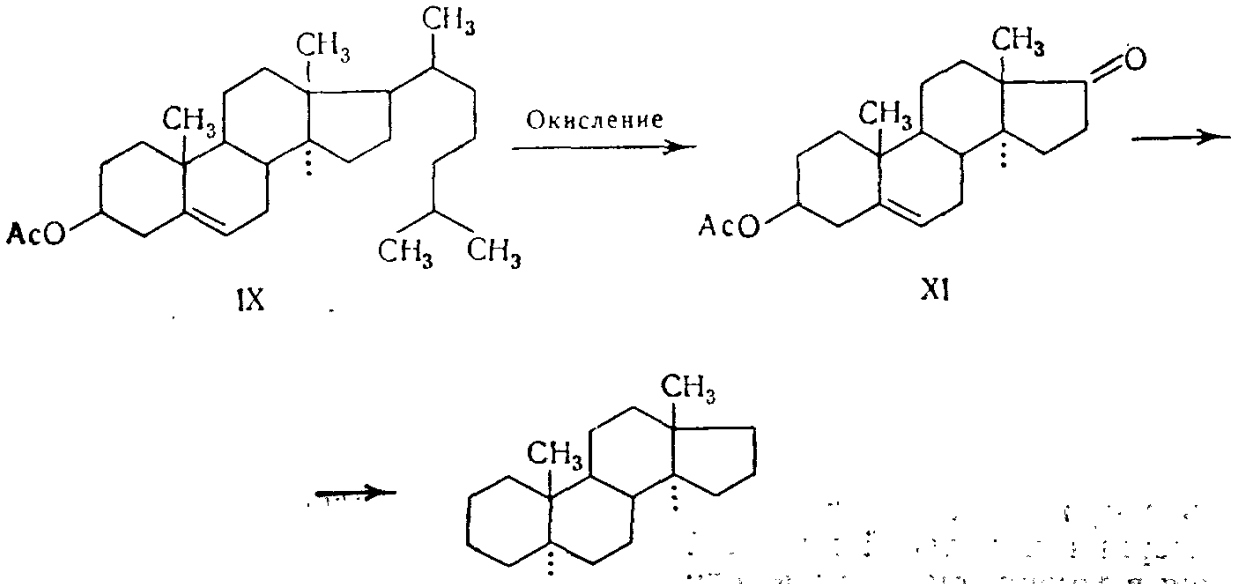
холановую кислоту (VIII). Та же холановая кислота была выделена из продуктов окисления копростана (VI).



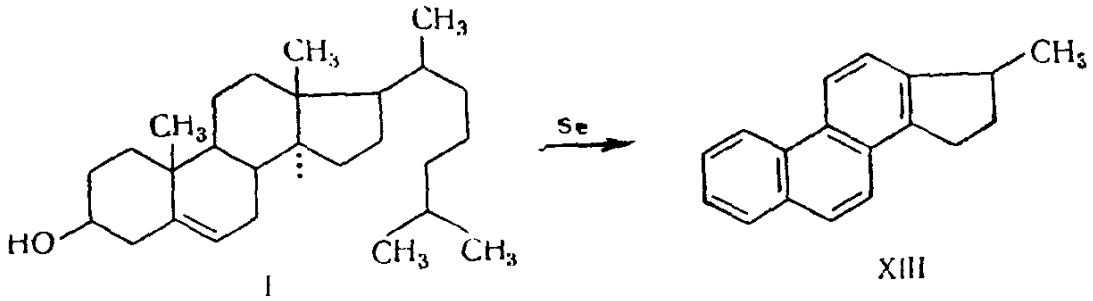
Метод окисления был также использован при установлении строения боковой цепи. Так, при окислении ацетата холестерина (IX) были выделены метилизогексилкетон (X) и ацетон, в то время как при окислении холевых кислот ацетона выделено не было. Из этих фактов был сделан правильный вывод, что холестерин имеет изооктильную боковую цепь, связанную с полициклической системой в положении 2, а холевая кислота имеет пентильную цепь.



В дальнейшем при окислении того же ацетата холестерина (в виде дибромида) был выделен ацетат дегидроэпиандростерона (XI), превращенный затем в андростан (XII), тетрациклическое строение которого вытекало уже из аналитических данных.

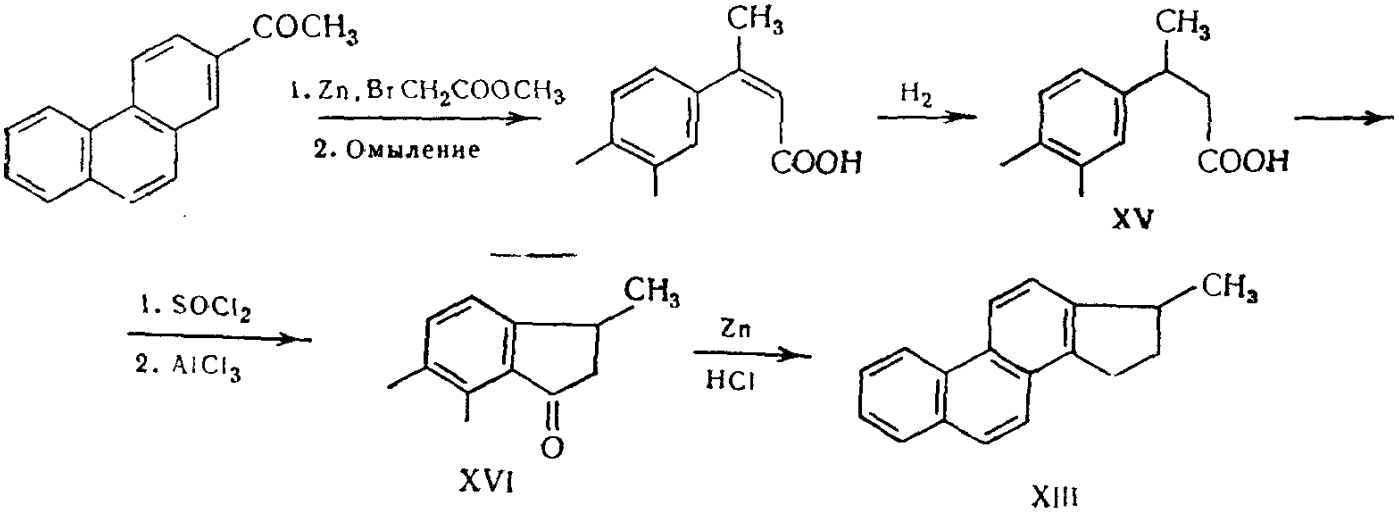


Неоценимое значение для выяснения природы полициклической системы стероидов имел метод дегидрирования с селеном. Как из холестерина, так и из желчных кислот при этом всегда получался так называемый углеводород Дильса, оказавшийся 3′-метил-1,2-циклопентанофенантреном (XIII).

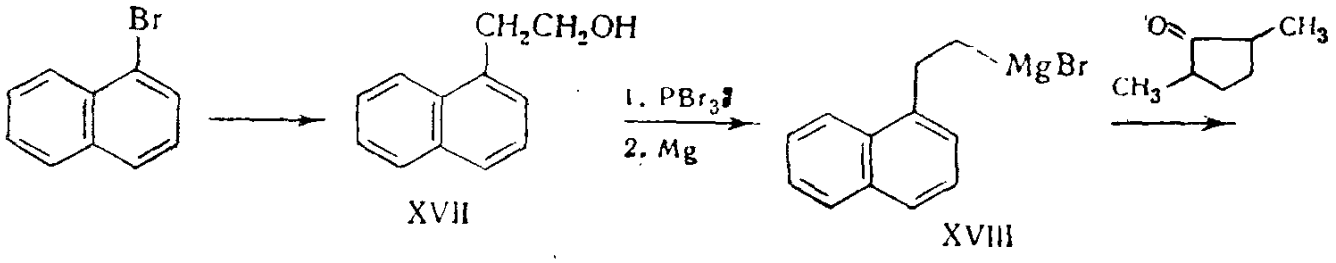


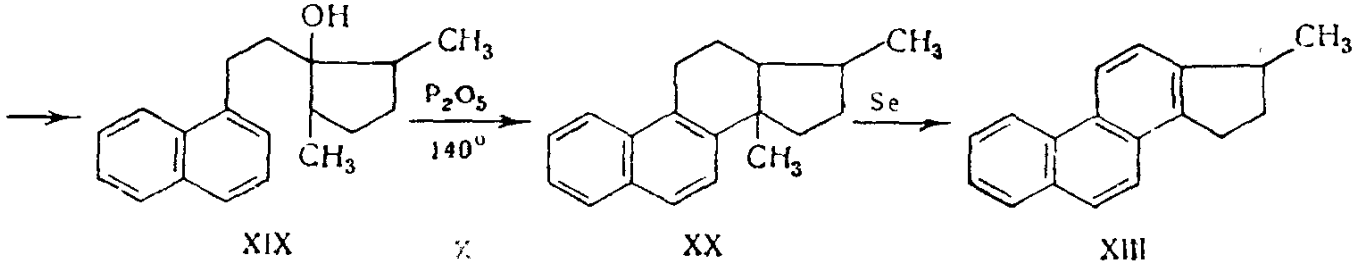
I XIII

Образование углеводорода Дильса было доказательством наличия в стероидах гидрированного скелета циклопентанофенантрена. Его строение было установлено синтезами Бергмана — Хиллемана и Харпера — Кона — Ружички. Бергман и Хиллеман исходили из 2-ацетилфенантрена (XIV). Реакцией Реформатского с последующей дегидратацией и гидрированием они получили кислоту (XV), хлорангидрид которой циклизовался *по* Фриделю — Крафтсу (в более реакционное α-положение нафталиновой системы!) в тетрациклический кетон (XVI). Восстановление последнего по Клемменсену привело к углеводороду Дильса.



Вторая группа исследователей исходила из α-бромнафталина, из которого обычным синтезом Гриньяра был получен β- (α-нафтил)этанол (XVII), а из него (через бромид) — магний-β-(α-нафтил)этилбромид

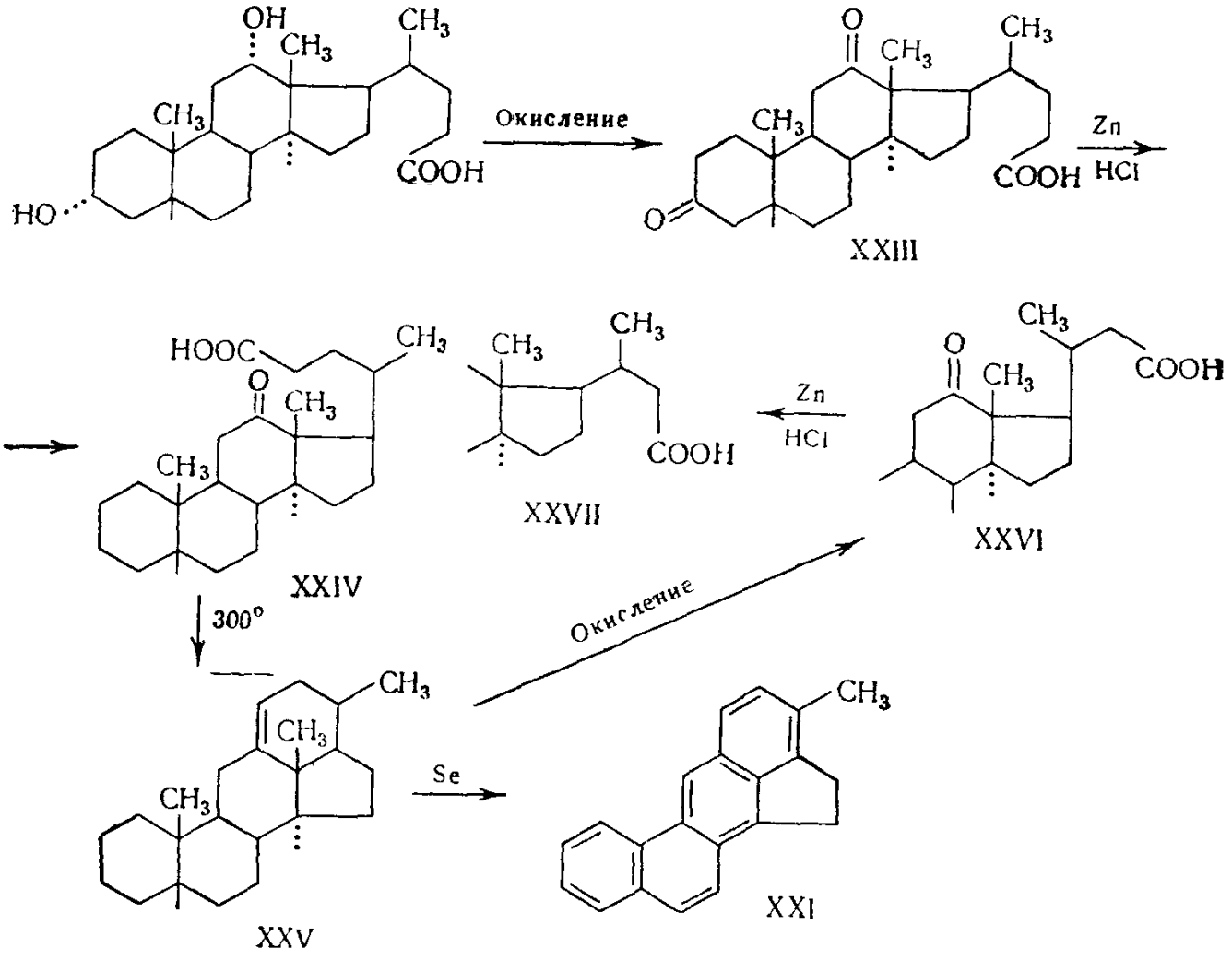




(XVIII). Конденсация последнего с 2,5-диметилциклопентаноном дала карбинол (XIX), циклизующийся под действием фосфорного ангидрида в углеводород (XX) (см. стр. 279). Дегидрирование углеводорода (XX) привело к углеводороду Дильса.

Большой материал по строению стероидов дало изучение другого углеводорода — метилхолантрена (XXI), полученного из дезоксихолевой кислоты (XXII). Ее окислением была получена 3,12-дикетохолановая кислота (XXIII), а частичным восстановлением последней 12-кетохолановая кислота (XXIV).

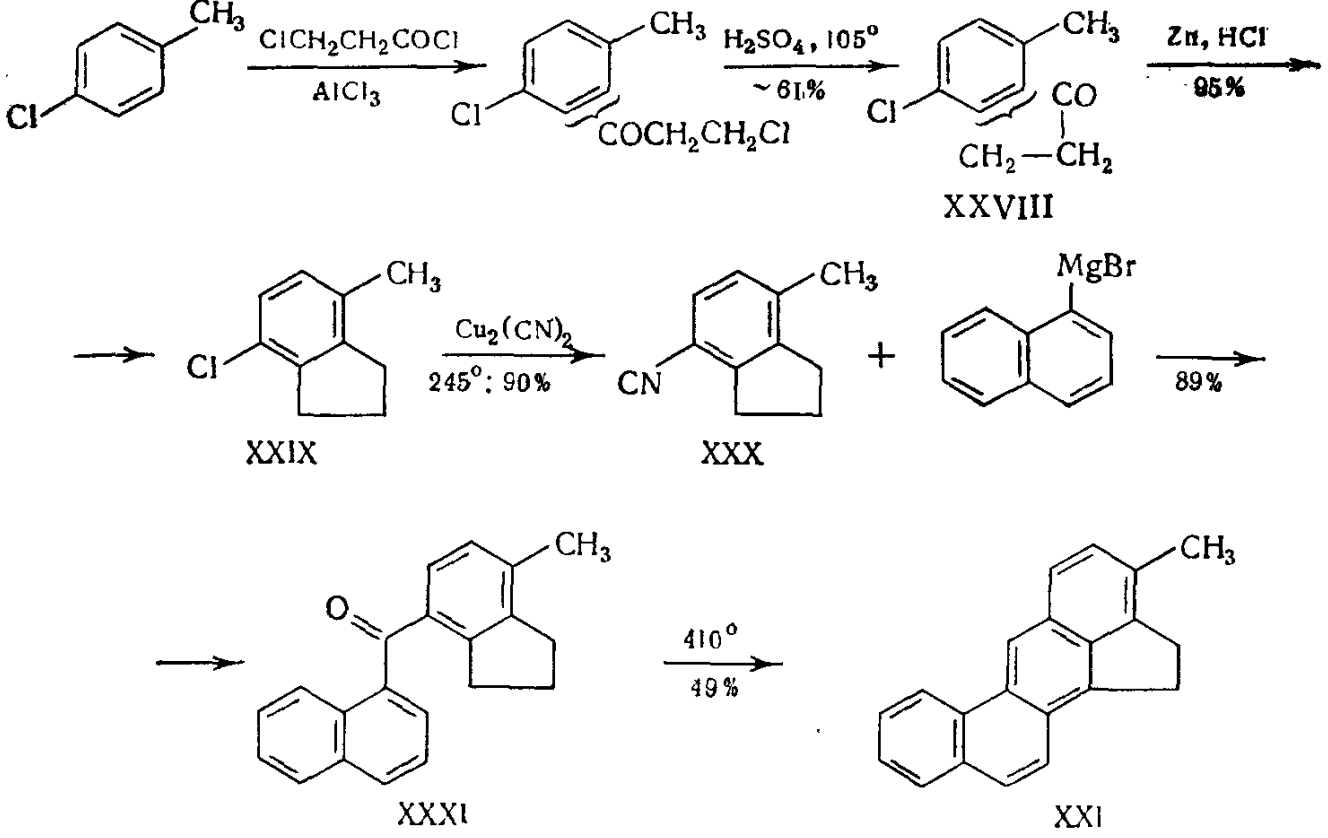
При многочасовом нагревании до 330° 12-кетохолановая кислота претерпевает внутримолекулярную конденсацию Перкина с одновременным декарбоксилированием и превращается в дегидронорхолен (XXV). При этом основной скелет стероида остается неизменным, что было доказано окислением дегидронорхолена в кетокислоту (XXVI), которая при восстановлении дала норхолановую кислоту (XXVII), полученную ранее из холановой кислоты.



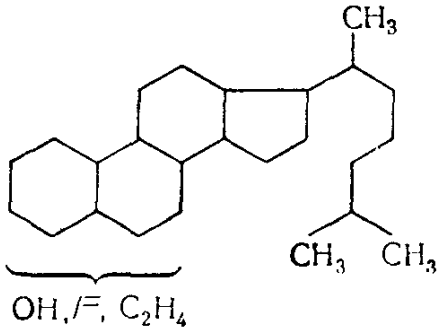
Дегидрирование дегидронорхолена (XXV) привело к получению метилхолантрена (XXI), строение которого было доказано синтезом из *n*-хлортолуола (см. стр. 281).

n-Хлортолуол рядом реакций был превращен в смесь хлорметилиндаионов (XXVIII), восстановление которой привело к индивидуальному 4-метил-7-хлориндану (XXIX). Последний с цианистой медью по Ульману дал нитрил (XXX), который конденсировался с магний-(α-нафтил)-бромидом в кетон (XXXI). Нагреванием кетона при 410° был получен метилхолантрен (XXI).

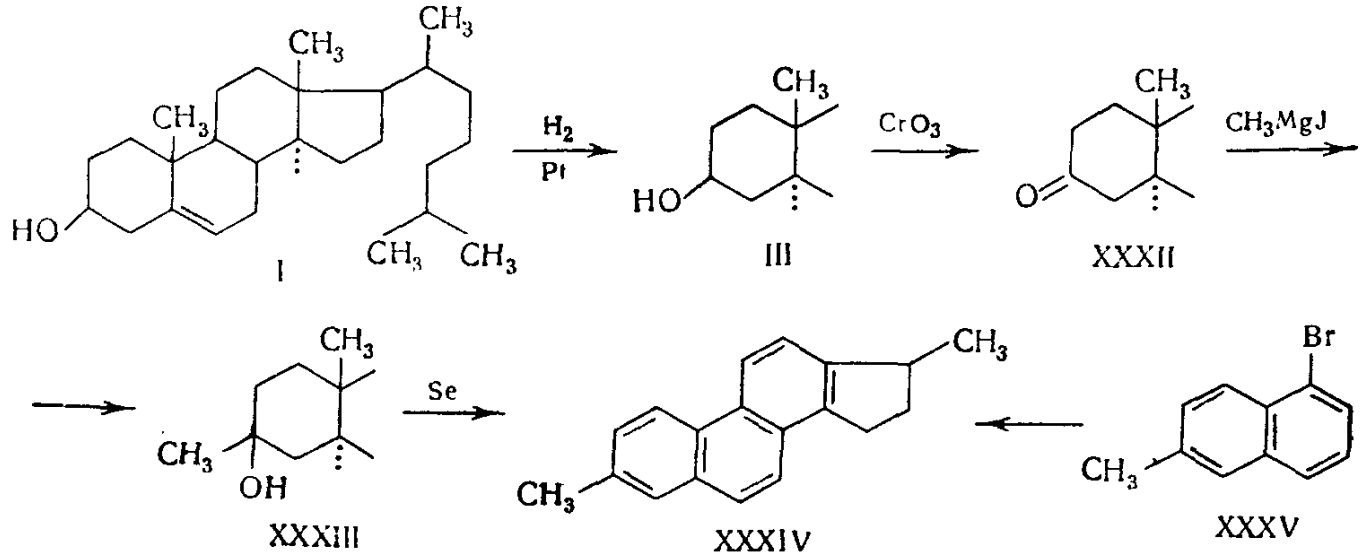
Установление строения метилхолантрена не только помогло доказать строение стероидного скелета, но определяло место одной из гидроксильных групп в холевой и дезоксихолевой кислотах.



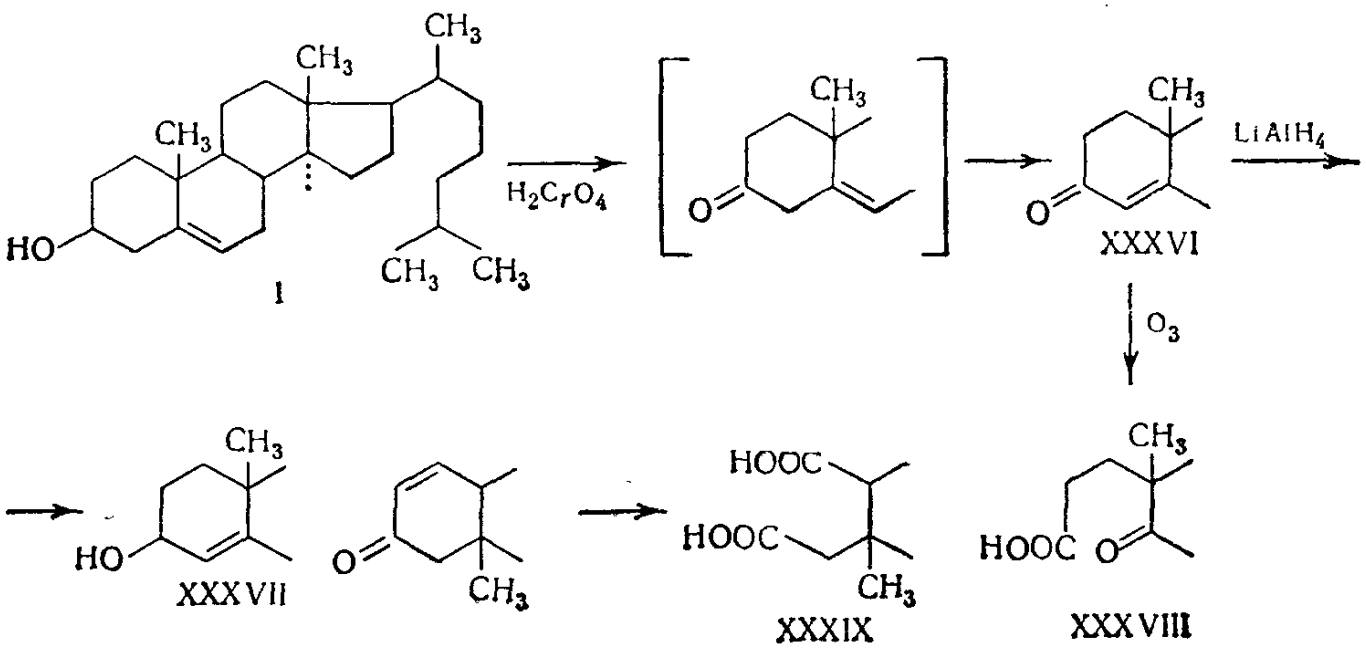
Для холестерина теперь оставалось определить положение гидроксильной группы, двойной связи и двух атомов углерода.



Положение гидроксила было установлено следующим образом. Холестерин (I) через холестанол (III) и холестанон (XXXII) был превращен реакцией Гриньяра в 3-метилхолестанол (XXXIII), давший при дегидрировании гомолог углеводорода Дильса (XXXIV). Строение последнего было доказано синтезом из 6-метил-1-бромнафталина (XXXV) по Харперу — Кону — Ружичке согласно схеме, приведенной выше.



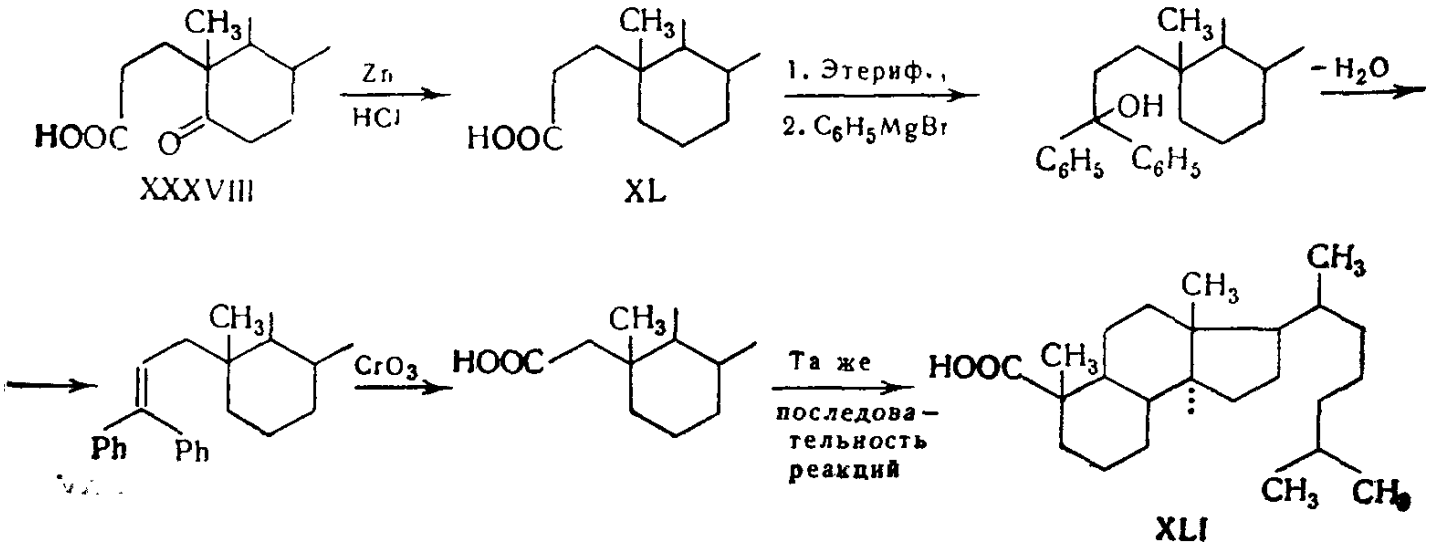
Положение двойной связи определилось из следующих данных. Холестерин (I) при окислении хромовой кислоты дает холестенон (XXXVI), в котором двойная связь сопряжена с кетонной группой, как это следует из данных ультрафиолетового спектра. Однако при обратном восстановлении холестенона получается не холестерин, но его изомер — аллохолестерин (XXXVII), из чего вытекает, что двойная связь в исходном холестерине находится не в α, β-, но β, γ-положении, и в процессе окисления (в кислой среде) мигрирует. Подобные случаи миграции были известны раньше, и поэтому двойная связь должна занимать положение 5(6) или 1(10) (следует иметь в виду, что положение ангулярных метильных групп еще не было определено).



Так как при озонировании (и окислительном расщеплении озонида) холестенона (XXXVI) была получена кетокарбоновая кислота (XXXVIII), а не дикарбоновая кислота (XXXIX), то вопрос решился бесспорно в пользу положения двойной связи 5(6).

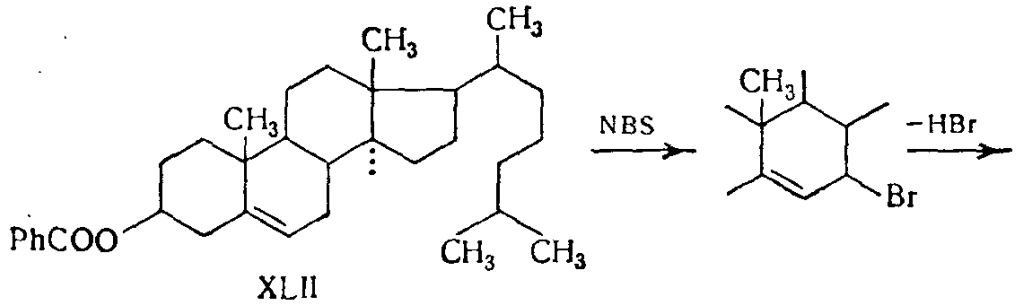
Оставалось решить вопрос о положении двух углеродных атомов. Поскольку в процессе дегидрирования они отщеплялись, то это означало, что они являются ангулярными и могут находиться в виде двух метильных (или одной этильной) групп в положениях 8, 9, 10, 13 и 14.

Положение одной ангулярной метильной группы было установлено расщеплением кислоты (XL), получаемой восстановлением вышеприведенной кетокислоты (XXXVIII). Расщепление (или деградация) приводилось по так называемому способу Барбье — Виланда последовательной этерификацией, действием магнийфенилбромида, дегидратацией

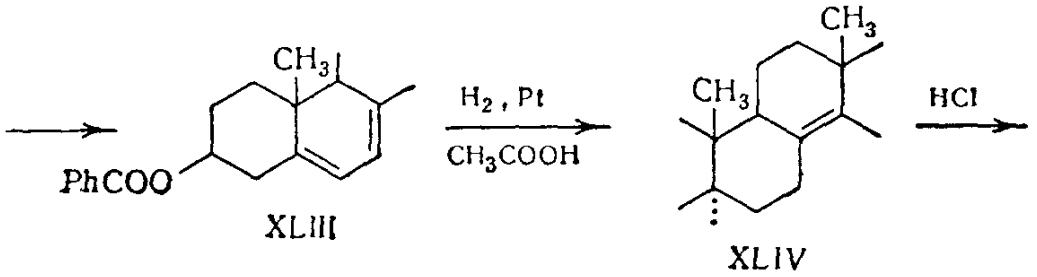


образующегося дейфенилкарбинола и окислением полученного дифенилэтилена в карбоновую кислоту, содержащую на один атом углерода меньше (см. стр. 282). В результате такого расщепления была получена кислота (XLI), которая трудно этерифицировалась и легко отщепляла окись углерода при нагревании с серной кислотой, что характерно для третичных карбоновых кислот. Следовательно, в положении 10 находился какой-то заместитель, т. е. ангулярная метильная группа.

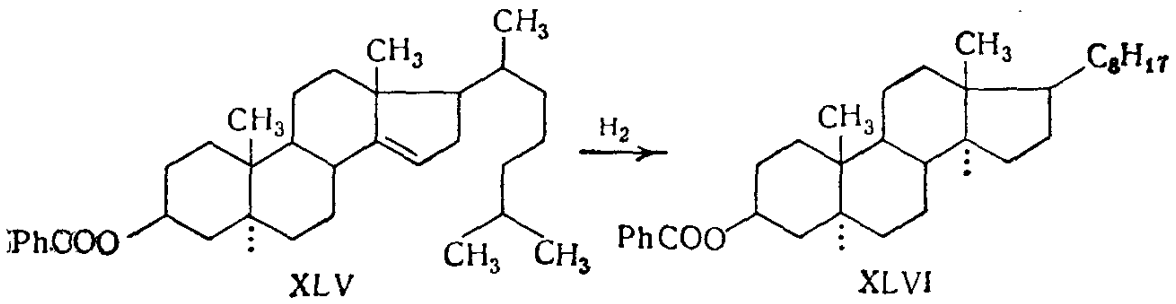
Положение второй метильной группы определяется из сопоставления следующих фактов. Бромированием бензоата холестерина (XLII) с помощью N-бромсукцинимида с последующим дегидробромированием получается бензоат так называемого 7-дегидрохолестерина (XLIII). Частичным гидрированием с платиной в уксусной кислоте он может быть переведен (с миграцией двойной связи в положение 8—9) в бензоат



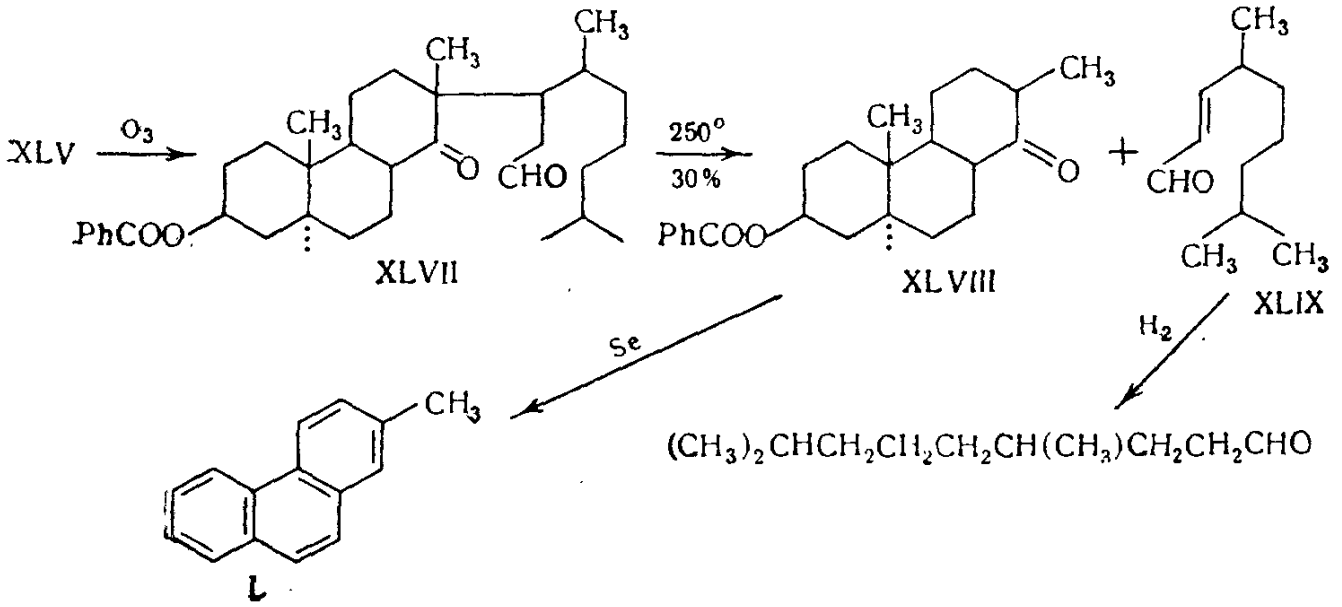
XLII



XLIII XLIV



XLV XLVI

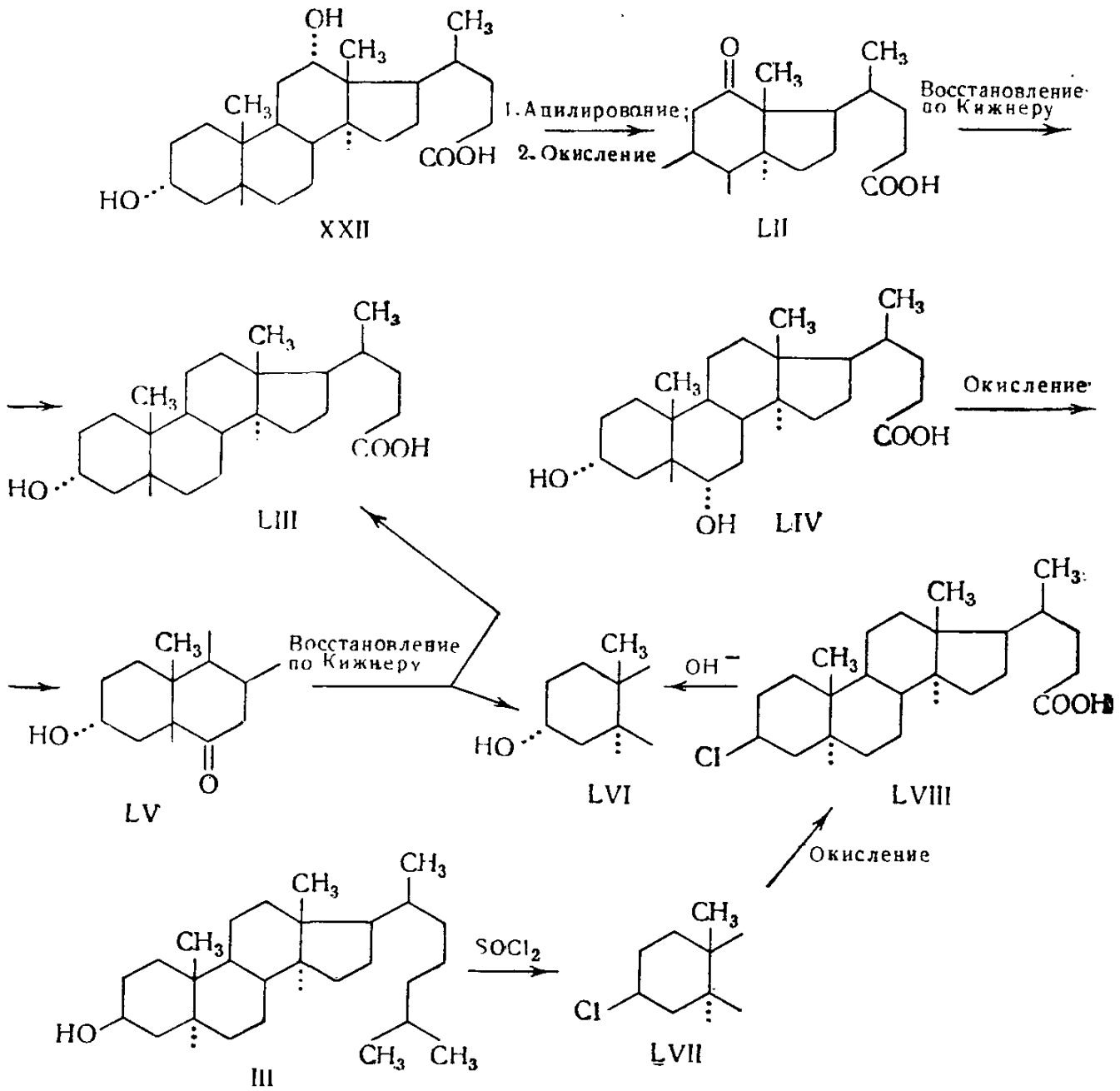


XLVII XLVIII XLIX

L

$\Delta^{8(14)}$ -холестенола (XLIV), который под действием HCl легко изомеризуется в бензоат Δ^{14}-холестенола (XLV). Последний при гидрировании дает бензоат холестанола (LVI), и следовательно, во время этих превращений стероидный скелет остается нетронутым. При озонировании бензоата (XLIV) образуется кетоальдегид (XLVII), который при нагревании до 250° претерпевает расщепление на бензоат так называемого кетона Кюстера—Логемана (XLVIII) и альдегид (XLIX) (см. стр. 283). Так как кетон Кюстера—Логемана (XLVIII) при дегидрировании с селеном дал 2-метилфенантрен (L), то положение второй метильной группы при $C_{(13)}$ было установлено. Альдегид (XLIX) при гидрировании дал 4,8-диметилнонаналь (LI), строение которого было доказано синтезом из цитронеллаля. Таким образом, формула холестерина не вызывала сомнений.

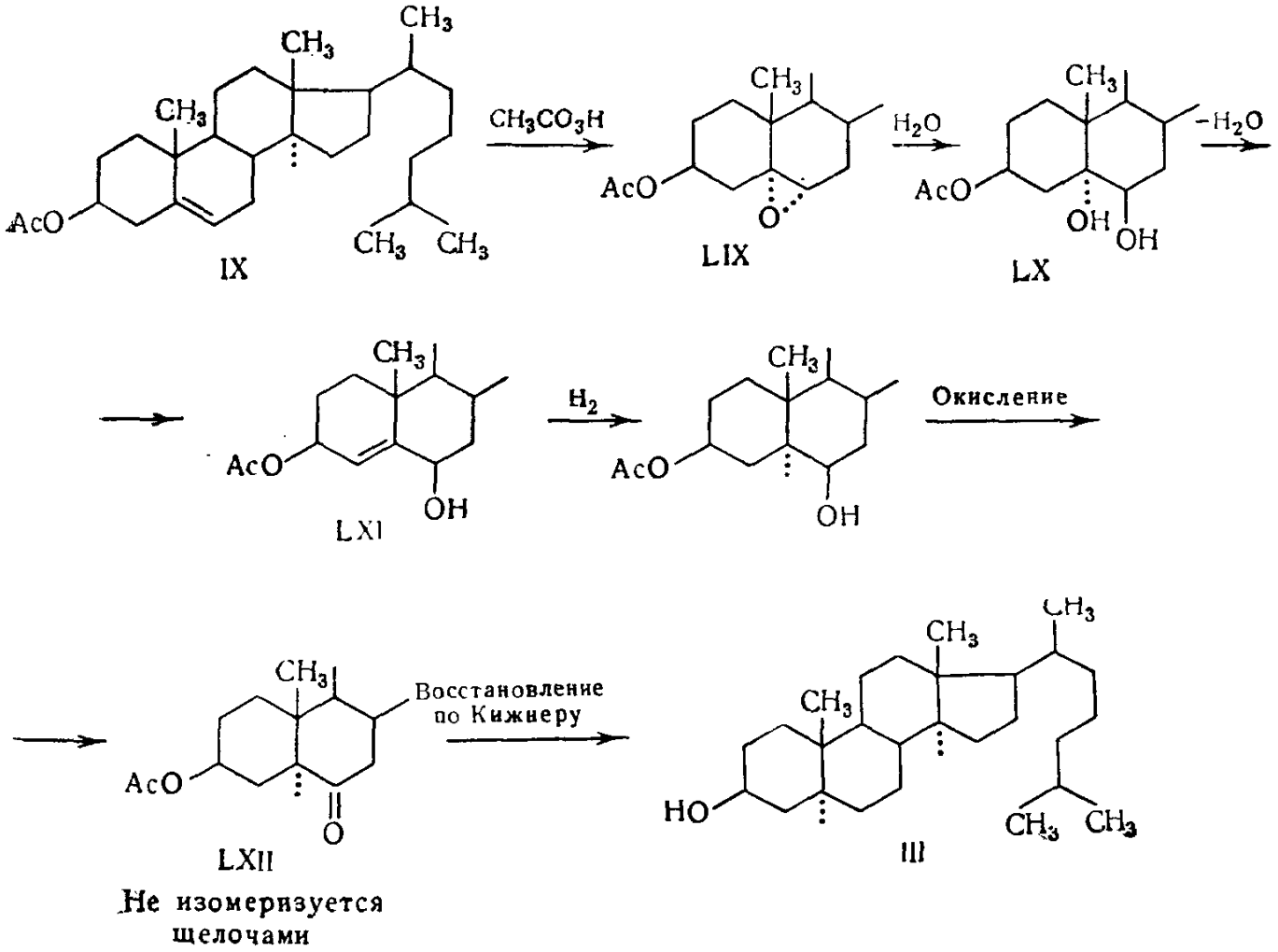
Что касается желчных кислот, то положение одного гидроксила при $C_{(12)}$ в дезоксихолевой кислоте (XXII) было доказано выше. Положение другого гидроксила было установлено впервые на основании детального изучения продуктов окисления, но эти доказательства слишком сложны. Гораздо проще сделать вывод из сопоставления следующих фактов. Дезоксихолевая кислота (XXII) частично ацилируется в положении 3, затем окисляется до кетокислоты (LII) и восстанавливается по Кижнеру в литохолевую кислоту (LIII). С другой стороны, гиодезоксихолевая



кислота (LIV) при частичном окислении переходит в 3α-окси-6-кетохолановую кислоту (LV), дающую при восстановлении по Кижнеру как литохолевую кислоту, так и ее 5-эпимер-3α-оксихолановую кислоту (LVI). Но последняя получается также из холестанола (III) переводом его в хлористый холестанил (LVII), окислением его в 3-хлораллохолановую кислоту (LVIII) и омылением (см. стр. 284). Поскольку при этих реакциях исключается возможность миграции гидроксильных групп (или галоидов) и имеют место лишь цис-транс-превращения сочленений циклов и Вальденовское обращение, то положение второй OH-группы в дезоксихолевой кислоте (и в других желчных кислотах) является доказанным.

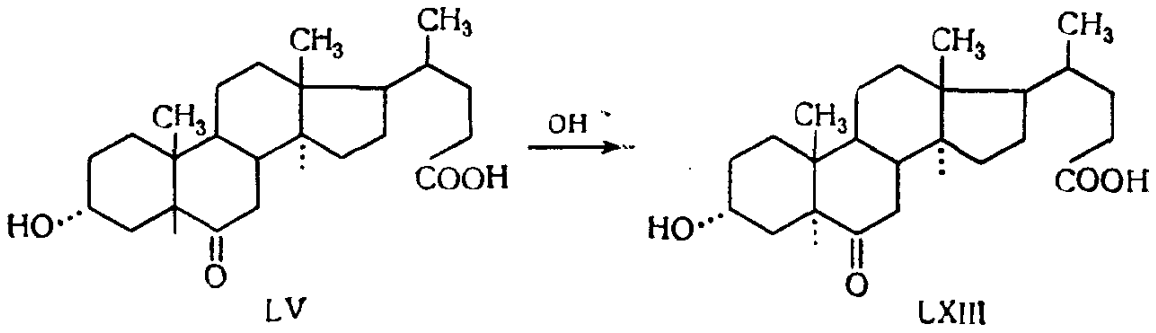
После установления строения основных стероидов встала задача расшифровки их пространственной конфигурации.

Транс-сочленение колец *A* и *B* в холестаноле было доказано следующим образом. При действии надуксусной кислоты на ацетат холестерина (IX) получается окись (LIX), дающая при гидролизе диол (LX). Дегидратация последнего проходит, как и следовало ожидать, с отщеплением третичного гидроксила и образованием соединения (LXI), которое после гидрирования и окисления перешло в ацетоксикетон (LXII). Этот кетон, имеющий систему α-декалона, не изомеризовался под действием щелочных агентов и, следовательно, принадлежал к транс-ряду. Поскольку при восстановлении по Кижнеру он дал холестанол (III), то в последнем кольца *A* и *B* также должны иметь транс-сочленение.



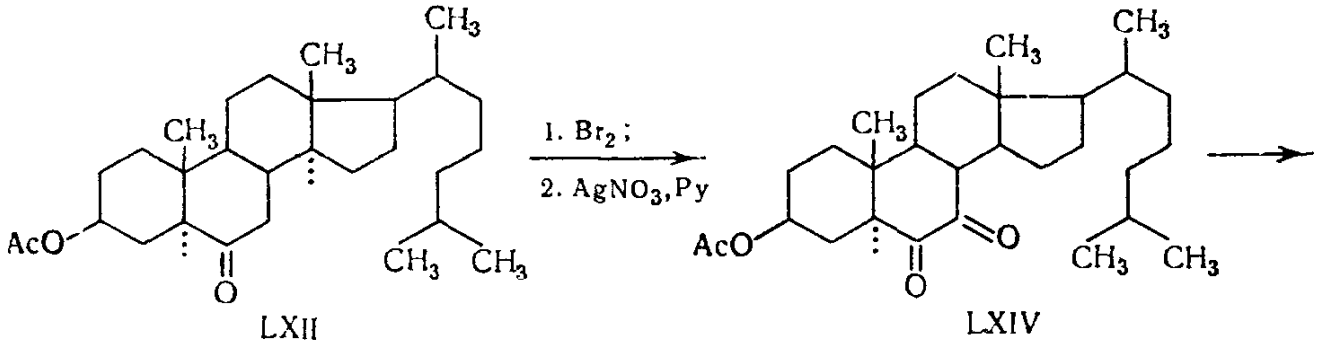
Так как копростанол (IV) является пространственным изомером холестанола (оба получаются при гидрировании холестерина), то он имеет цис-сочетание колец *A* и *B*. Такую же конфигурацию должны иметь

кольца *A* и *B* в желчных кислотах, о связи которых с копростанолом говорилось ранее. Это подтверждается также фактом, что 3α-окси-6-кетохолановая кислота (LV) изомеризуется в щелочных условиях в 3α-окси-6-кетоаллохолановую кислоту (LXIII).

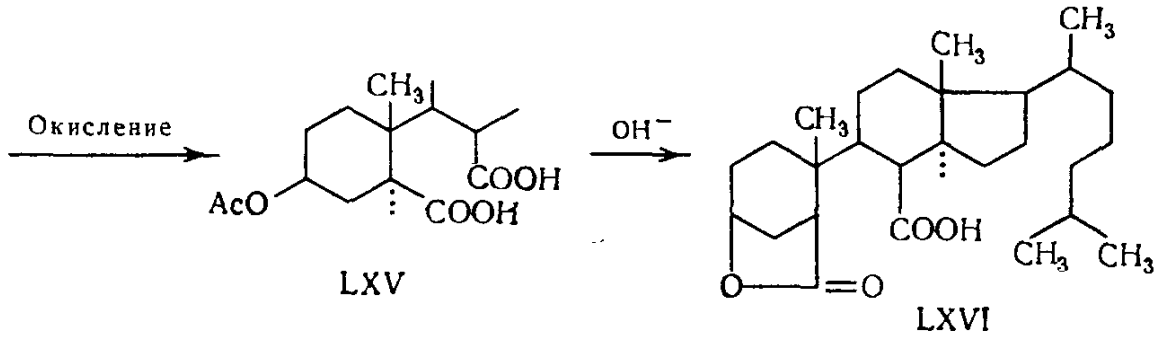


LV LXIII

Далее встал вопрос о конфигурации OH-группы в холестерине (и, следовательно, в холестаноле и копростаноле). Вопрос был решен в пользу β-конфигурации на основании следующих превращений ацетата 6-кетохолестанола (LXII), полученного выше. Его окислением (вначале бромирование, затем обработка азотнокислым серебром в пиридине) был получен α-дикетон (LXIV), давший при окислении ацетоксидикарбоновую кислоту (LXV).



LXII LXIV



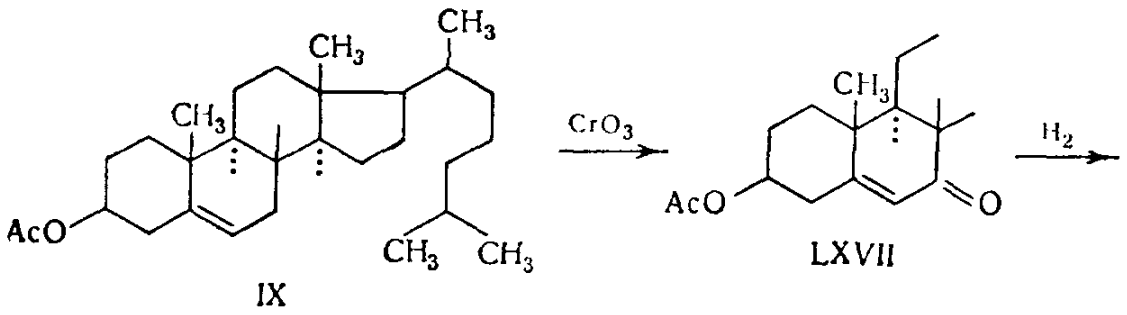
LXV LXVI

При омылении последней получен лактон (LXVI), образование которого возможно лишь тогда, когда карбоксильная и гидроксильная группы находятся в цис-положении друг к другу. Поскольку транс-сочленение колец *A* и *B* определяет β-положение карбоксильной группы, то такую же β-конфигурацию должна иметь и 3-OH-группа.

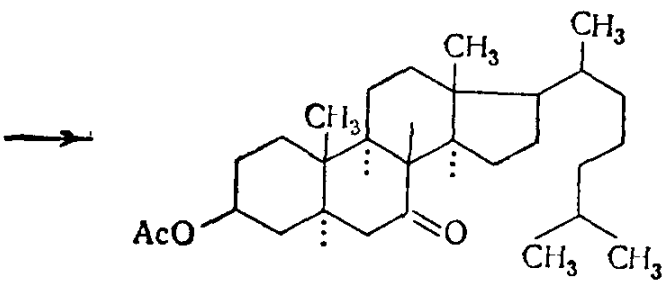
Для определения сочленения колец *B* и *C* прямых доказательств не имеется, если не считать полного синтеза стероидов, который является окончательным подтверждением их конфигурации. В принципе доказательство одинаково с доказательством транс-сочленения колец *A* и *B* в холестаноле.

Ацетат холестерина (IX) при окислении хромовым ангидридом дает ацетат 7-кетохолестерина (LXVII), гидрирование которого приводит к

ацетату 7-кетохолестанола (LXVIII). Последний не изомеризуется при действии метилата натрия и, следовательно, здесь имеется система *транс*-декалона.



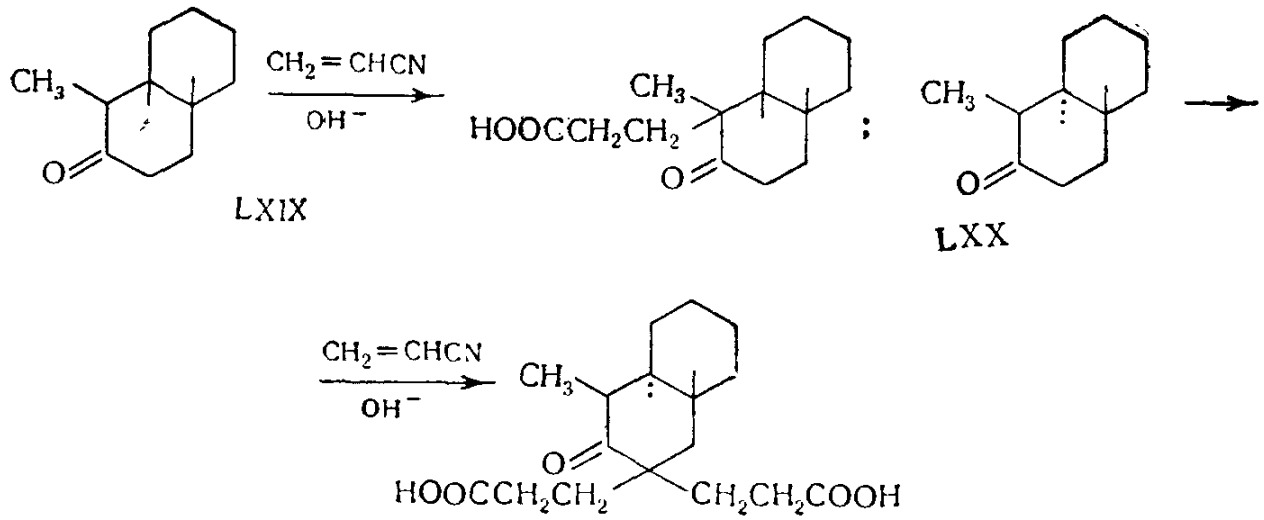
IX LXVII



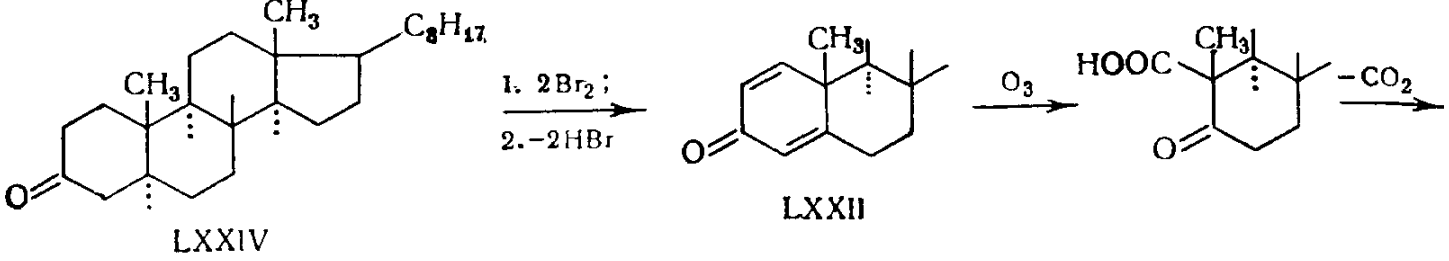
LXVIII

Не изомеризуется щелочами

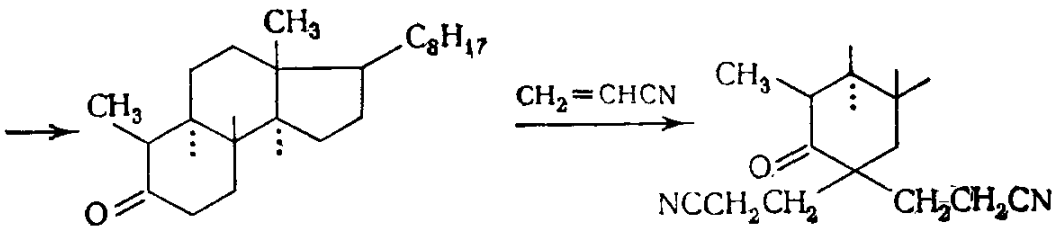
Второе доказательство было получено сравнением стеринов с цис- и транс-1-метил-2-декалонами (LXIX) и (LXX). Эти стереоизомеры декалона ведут себя неодинаково при конденсации с акрилонитрилом. В то время как цис-кетон реагирует с акрилонитрилом в положении 1, образуя монозамещенное производное, транс-кетон присоединяет две молекулы акрилонитрила в положении 3.



Оказалось, что так называемый кетон Инхоффена (LXXI), полученный озонированием $\Delta^{1,4}$-холестадиенона-3 (LXXII), реагирует с акрилонитрилом, образуя дизамещенный продукт (LXXIII), что по аналогии с кетонами (LXIX и LXX) указывает на транс-сочленение колец *B* и *C*. Кетон (LXXII) был получен из холестанона (LXXIV) бромированием и дегидробромированием.

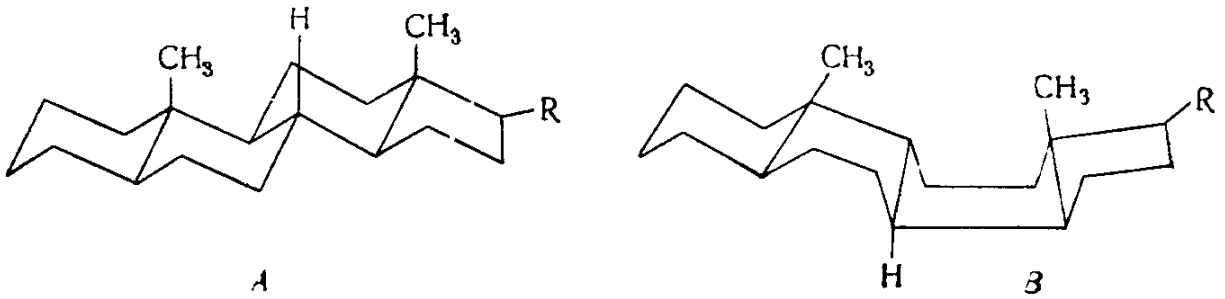


LXXIV LXXII



LXXI LXXIII

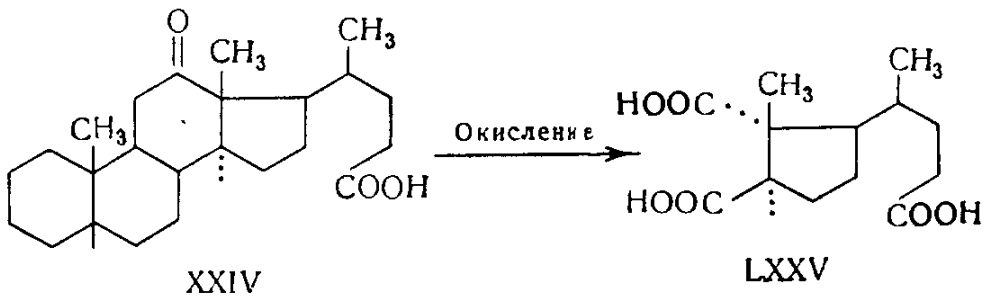
Легко видеть, что транс-сочленение колец *B* и *C* может быть осуществлено двумя путями: так, чтобы $H_{8)}$ был в β- или в α-положении. Для того чтобы сделать выбор, лучше всего прибегнуть к конформационному анализу. Для соединения с 8β-H возможна лишь пространственная модель (A), для 8α-H — модель (B).



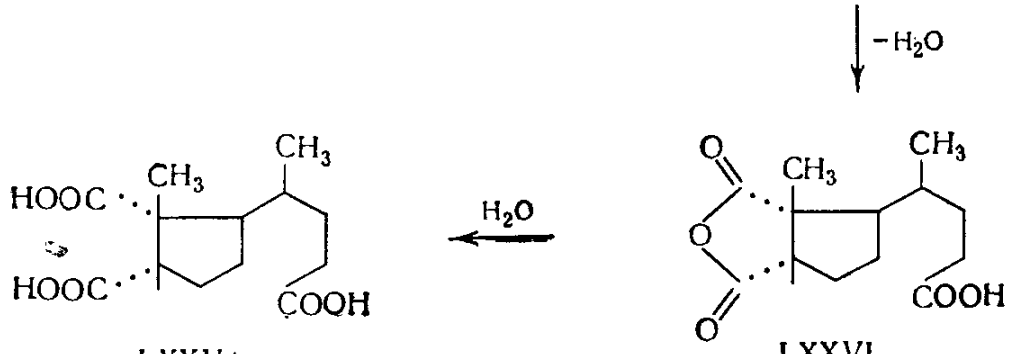
A *B*

В модели A все циклогексановые кольца имеют энергетически выгодную форму кресла, тогда как в модели B имеются два кольца в форме ванны (иначе нельзя собрать модель). Молекула, отвечающая второй модели, должна быть неустойчивой, если она вообще способна к существованию.

Транс-сочленение колец *C* и *D* было доказано как на производных желчных кислот, так и на производных стеринов. При окислении 12-кетохолановой кислоты (XXIV) была выделена трикарбоновая кислота (LXXV), где сохранилась боковая цепь и кольцо *D*. При нагревании



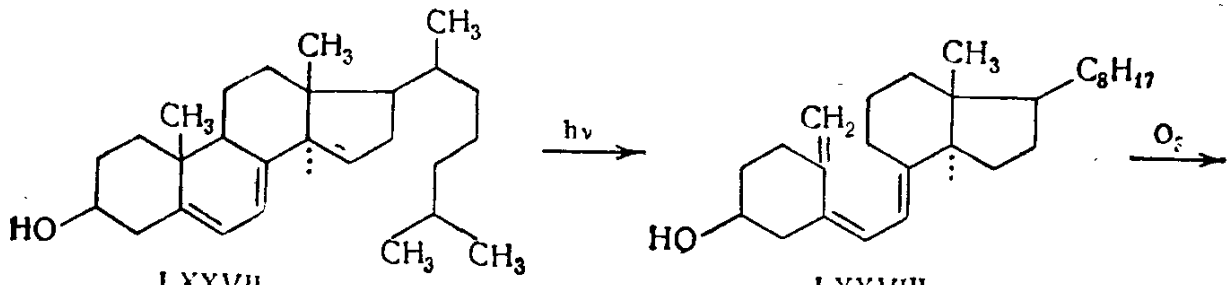
XXIV LXXV



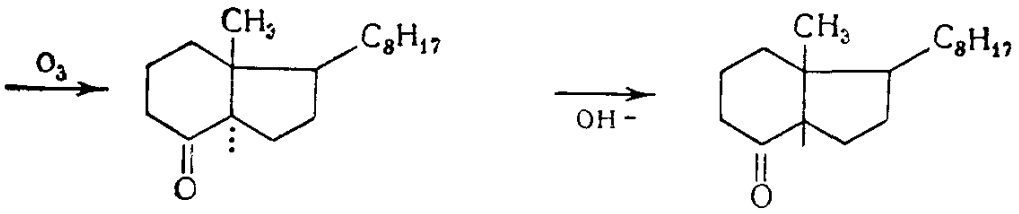
LXXVa LXXVI

кислота давала ангидрид (LXXVI), что, казалось, доказывало цис-расположение карбоксильных групп. Однако при омылении ангидрида получалась кислота (LXXVa) отличная от исходной (и уже безусловно имеющая цис-конфигурацию), и, следовательно, исходная кислота (LXXV) принадлежала к транс-ряду (см. стр. 288).

При облучении 7-дегидрохолестерина (LXXVII) (получение его бензоата описано выше), образуется витамин D (LXXVIII) с разомкнутым кольцом *D*, а при его озонировании кетон (LXXIX). Известно, что транс-инданоны менее устойчивы, чем их цис-изомеры, и переходят в них при обработке щелочными реагентами. Так как кетон (LXXIX) изомеризовался в кетон (LXXX), то первому из них, а, следовательно, и холестерину следовало приписать транс-сочленение колец *C* и *D*.



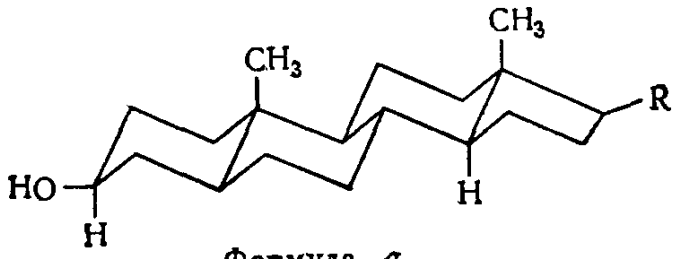
LXXVII LXXVIII



LXXIX LXXX

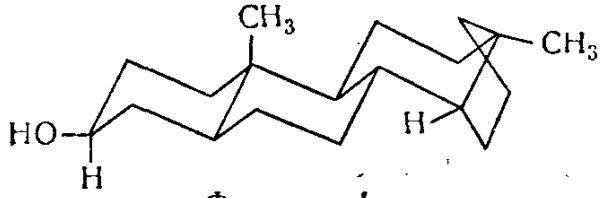
Для такого транс-сочленения могут быть две возможности. Рассмотрим обе формулы холестанола.

Формула *a* изображает молекулу холестанола с 13-CH_3-группой в β-положении и 14-H в α-положении.



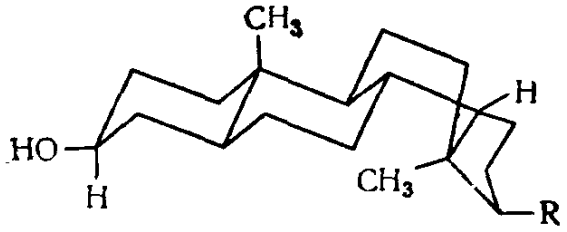
Формула *a*

Теоретически можно предположить, что возможна конфигурация с ангулярной метильной группой в α-положении и 14-H в β-положении. Однако при построении моделей оказалось, что такая конфигурация возможна только с ваннообразной формой кольца *C*; при креслообразном кольце *C* не удается соблюсти межатомные расстояния (см. формулу *b*).



Формула *b*

Формула *c* показывает, как будет выглядеть молекула, если кольцу *C* придать ваннообразное положение.



Формула *c*

Разница между конфигурациями *a* и *c* сразу бросается в глаза. Выбор между этими двумя структурами был сделан с помощью спектральных исследований (Бернала). В случае конфигурации *a* молекула относительно плоская и длинная, что подтвердилось рентгеноструктурными данными, а при конфигурации *c* молекула явно короче и толще, потому что не только циклопентановое кольцо, но и радикал боковой цепи смотрят «вниз».

Следует привести еще одно чисто химическое соображение. Как видно, положение 11 в кольце *C* (формула *c*) экранируется с обеих сторон метильными группами, т. е. должно быть малодоступным реакционным центром. Это и имеет место в действительности. Так, 11-кетосоединения не дают ни семикарбазона, ни оксима, ни вообще производных по кетогруппе, более того, они не реагируют с магнийбромфенилом. Это легко объяснимо при конфигурации *a*, поскольку здесь имеются две экранирующие метильные группы, и совершенно необъяснимо при другой форме, когда кетогруппа должна быть свободна для атаки реагента.

Дальше встает вопрос: в α- или β-положении находится боковая цепь углеродных атомов при $C_{(17)}$?

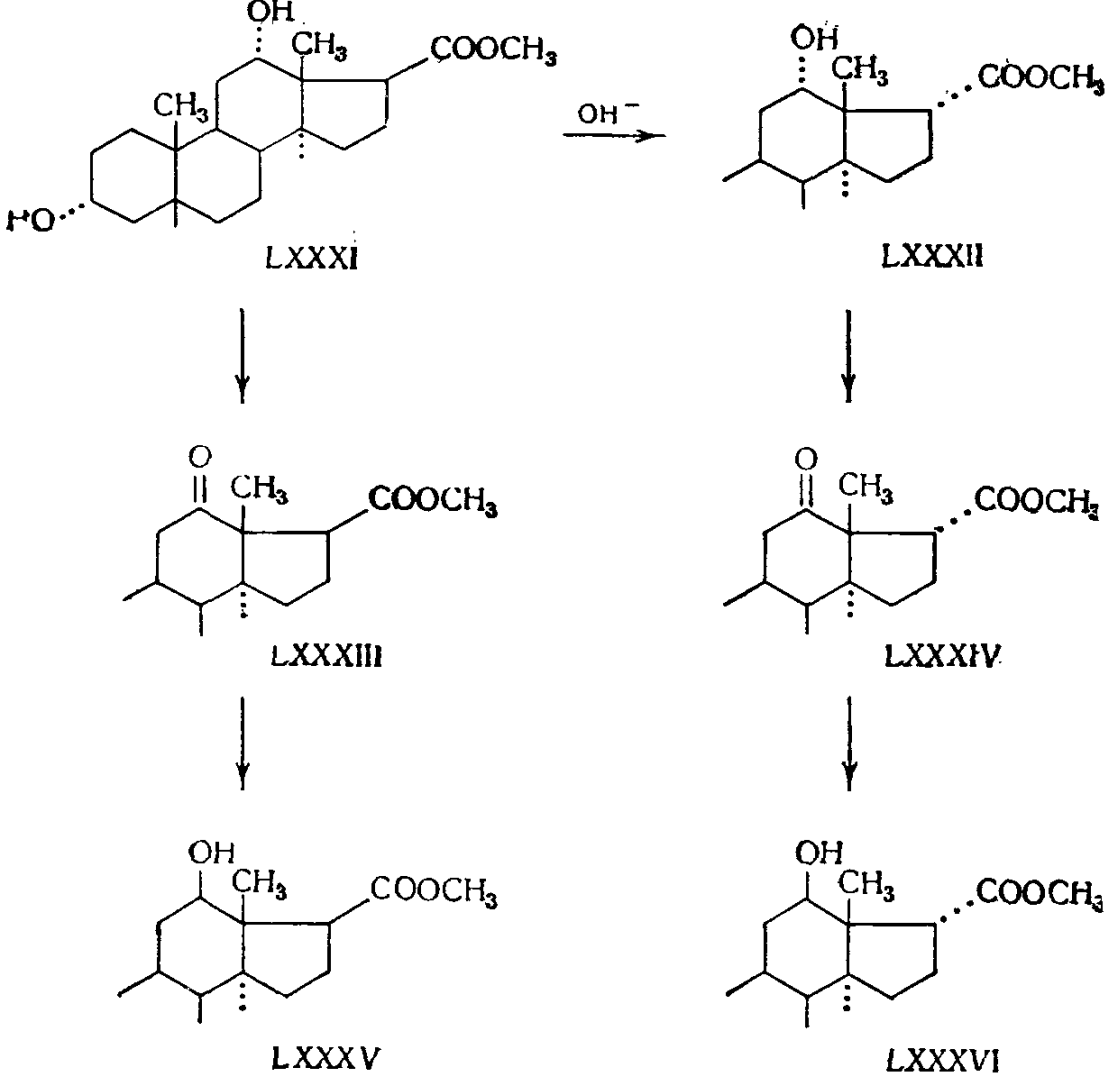
Оказалось, что все природные стероиды имеют β-конфигурацию боковой цепи.

Правильное доказательство положения боковой цепи было получено не сразу. До 1946 г. на основании ряда соображений (ошибочных, как оказалось потом) считали, что боковая цепь имеет α-конфигурацию. Только в 1946 г. Ружичка точно доказал β-положение боковой цепи, исследуя производные желчных кислот (см. приводимую схему на стр. 291).

При обработке метилатом натрия метилового эфира 3 α, 12 α-диоксиэтиановой кислоты (LXXXI) Ружичка обнаружил, что происходит эпимеризация карбоксильной группы с образованием эфира (LXXXII). Что происходит именно эпимеризация карбоксильных групп, а не гидроксильных, было доказано окислением, причем получились две различные кетокислоты (LXXXIII и LXXXIV).

Восстанавливая эти кетокислоты, Ружичка получил два других изомера диоксиэтиановой кислоты с β-гидроксильной группой (LXXXV и LXXXVI). Оказалось, что только одна кислота, именно соответствующая формуле (LXXXII), давала лактон. Следовательно, в ней гидроксильная и карбоксильная группы должны быть по одну сторону плоскости молекулы, т. е. их положение может быть либо α,α, либо β,β.

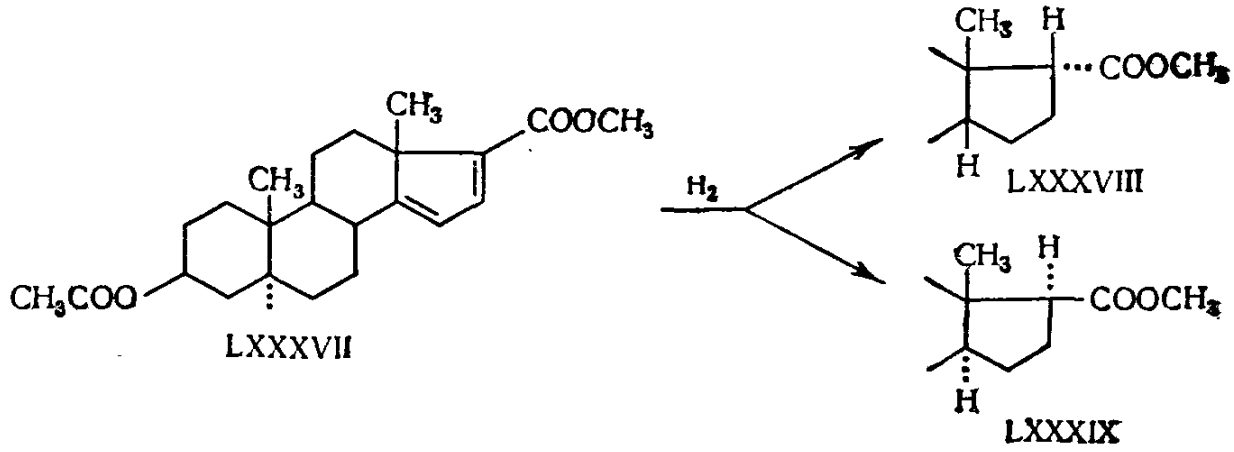
Если мы возьмем молекулярную модель кислоты (LXXXII), то оказывается, что соответствующий лактон построить очень легко. Напротив, модель лактона из кислоты (LXXXV) построить чрезвычайно трудно из-за пространственных затруднений, создаваемых ангулярной метильной группой.



Эфир (LXXXII) был получен из эфира (LXXXI), который, в свою очередь, был выделен из природных желчных кислот. Из вышеизложенного следует, что карбоксильная и гидроксильная группы в (LXXXI) занимают транс-положение, и цепь при кольце *D* должна занимать β-положение.

Это первое доказательство Ружички.

Он также дал и второе доказательство на примере гидрирования эфира 3-ацетоксиаллоэтиадиеновой кислоты (LXXXVII), при котором было получено два изомера. Так как каталитическое гидрирование идет с цие-присоединением водорода (правило Ауверса — Скита) в положении 1—4, то, следовательно, должны образоваться предельные эфиры (LXXXVIII) и (LXXXIX).



Один из полученных Ружичкой эфиров оказался идентичен соединению, синтезированному из природных желчных кислот. Поскольку природные стероиды имеют транс-сочленение колец *C* и *D*, то им отвечает лишь формула (LXXXIX) с β-положением карбоксильной группы.

ЛИТЕРАТУРА

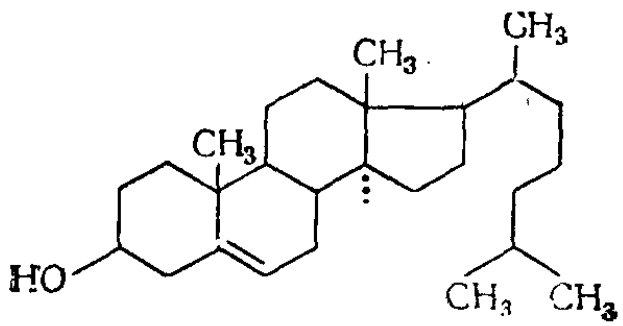
И. Н. Назаров, Л. Д. Бергельсон. Химия стероидных гормонов. М., Изд-во АН СССР, 1955.

Л. Физер, М. Физер. Химия природных соединений фенантренового ряда. М. Госхимиздат, 1953.

Глава 3

СТЕРИНЫ И ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ

Эта глава посвящена представителям одной из многочисленных групп стероидов — стеринам и, прежде всего, холестерину. Выше уже говорилось о том, что холестерин чрезвычайно распространен в животном организме и содержится в любой животной клетке; его особенно много в нервных клетках, но в небольшом количестве он находится также и в крови. Организм человека содержит около 140 *г* холестерина.



Холестерин

Обычно холестерин выделяют из мозга рогатого скота. По одному из способов рекомендуют замораживать исходный материал в жидком воздухе, тонко раздроблять и затем экстрагировать ацетоном, причем получается раствор холестерина. Для того чтобы очистить полученный сырой холестерин, его переводят в дибромид, плохо растворимый в органических растворителях. Этот дибромид легко перекристаллизовать и затем перевести в холестерин добромированием с цинком в спирте.

Имеется еще и другой способ выделения холестерина, тоже чрезвычайно важный. Оказывается, что холестерин образует нерастворимое комплексное соединение с дигитонином — соединением, принадлежащим к классу сапонинов. Этот комплекс легко разлагается либо при нагревании в вакууме при 240° (отгоняется чистый холестерин); либо при взаимодействии с пиридином. Ввиду чрезвычайно малой растворимости комплекса эта реакция употребляется для количественного определения холестерина. Однако в эту реакцию вступает не только холестерин, но и другие стероиды, при этом обязательно те, которые содержат β-гидроксильную группу в положении 3. Так, аналогичные комплексы образуют также эргостерин, стигмастерин и даже любой искусственно полученный стероид, опять-таки при условии, что гидроксильная группа занимает это положение.

Весьма важными являются качественные реакции на холестерин, особенно реакция Либермана — Бурхардта. Для проведения этой реакции раствор холестерина в хлороформе или в дихлорэтане приливается к раствору уксусного ангидрида в серной кислоте. При этом появляется чрезвычайно устойчивое темно-зеленое окрашивание.

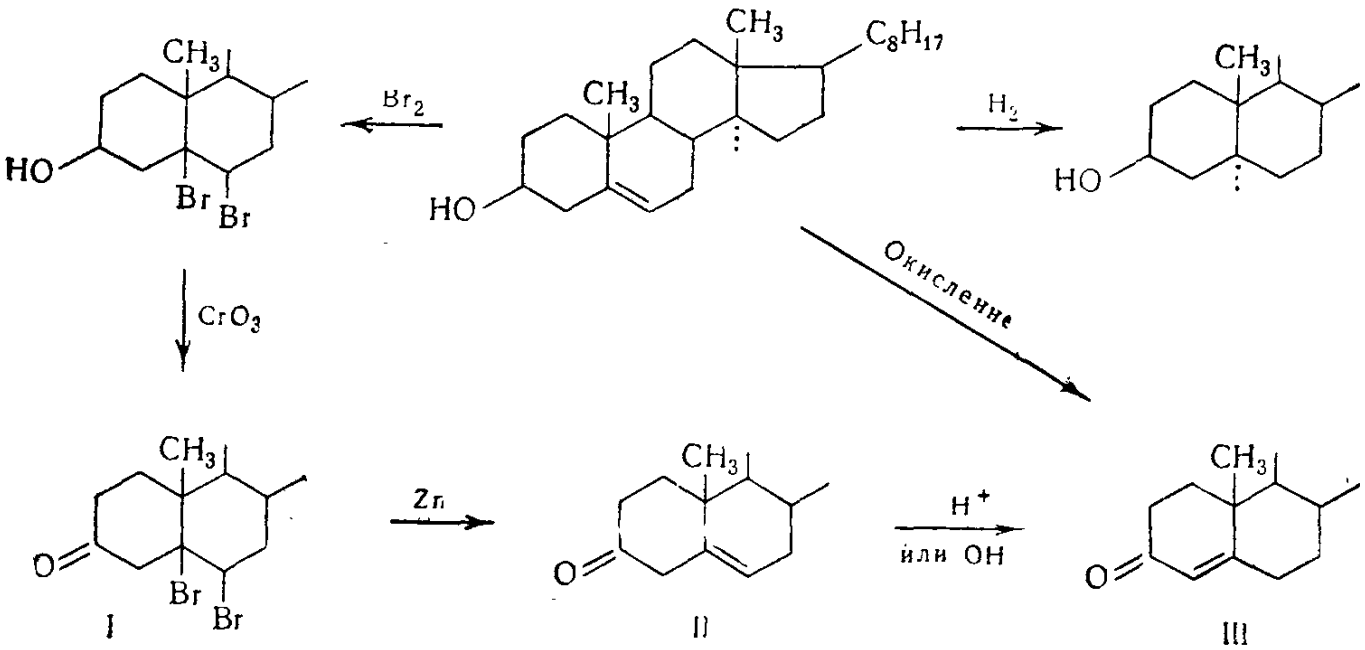
Эту реакцию дают не только холестерин, но также и его сложные эфиры. Вообще она характерна для всех стеринов, которые имеют двойную связь в положении 5.

Реакция Либермана имеет практическое приложение, например в меховой промышленности, когда овечьи шкуры моют и очищают от грязи. Концом этой очистки считается отрицательная реакция Либермана — Бурхардта, показывающая, что все стерины (а следовательно, и жиры) удалены с поверхности шкуры. Реакция применима и для количественного определения холестерина колориметрическим путем, так как окраска очень устойчива.

Следует упомянуть еще один биохимический метод количественного анализа на холестерин. Дигитонин вызывает гемолиз эритроцитов, добавление небольшого количества холестерина подавляет этот гемолиз. Этим методом возможно определять содержание холестерина до 1 γ. Сущность этого определения сводится, как уже говорилось, к образованию комплексного соединения между холестерином и дигитонином.

Окисление холестерина можно провести разными способами — с защитой и без защиты двойной связи. При последовательном бромировании и окислении хромовым ангидридом образуется дибромкетон (I). При его дебромировании в мягких условиях (цинком в спирте) получается кетон с тем же положением двойной связи, что и в исходном холестерине, т. е. Δ^5-холестенон (II).

Если же окислять холестерин без предварительной защиты двойной связи, то получается кетон с иным положением двойной связи, т. е. Δ^4-холестенон (III).



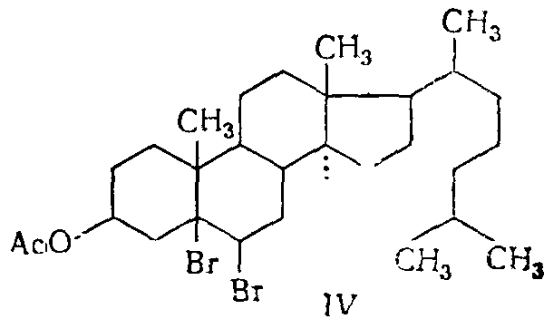
Такое различие в результатах объясняется тем, что в обоих случаях вначале образуется Δ^5-холестенон, который чрезвычайно неустойчив и в присутствии кислых или щелочных агентов легко переходит в Δ^4-холестенон. Это случай не единичный и имеется много других примеров, когда кетоны с двойной связью в положении β, γ легко переходят в α, β-непредельные кетоны.

Что касается гидрирования холестерина, то оно приводит преимущественно к холестанолу, копростанол образуется в небольших количествах. Вообще гидрирование Δ^5-связи в стероидах дает производные холестана, гидрирование Δ^4-соединеий приводит, в зависимости от соединения, к 5α- или 5β-производным.

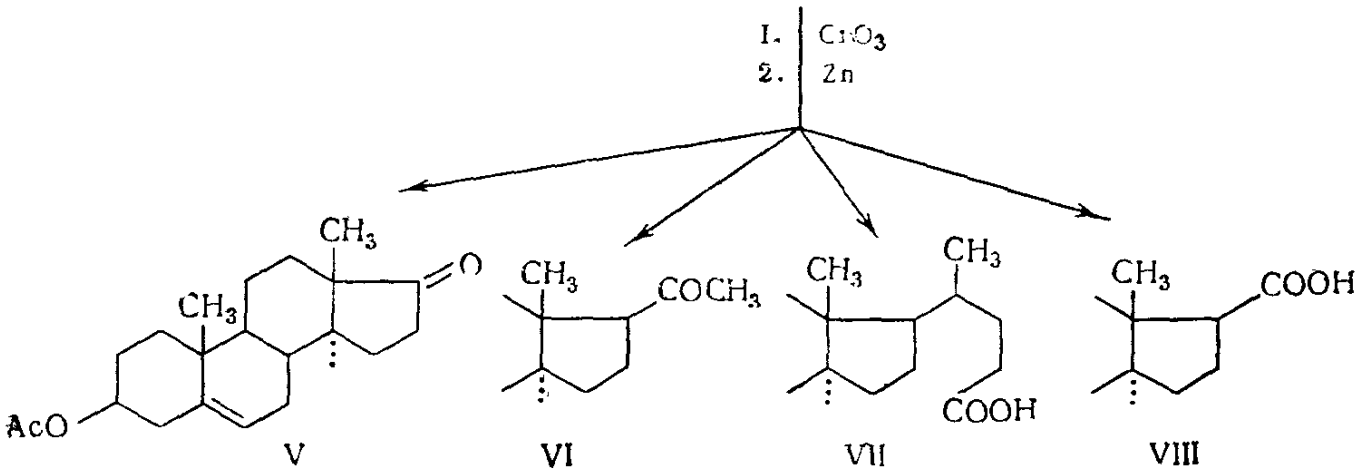
Особо следует отметить интересную реакцию превращения холестерина в Δ^4-холестенон, так называемую реакцию Оппенауэра. Если холестерин кипятить с раствором алкоголята алюминия в присутствии какого-нибудь акцептора водорода, например циклогексанона или ацетона, то при этом получается до 90% холестенона, больше, чем любым из других способов. Здесь так же, как и при реакции с хромовой кислотой, наблюдается миграция двойной связи.

В техническом отношении чрезвычайно важна другая реакция окисления холестерина, с защитой не только двойной связи, но также и гидроксильной группы, т. е. окисление ацетата дибромида холестерина (IV). Об этой реакции уже упоминалось в главе об определении строения стероидов. Сейчас к ней следует вернуться.

Так как холестерин чрезвычайно доступен, то, естественно, напрашивалась мысль получать различные стероидные соединения, исходя из холестерина. Самый простой способ, который был открыт в 30-х годах, это окисление ацетата дибромида холестерина хромовой кислотой в уксусной кислоте. При этом получается целая гамма продуктов, из которых основными являются ацетат дегидроэпиандростерона (V), ацетат прегненолона (VI), 3β-ацетокси-Δ^5-холеновая кислота (VII) и 3β-ацетокси-Δ^5-этиеновая кислота (VIII), нашедшие применение в частичном синтезе стероидных гормонов.



IV



V VI VII VIII

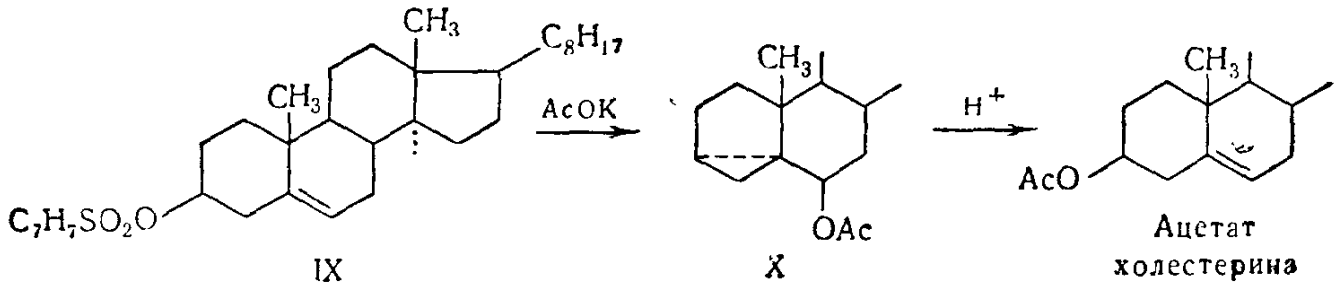
Технически окисление холестерина производится при 50—60°. Трудность процесса заключается в том, что при этом получаются хромовые соли стероидных кислот, которые образуют вязкую массу. Для того, чтобы процесс шел лучше, обычно добавляют сульфат натрия и хромовый ангидрид берут в некотором избытке. Дальше идет фильтрация, упаривание в вакууме, дебромирование цинком, экстракция бензолом и разделение на нейтральную и кислую фракции. В нейтральной фракции находятся кетоны (V) и (VI), в кислой фракции кислоты (VII), (VIII) и ряд других кислот. Ацетаты дегидроэпиандростерона (V) и прегненолона (VI) разделяются через семикарбазоны. Семикарбазон (V) выделяется из горячего раствора, а семикарбазон (VI) при охлаждении маточного раствора.

Соответствующие кетоны выделяются из семикарбазонов нагреванием с различными карбонилсодержащими соединениями, как то: бензальдегид, формальдегид, *n*-оксибензальдегид, пировиноградная кислота и т. д. Особенно хорошо идет реакция с пировиноградной кислотой, при этом получаются чистые кетоны, и выходы здесь близки к количественным. Пировиноградная кислота чрезвычайно удобна тем, что ее семикарбазон растворим в воде, а получающиеся кетоны в воде не растворимы.

Общие выходы продуктов невелики: дегидроэпиандростерона получается примерно 6—8%, количество прегненолона может быть увеличено, если вести процесс не при 50—60°, а при более низкой температуре, но обычно выходы составляют 1—2%. Кислот получается гораздо больше. В частности, в смеси содержится 30—40% кислоты (VII), но выделить ее в чистом виде затруднительно.

Если вести окисление ацетата холестерина хромовым ангидридом в специально подобранных условиях, то кетогруппа становится в положение 7. Особенно хорошо эта реакция протекает, если брать хромовый ангидрид в растворе третичного бутанола. При этом действующим началом является, в сущности, не хромовый ангидрид, а сложный эфир хромовой кислоты — третично-бутилхромат. Выходы достигают 60—65%.

Следует упомянуть еще об одной интересной реакции производного холестерина. При взаимодействии холестерина с паратолуолсульфохлоридом получается соответствующий эфир паратолуолсульфокислоты или, как его называют обычно, тозилат холестерина (IX).



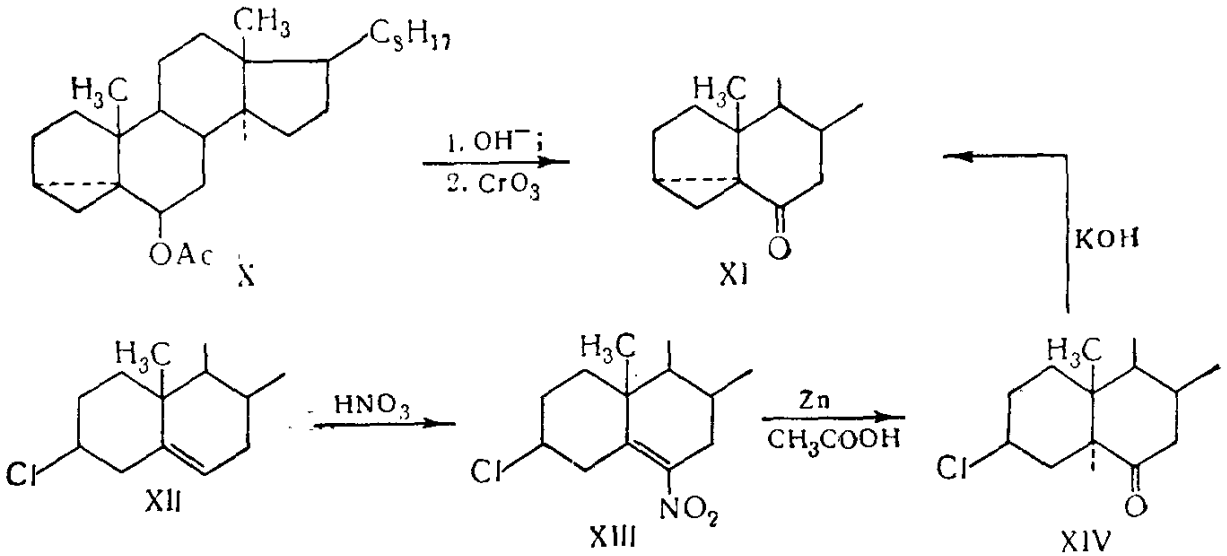
IX X

Если этот тозилат обработать ацетатом калия, то происходит интересная перегруппировка с образованием соединения, уже имеющего трехчленный цикл — так называемого ацетата *i* холестерина (X).

При действии серной кислоты в присутствии уксусной идет обратная реакция и получается ацетат холестерина.

Некоторое время строение *i*-холестерина оставалось неясным. Потом оно было выяснено следующим образом.

Ацетат *i*-холестерина после омыления и окисления, например хромовым ангидридом, дает *i*-холестанон (XI), который был получен также из хлористого холестерила (XII) путем, подтверждающим его строение.



X XI

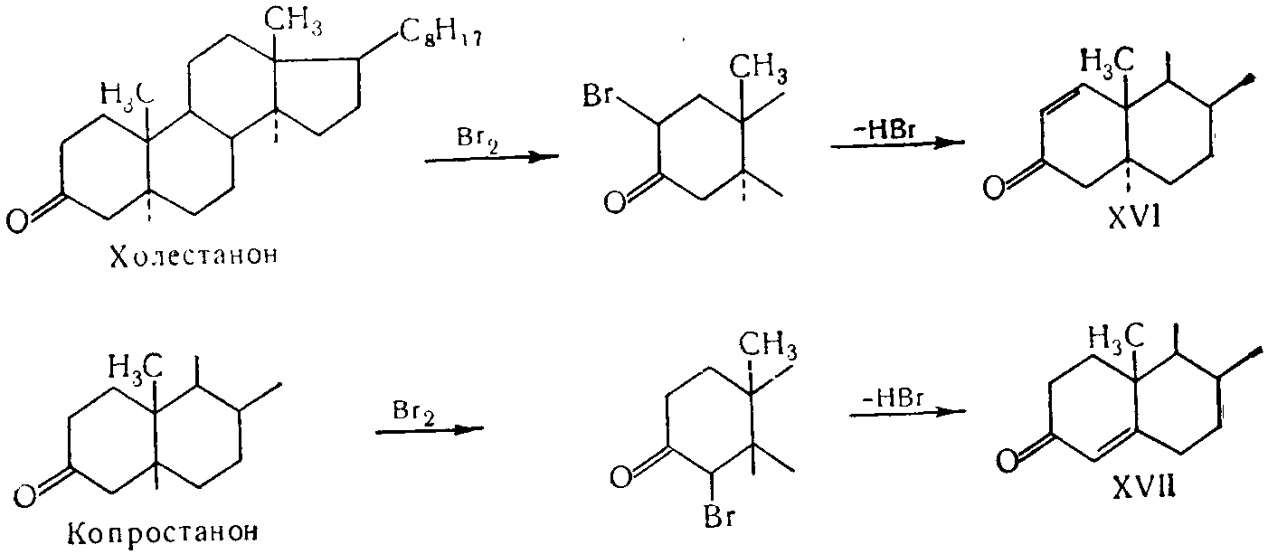
XII XIII XIV

Нитрованием хлористого холестерила (XII) получают нитросоединение (XIII). Действием цинка в уксусной кислоте это соединение восстанавливается с удалением нитрогруппы, причем образуется 3β-хлорхолестанон-6 (XIV). Последний при действии едкого кали превращается в *i*-холестанон (XI). Такого рода реакции с образованием трехчленного цикла были известны ранее в алифатическом ряду. Так, 5-хлорпентанон-2 (XV) при действии щелочей переходит в метилциклопропилкетон.

$$CH_2ClCH_2CH_2COCH_3\,(XV) \xrightarrow{\text{кон}} CH_2CH_2CH{-}\,COCH_3$$

При реакциях стероидных соединений надо всегда иметь в виду возможность образования таких циклопропановых производных.

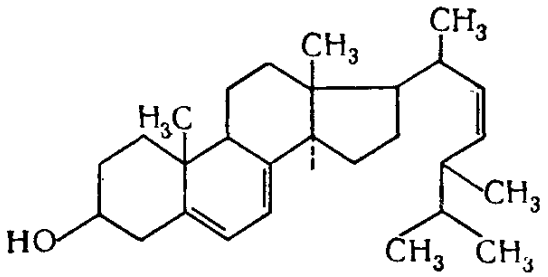
Интересно направление реакций бромирования холестанона и копростанона. Оказывается, что бромирование этих соединений проходит совершенно различно. В то время как холестанон с транс-сочленением колец *C* и *D* образует исключительно 2-бромпроизводное, копростанон образует 4-бромпроизводное. При последующем дегидробромировании этих соединений, лучше всего действием органических оснований, получаются соответствующие α,β-непредельные кетоны (XVI) и (XVII) различного строения.



Во втором случае получается уже известный Δ^4-холестенон (XVII).

Такое направление бромирования для *AB-транс* и *AB-цис*-3-кетостероидов чрезвычайно важно при частичном синтезе стероидов. В первой главе уже говорилось, что кортикоидные гормоны всегда содержат Δ^4-CO-группировку. Если при частичном синтезе исходить из транс-соединения, то ввести двойную связь в это соединение довольно трудно. Напротив, при соединении с цис-сочленением колец *A* и *B* эта группировка создается чрезвычайно легко.

Более сложно построенный аналог холестерина эргостерин (XVIII) содержит три двойных связи, одна из которых находится в боковой цепи, а две другие в кольце *B*.



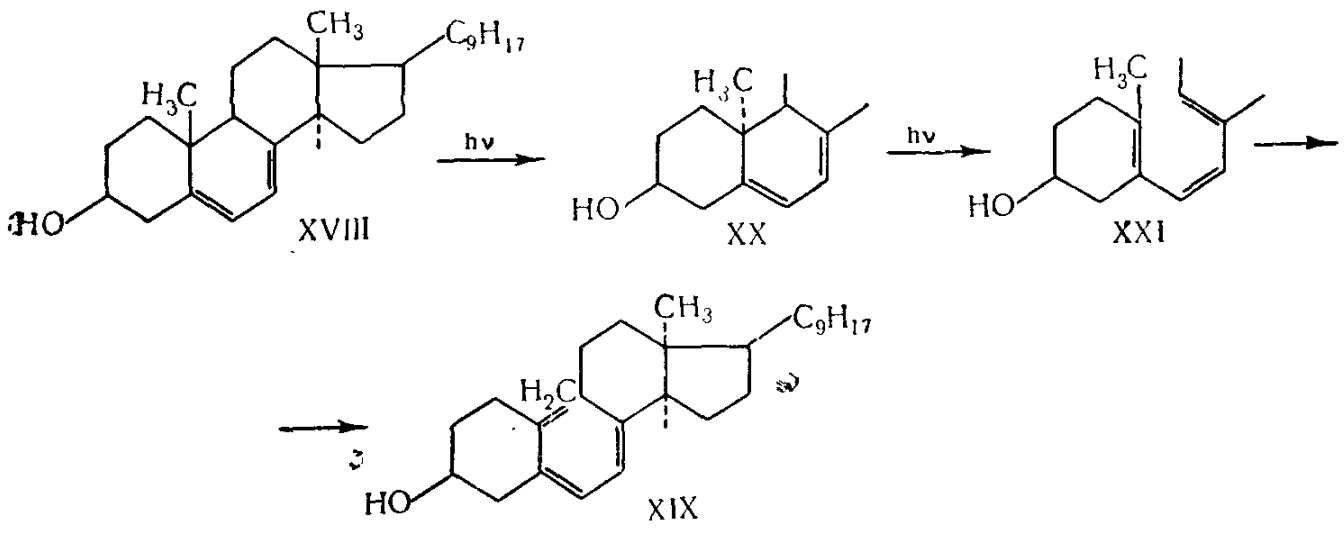
XVIII

Его строение было подтверждено в частности тем фактом, что при озонировании, наряду с другими продуктами, был получен метилизопропилацетальдегид. Это сразу определило строение боковой цепи, которая содержит девять углеродных атомов вместо восьми у холестерина, и установило положение двойной связи.

Эргостерин при окислении по Оппенауэру дал α,β-непредельный кетон и, следовательно, одна двойная связь находится в том же положении, что в холестерине, т. е. в положении 5. Далее, он реагирует с малеиновым ангидридом; следовательно, он содержит две сопряженные двойные связи, одна из которых должна быть в положении 7 (8); иное положение трудно себе представить. Еще следует сказать, что после гидрирования и окисления образующегося эргостанола были получены те же кислоты, что и при окислении холестанола.

Эргостерин содержится в значительных количествах в дрожжах и в спорынье. Известны и другие источники его нахождения, но практически эргостерин может получаться только из дрожжей.

Наибольшее значение эргостерин приобрел тогда, когда была установлена его связь с витамином D (XIX). Давно было известно, что жир печени многих рыб содержит вещества, которые предотвращают заболевание рахитом. Однако выделить какое-нибудь индивидуальное соединение из рыбьего жира оказалось необычайно трудным. Дело значительно упростилось, когда в 20-годах установили, что вместо того, чтобы давать рыбий жир, достаточно давать в пищу облученные продукты. Так как было известно, что облученные белки не обладают никакой противорахитной активностью, и жирные кислоты также не имеют ее, то выбор пал на стерины, в первую очередь на холестерин. Стали облучать чистый холестерин, но при этом получались различные результаты. Когда были поставлены контрольные опыты с весьма чистыми образцами холестерина, то оказалось, что холестерин при облучении не дает препаратов, которые бы вызывали задержку развития рахита. Тогда по ряду аналогий химики пришли к выводу, что действующим началом здесь, вероятно, является эргостерин. Действительно, при облучении его производных пришли к положительным результатам, правда, не сразу, потому что при этом образуется целый ряд продуктов, из которых только некоторые обладают противорахитной активностью.



Прежде всего с инверсией ангулярной метильной группы образуется люмистерин (XX). При дальнейшем облучении люмистерин переходит в другое соединение с расщеплением кольца *B* и соответствующим распо-

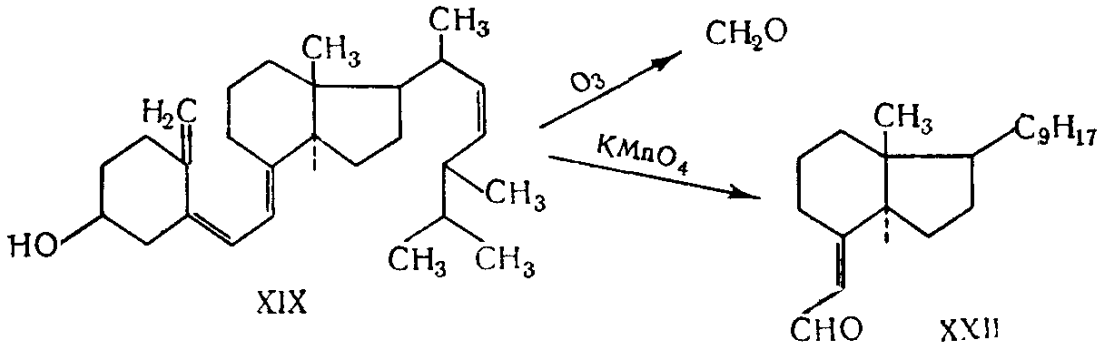
ложением двойных связей. Это очень неустойчивое соединение, не выделенное в чистом виде, превращается в тахистерин (XXI), а последний уже легко изомеризуется в витамин D_2 (кальциферол), у которого положение связей несколько иное.

Если облучать или нагревать витамин D, то он снова переходит в циклическое соединение с тем же расположением двойных связей, что и у эргостерина, но с иным положением водорода при C_9, так называемый эпипирокальциферол.

Такова сложная схема реакций, происходящих при облучении эргостерина.

Противорахитное действие витамина D_2 объясняется тем, что он влияет на обмен калия в организме, а рахит вызывается расстройством этого обмена.

Несколько слов о строении самого витамина D_2. После того, как он был выделен в чистом виде, началось его химическое исследование. При озонировании был выделен формальдегид в количестве, достаточном для того, чтобы можно было сделать заключение, что в нем имеется метиленовая группа.



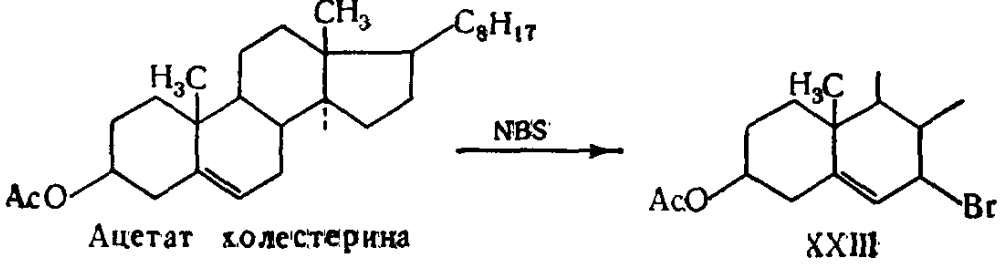
XIX XXII

Кроме формальдегида, были выделены циклические кетоны. При окислении марганцевокислым калием был получен α,β-непредельный альдегид (XXII). Этих данных было вполне достаточно для того, чтобы определить строение витамина D_2. Образование продукта конденсации с малеиновым ангидридом не оставило сомнения в том, что здесь имеется раскрытая гексатриеновая система.

При более тщательном исследовании действующего начала рыбьего жира обнаружили, что там имеется витамин, происходящий не от эргостерина, но от холестерина, так называемый витамин D_3. После установления строения витамина D_3 начались поиски возможностей получить его из холестерина. Оказалось, между прочим, что, несмотря на близкое сходство витаминов D_2 и D_3, их физиологические свойства несколько различны. Оба витамина одинаково положительно действуют на человеческий организм, но на птиц витамин D_3 не действует, а витамин D_2 действует.

Поскольку витамин D_2 получается из эргостерина, содержащего сопряженную систему связей в кольце *B*, следовательно, надо было попытаться построить аналогичную систему в холестерине, иначе говоря, получить 7-дегидрохолестерин. Это можно осуществить различными способами, из которых нижеследующий, по-видимому, наиболее перспективен и имеет наименьшее количество стадий.

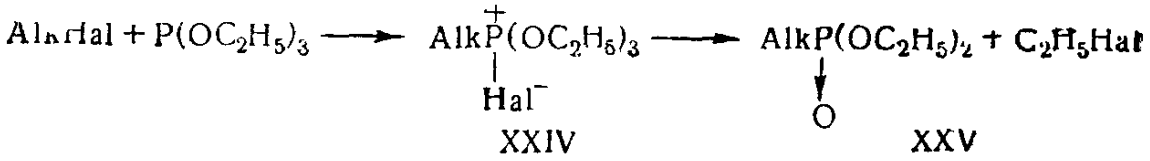
При действии на ацетат холестерина N-бромсукцинимида, получается соответствующее 7-бром-производное (XXIII). Дегидробромированием последнего, казалось бы, легко перейти к 7-дегидрохолестерину, вопрос лишь в том, как проводить это дегидробромирование.



Ацетат холестерина XXIII

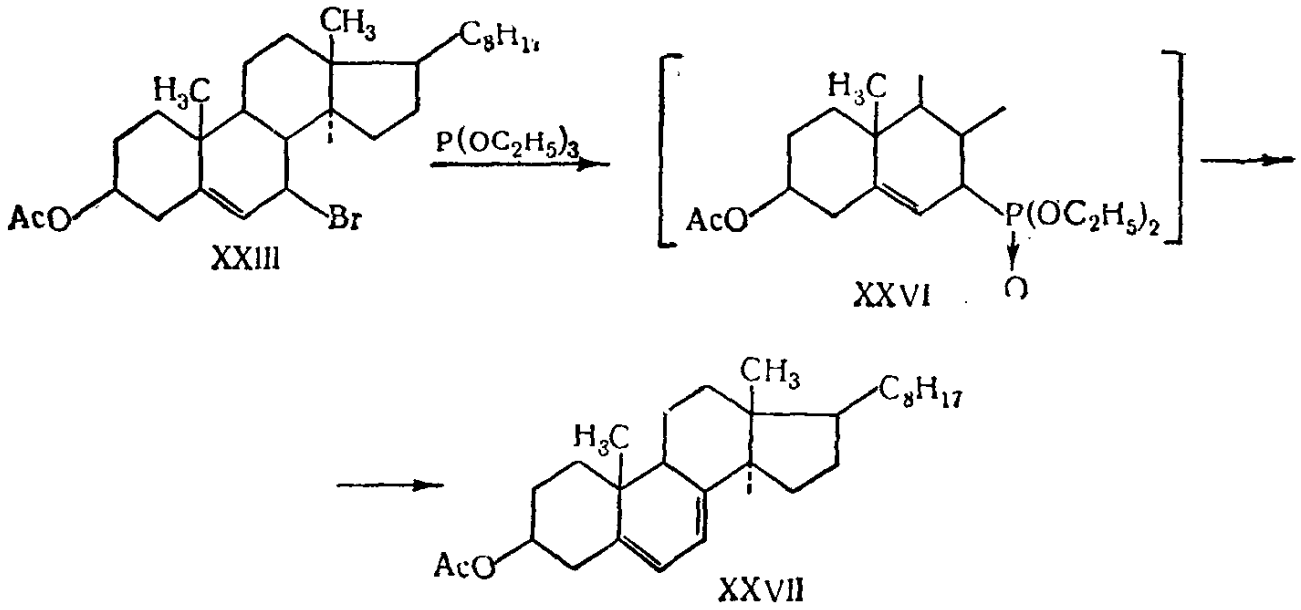
Здесь возникли трудности. При применении пиридина и других оснований можно получить 7-дегидрохолестерин лишь в незначительном количестве.

Наиболее обещающим является метод, основанный на известной перегруппировке Арбузова. Если действовать галоидным алкилом на этиловый эфир фосфористой кислоты, то происходит образование соединения (XXIV), содержащего 4-ковалентный фосфор. При перегруппировке, проходящей в присутствии катализаторов, отщепляется иодистый этил и образуется диэтиловый эфир алкилфосфиновой кислоты (XXVIII).



XXIV XXV

Ацетат 7-бромхолестерина также способен вступать в эту реакцию и с триалкилфосфитом образует вещество (XXVI), подобное соединению (XXV), очень нестойкое и разлагающееся с выделением ацетата 7-дегидрохолестерина (XXVII).



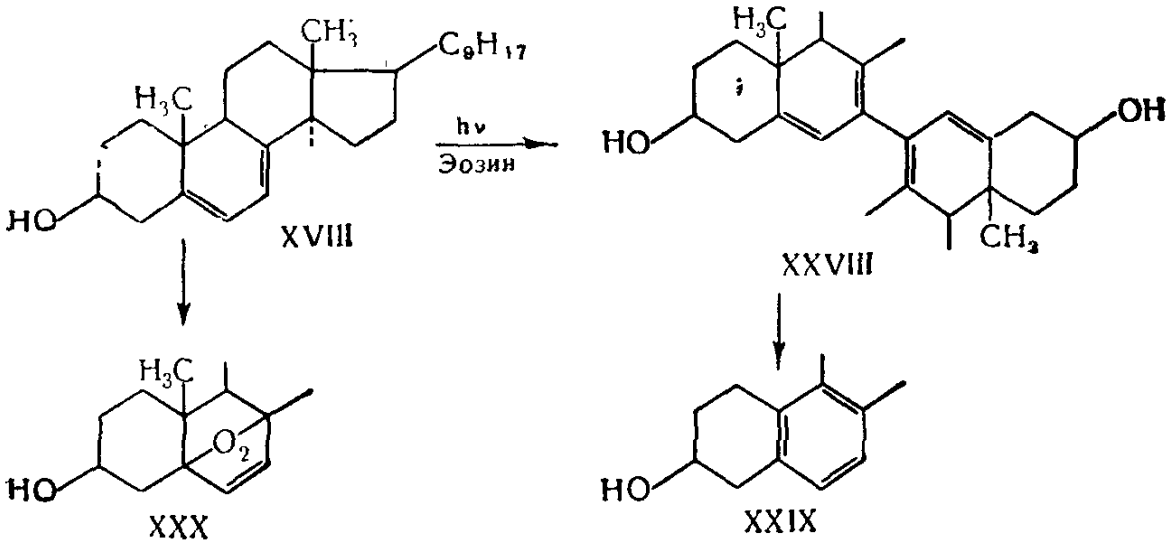
XXIII XXVI XXVII

Общий выход 7-дегидрохолестерина, считая на ацетат холестерина, составляет 50%.

Следует упомянуть еще об одной интересной реакции эргостерина, связанной с превращением кольца *B*.

Если эргостерин облучать в растворах в присутствии эозина и в отсутствии кислорода, то выделяется так называемый эргопинакон (XXVIII). Этот пинакон при пиролизе отщепляет метильную группу и дает так называемый неоэргостерин (XXIX) с ароматическим кольцом *B*. При облучении же в присутствии кислорода получается перекись

(XXX), очень важное соединение, с которым придется встретиться при частичном синтезе стероидных гормонов.



Эти краткие данные о стеринах важны ввиду их большого значения для частичных синтезов стероидов. С этой точки зрения нужно остановиться на некоторых деталях поведения желчных кислот.

Важнейшие из желчных кислот — холевая кислота, содержащая три гидроксильных группы, и дезоксихолевая кислота, с двумя гидроксильными группами. Дезоксихолевая кислота была выделена в чистом виде еще сто лет назад. В процессе ее выделения была изолирована сопутствующая ей так называемая холеиновая кислота, того же состава, но с точкой плавления выше, чем у холевой кислоты.

У химиков прошлого столетия и, пожалуй, у большей части химиков нашего времени не оставалось сомнения, что это совершенно разные вещества. Однако, когда в XX столетии Виндаус начал работать с желчными кислотами, он обнаружил, что дезоксихолевая и холеиновая кислоты дегидратируются в одну и ту же холадиеновую кислоту. При дегидратации холеиновой кислоты Виндаус выделил также некоторое количество стеариновой кислоты. Это навело его на мысль, что холеиновая кислота представляет комплекс дезоксихолевой кислоты со стеариновой кислотой. Действительно, когда Виндаус смешал спиртовые растворы чистейшей дезоксихолевой и стеариновой кислот, у него сразу выкристаллизовалась холеиновая кислота. Было установлено, что на 8 молекул дезоксихолевой кислоты приходится только 1 молекула стеариновой, так что разница в анализе была очень мала.

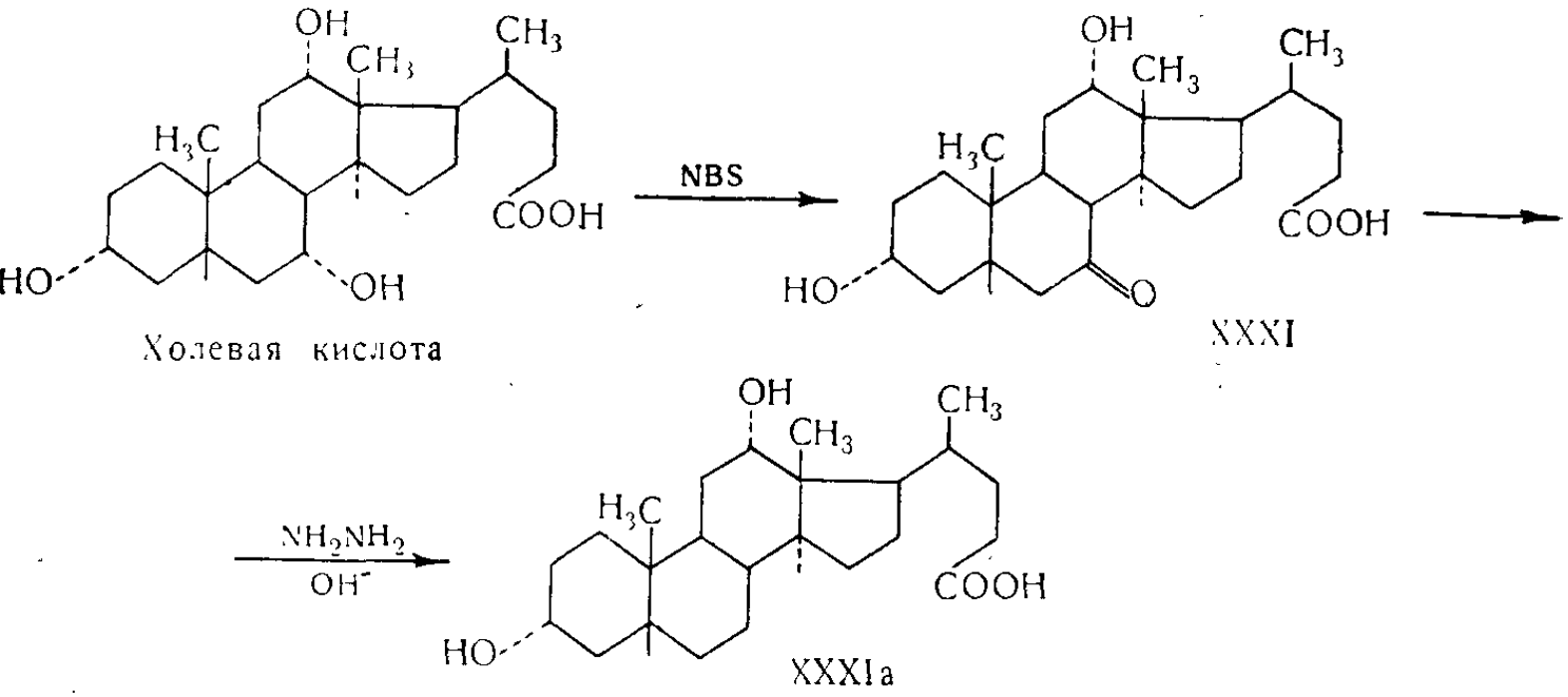
Далее было показано, что если вместо стеариновой кислоты взять какую-нибудь другую алифатическую кислоту или даже углеводород, то дезоксихолевая кислота образует аналогичные комплексы. Таким образом был открыт целый ряд холеиновых кислот.

Комплексы эти настолько прочны, что не могут быть разложены обычными методами, и их строение было обнаружено только химическим путем.

Для частичного синтеза стероидных гормонов оказалось весьма важным превращение холевой кислоты в дезоксихолевую.

Как известно, среди стероидных гормонов не имеется соединений, в которых активирующие группы находились бы в положении 7. Зато они имеются в положении 3 и 17, а в кортикоидных гормонах и в положении 11. Поэтому для того, чтобы из холевой кислоты, составляющей основную часть желчи, выделить соединение для последующего синтеза, необходимо селективно удалить 7-OH-группу.

При изучении реакционной способности трех гидроксильных групп было обнаружено, что в первую очередь ацетилируется и окисляется 7-ОН-группа, затем 3-ОН-группа и, наконец, ОН-группа в положении 12. Это само собой определило ход превращения холевой кислоты в дезоксихолевую. Вначале холевую кислоту обрабатывают N-бромсукцинимидом в присутствии воды, причем, в этих условиях он действует как окислитель и образует 7-кетодезоксихолевую кислоту (XXXI).



Холевая кислота

XXXI

XXXIa

Последнюю восстанавливают, по Кижнеру, при нагревании с гидразингидратом в присутствии щелочи или этилата натрия. Если растворителем взять не спирт, а этиленгликоль, то кетогруппа отщепляется почти количественно и образуется дезоксихолевая кислота (XXXIa), которую для очистки перекристаллизовывают из спирта (другие растворители непригодны).

ЛИТЕРАТУРА

Л. Физер, М. Физер. Химия природных соединений фенантренового ряда. М., Госхимиздат, 1953.

Глава 4

ЭСТРОГЕННЫЕ ГОРМОНЫ. НЕКОТОРЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ЭСТРОГЕНОВ. СИНТЕТИЧЕСКИЕ ЭСТРОГЕНЫ

Давно было известно, что женские и мужские половые органы выделяют в организм животных вещества, способствующие их развитию и размножению и формированию вторичных половых признаков.

В 20-х годах была предпринята попытка извлечь активные вещества как из тестикул, так и из яичников. Соответствующие вытяжки оказались активными и вначале им придавали почти чудодейственное значение, считая, что они являются ключом к омоложению и что задача Фауста решена. Однако очень скоро было выяснено, что причиной старения является не только отсутствие половых гормонов. Если машина очень стара и изношена, то недостаточно заменить одну часть, а надо сменить многие части. Тем не менее было ясно, что выяснение строения этих веществ имеет большое значение для терапии как болезней половой сферы, так и других связанных с ней болезней.

Прежде всего пришлось начать с определения активности веществ, т. е. разработки пробы (теста) на половую активность.

В 1923 г. Аллен и Дойзи предложили такую пробу для определения активности женских половых гормонов. Этот тест достаточно прост по описанию, но, конечно, не совсем прост в осуществлении.

Аллен и Дойзи брали кастрированных самок мышей и крыс, у которых половой цикл после операции, естественно, прекращается. Если же подопытному животному ввести активное начало, то цикл возобновляется и, в частности, появляется чрезвычайно характерное явление эструса (в просторечии — течка), причем ткань влагалища изменяется столь явно, что достаточно одного мазка для микроскопического исследования, чтобы стало ясно, активно или неактивно данное соединение или вытяжка.

Если взять в качестве подопытных животных мышей, у которых половой цикл занимает всего 4—6 дней, то результат можно узнать очень скоро. То минимально необходимое количество вещества (или экстракта), которое у 70% мышей вызывает явления эструса, получило название мышиной единицы (соответственно — крысиной единицы, если испытания проводятся на крысах). Правда, сразу же было отмечено, что этот тест не отличается такой точностью, как аналитическое определение. Очень много зависит от того, как вводится вещество или вытяжка. Так, если вещество ввести в масляном растворе, то действие окажется слабее, чем если вводить его, например, в двухпроцентном растворе яичного белка. Результаты зависят также от вида подопытных животных. Поэтому в литературе очень часто приходится сталкиваться с тем,

что активность одного и того же вещества по разным данным различается в 3—4 раза. Этим не надо смущаться, потому что сам тест допускает такие колебания.

После введения тестов в научную практику было установлено, что эстрогенные гормоны находятся не только в яичках, но также в плаценте и в крови. Затем было замечено, что сама деятельность половых гормонов чрезвычайно зависит от деятельности гипофиза. Если удалить гипофиз у животных, то половой цикл совершенно нарушается, но при введении экстракта гипофизарной ткани он восстанавливается. Отсюда следует вывод, что толчок для начала полового цикла дают гормоны, вырабатываемые гипофизом, так называемые гипофизарные или гонадотропные, которые вызывают выработку половых гормонов непосредственно из яичников или мужских половых органов. Это было установлено не химическими методами, а чисто биологическим путем, когда еще ничего не знали о строении самого активного вещества. Был установлен также факт обратного порядка. Оказывается, что и сами половые органы известным образом действуют на выработку гормонов в гипофизе. Так, у кастрированной мыши (женская особь) выделение гипофизарных гормонов после операции чрезвычайно увеличивается. Однако если этой мыши впрыснуть половой гормон, то выделение гипофизарных гормонов немедленно падает. Таким образом, в организме имеется равновесие между деятельностью половых желез, с одной стороны, и деятельностью гипофиза — с другой.

Было выяснено, что гипофизарные гормоны являются гликопротеинами, т. е. содержат остатки сахара и белковую часть. Строение их очень сложно и в настоящее время еще не выяснено. В данной главе будут рассматриваться только те гормоны, которые вырабатываются непосредственно половыми органами.

Толчок исследованиям этих гормонов дало открытие Цондека в 1927 г. Он нашел, что в моче беременных женщин находится большое количество женского полового гормона, около 1 *мг* на литр.

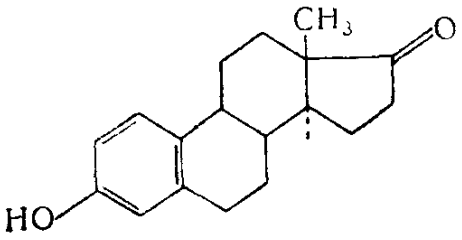
В 1929 г., работая на этом исходном материале, три группы ученых (Дойзи в Америке, Бутенандт в Германии и Лакёр в Нидерландах) одновременно выделили женский половой гормон.

Процедура была довольно сложной и трудоемкой. Бутенандт, например, работал с 2000 *л* мочи. Моча подкислялась соляной кислотой и оставлялась на несколько дней. Это делалось потому, что половые гормоны находятся в моче не в чистом виде, а в виде сернокислых эфиров или глюкуронидов, которые удается расщепить кислым гидролизом. Дальше следовала экстракция эфиром. Так как вместе с гормонами экстрагировались и другие вещества кислого характера, то эфирный экстракт обрабатывался 8%-ным бикарбонатом натрия. Затем экстракт упаривали, концентрировали и экстрагировали толуолом. При этом все гормоны переходили в толуольный раствор, который экстрагировали 1 *N* едким натром.

Следует заметить, что такой метод обработки был выработан не сразу. Путеводной нитью при этой довольно сложной процедуре служил тест Аллена — Дойзи, по которому определяли активность той или иной фракции. Оказалось, что экстрогенные гормоны в конце концов перешли в щелочной раствор. Этот очень важный факт свидетельствовал, что половые гормоны имеют какую-то кислую группу. Дальше, разумеется, проводили подкисление, экстракцию и перегонку в вакууме. Таким образом, была получена смесь эстрогенов, из которой Бутенандт выделил эстрон, в количестве 25 *мг*.

Уже сама методика выделения говорила за то, что эстрон имеет фенольную группу, именно фенольную, а не карбоксильную, потому что

он растворим только в щелочах, а не в растворах соды. Было установлено, что он легко метилируется, дает ацетат, семикарбазон и другие производные, т. е. имеет и кетогруппу. На основе опыта, который перед этим уже был накоплен в химии стеринов, Бутенандту удалось сразу же дать правильную формулу эстрона.

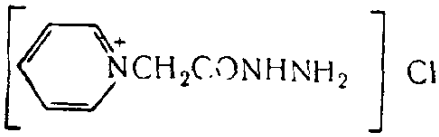


Эстрон

Вскоре после выделения эстрона были выделены и идентифицированы и другие эстрогенные гормоны.

При очистке их чрезвычайно большую помощь оказали так называемые реактивы Жирара Т и Р.

$[(CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CONHNH_2]\ Cl^-$ реактив Т

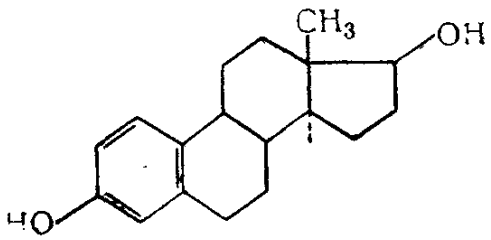


реактив Р

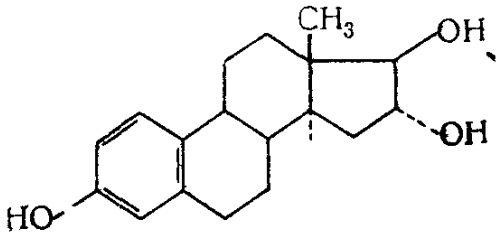
Так же, как и семикарбазид, они образуют соответствующие соединения с карбонилсодержащими веществами, но если семикарбазид образует нерастворимое соединение, то реактив Жирара образует водорастворимые соединения, благодаря чему он оказался чрезвычайно выгоден.

Само разделение проводится весьма просто. Спиртовый раствор смеси веществ обрабатывается уксуснокислым раствором реактива Жирара. Смесь кипятят в течение короткого времени, разбавляют водой и экстрагируют эфиром для удаления соединений, которые не содержат карбонильной группы. Затем водный раствор подкисляют соляной кислотой, нагревают и выделяющийся кетон экстрагируют подходящим растворителем.

Таким образом, Бутенандтом были выделены эстрадиол и эстриол.

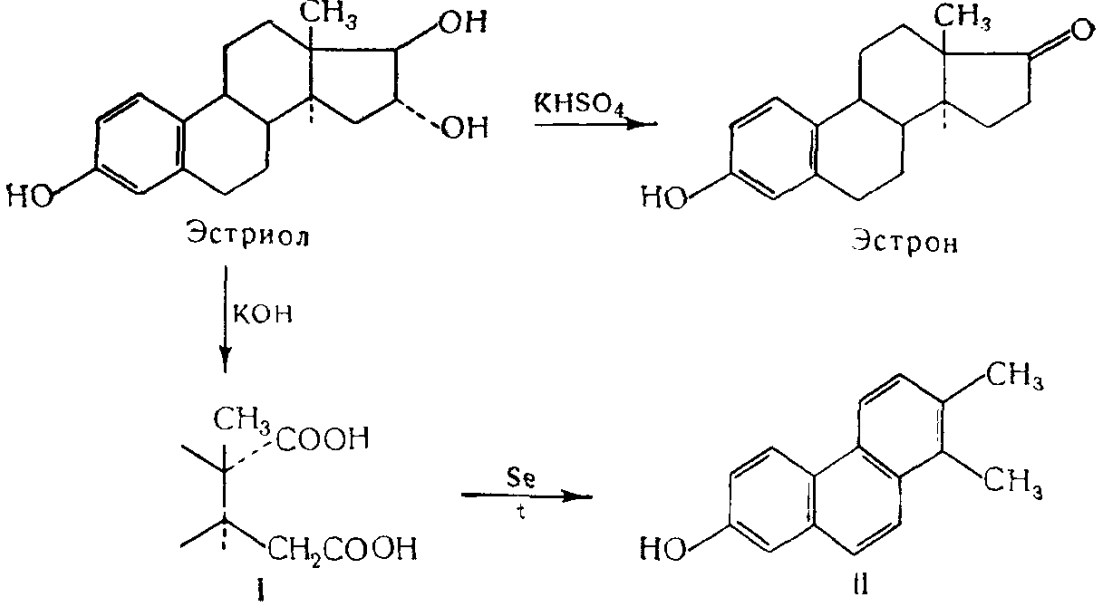


Эстрадиол

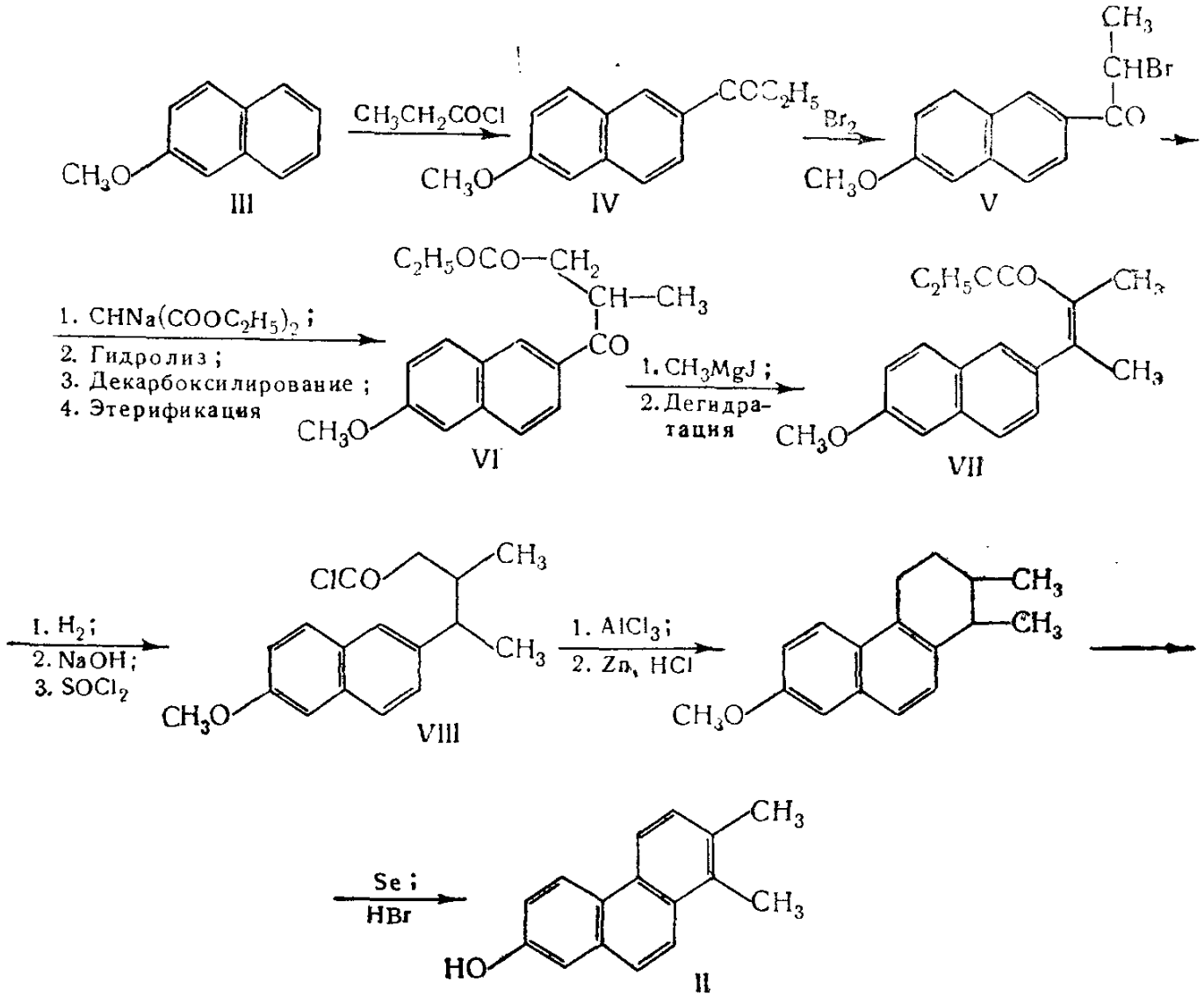


Эстриол

Вскоре появилось подтверждение формулы эстрона, данной Бутенандтом. Было обнаружено, что эстриол при нагревании с $KHSO_4$ переходит в эстрон. Так как эстриол содержит три гидроксильных группы, то, следовательно, две из них находятся рядом. При сплавлении эстриола с едким кали была получена дикарбоновая кислота (I), которая при нагревании дала ангидрид, а не кетон, что говорило о наличии в молекуле эстриола (и, следовательно, эстрона) пятичленного кольца.



При нагревании кислоты (I) с селеном был выделен 1,2 диметил-фенантрол-7 (II), строение которого было подтверждено синтезом из неролина (III).

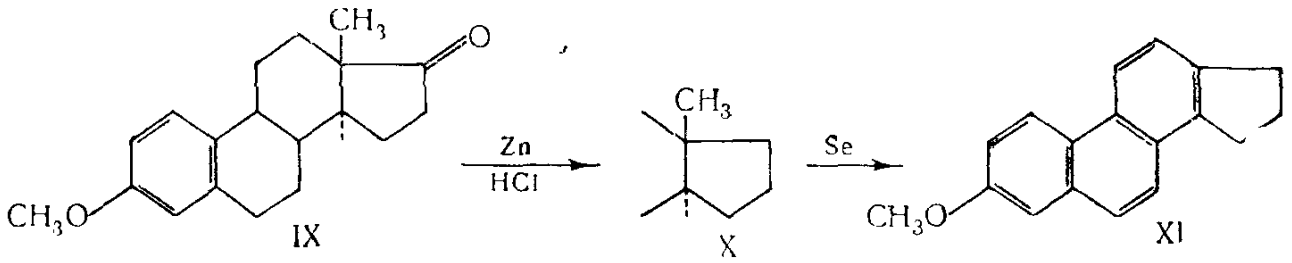


Неролин с пропионилхлоридом дал по реакции Фриделя — Крафтса кетон (IV), который бромировался, и бромид (V) подвергался конденсации с натрмалоновым эфиром. Полученный дикарбоновый эфир после омыления, декарбоксилирования и этерификации превратился в кетоэфир (VI). Действие на последний магнийметилиодида привело к получению оксиэфира, который дегидратировался в эфир (VII).

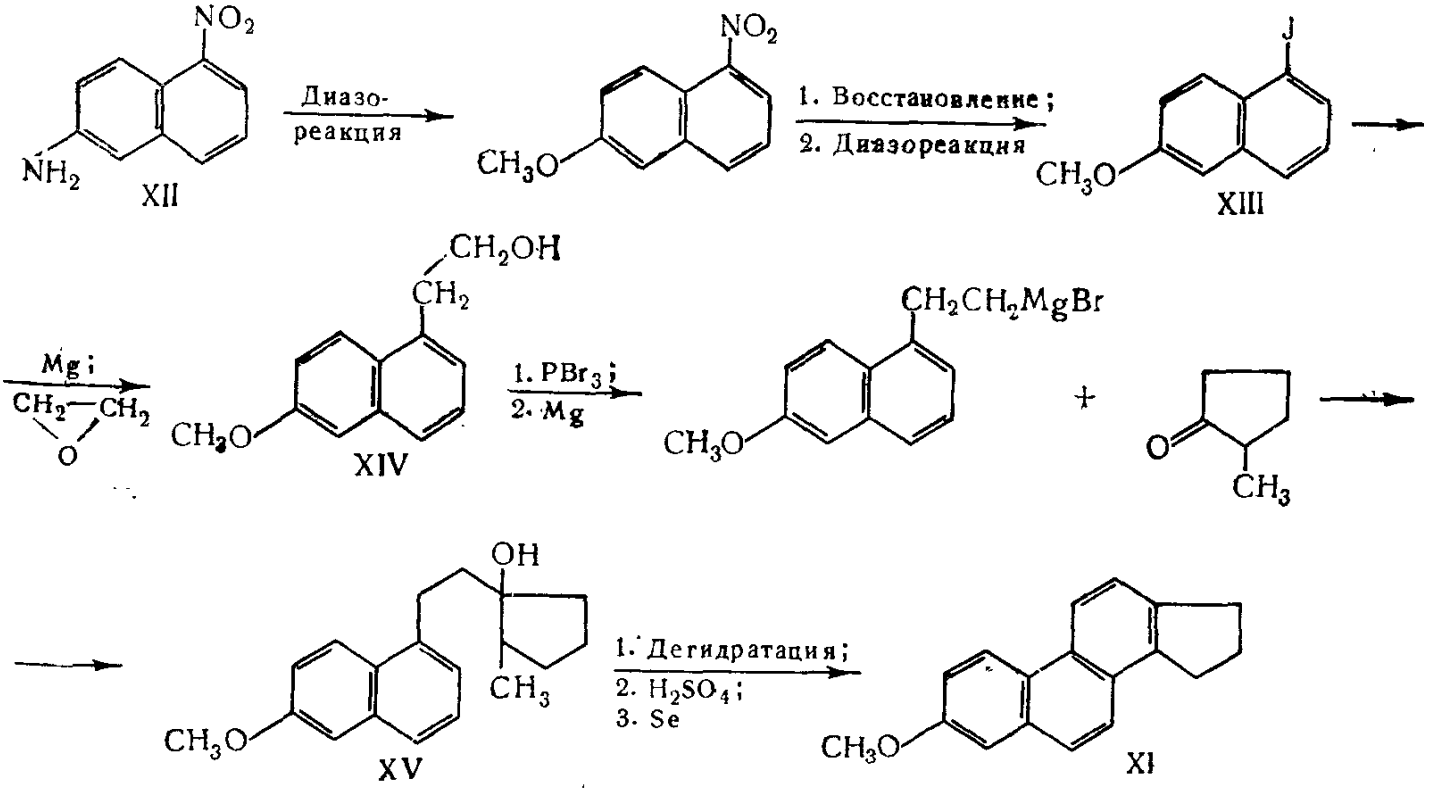
Дальнейшие операции напрашивались сами собой. Последовательным гидрированием, омылением и действием хлористого тионила был получен хлорангидрид (VIII). Циклизация по Фриделю — Крафтсу, восстановление по Клеменсену цинком и соляной кислотой, дегидрирование с селеном и деметилирование привели к диметилфенантролу (II), который оказался во всех отношениях идентичным с диметилфенантролом, полученным из эстриола.

Этим было точно установлено, что эстриол, а следовательно, и эстрон, который получается из него при дегидратации, принадлежат к ряду стероидов.

Можно привести еще одно доказательство. Если эстрон метилировать, то получается метиловый эфир эстрона (IX). При восстановлении его получается так называемый дезоксиэстрон (X). При дегидрировании его с селеном был получен метоксициклопентанофенантрен (XI).



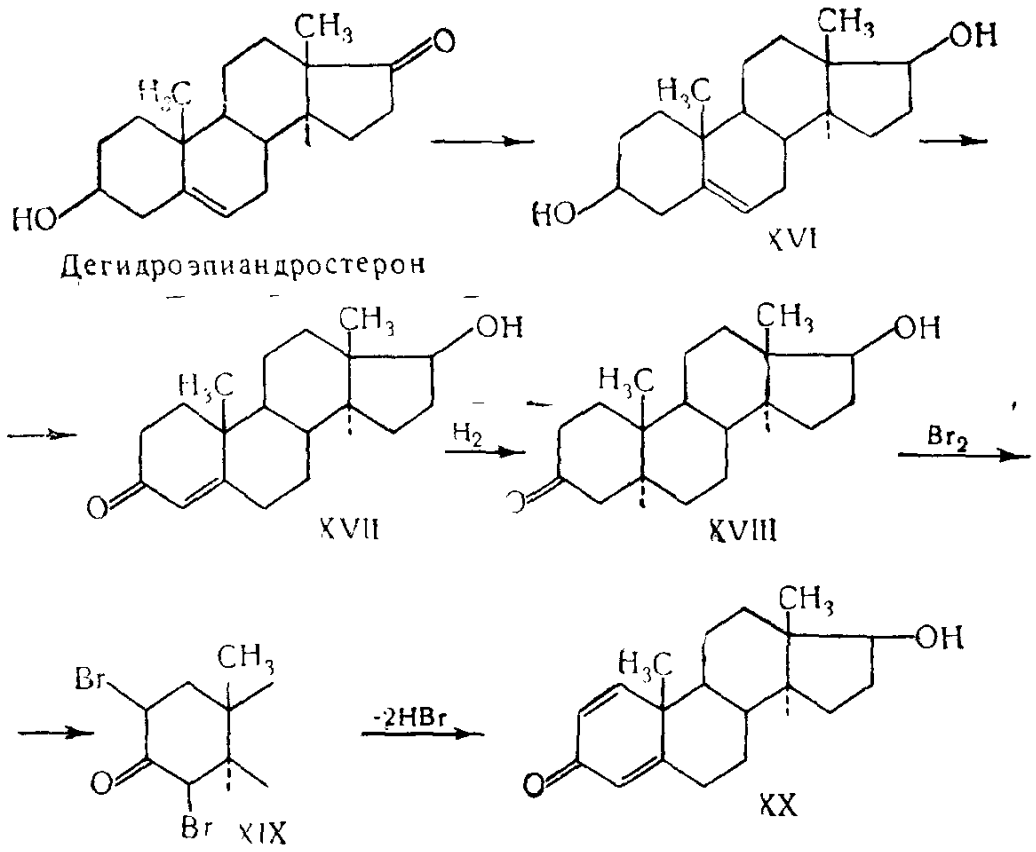
Этот метоксициклопентанофенантрен (XI) был также получен Хеуорзсом путем полного синтеза. Хеуорзс исходил из 5-нитро-2-нафтиламина (XII). Диазореакцией вместо аминогруппы была введена метоксильная группа, затем следовало восстановление нитрогруппы, диазотирование и диазореакция в присутствии иодистой меди, что привело к 6-метокси-1-иоднафталину (XIII). Последний был превращен в магнийорганическое соединение, которое с окисью этилена дало первичный спирт (XIV). Этот первичный спирт дал бромид, а затем магнийорганическое соединение, которое конденсировали с 2-метилциклопентаноном. При этом был получен соответствующий карбинол (XV), который последовательной дегидратацией, циклизацией и дегидрированием с селеном был превращен в метоксициклопентанофенантрен (XI), идентичный с тем, который был получен из эстрона.



Оставался открытым вопрос о пространственном строении эстрона. Он был разрешен сравнительно просто, поскольку удалось связать холестерин с эстроном.

Как упоминалось выше, одним из основных продуктов окисления холестерина является дегидроэпиандростерон. Рядом нижеописанных превращений Ингоффену удалось превратить его в эстрадиол и затем в эстрон.

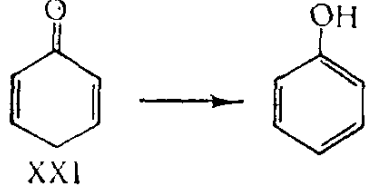
Прежде всего восстановлением дегидроэпиандростерона (например, алюмогидридом лития) был получен андростендиол (XVI), а из него окислением по Оппенауэру непредельный кетон (XVII).



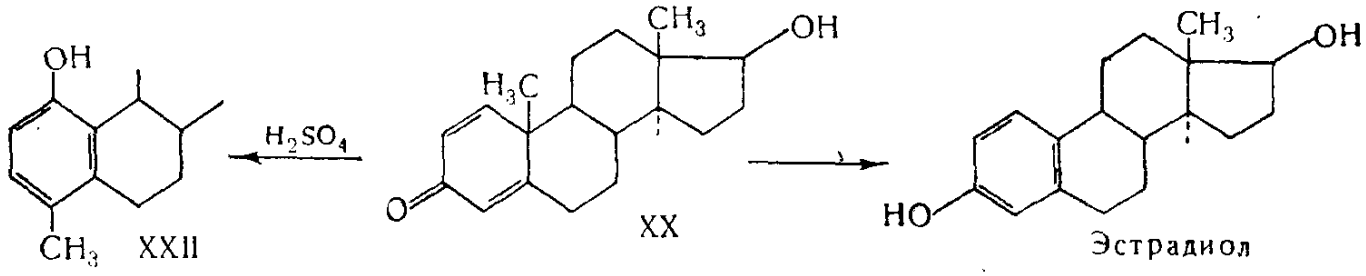
Следует отметить, что в условиях реакции Оппенауэра прежде всего окисляются спирты аллильного типа и значительно труднее насыщенные вторичные спирты. При гидрировании кетона (XVII) был получен транскетон (XVIII), который затем бромировали. Транс-кетоны такого типа бромируются прежде всего в положении 2 и затем в положении 4 и в отличие от цис-кетонов, которые бромируются только в четвертом положении.

Соответствующим бромированием с хорошим выходом был получен 2,4-дибромид (XIX). Нагреванием его с пиридиновыми основаниями, например с коллидином, были отщеплены две молекулы бромистоводородной кислоты и получен диенон (XX). Диеноны такого строения замечательны тем, что они очень легко перегруппировываются в фенолы и, например, циклогексадиенон (XXI) вообще не способен к существованию; при любых попытках его синтеза всегда образуется фенол. Когда Ингоффен дошел до диенона (XX), он имел в виду превратить его в соответствующий фенол. Вначале он пытался достичь этого действием уксусного ангидрида и серной кислоты и действительно получил фенол, но совершенно другого строения, так как в результате перегруппировки получалось соединение (XXII) (см. стр. 309).

После многих попыток Ингоффен нашел, что если диенон (XX) нагревать при 325° в присутствии тетралина, ангулярная метильная группа



XXI



XXII XX Эстрадиол

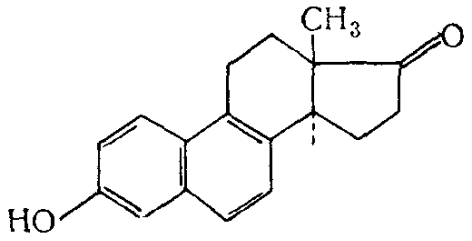
отщепляется и образуется эстрадиол. Выход этого соединения был невелик, всего 10%, однако этот синтез, т. е. переход от производных холестерина к эстрадиолу и другим эстрогенам имел очень большое значение, так как он сразу устанавливал пространственную конфигурацию эстрона.

Впоследствии многие исследователи пытались улучшить эту реакцию. Пиролизом андростендиона при 525° удалось получить эстрон с выходом 21%.

Активность эстрона равна 1 γ на мышиную единицу, эстрадиол активнее в 10 раз. Напротив, эстриол, содержащий дополнительную гидроксильную группу, имеет пониженную активность — 10 γ на мышиную единицу.

Кроме мочи беременных женщин, природным источником эстрона (и эстрадиола) является моча жеребых кобыл, где содержание эстрогенов еще больше. Интересно заметить, что большое количество эстрогенных гормонов находится также в моче жеребцов, причем в количествах, чуть ли не в два раза больших, чем у кобыл. Однако ввиду трудности выделения не удается использовать этот источник.

Упомянем еще об одном эстрогенном гормоне — эквиленине, который находится в большом количестве в моче жеребых кобыл и отличается простотой строения.



Эквиленин

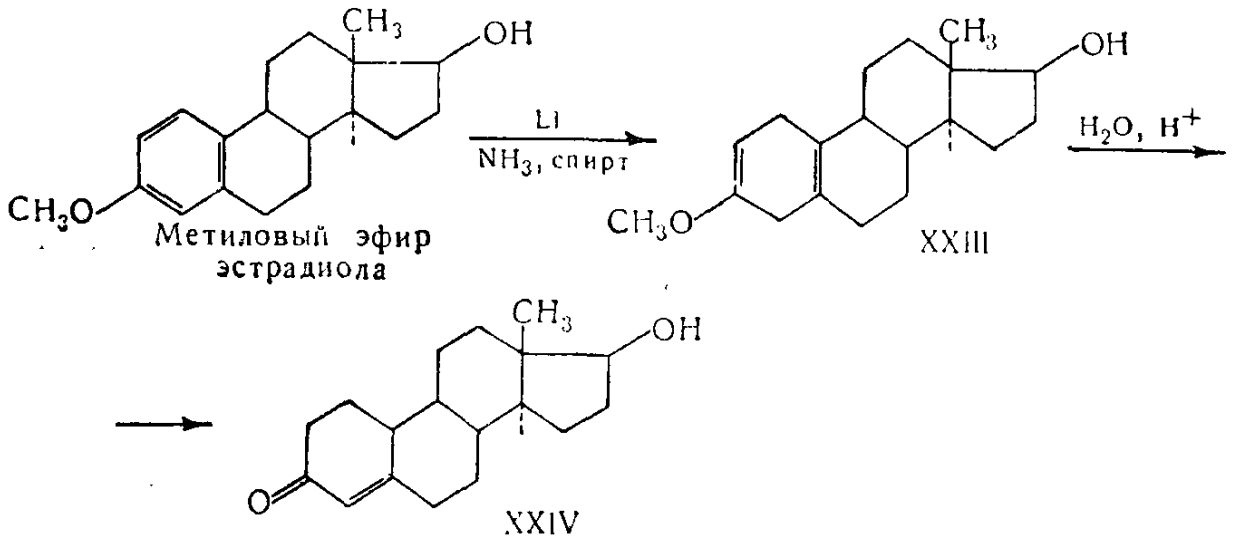
Он имеет два ароматических кольца, в остальном его строение подобно строению эстрона, т. е. он имеет транс-сочетание колец *C* и *D*. Активность его невелика и составляет 30 γ на мышиную единицу.

Эстрогенные гормоны присущи животным организмам, но в некоторых случаях они были найдены и в растениях, например, эстрон был найден в вытяжке из кокосовых орехов и в женских цветках ивы. Если у животных гормоны играют существенную роль, то у растений они, видимо, не влияют ни на рост, ни на другие функции вегетации и являются просто продуктами обмена.

При действии алюмогидрида лития на эстрон получается 17 β-карбинол или эстрадиол, при восстановлении же натрием в спирте получает-

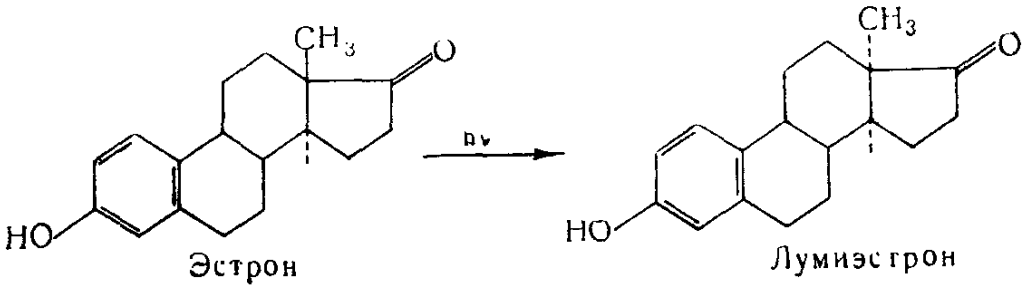
ся его изомер — α-эстрадиол, активность которого всего 7 γ, т. е. в 70 раз слабее активности эстрадиола.

При обработке метилового эфира эстрадиола литием в жидком аммиаке в присутствии спирта (по Бёрчу) восстанавливается ароматическое кольцо и получается виниловый эфир (XXIII), который после гидролиза переходит в непредельный кетон (XXIV).

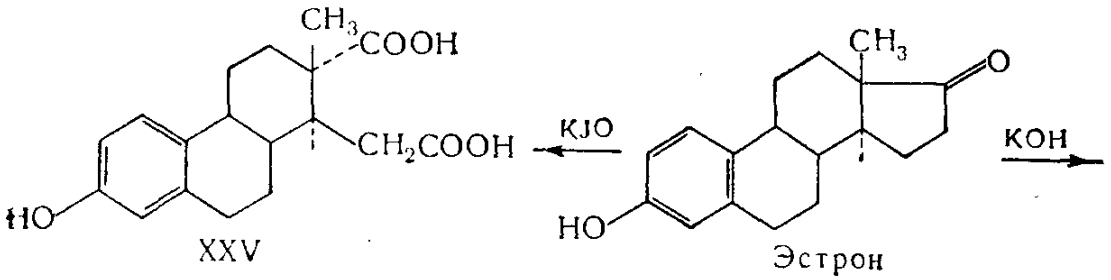


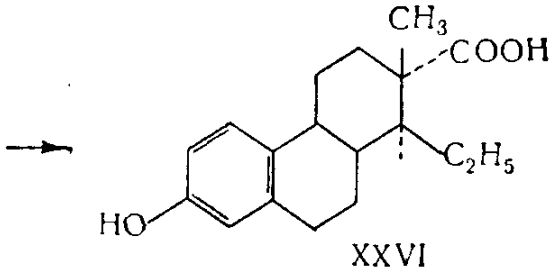
В результате получается так называемый нортестостерон, являющийся одним из активных мужских половых гормонов. Таким образом, превращение ароматического кольца в циклогексеновое сопровождается исчезновением эстрогенного действия и появлением андрогенной активности. Как мы увидим в дальнейшем, восстановление производных эстрона металлами в жидком аммиаке является основным методом получения 19-норстероидов.

Если эстрон подвергнуть облучению, то происходит изомеризация, сходная с изомеризацией эргостерина, затрагивается асимметрический центр при $C_{(10)}$ и получается эпимер эстрона с иным положением ангулярной метильной группы, так называемый лумиэстрон. В отличие от эстрона он совершенно неактивен.

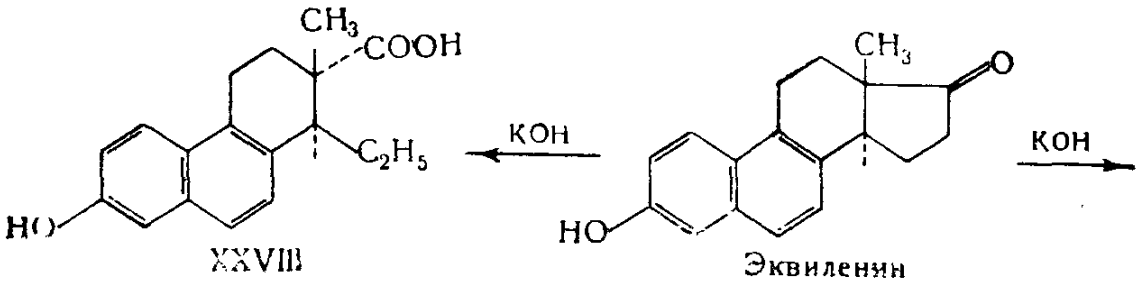


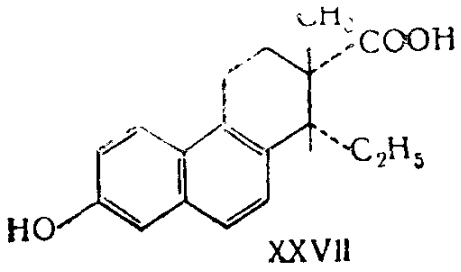
Таким образом, небольшие изменения в пространственном строении уже лишают соединение всякой активности. При окислении эстрона иодом в щелочном растворе образуется так называемая марианнолевая кислота (XXV) (по имени впервые открывшего ее американца Марианна). Она совершенно неактивна и, казалось, надо было сделать вывод, что при разрушении кольца *D* исчезает активность. Однако далее было сделано интересное открытие, что если сплавлять эстрон с едким кали, то (при разрушении кольца *D*) получается монокарбоновая (XXVI), так называемая дойзинолевая кислота, которая столь же активна, как и эстрон (1 γ на мышиную единицу).





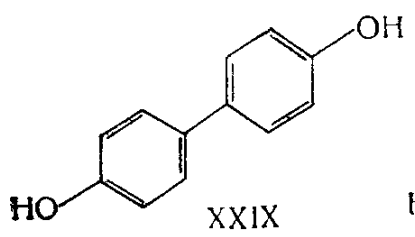
Следовательно, разрушение кольца *D* не всегда сопровождается уменьшением активности. Это было подтверждено еще одним примером, именно на эквиленине. При сплавлении его с едким кали получаются две кислоты цис- и транс-строения (XXVII, XXVIII).

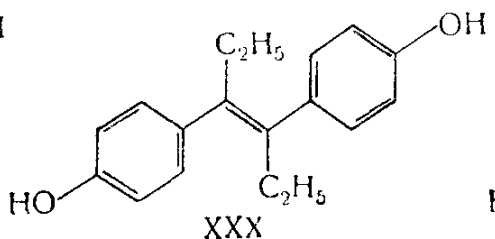


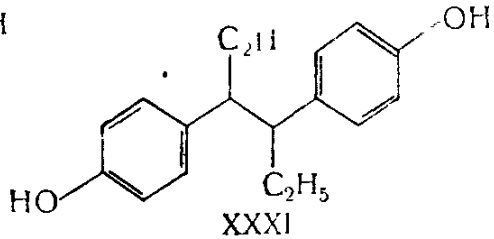


Цис-изомер или так называемая бисдегидродойзинолевая кислота является одним из самых активных эстрогенов (0,05 γ на мышиную единицу). Такая неспецифичность эстрогенного действия не является случайной. Вскоре после открытия эстрона было найдено другое вещество, именно *п, п*-диоксидифенил (XXIX), внешне не имеющий ничего общего с эстроном, но обладающий эстрогенной активностью в дозе 70 *мг*.

В 1935 г. Додсом были открыты получившие сейчас широкую известность стильбэстрол (XXX) и гексестрол (XXXI) — производные стильбена с ОН-группами также в пара-положении. Стильбэстрол может существовать в цис- и транс-изомерных формах, причем активна только транс-форма. Активность стильбэстрола примерно равна активности эстрона.



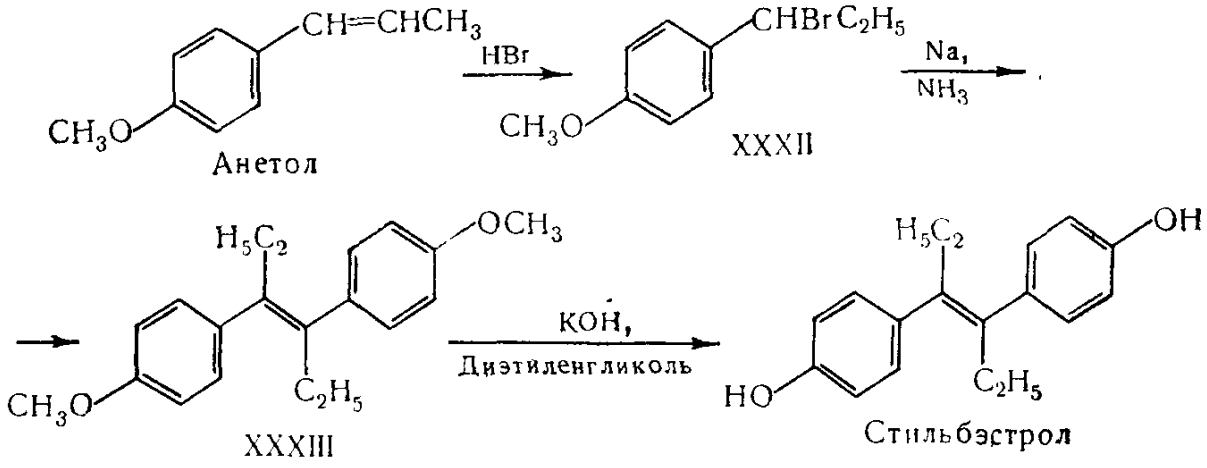




В гексэстроле имеется два асимметрических центра, т. е. здесь может быть рацемат и мезоформа. Активна лишь мезоформа (0,2 γ).

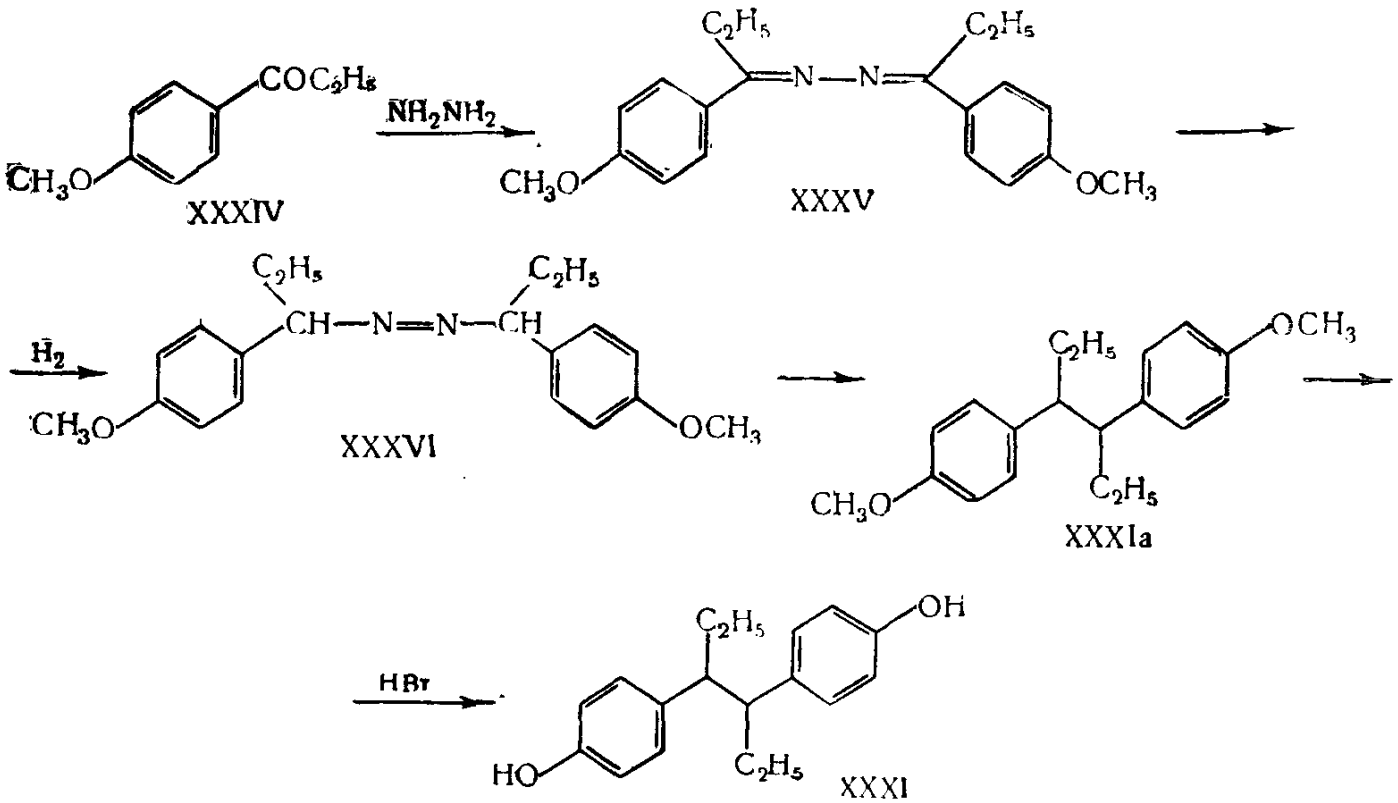
По физиологическому действию стильбэстрол и гексэстрол не могут полностью заменить эстрон, но частично применяются для клинической терапии и в сельском хозяйстве.

В одном из наиболее простых синтезов стильбэстрола исходят из гидробромида анетола (XXXII), легко образующегося при действии бромистого водорода на анетол.



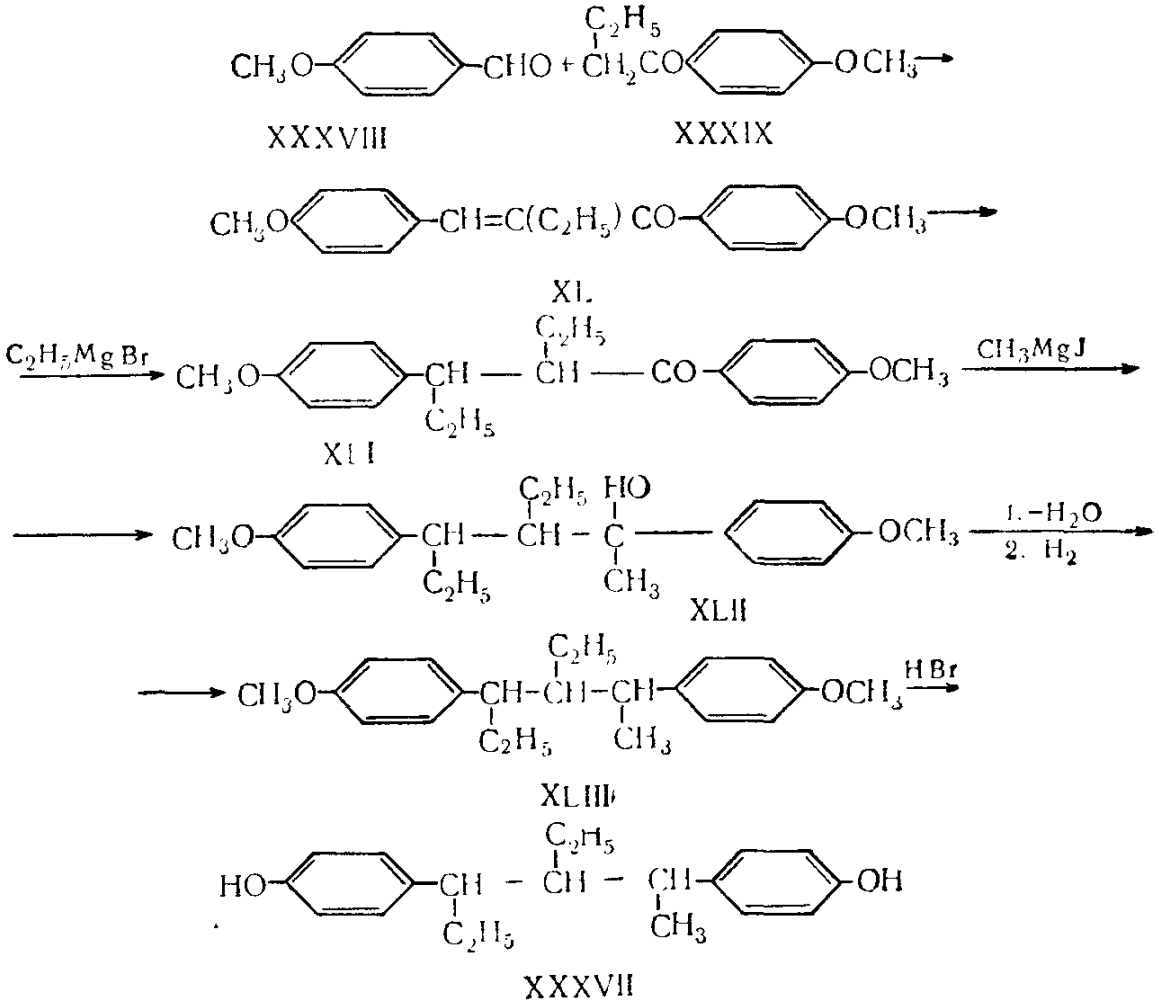
При восстановлении бромида (XXXII) натрием в жидком аммиаке происходит удаление бромистого водорода и получается метиловый эфир стильбэстрола (XXXIII). Отщепление метоксильных групп оказалось нелегким делом. Обычный метод обработки бромистым или иодистым водородом дает незначительный выход, поскольку в реакцию вступает и двойная связь. Бо́льших успехов удалось достигнуть, применяя едкое кали и диэтиленгликоль. При этом выход составил 55%.

Гексэстрол можно синтезировать, исходя из *n*-метоксипропиофенона (XXXIV), который, в свою очередь, легко получается из анизола и пропионовой кислоты. Действием гидразингидрата на кетон (XXXIV) получается азин (XXXV).



Каталитическое гидрирование азина приводит к получению азосоединения (XXXVI), при нагревании которого происходит отщепление молекулы азота и получается метиловый эфир гексэстрола (XXXI*a*). Здесь можно применять самые обычные методы отщепления метильной группы, т. е. действовать бромистым водородом, в результате чего получается гексэстрол.

Среди синтетических экстрогенов встречаются и производные дифенилпропана, из которых так называемый бензэстрол (XXXVII) (или октофоллин) имеет практическое применение. Он синтезируется из анисового альдегида (XXXVIII) и *n*-метоксибутирофенона (XXXIX). Конденсацией обоих компонентов получается непредельный кетон (XL), который присоединяет молекулу магнийэтилбромида и образует кетон (XLI). Действие на него магнийметилиодида приводит к карбинолу (XLII), который после дегидратации и гидрирования превращается в смесь соединений, общая формула которых (XLIII).



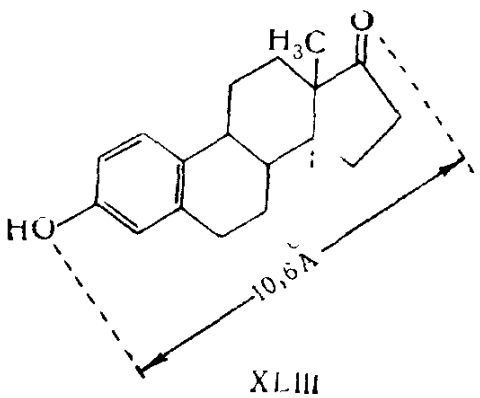
Деметилированием соединения (XLIII) был получен (после разделения на изомеры) бензэстрол (XXXVII), активная доза которого равна 0,8γ.

Позже было открыто не менее 500 соединений, которые в той или иной степени вызывают эстрогенное действие. Большинство из них — производные стильбена или дифенилэтана, но некоторые принадлежат и к другим классам, например, *n*-хлортрифенилэтилен.

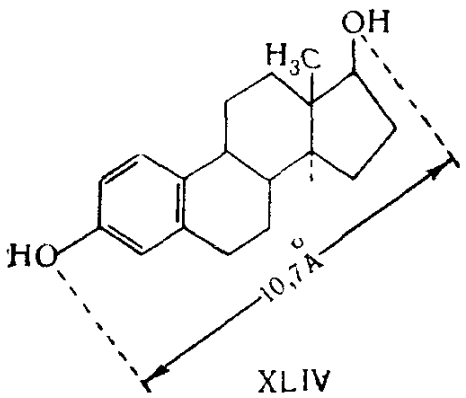
$$C_6H_5CH{=}C(C_6H_5)(C_6H_4Cl\text{-}n).$$

Поэтому возник законный вопрос, какие особенности строения обусловливают эстрогенную активность. Несомненно, наличие ароматического кольца является необходимым признаком, так как его гидрирование совершенно снимает физиологическое действие эстрогенных гормонов. Сейчас также считают, что в соединении должны быть активные группы (кетонные, гидроксильные), способные образовывать водородные

связи и могущие давать в организме комплексы с белками. Поскольку белки имеют определенное пространственное строение и в них чередуются аминные и карбонильные группы, то и в эстрогенах между активными группами также должно существовать некоторое оптимальное (для образования комплексов) расстояние. Для классических эстрогенов эстрона (XLIII) и эстрадиола (XLIV) оно составляет около 11 Å.

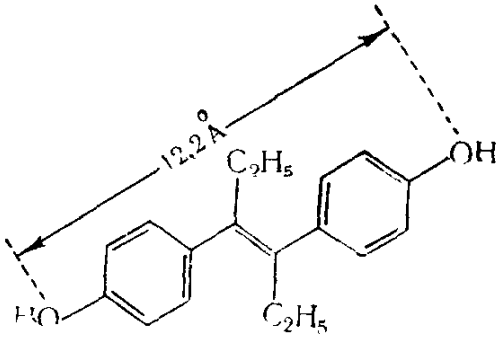


XLIII

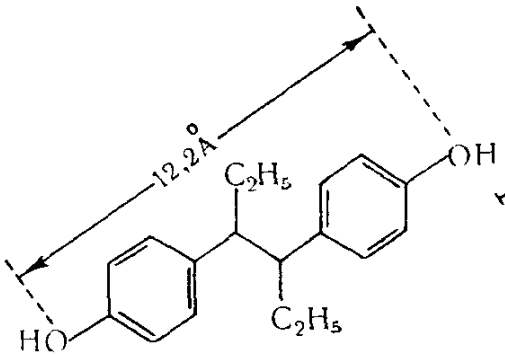


XLIV

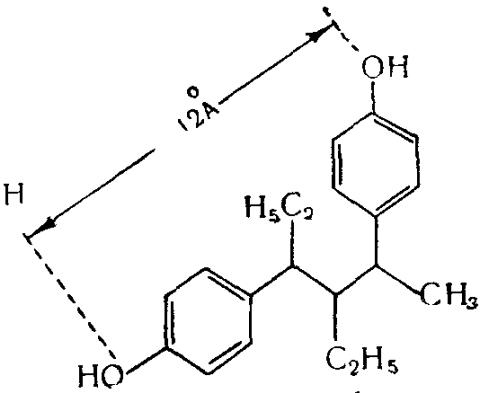
Для стильбэстрола (XXX), гексэстрола (XXXI) (мезоформа) и бензэстрола (XLV) оно близко к предыдущему и составляет около 12Å.



XXX

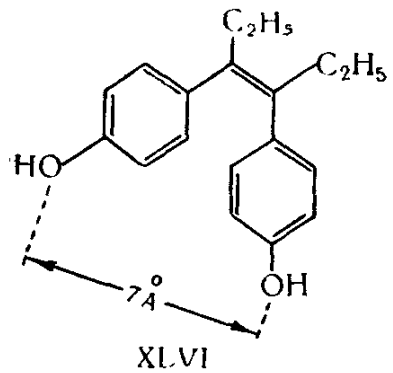


XXXI

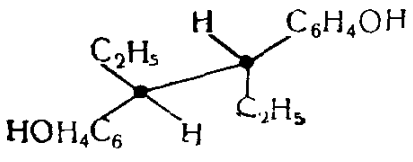


XLV

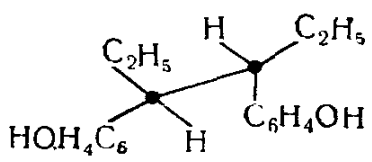
Следует подчеркнуть, что цис-изомер стильбэстрола (XLVI), где расстояние между гидроксильными группами всего 7Å, неактивен. Рацемат



XLVI



XLVII



XLVIII

гексэстрола (XLVII) в тысячу с лишним раз менее активен, чем его мезоформа (XLVIII) и, действительно, расстояние между гидроксилами в первом значительно больше, чем во втором (особенно хорошо это видно на моделях).

Все же остается непонятным, почему гидрирование одного из колец гексэстрола влечет за собой резкое падение активности, в то время как у эстрадиола наличие спиртового (нефенольного) гидроксила не сказывается на величине эстрогенного действия.

В клинической практике эстрогенные гормоны применяются при расстройствах женской половой сферы, при лечении рака предстательной железы и рекомендованы при язвенных болезнях. В сельском хозяйстве их применяют для стимулирования роста молодняка, для увеличения яйценоскости и пр.

ЛИТЕРАТУРА

И. Н. Назаров, Л. Д. Бергельсон. Химия стероидных гормонов. М., Изд-во АН СССР, 1955.

Л. Физер, М. Физер. Химия природных соединений фенантренового ряда. М., Госхимиздат, 1953.

Глава 5

АНДРОГЕННЫЕ ГОРМОНЫ

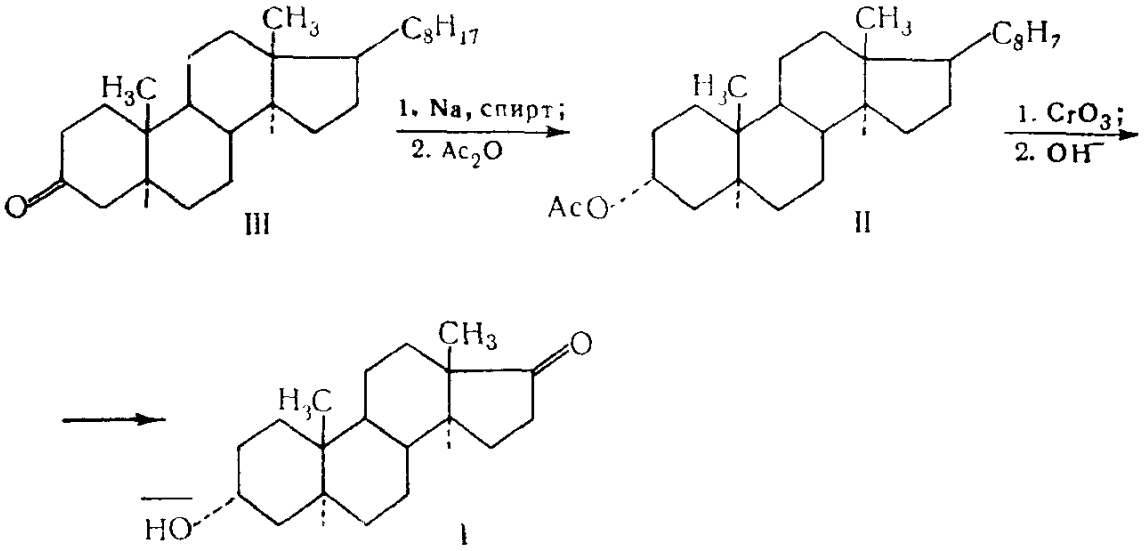
Уже давно было известно, что при пересадке семенников молодым кастрированным петушкам у них восстанавливаются вторичные половые признаки, возобновляется рост гребня, изменяются голос и поведение. Отсюда был сделан правильный вывод, что в семенниках содержатся какие-то активные вещества, обусловливающие половые отличия и половую деятельность.

В 1927 г. были разработаны количественные методы определения активности экстрактов и было обнаружено, что активное начало содержится не только в семенниках, но и в моче половозрелых мужчин (до 1 *мг* в литре).

Общепринятым считается тест на рост гребня у молодых кастрированных петушков. Испытуемый экстракт вводят ежедневно инъекциями масляного раствора в течение 3—5 дней и замеряют увеличение гребня через сутки после последней инъекции. Единицей считается наименьшее количество вещества, вызывающее рост гребня на 15—20% (так называемая петушиная единица). Имеется и другой тест — на рост семенных пузырьков у кастрированных грызунов. Дегенерированные после кастрации пузырьки вновь вырастают при инъекции активного начала и возобновляют секреторную деятельность. Как и при определении эстрогенной активности, величины активности, определенные разными способами, могут сильно розниться между собой и приводимые далее цифры представляют собой средние величины, полученные на основании многих опытов.

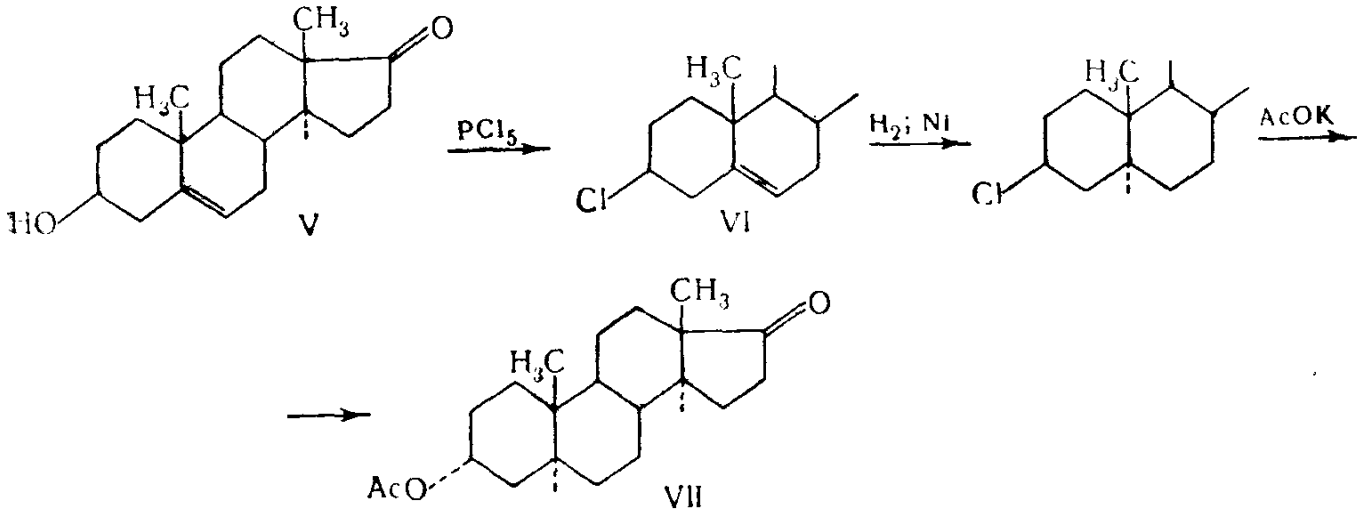
Первый андрогенный гормон — андростерон (I) был выделен Бутенандтом в 1931 г. из мужской мочи, где этот гормон находится в связанном состоянии (возможно, в виде глюкуронидов). Ход выделения был следующий. Мочу подкисляли и оставляли на некоторое время для гидролиза связанных стероидов. В дальнейшем было установлено, что при этом часть гормонов разрушается и что лучше нагревать мочу при 100° несколько часов. Затем мочу упаривали и концентрат экстрагировали хлороформом. Экстракт обрабатывали разбавленной щелочью для удаления веществ кислого и фенольного характера, и затем паром для очистки от летучих примесей. Остаток подвергали еще раз двойному гидролизу — в кислой и щелочной среде, продукт гидролиза растворяли в смеси бензола и петролейного эфира и экстрагировали 60%-ным спиртом. Андрогены оставались в углеводородном слое и были превращены в оксимы. В течение всего хода выделения процесс контролировался пробами на физиологическую активность. После гидролиза оксимов и перегонки в вакууме было выделено три вещества, одно из которых,

обладающее наибольшей активностью, получило название андростерона (I). Из 5 *т* мочи Бутенандт выделил 15 *мг* гормона. На основании данных анализа и наличия окси- и кетогрупп, а также на основании предположения о генетической связи с эстроном и холестерином (что оказалось правильным) он предложил для андростерона строение андростанол-3-она-17. В 1934 г. Ружичка подтвердил это строение и установил его пространственную конфигурацию, получив ацетат андростерона с выходом 0,2% окислением ацетата холестанола-3α (II), в свою очередь полученного из холестанона (III).



Активность андростерона составляет ~100γ на петушиную единицу. Его 3-эпимер — эпиандростерон (IV) имеет значительно меньшую активность (600—700γ).

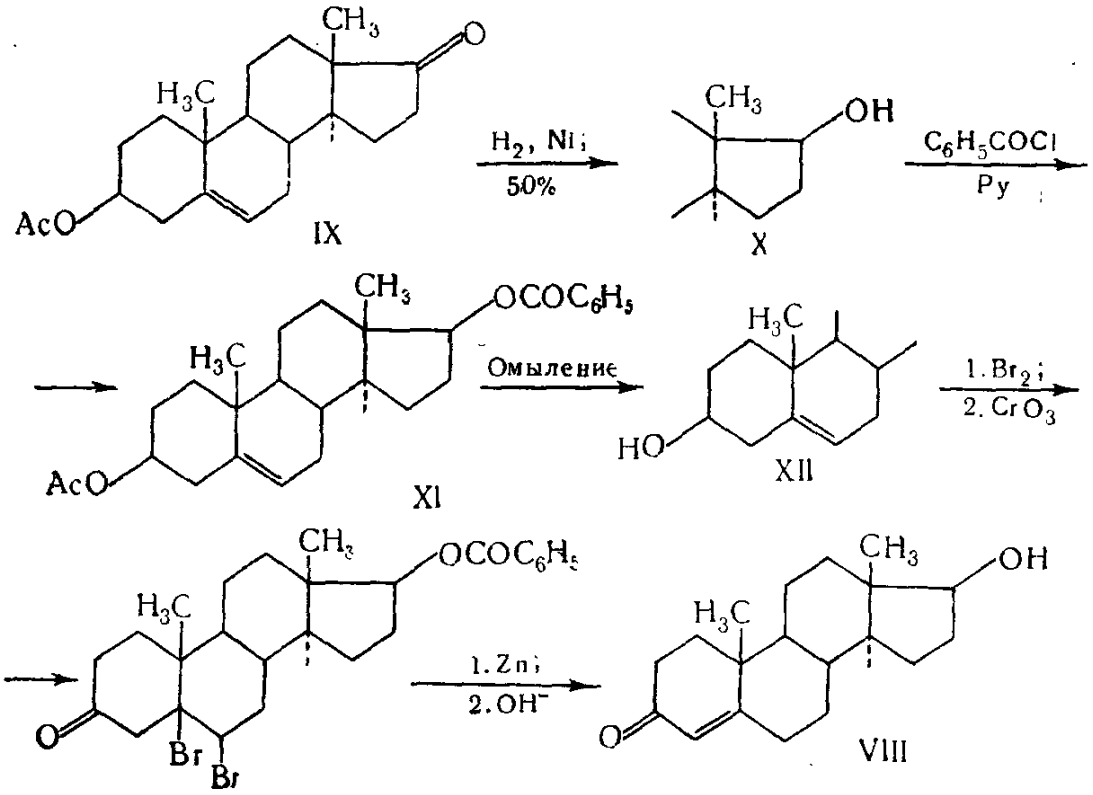
Вскоре Бутенандт предложил другой, более практический способ получения андростерона из доступного дегидроэпиандростерона (V). Взаимодействием этого кетола с пятихлористым фосфором он получил хлоркетон (VI), который после гидрирования и обменной реакции с ацетатом калия (эта реакция шла с Вальденовским обращением) дал ацетат андростерона (VII).



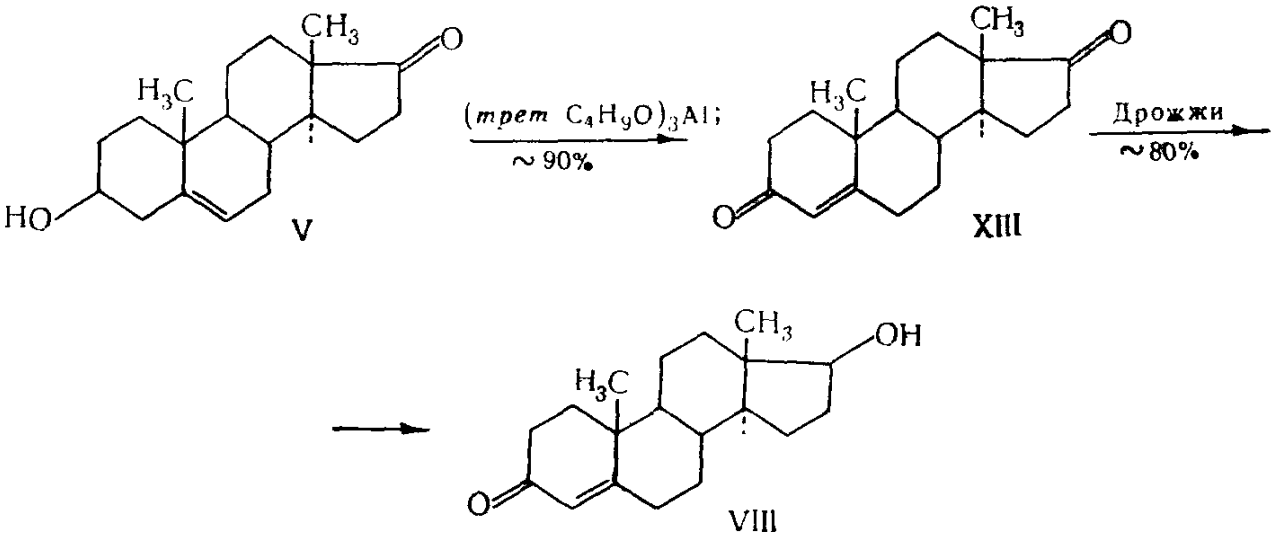
Несмотря на доступность, андростерон почти не нашел практического применения. Дело в том, что в 1935 г. Лакёр (Нидерланды) выделил из семенников быков (а затем и других животных) гораздо более активный гормон, названный им тестостероном (VIII). Новый гормон оказался примерно в семь раз более активным, чем андростерон (I). Первоначально он был выделен в ничтожных количествах (10 *мг* вещества из 100 *кг* семенников быка), но и этого оказалось достаточно для

установления его строения как Δ^4-андростенол-17β-она-3. Согласно спектральным данным, он содержал группировку COCH=CH и гидроксильную группу (дал ацетат), а при окислении превращался в уже известный Δ^4-андростендион-3,17.

Первый синтез тестостерона был осуществлен также Бутенандтом. При гидрировании ацетата дегидроэпиандростерона (IX) получается 3-ацетат Δ^5-андростендиола-3β, 17β (X), который бензоилируют в бензоат (XI) и частично омыляют до 17-бензоата Δ^5-андростендиола-3β, 17β (XII). Последний окисляют, предварительно защитив двойную связь бромом, и после дебромирования и омыления получают тестостерон (VIII).

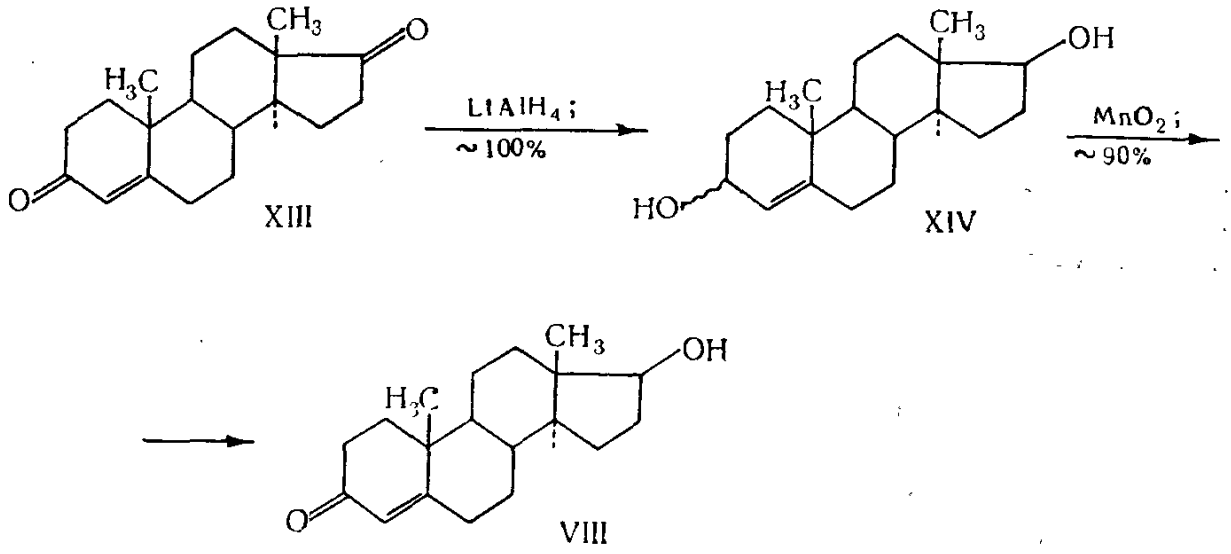


Было предложено много вариантов получения тестостерона (VIII) из дегидроэпиандростерона (V), из которых интересен способ Мамоли (Италия). Дегидроэпиандростерон окисляют по Оппенауэру в андростендион (XIII), который под влиянием дрожжевых грибков восстанавливается до тестостерона (VIII).

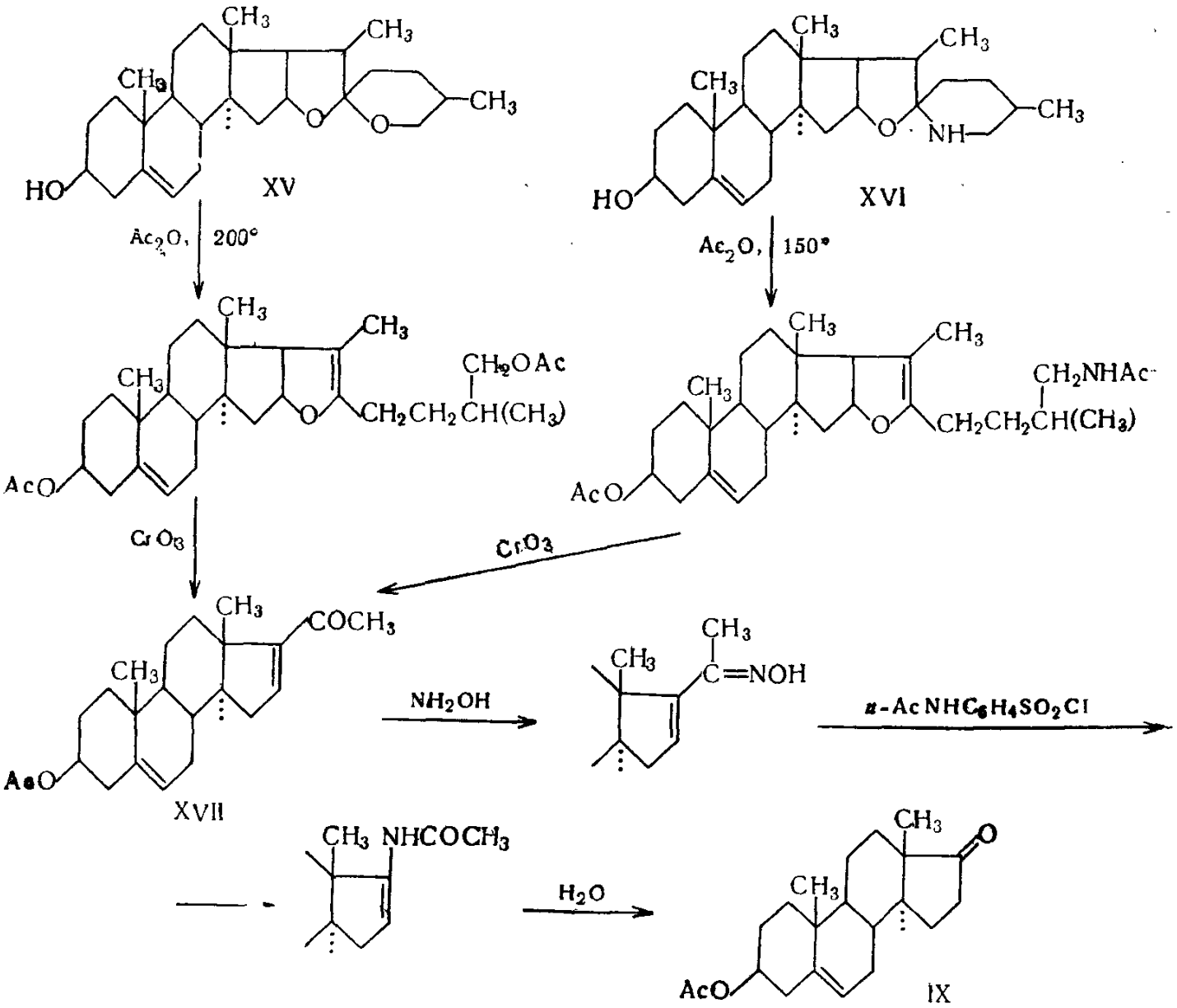


Очень оригинален также чисто химический метод превращения андростендиона (XIII) в тестостерон (VIII). Дикетон восстанавливают алюмогидридом лития в смесь изомерных диолов (XIV), а последнюю окис-

ляют перекисью марганца в нейтральном растворителе. Этот реагент селективно окисляет лишь аллильные спирты и в результате получается тестостерон

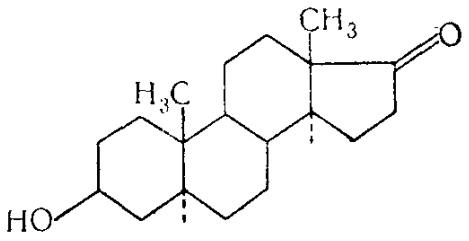


В связи с доступностью других источников стероидов — сапогенинов и стероидных алкалоидов был разработан специальный способ перевода их в дегидроэпиандростерон (V), а следовательно, в тестостерон (VIII). Так, сапогенин диосгенин (XV) и продукт гидролиза алкалоида

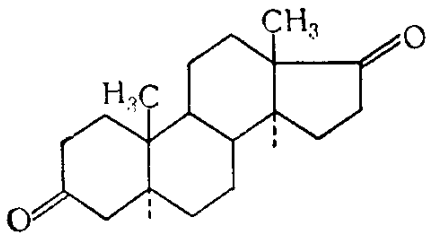


соланина соласодин (XVI) при нагревании с уксусным ангидридом и последующем окислении дают один и тот же ацетат дегидропрегненолона (XVII). Оксим последнего подвергают перегруппировке Бекмана (под влиянием хлорангидрида ацетосульфаниловой кислоты). При этом образуется ацетат дегидроэпиандростерона (IX) (см. стр. 319).

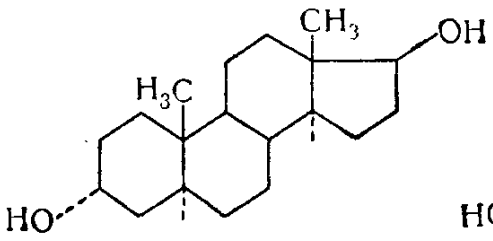
Физиологическое действие андрогенов зависит от характера кислородных заместителей, но в еще более сильной степени от их пространственной конфигурации и характера сочленения колец в стероидной молекуле. Так, андростандион-3,17 (XVIII) обладает активностью (130γ), почти равной активности андростерона, а андростандиол-3α, 17β (XIX) даже значительно сильнее его (20—25 γ). С другой стороны, эпиандростерон



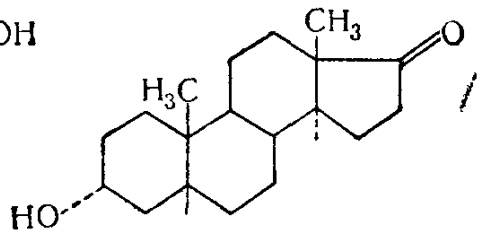
IV (500–600γ)



XVIII (130γ)



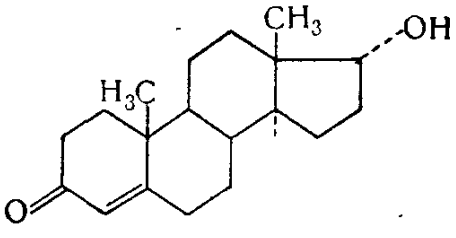
XIX (20–25γ)



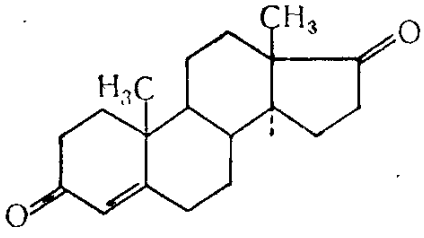
XX (неактивен)

(IV) с другим пространственным расположением гидроксила в 5—6 раз менее активен, чем андростерон, а изомер последнего тестанол-3α-он-17 с цис-сочленением колец *A* и *B* вообще неактивен.

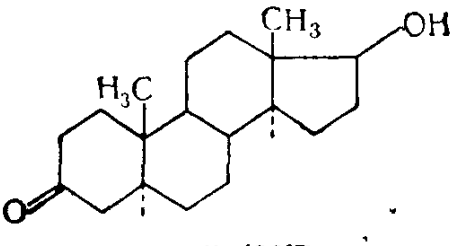
Аналогично, 17-изотестостерон (XXI) в 20 раз слабее тестостерона, а Δ^4-андростендион-3,17 (XIII) слабее его лишь в 5—6 раз. Дигидротесто-



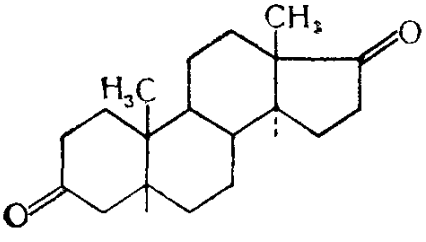
XXI (400γ)



XIII (100–120γ)



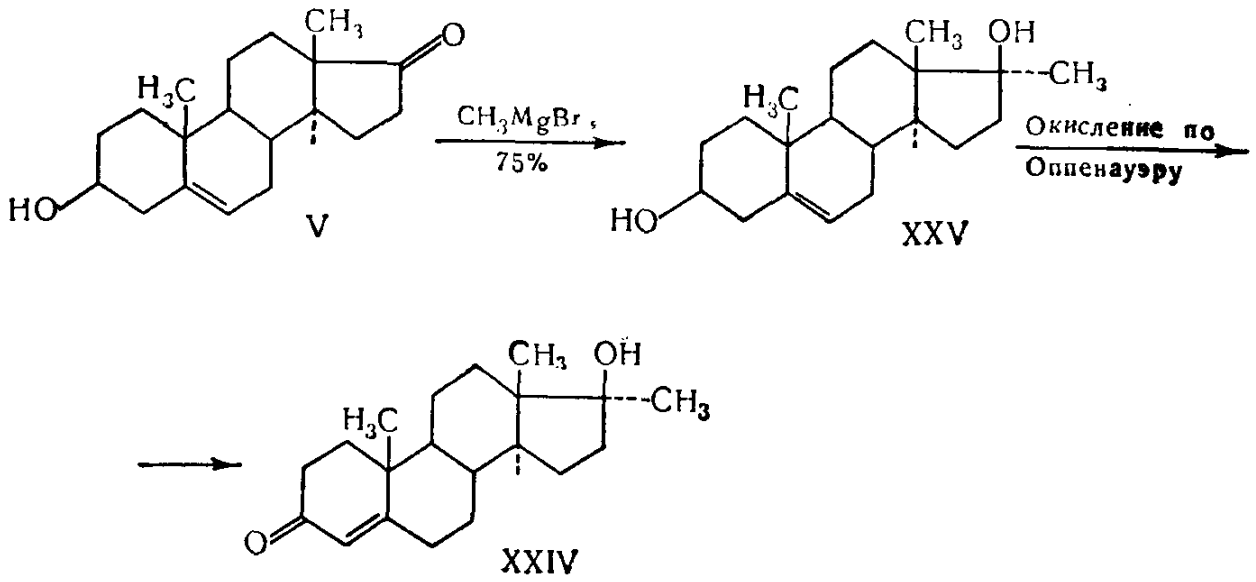
XXII (20γ)



XXIII (неактивен)

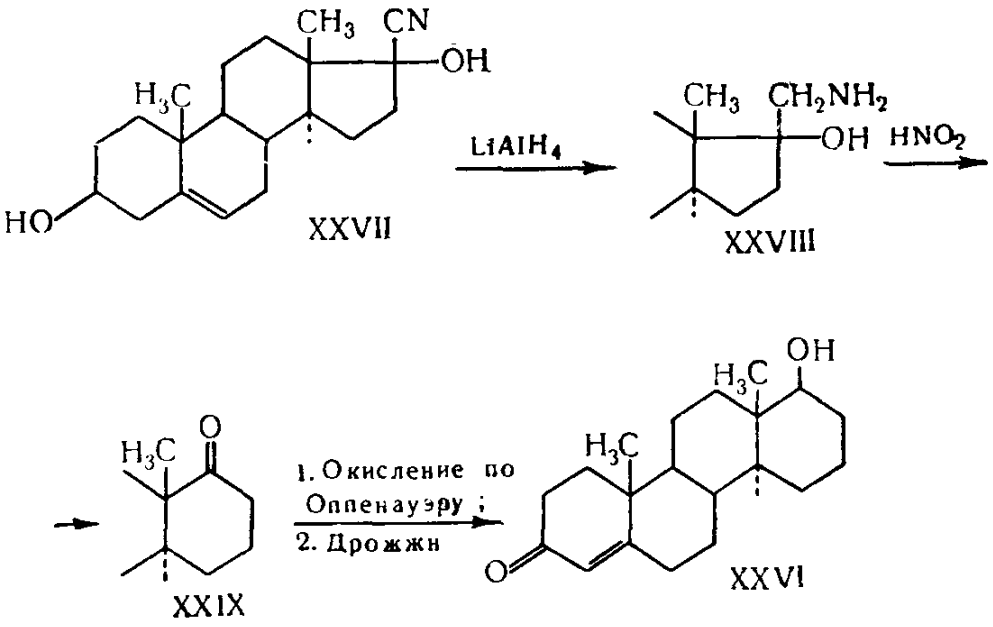
стерон (XXII) не отличается по силе действия от тестостерона, а 5-эпимер активного андростандиона-3,17 (XXIII) с цис-сочленением колец *A* и *B* неактивен.

Были предприняты синтезы различных гомологов андрогенов, причем наиболее плодотворные результаты получены с гомологами тестостерона. Так, 17-метилтестостерон (XXIV) лишь немного слабее тестостерона, но его преимущество перед последним состоит в том, что он высокоактивен также и при приеме внутрь. Он получается в промышленном масштабе из дегидроэпиандростерона (V).



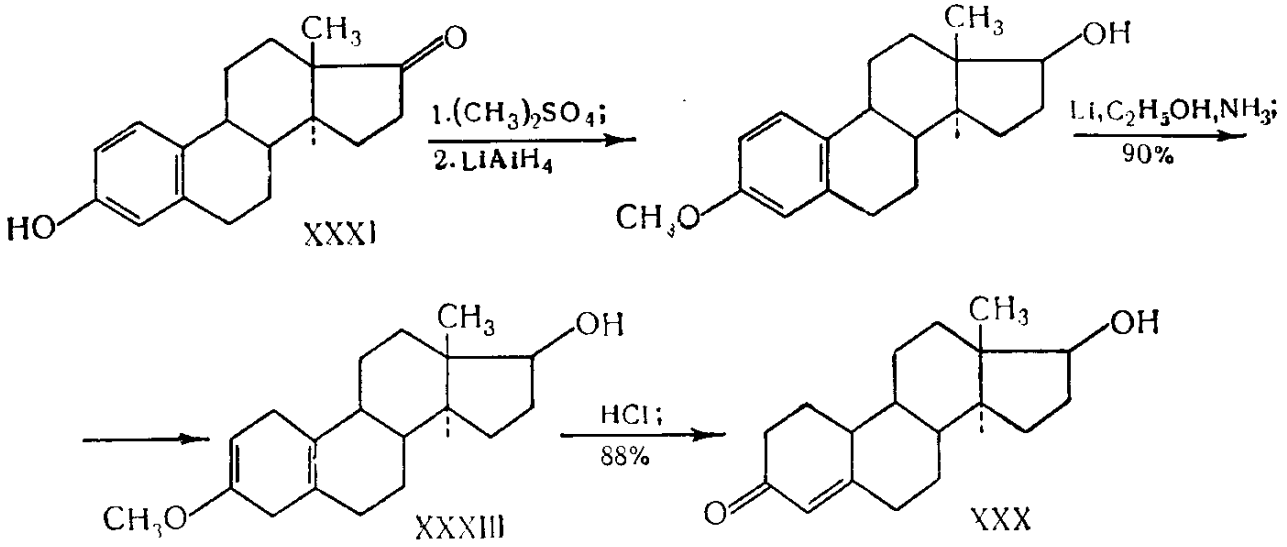
Действием магнийметилиодида на дегидроэпиандростерон (V) получают диол (XXV), который при окислении третичнобутилатом алюминия в ацетоне (или циклогексаноне) дает метилтестостерон.

Замена пятичленного кольца *D* на шестичленное ведет лишь к незначительному уменьшению активности и *D*-гомотестостерон (XXXVI) обладает активностью 20—30 γ. Он получен из цианогидрина дегидроэпиандростерона (XXXII), который при восстановлении дает оксиамин (XXVIII). При действии на него азотистой кислоты имеет место перегруппировка Демьянова с расширением кольца и образованием *D*-гомоаналога дегидроэпиандростерона (XXIX), который по способу Мамоли легко перевести в *D*-гомотестостерон (XXVI).



Интересно, что другой аналог тестостерона — 19-нортестостерон (XXX) также обладает андрогенной активностью (по разным данным от 30 до 100% активности тестостерона). Он получается из эстрона (XXXI) через

метиловый эфир эстрадиола (XXXII) с последующим восстановлением ароматического кольца литием и спиртом в жидком аммиаке в метоксикарбинол (XXXIII).



Полученный карбинол (XXXIII) при кислом гидролизе переходит в 19-нортестостерон (XXX).

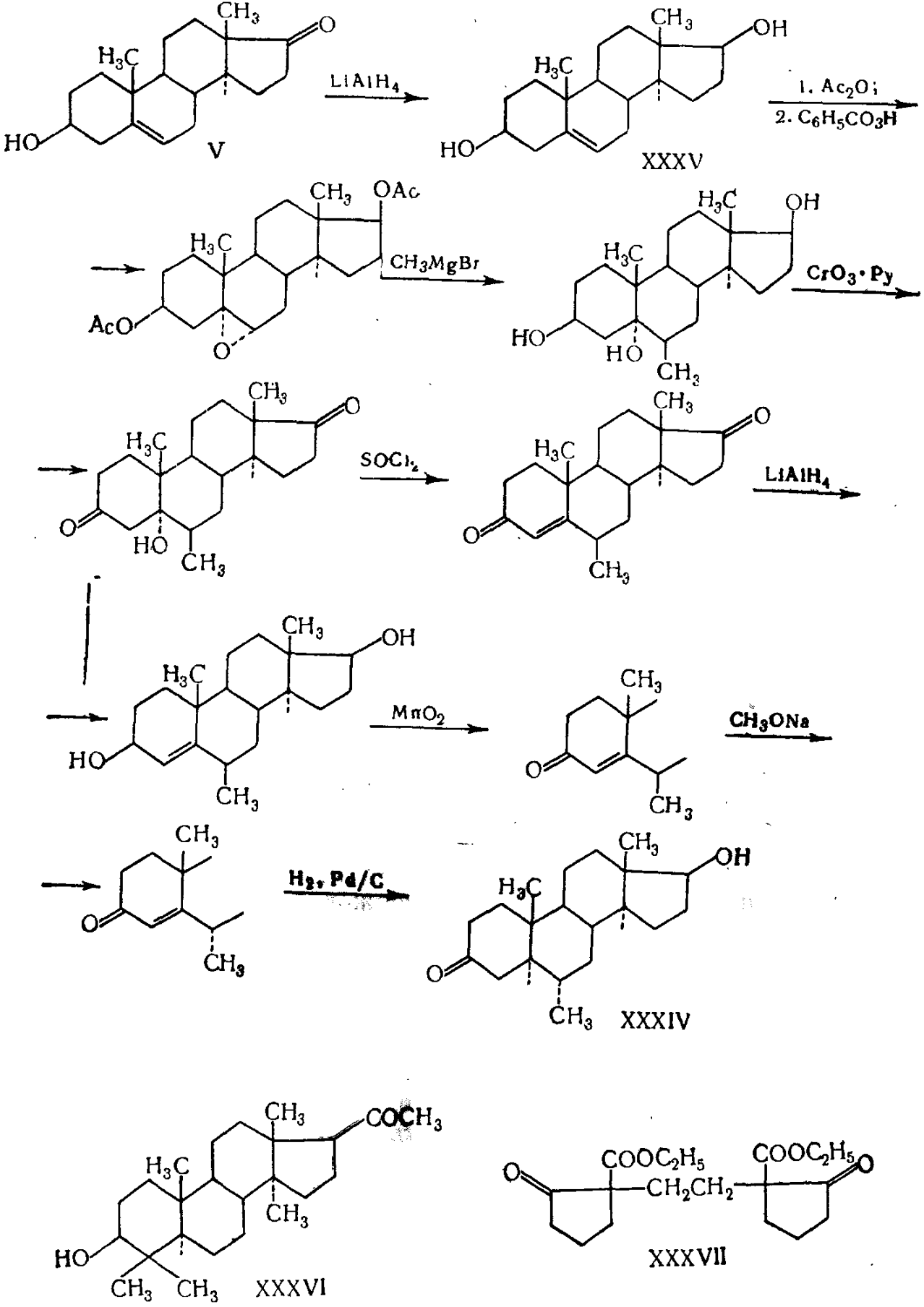
Следует особо отметить, что введение метильной группы в молекулу стероида вообще и андрогена в частности, часто усиливает физиологическое действие. Это было уже видно на примере 17-метилтестостерона, но еще ярче демонстрируется на примере 6α-метилдигидротестостерона (XXXIV), получаемого из Δ^5-андростендиола-3β, 17β (XXXV) по схеме, приведенной на стр. 323.

Конечный кетол (XXXIV) оказался в 4 раза сильнее тестостерона. Такое благоприятное влияние 6-CH_3-группы было отмечено не только для андрогенных, но также и для гестагенных и кортикоидных гормонов, о чем будет сказано в дальнейшем. Приведенный на схеме метод введения CH_3-группы в положение 6 является классическим и был открыт в 1940 г. М. И. Ушаковым.

Андрогенное действие в высокой степени присуще именно стероидной молекуле, и все попытки получить активные соединения восстановлением заменителей эстрогенов (стильбэстрола, гексэстрола, дойзинолевой кислоты) не дали результатов, хотя продукт гидрирования эстрона обладает заметной андрогенной активностью, не говоря уже о другом продукте восстановления эстрадиола — 19-нортестостероне. С другой стороны 4,4,14-триметил-5α-прегнанол-3β-он-20 (XXXVI), являющийся в сущности производным тритерпена ланостанола, обладает активностью всего лишь на 30% меньшей, чем активность тестостерона (см. стр. 323).

В свете изложенных фактов совсем неожиданным было сообщение А. М. Халецкого (Ленинград, 1956 г.) о высокой андрогенной активности (10—30% активности тестестерона) соединения (XXXVII), не имеющего ничего общего со стероидами. Возможно, что это лишь «первая ласточка» и в дальнейшем будут синтезированы и другие «синтетические» андрогены.

Андрогенные гормоны применяются при расстройствах мужской половой сферы, особенно если причиной являются переутомление, при раке молочной железы, при различных заболеваниях сосудистой системы (гипертонии, гипотонии) и т. д. Некоторые стероиды, близкие по строению к андрогенам, обладают так называемой анаболической активностью, т. е. свойством промотировать синтез белка в организме. При этом их андрогенные свойства являются излишними. Сейчас найден ряд соединений с высокой анаболической и малой андрогенной активностью, например, 17α-этилтестостерон и фенилпропионат 19-нортестостерона, кото-



рые предложены при терапии многих болезней (в том числе и рака), связанных с расстройством обмена белка.

Следует упомянуть об аналитическом определении стероидов, которое сейчас стало неотъемлемой частью клинического исследования больных. Количество эстрогенов и 17-кетостероидов в моче, соотношение 3α- и 3β-изомеров позволяют делать определенные заключения о патологическом состоянии половых желез или надпочечников. С целью наиболее полного извлечения стероидов гидролиз мочи проводят в две стадии. Сначала мочу нагревают при 100° в течение 8 часов и экстраги-

руют эфиром. Водный остаток гидролизуют в присутствии серной кислоты (0,1 объема 70%-ной кислоты) при 100° в течение 30 мин. и затем экстрагируют эфиром. Обе эфирные вытяжки объединяют и анализируют, причем для определения 17-кетостероидов пользуются тем, что *м*-динитробензол в щелочной среде дает с кетонами (типа $COCH_2$) фиолетовую окраску (реакция Циммермана). Естественно, стероиды с кетогруппой в положении 3 и 20 тоже дают окраску, но она устойчива именно у соединений с 17-CO-группой. Дегидроэпиандростерон определяют по окрашиванию с серной кислотой (при 100°). Более точные результаты получают при хроматографировании эфирного раствора стероидов на окиси алюминия. Примером диагностической важности таких анализов служит тот факт, что у больных аддисоновой болезнью количество 17-кетостероидов снижается втрое против нормы, а при раке надпочечников увеличивается в 100—200 раз.

ЛИТЕРАТУРА

И. Н. Назаров, Л. Д. Бергельсон. Химия стероидных гормонов. М., Изд-во АН СССР, 1955, стр. 107—191.

Л. Физер, М. Физер. Химия природных соединений фенантренового ряда. М., Госхимиздат, 1953, стр. 345—364.

А. М. Халецкий, Б. А. Запутряев, ЖОХ, 1956, **26**, 3026.

L. Fieser, M. Fieser. Steroids New York, Reinold Publishing Corporation, 1959, pp. 503—538, 592—594.

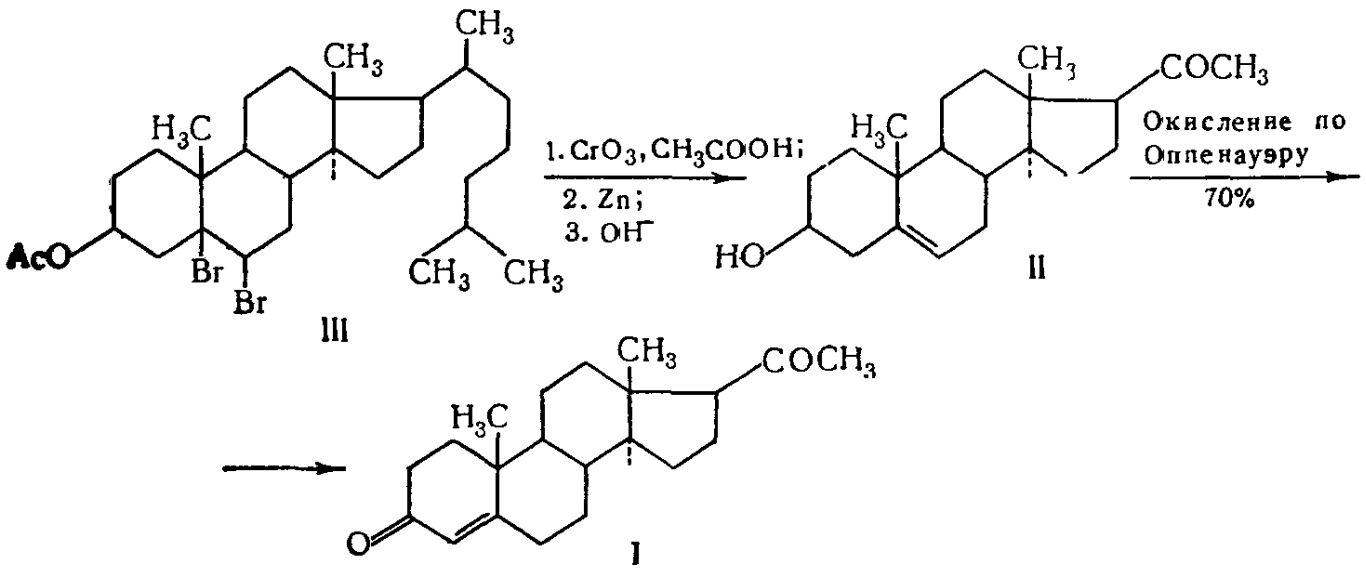
Глава 6

ГЕСТАГЕННЫЕ ГОРМОНЫ

Гестагенные гормоны были выделены в результате исследования функций так называемого желтого тела (Corpus luteum), периодически образующегося после овуляции и развивающегося после оплодотворения. Удаление желтого тела в ранний период беременности приводит к выкидышу, следовательно, оно выделяет гормон, необходимый для поддерживания беременности. Далее было установлено, что кроме этого он сенсибилизирует матку к восприятию зародыша и способствует имплантации яйцеклетки и развитию молочных желез.

Выделение гормона оказалось возможным лишь после разработки соответствующих биологических тестов на гестагенную активность, из которых наиболее распространен тест Клауберга. Неполовозрелым крольчихам в течение 8 дней вводят ежедневно подкожно по 10 мышиных единиц эстрогенного гормона. Затем в течение 5 дней вводят подкожно испытуемое вещество. Наименьшим количеством вещества, вызывающим в слизистой оболочке матки изменения, подобные тем, которые наблюдаются в начале беременности, называется кроличьей единицей. Испытание, как видно, значительно сложнее, чем испытание на эстрогенную и андрогенную активность, тем более что величина кроличьей единицы значительно колеблется в зависимости от чувствительности животных.

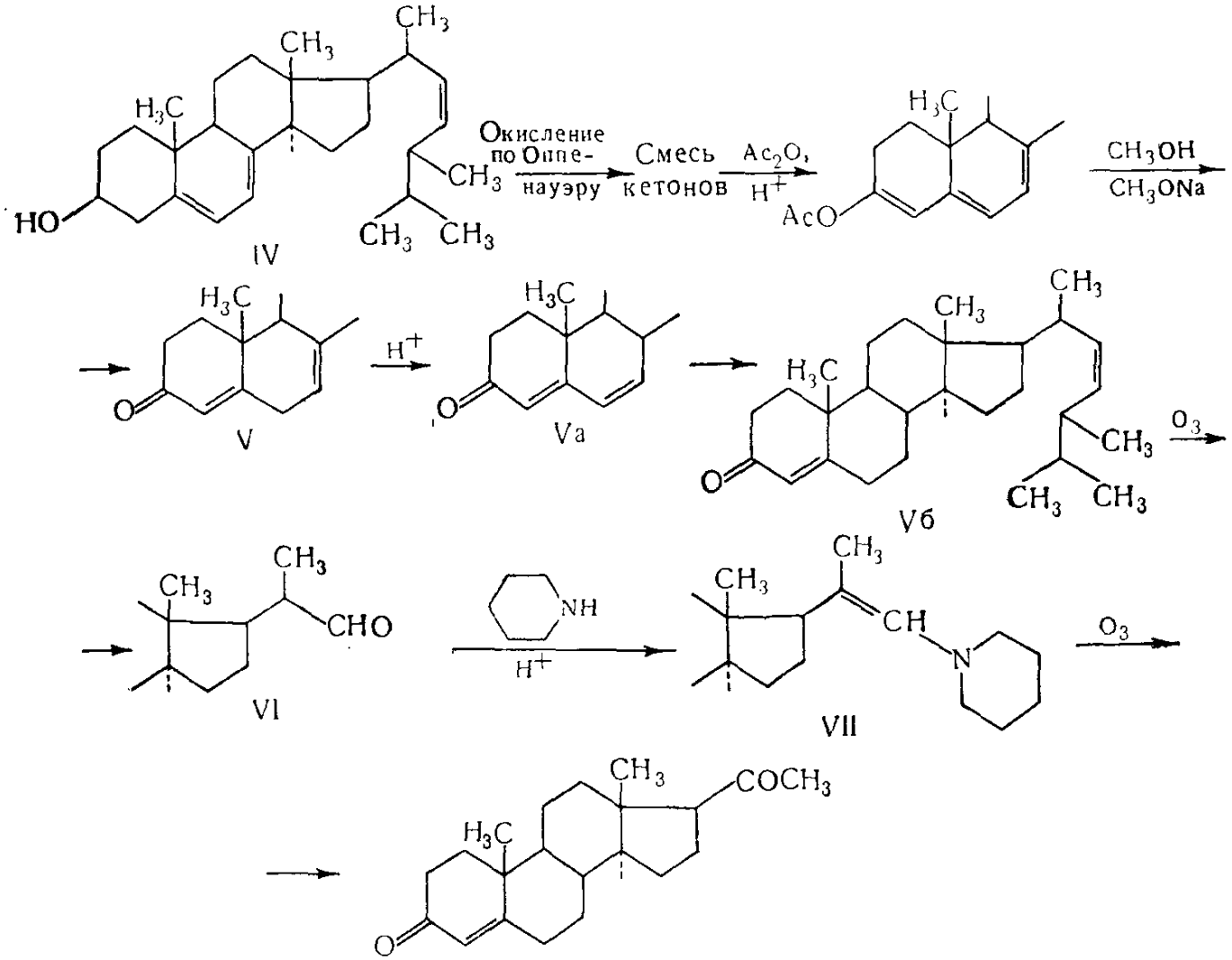
В 1934 г. Бутенандт выделил из желтого тела свиньи вещество, имеющее активность 1 *мг* и названное прогестероном (I). Строение его, как и строение других гормонов, было выведено на основании аналитических и спектральных данных и подтверждено частичным синтезом из прегненолона (II) путем окисления по Оппенауэру. Сам прегненолон получается при окислении ацетата дибромида холестерина (III).



Для практического использования этот способ непригоден ввиду малого выхода прегненолона при окислении (1—3%).

Практически более пригодны способы получения прогестерона (I) из эргостерина (IV).

Один из этих способов был предложен Шефердом (США) и усовершенствован Дери (Венгрия). Окислением эргостерина (IV) по Оппенауэру получается смесь кетонов с различным положением двойных связей. Действием уксусного ангидрида в присутствии кислот их переводят в енолацетат, который при омылении по Земплену (метанол с небольшим количеством метилата натрия) дает чистый $\Delta^{4,7}$-кетон (V) изомеризующийся под действием кислот в $\Delta^{4,6}$-кетон (V*а*). Гидрирование последнего протекает селективно с образованием $\Delta^{4,22}$-эргостадиенона-3 (V*б*), который озонируют вычисленным количеством озона, причем боковая цепь расщепляется по двойной связи и образуется альдегид (VI). Теперь остается только удалить альдегидную группу и ввести в положение 20 кетонную функцию. Это делается довольно оригинальным образом. Действием пиперидина (или пирролидина) в присутствии *п*-толуолсульфокислоты получается так называемый енамин (VII), т. е. производное енольной формы альдегида. При этом в реакцию вступает более реакционноспособная альдегидная группа, а не кетонная, сопряженная с двойной связью.



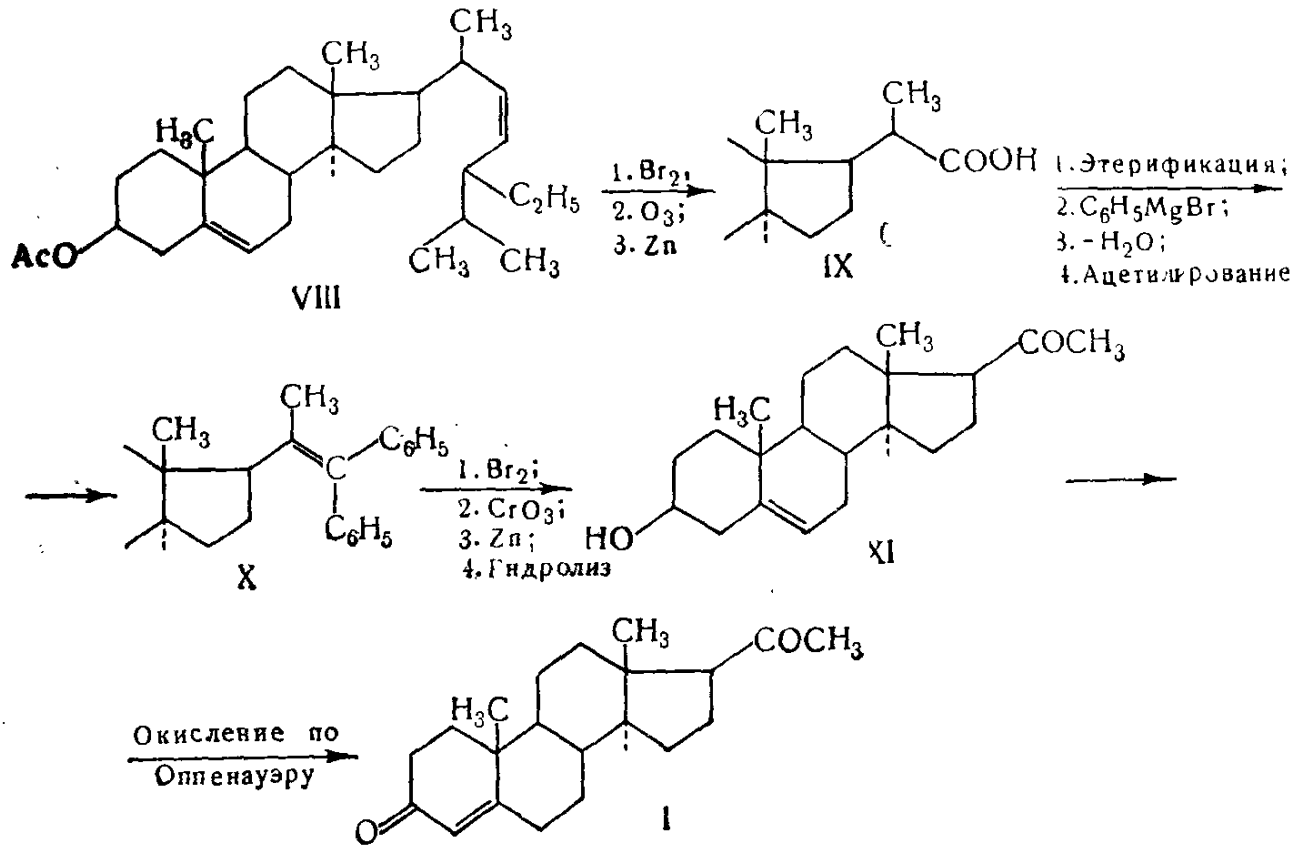
В результате второго озонирования (или окисления) енамина (VII) получается прогестерон. Все стадии протекают с хорошими выходами, а такие стадии, как гидрирование и образование енамина, идут количественно. Общий выход прогестерона достигает 50%. При получении же прогестерона из холестерина наибольший выход составил 1,5%. К сожалению, сам эргостерин, добываемый в сравнительно небольших количествах из дрожжей, является еще трудно доступным сырьем.

Синтез прогестерона чрезвычайно важен для химии стеринов не только потому, что он сам является гормоном. Его потребление для этих целей сравнительно невелико, но он представляет собой промежуточный продукт для получения других, более важных, кортикоидных гормонов и поэтому, может быть, ни для одного гормона не было предложено столько способов синтеза из самых разнообразных видов сырья, как для прогестерона.

Таков, например, синтез из стигмастерина, одной из составных частей соевого масла (именно его неомыляемой части).

Обычно исходят не из самого стигмастерина, а из его ацетата (VIII). Последний бромируют, затем озонируют до кислоты и отщепляют бром цинком. Все эти стадии осуществляются обычно сразу без выделения промежуточных продуктов. В результате отщепляется только боковая цепь. Вероятно и здесь можно было бы провести синтез таким же путем, как и из эргостерина. Далее кислоту (IX) превращают в эфир и действуют магнийфенилбромидом, т. е. пользуются тем способом расщепления боковой цепи, который известен под названием способа Барбье — Виланда.

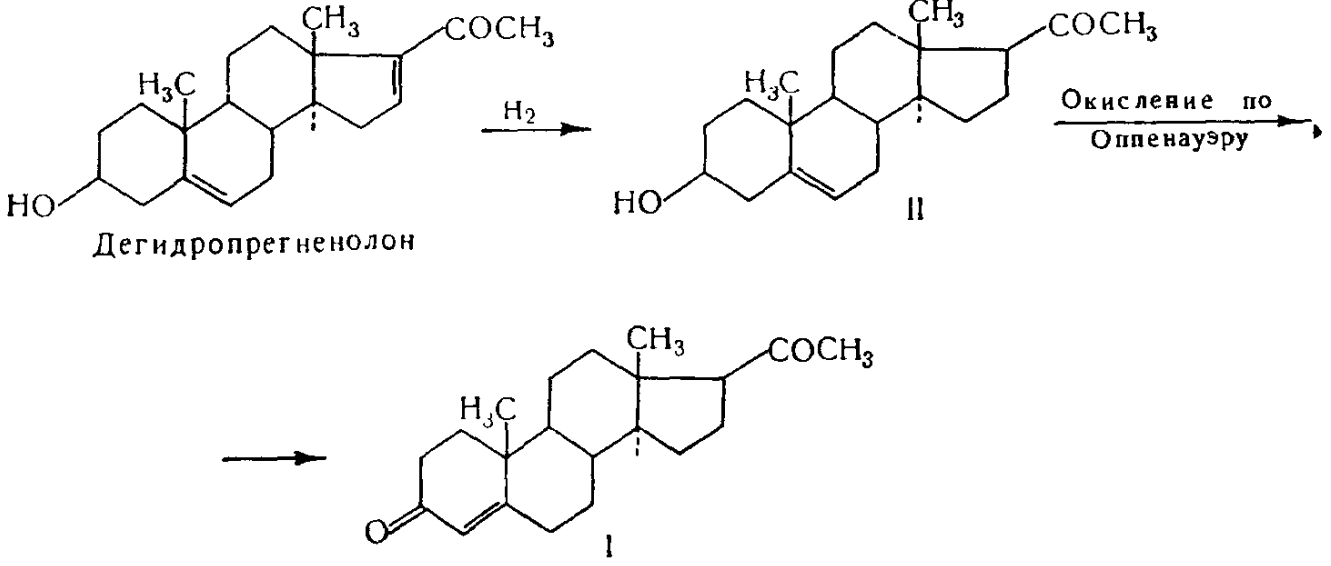
В результате получается дифенилкарбинол, который очень легко теряет молекулу воды, давая этиленовый углеводород (X).



Дальше идет защита связи в кольце *B* бромированием, затем окисление хромовым ангидридом и удаление брома. В результате получается прегненолон, а окислением его по Оппенауэру прогестерон.

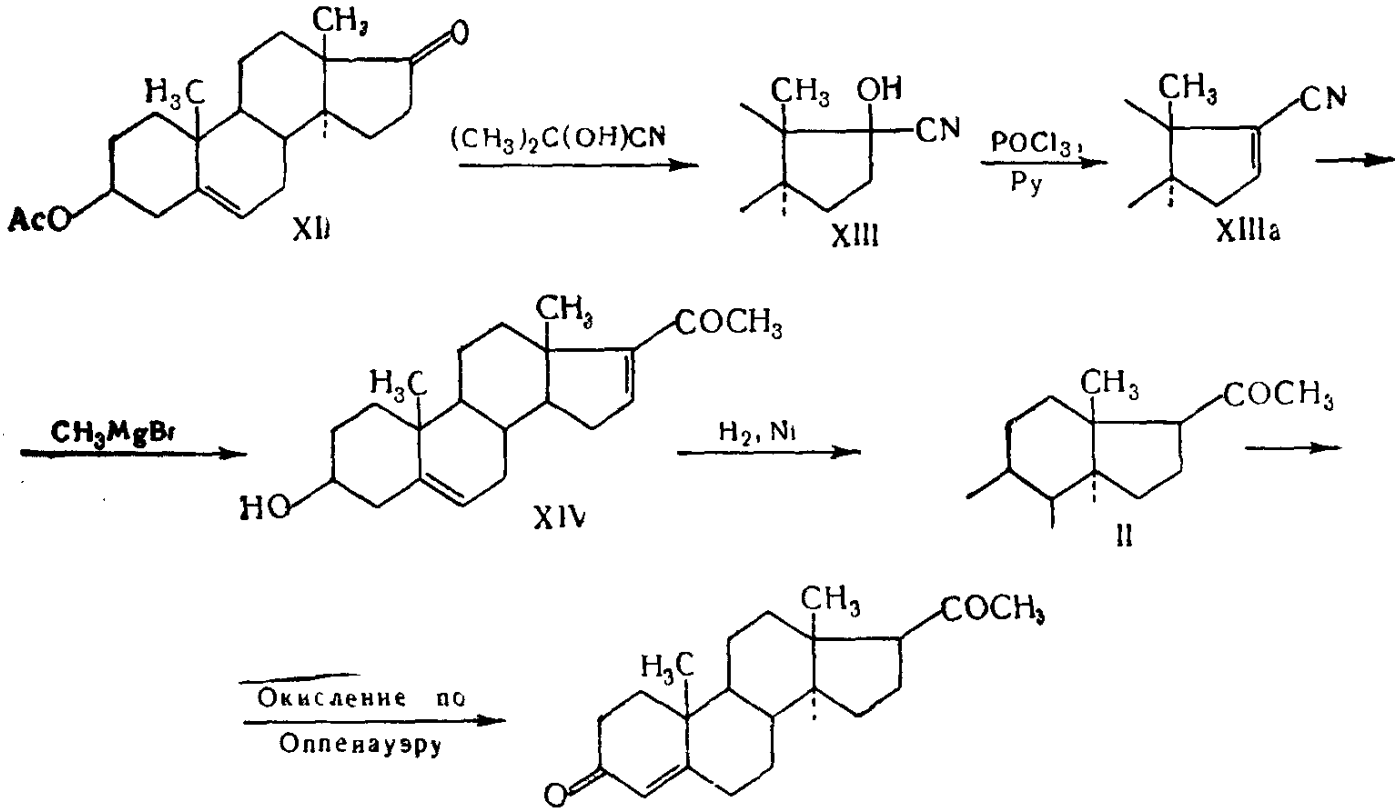
Синтез прогестерона из стигмастерина может иметь значение для стран Восточной Азии, где производится много соевого масла и имеются большие отходы при его производстве. Другим перспективным сырьем для получения прогестерона, и вообще стероидных гормонов, является соласодин — продукт гидролиза алкалоида соланина.

Получаемый из него дегидропрегненолон (см. стр. 319) при гидрировании переходит в прегненолон (II), который при окислении по Оппенауэру дает прогестерон (I):



До сих пор имеет практическое применение синтез прогестерона из ацетата дегидроэпиандростерона (XII), который в свою очередь получается из холестерина.

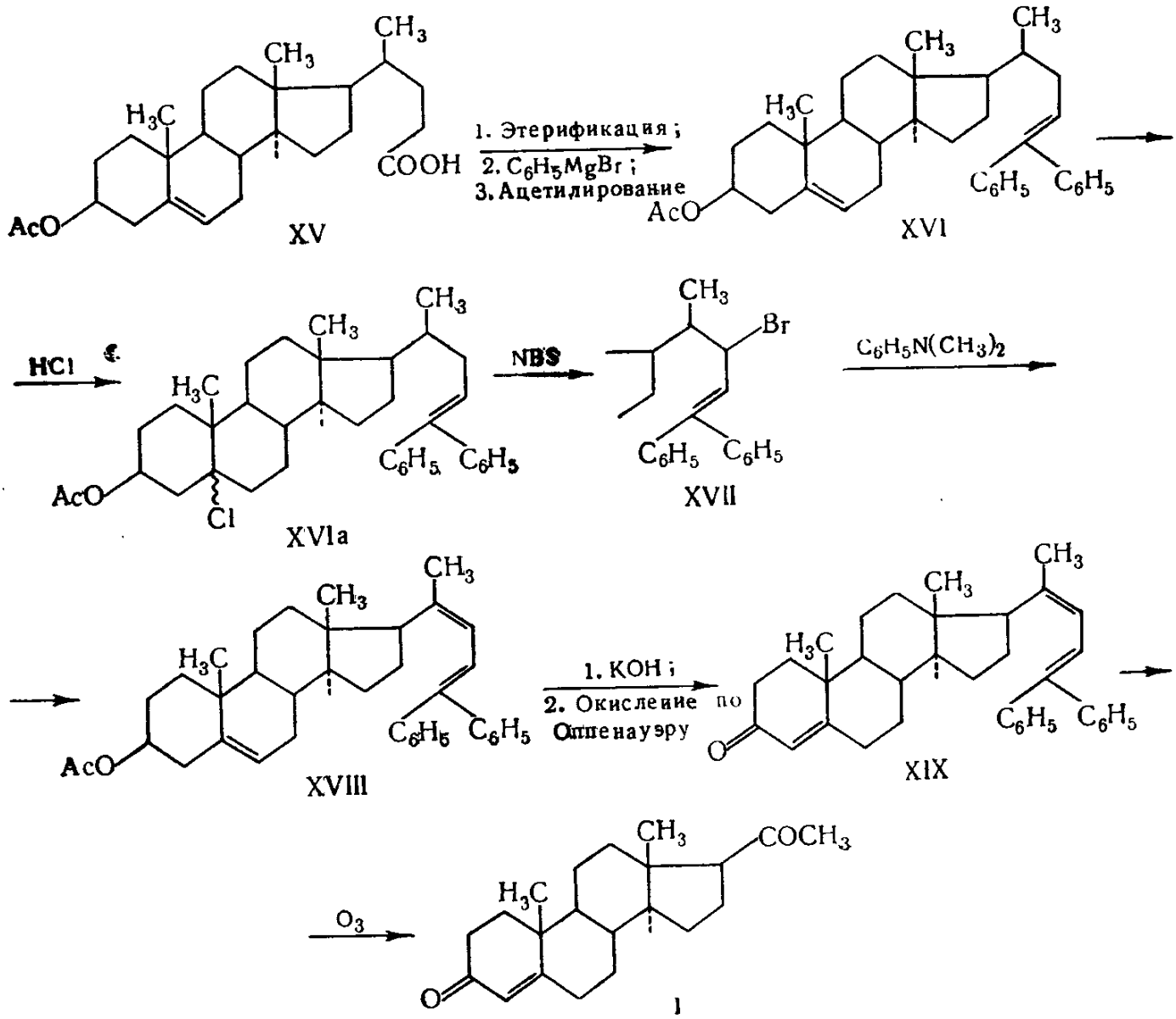
В данном случае задача состоит, как видно, во введении боковой цепочки из двух атомов. Прежде всего получают оксинитрил (XIII), действуя на ацетат дегидроэпиандростерона цианистым водородом или, что гораздо лучше, циангидрином ацетона, поскольку работать с синильной кислотой в производственных условиях опасно. Оксинитрил (XIII) дегидратируют действием хлорокиси фосфора в пиридине, причем выход продукта достигает почти 80%.



Затем на образовавшийся непредельный нитрил (XIII*а*) действуют магнийметилбромидом и в результате обычной обработки получают уже упоминавшийся выше дегидропрегненолон (XIV). Этот же дегидропрегненолон получается из соласодина. Селективным гидрированием кетона (XIV) и последующим окислением образующегося прегненолона (II) по Оппенауэру получают прогестерон.

Способ получения прогестерона из дегидроэпиандростерона дополняется способом получения из 3β-ацетокси-Δ^5-холеновой кислоты (XV). Дело в том, что при окислении холестерина выход дегидроэпиандростерона составляет самое большое 8%, основную же часть продуктов представляют кислоты. Из этой смеси кислот легче всего выделяется (и в довольно больших количествах) 3β-ацетокси-Δ^5-холеновая кислота, которую заманчиво перевести в прогестерон или какое-либо другое стероидное соединение.

Задачу перехода к прогестерону можно в принципе разрешить постепенной деградацией боковой цепи по Барбье, но так как эта постепенность стоит очень дорого, то был разработан более или менее удачный способ, где эта многостадийность устранена (Мишер, Швейцария). Исходят из метилового эфира кислоты (XV), действуя на него фенилмагнийбромидом. В результате дегидратации промежуточно образующегося дифенилкарбинола получается соединение (XVI). Вместо того, чтобы окислять последнее, как это делали по старым методам, поступают следующим образом. Прежде всего действуют хлористым водородом, который присоединяется по двойной связи в кольце *B*, защищая эту двойную связь приблизительно так же, как бромом защищали двойную связь в холестерине.



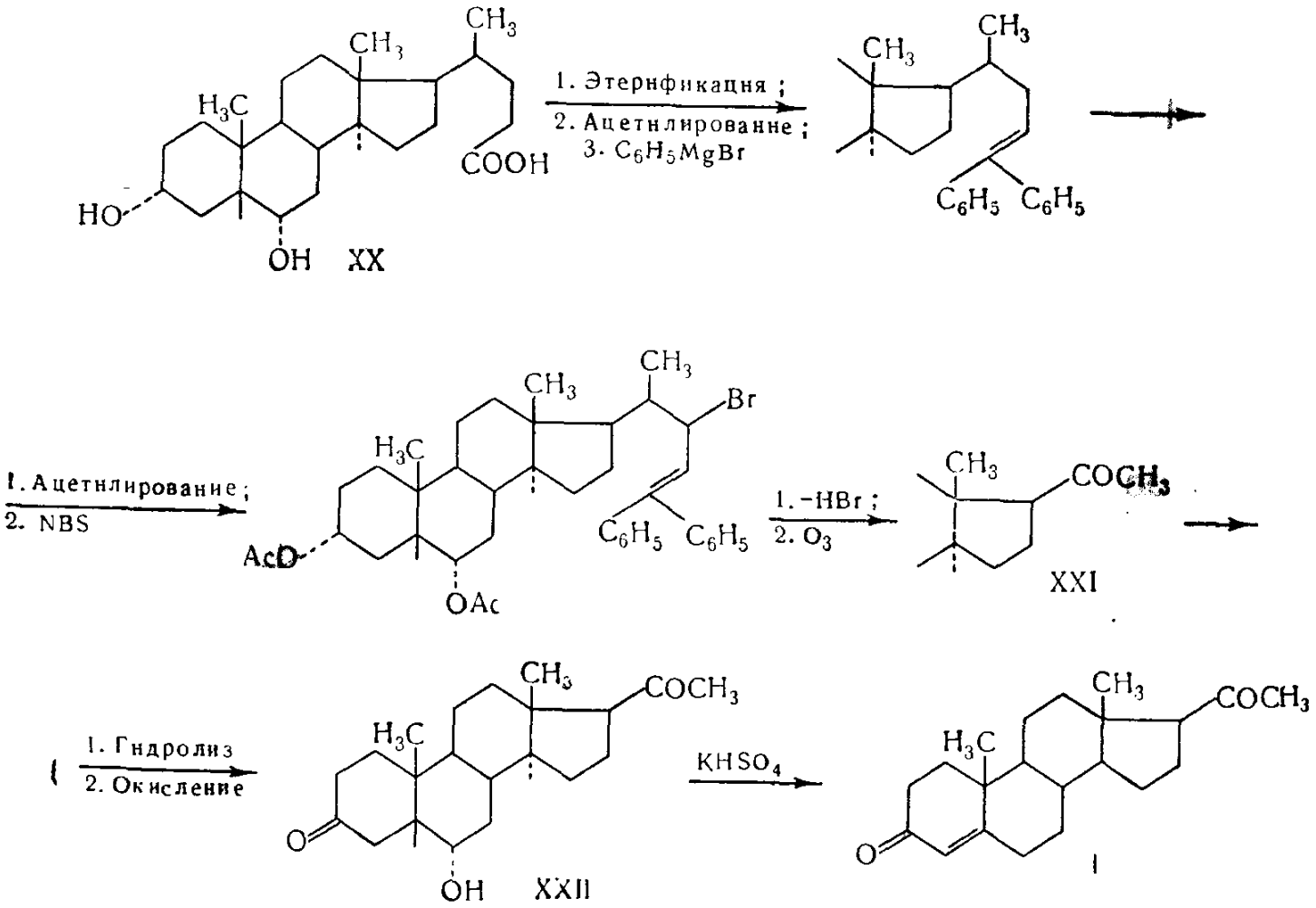
Далее на хлорсоединение (XVI а) действуют N-бромсукцинимидом, который бромирует его в аллильном положении при двойной связи. Теперь становится понятно, почему было нужно защитить двойную связь.

Если подействовать N-бромсукцинимидом непосредственно на соединение (XVI) бромирование пойдет не в одном, а в двух направлениях.

Хлорбромид (XVII) обрабатывают диметиланилином, причем одновременно отщепляются молекулы бромистого и хлористого водорода. Полученный ацетокситриен (XVIII) гидролизуют и затем окисляют по Оппенауэру в триенон (XIX). На этой стадии обнаруживаются все преимущества этого метода, так как окисление не задевает двойные связи в боковой цепи, а только вторичную спиртовую группу. Озонированием кетона (XIX) получают прогестерон. Общий выход составляет 31%, что, принимая во внимание некоторую многостадийность, является очень хорошим результатом.

Предложен также способ получения прогестерона из гиодезоксихолевой кислоты (XX), выделяемой из желчи свиней. Получение ее в чистом виде на скотобойнях не представляет ничего сложного и этот продукт достается почти даром. Она отличается от упоминавшейся выше 3β-окси-Δ^5-холеновой кислоты только тем, что гидроксильная группа находится не в β- а в α-положении, а двойная связь как бы гидратирована молекулой воды.

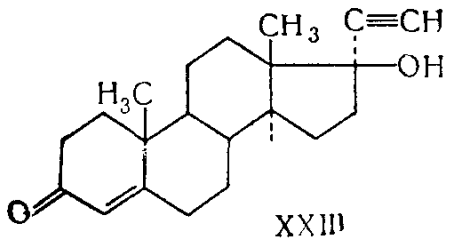
Наличие второй OH-группы удобно потому, что при дегидратации образуется нужная Δ^5двойная связь. Способ в общем сводится к тому, что гиодезоксихолевую кислоту подвергают тем же превращениям, что и кислоту (XV) при вышеописанном синтезе Мишера.



После озонирования получается диацетат прегнандиол-3α, 6α-она-20 (XXI), который омыляют и селективно окисляют в дикетон (XXII). Дегидратация нагреванием с бисульфатом калия дает прогестерон.

С того момента, когда прогестерон был получен в чистом виде, начались поиски соединений, которые были бы столь же активны, как и он сам. Вскоре такие соединения были найдены, причем они оказались

чрезвычайно простыми по строению. Одно из них под названием прегнин (XXIII) производится в промышленном масштабе, в частности в Советском Союзе, и является 17-этинилтестостероном.

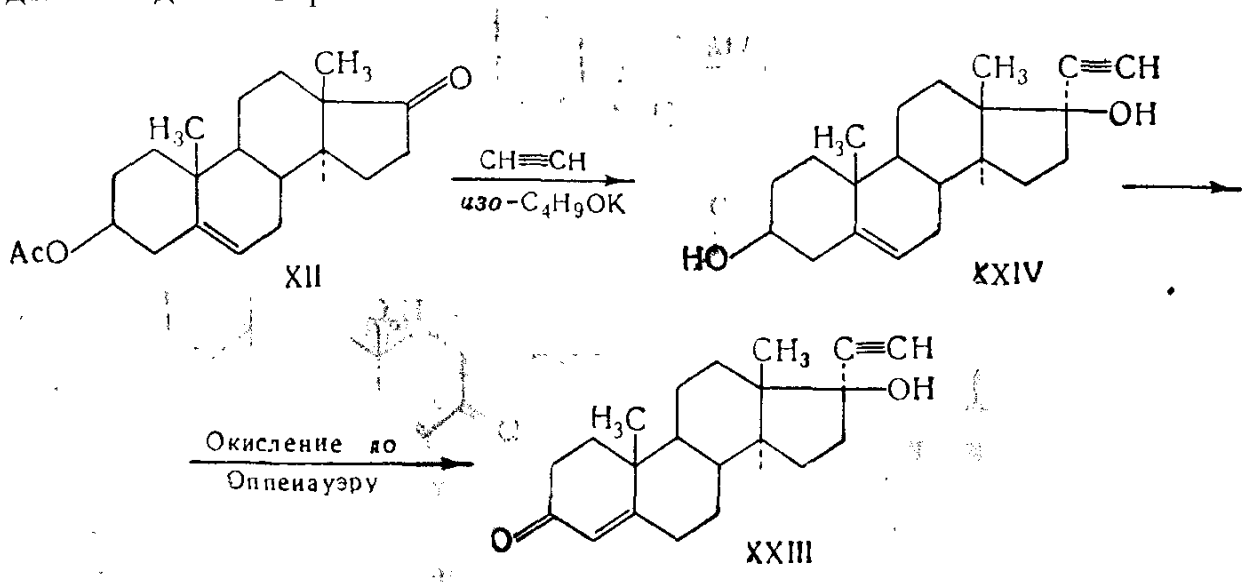


XXIII

Его активность составляет лишь $^1/_3$ активности прогестерона, но он имеет преимущество, заключающееся в том, что его можно принимать в таблетках, тогда как прогестерон действует исключительно при инъекции.

Производство прегнина аналогично производству 17-метилтестостерона, с теми особенностями, которые само собой разумеются, поскольку здесь вводится не метильная, а этинильная группа.

Ацетат дегидроэпиандростерона (XII) конденсируется с ацетиленом в присутствии раствора изобутилата калия при температуре около 5°. Выход достигает 91%. Изобутилат калия готовят кипячением смеси изобутилового спирта, толуола и едкого кали с отгонкой образующейся воды в виде азеотропа.



XII XXIV XXIII

При обработке реакционной смеси водой происходит гидролиз ацетоксигруппы и образовавшийся промежуточный диол (XXIV) окисляется по Оппенауэру, причем тройная связь абсолютно не затрагивается. Выход прегнина составляет 80%.

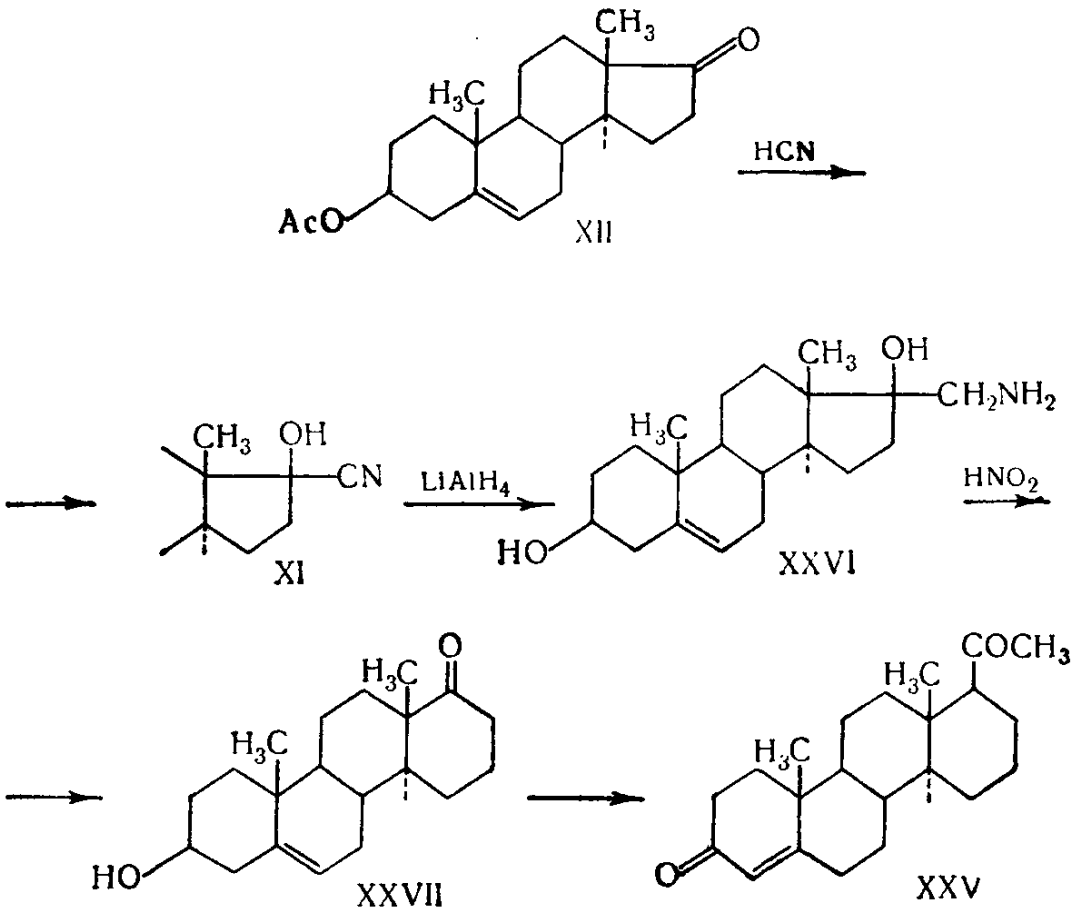
Первоначальные попытки трансформировать молекулу прогестерона, не уничтожая его активности, были малообещающими. При гидрировании двойной связи или замене кетонной группы гидроксильной активность полностью утрачивалась в отличие от андрогенных гормонов, которые при таком изменении молекулы сохраняют активность. Возникло мнение, что гестагенная активность прогестерона является чем-то особенным, специфическим для данного строения.

Наличие физиологической активности у прегнина заставило отказаться от этого мнения. Более того, оказалось, что можно значительно изменять строение молекулы, не лишая соединение гестагенной активности.

Так *D*-гомопрогестерон (XXV) обладает почти такой же активностью, как и прогестерон.

Синтез (XXV) представляет интерес как пример построения шестичленного кольца из пятичленного. Исходным соединением служит ацетат дегидроэпиандростерона (XII), из которого получают оксинитрил (XIII). Далее этот оксинитрил действием алюмогидрида лития восстанавливают до оксиамина (XXVI), который обрабатывают азотистой кислотой.

Как известно, первичные цикланметиламины при действии азотистой кислоты образуют карбинолы, но уже с расширением цикла (перегруппировка Демьянова). Если по соседству с аминогруппой имеется гидроксильная, то в результате получается уже не спирт, а кетон, в данном случае кетон (XXVII).

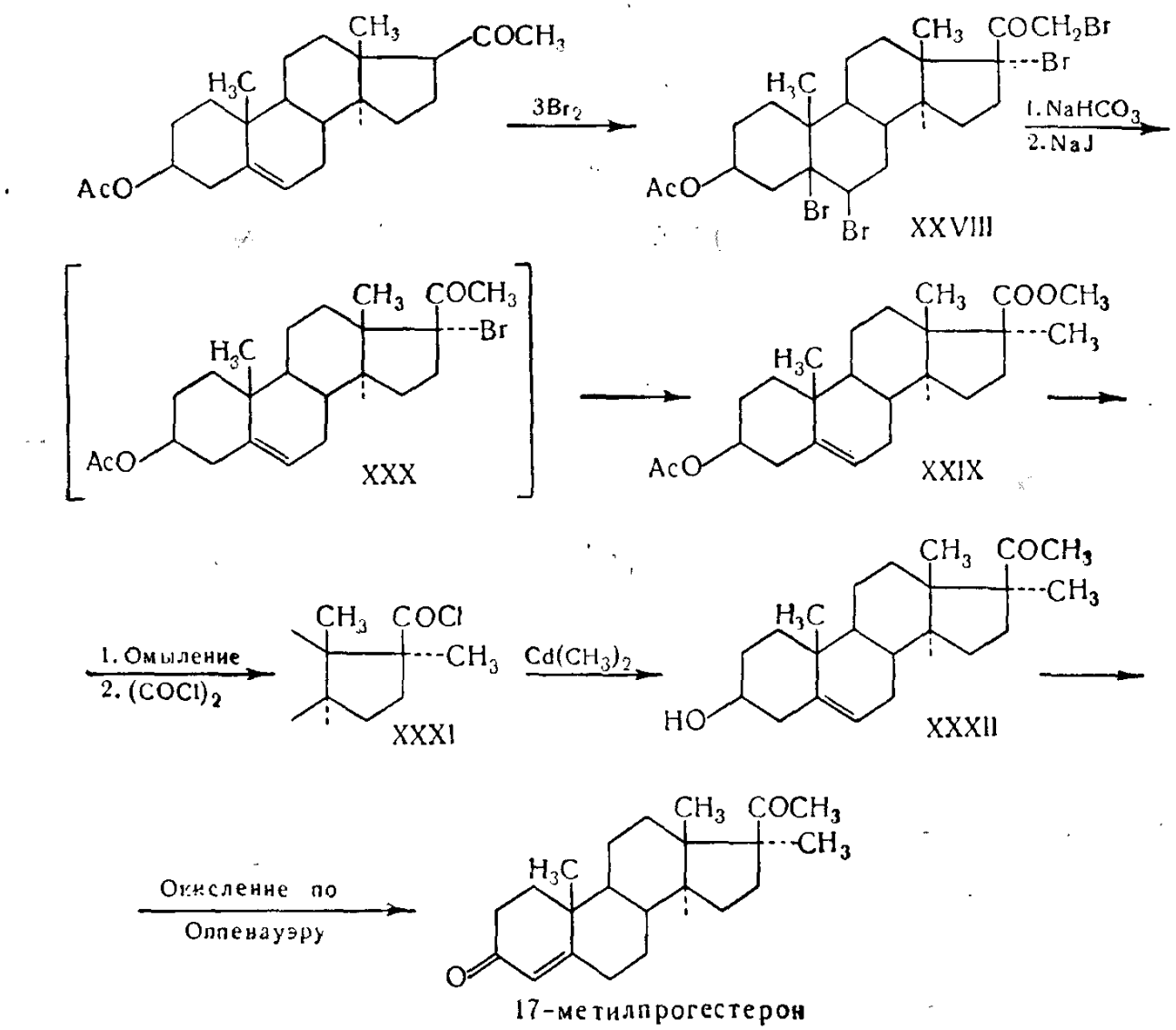


Кетон (XXVII) является *D*-гомологом дегидроэпиандростерона и, применяя к нему обычную цепь реакций (см. стр. 328), легко получить *D*-гомопрогестерон (XXV).

Другой аналог — 17-метилпрогестерон обладает активностью в три раза большей активности прогестерона. Его синтез представлял некоторые трудности. Исходным веществом служил ацетат прегненолона. При действии на него брома происходит присоединение по двойной связи, а равно и бромирование кетона в α-положении, в результате чего получается промежуточный тетрабромкетон (XXVIII).

Если последний обработать бикарбонатом натрия, а затем через несколько минут иодистым натрием, то происходит интересная перегруппировка с образованием эфира (XXIX). Реакция протекает, в сущности, под влиянием щелочного агента, ибо иодистый натрий служит только для отнятия брома.

Механизм этой перегруппировки не выяснен, но предполагается, что промежуточным соединением является монобромкетон (XXX), который, собственно, и перегруппировывается в соответствующую кислоту.



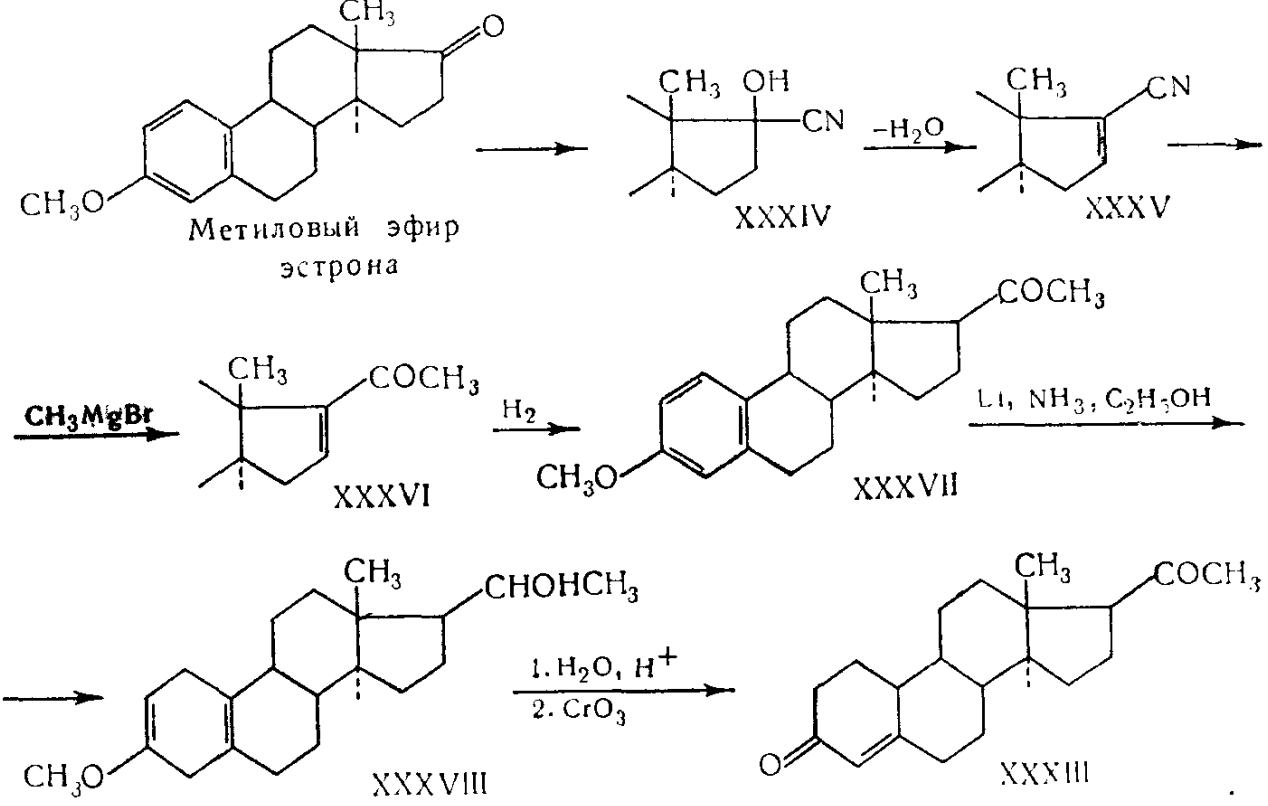
Данная перегруппировка представляет частичный случай перегруппировок бромкетонов, исследованных в свое время А. Е. Фаворским.

Исходя из эфира (XXIX) получить искомый 17-метилпрогестерон уже значительно легче. После омыления (и ацетилирования) действием хлористого оксалила получают хлорангидрид (XXXI), который вводят в реакцию с диметилкадмием. В результате с выходом 60% получается кетон (XXXII), окисляемый далее по Оппенауэру (ацетоксигруппа в процессе гриньяровского синтеза омыляется) в 17-метилпрогестерон. Практического значения синтез не приобрел, так как слишком дорог.

Таким образом было установлено, что замена пятичленного кольца *D* на шестичленное не меняет гормональных свойств прогестерона, а введение метильной группы в положение 17 даже усиливает его. Далее обнаружили, что удаление одной ангулярной метильной группы повышает активность и, например, 19-норпрогестерон (XXXIII) в 7—8 раз активнее прогестерона.

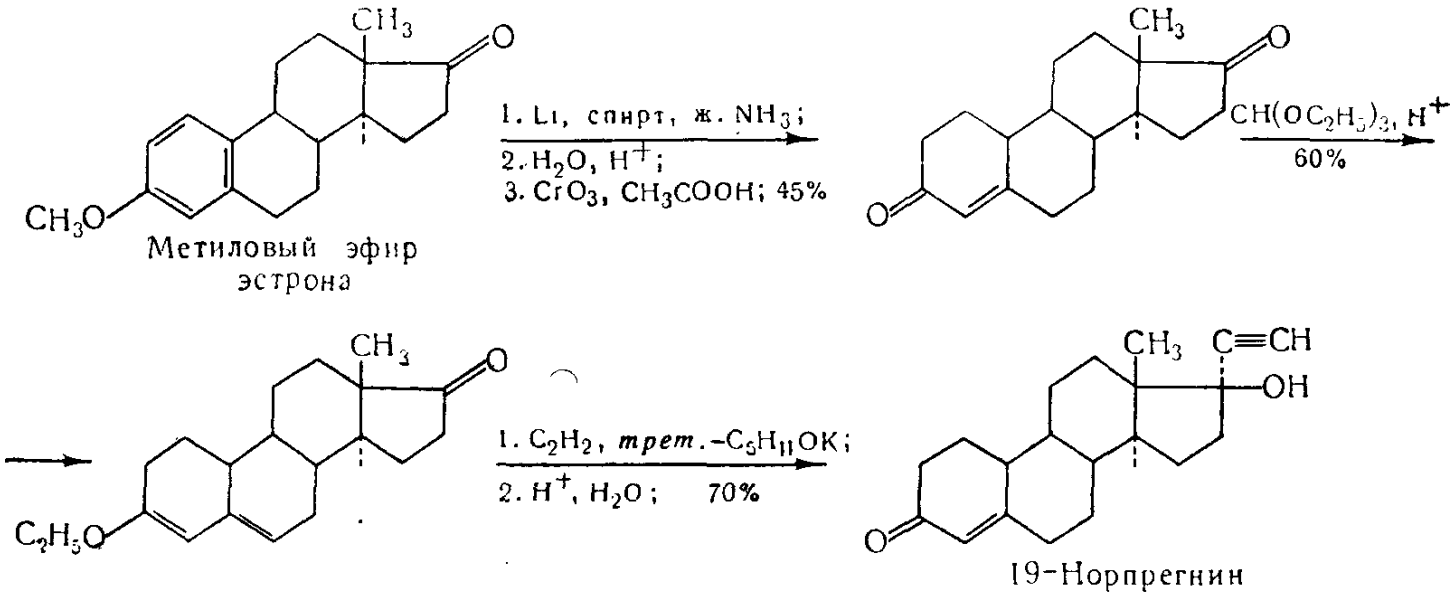
При синтезе 19-норпрогестерона исходят из метилового эфира эстрона. Боковую цепь можно построить точно по тому же способу, по какому получается прогестерон из дегидроэпиандростерона, то есть через оксинитрил (XXXIV), и продукт его дегидратации (XXXV), как показано на стр. 334.

Действием реактива Гриньяра на нитрил (XXXV) получают кетон (XXXVI), гидрированный в кетон (XXXVII). Все эти реакции протекают здесь также легко, как и на других примерах, и даже еще легче, поскольку тут нет двойной связи, за которую приходится опасаться в процессе гидрирования.



Далее осуществляется восстановление ароматического кольца щелочными металлами в жидком аммиаке. При этом восстанавливается, разумеется, и карбонильная группа. Гидролиз образовавшегося винилового эфира (XXXVIII) проходит весьма легко с образованием α,β-непредельного кетона, который при окислении хромовым ангидридом переходит в 19-норпрогестерон (XXXIII).

Исходя из эстрона, было получено другое интересное соединение — 19-норпрегнин (норлутин) по следующей схеме:



19-Норпрегнин в 3—4 раза активнее прегнина.

Во всех перечисленных аналогах прогестерона сохранялась пространственная конфигурация стероида, т. е. транс-сочленение колец *B—C* и *C—D*.

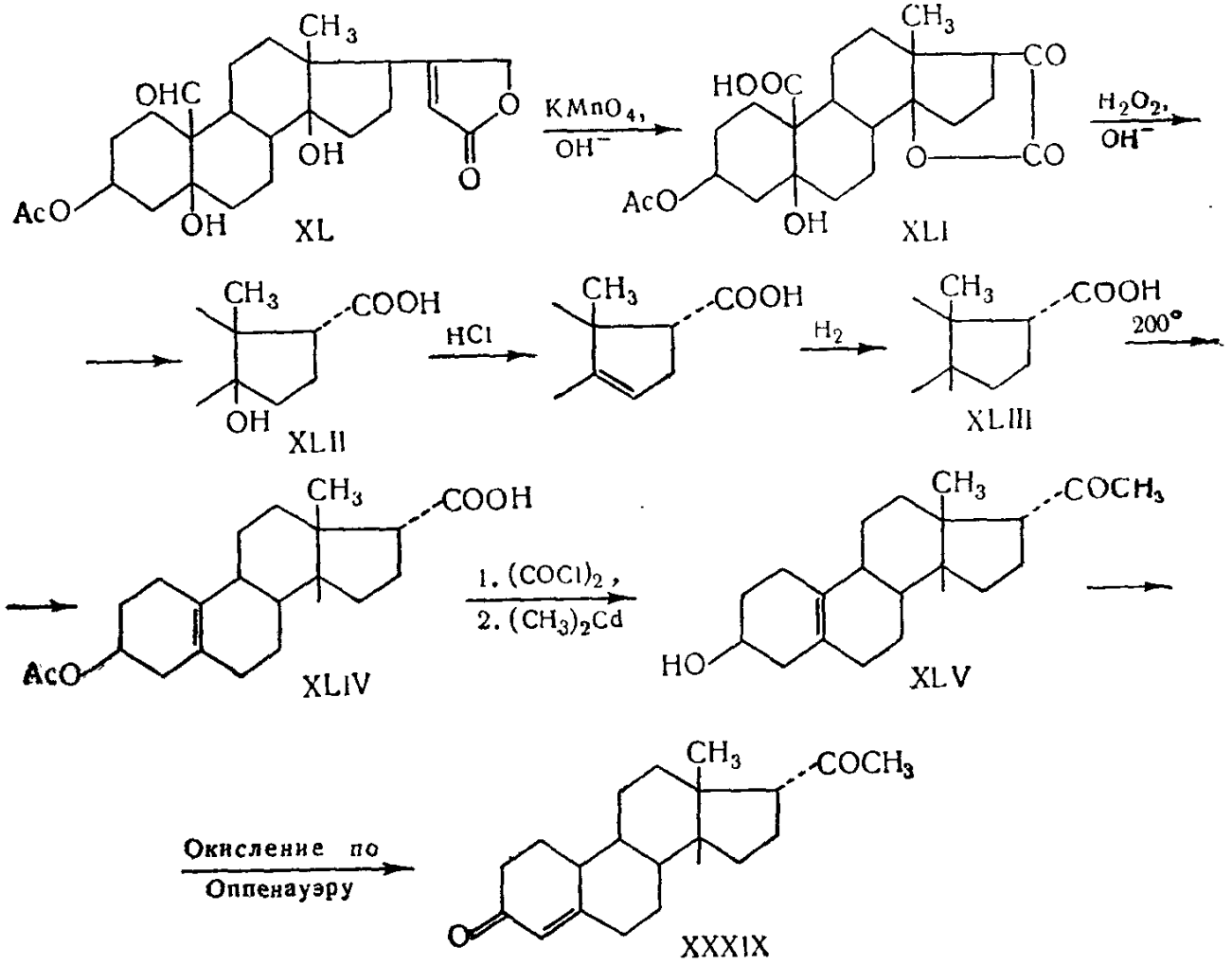
В 1957 г. Эренштейн в Америке получил соединение (XXXIX) подобное прогестерону, но с цис-сочленением колец *C* и *D* и показал, что оно весьма активно. Это заслуживает внимания и важно в том смысле, что обычно любое соединение с цис-сочленением колец *C* и *D* заранее объяснялось неактивным, не стоящим внимания и траты сил на иссле-

дование. Оказалось, что такое представление не отвечает действительности.

Прогестерон Эренштейна является изомером 19-норпрогестерона. Помимо цис-сочленения колец *C* и *D*, он имеет ту особенность, что боковая цепь в нем находится не в β-положении, как обычно, а в α-положении. Его активность в 8 раз выше активности прогестерона.

При его получении Эренштейн исходил из *CD*-цис-стероида, именно из строфантидина. Ацетат строфантидина (XL) окислялся перманганатом калия в щелочной среде. При этом альдегидная группа превращалась в карбоксильную, третичные гидроксильные группы, как инертные по отношению к окислителям, сохранялись, двойная связь расщеплялась и образовавшаяся кетокислота сразу замыкалась в лактон (XLI) с выходом примерно 40%. При обработке последнего перекисью водорода в присутствии щелочи боковая цепь окислялась далее до карбоксильной группы, причем под действием щелочи происходила инверсия у 17-го атома углерода и в результате получалась кислота (XLII).

Факт инверсии не вызвал удивления, поскольку уже раньше было известно, что соединения с транс-сочленением колец *C* и *D* имеют устойчивую β-конфигурацию боковой цепи, а в соединении с *CD*-цис-сочленением более устойчива α-конфигурация.

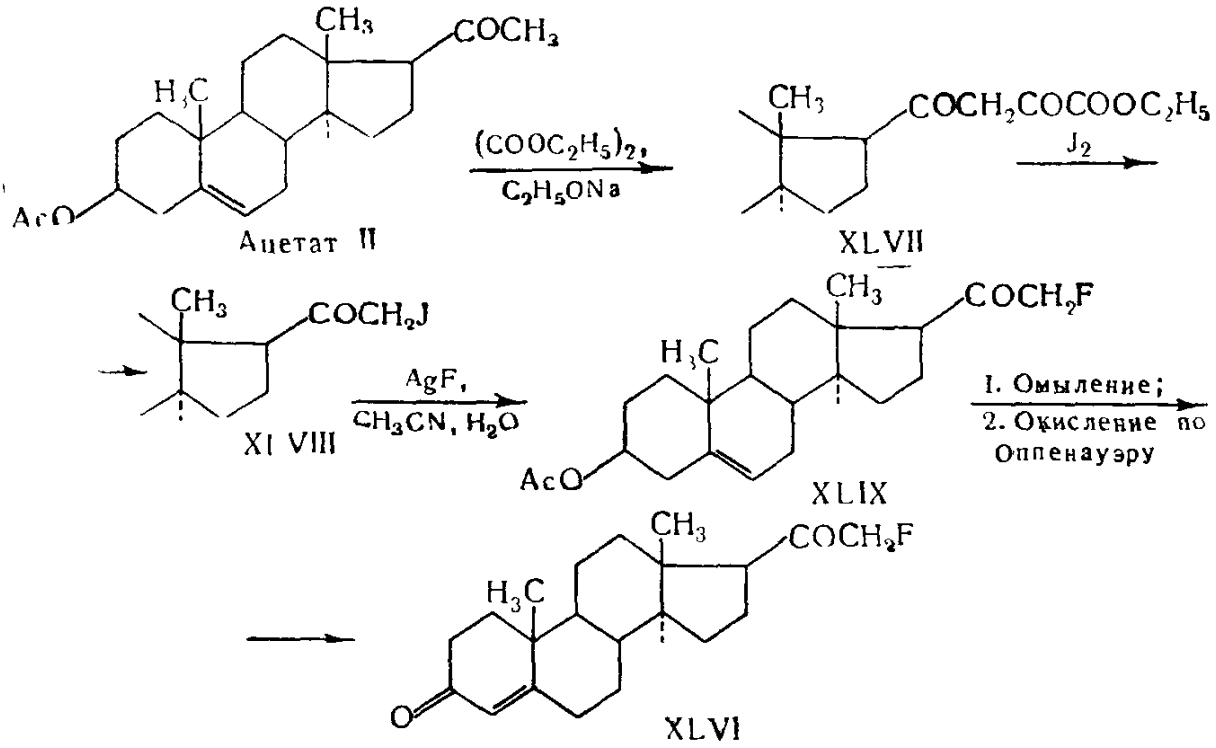


При действии хлористого водорода на (XLII) наступала дегидратация, а при последующем гидрировании получалось соединение (XLIII) опять с цис-сочленением колец *C* и *D*. Для того, чтобы перейти к аналогу прогестерона, надо было прежде всего удалить ангулярные OH- и COOH-группы, что было осуществлено нагреванием до 200°. Превращения полученной таким образом ацетоксикислоты (XLIV) напрашивались сами собой. Действием оксалилхлорида на последнюю получают хлорангидрид, который с диметилкадмием дает оксикетон (XLV). Сум-

марный выход по всем этим стадиям составляет примерно 25%. Дальше идет окисление по Оппенауэру в прогестерон Эренштейна (XXXIX).

Этим же ученым было сделано наблюдение, что введение в боковую цепь прогестерона атома фтора превышает активность в 2—4 раза.

Для получения 21-фторпрогестерона (XLVI) исходят из ацетата прегненолона, причем задача сводится к введению галоида в CH_3-группу боковой цепи, что не так просто ввиду наличия двойной связи и возможности галоидирования 20-кетостероидов в двух других местах — 17 и 21. Это затруднение было обойдено довольно оригинальным путем, который применим, пожалуй, только в химии таких дорогостоящих веществ, как стероиды, но не других соединений. При конденсации ацетата прегненолона с диэтилоксалатом в присутствии этилата натрия количественно образовывался эфир дикетокислоты (XLVII). Если последний обработать иодом (который присоединяется к двойной связи с трудом), то вся оксалильная цепочка элиминируется и образуется 21-иодкетон (XLVIII).

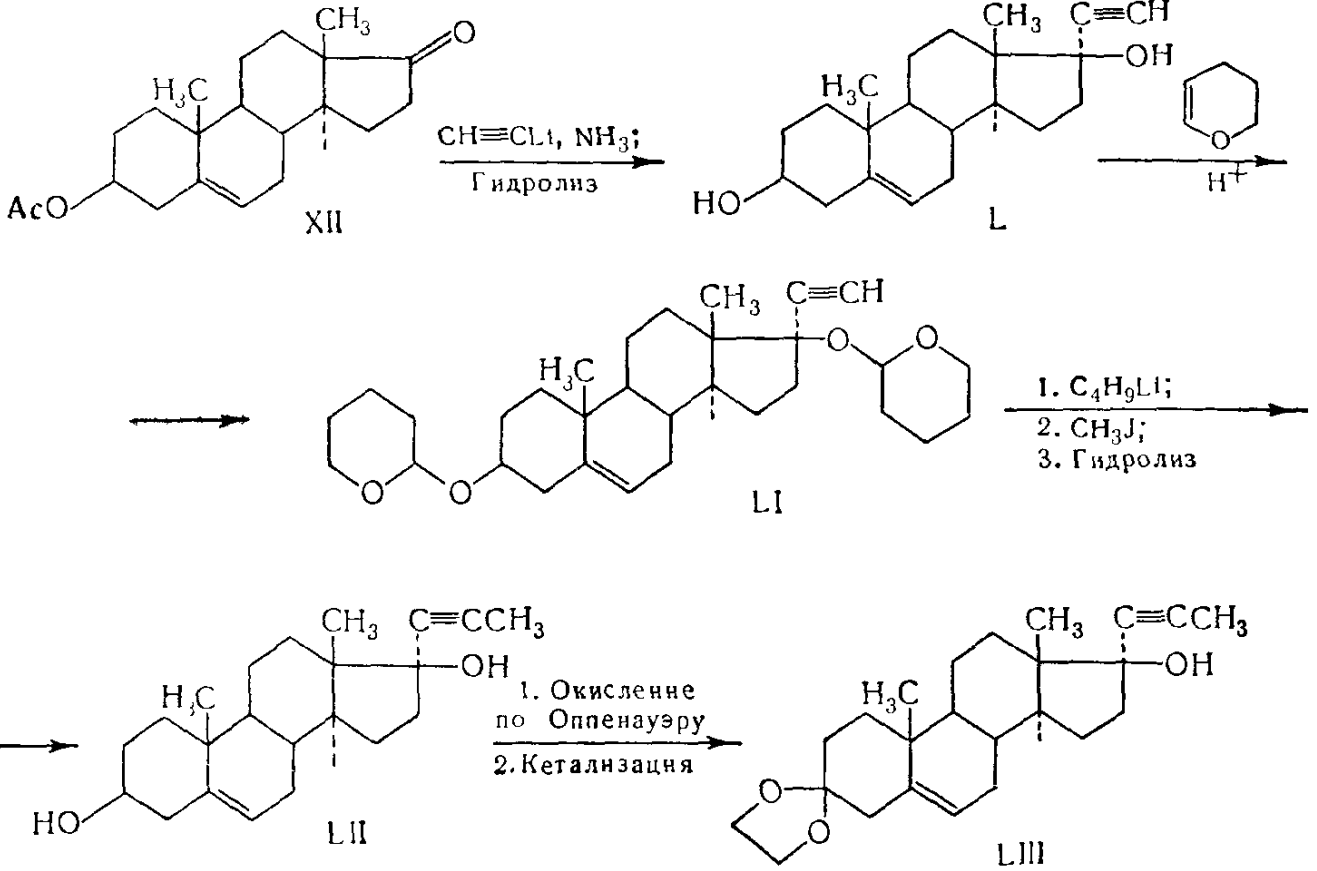


Обменной реакцией иодкетона (XLVIII) с фтористым серебром (лучше всего в смеси ацетонитрила и воды) получают ацетат 21-фторпрегненолона (XLIX), а из него обычным путем 21-фторпрогестерон (XLVI).

Интересная работа по синтезу аналогов прегнина была осуществлена В. Петровым (Англия). Оказалось, что если в молекулу прегнина ввести CH_3-группы в положения 6 и 21, то его активность возрастает в 12 раз.

Петров исходил из дегидроэпиандростерона (XII). Действием ацетиленида лития в жидком аммиаке на ацетат дегидроэпиандростерона он получил (после гидролиза) диол (L), в котором защитил обе гидроксильные группы с помощью дигидропирана. Дигидропиран является виниловым эфиром, а известно, что виниловые эфиры со спиртами дают кетали или ацетали, которые можно легко гидролизовать обратно в исходный спирт и альдегид (или кетон). Применение более простых винилэтиловых эфиров неудобно, потому что они легко полимеризуются.

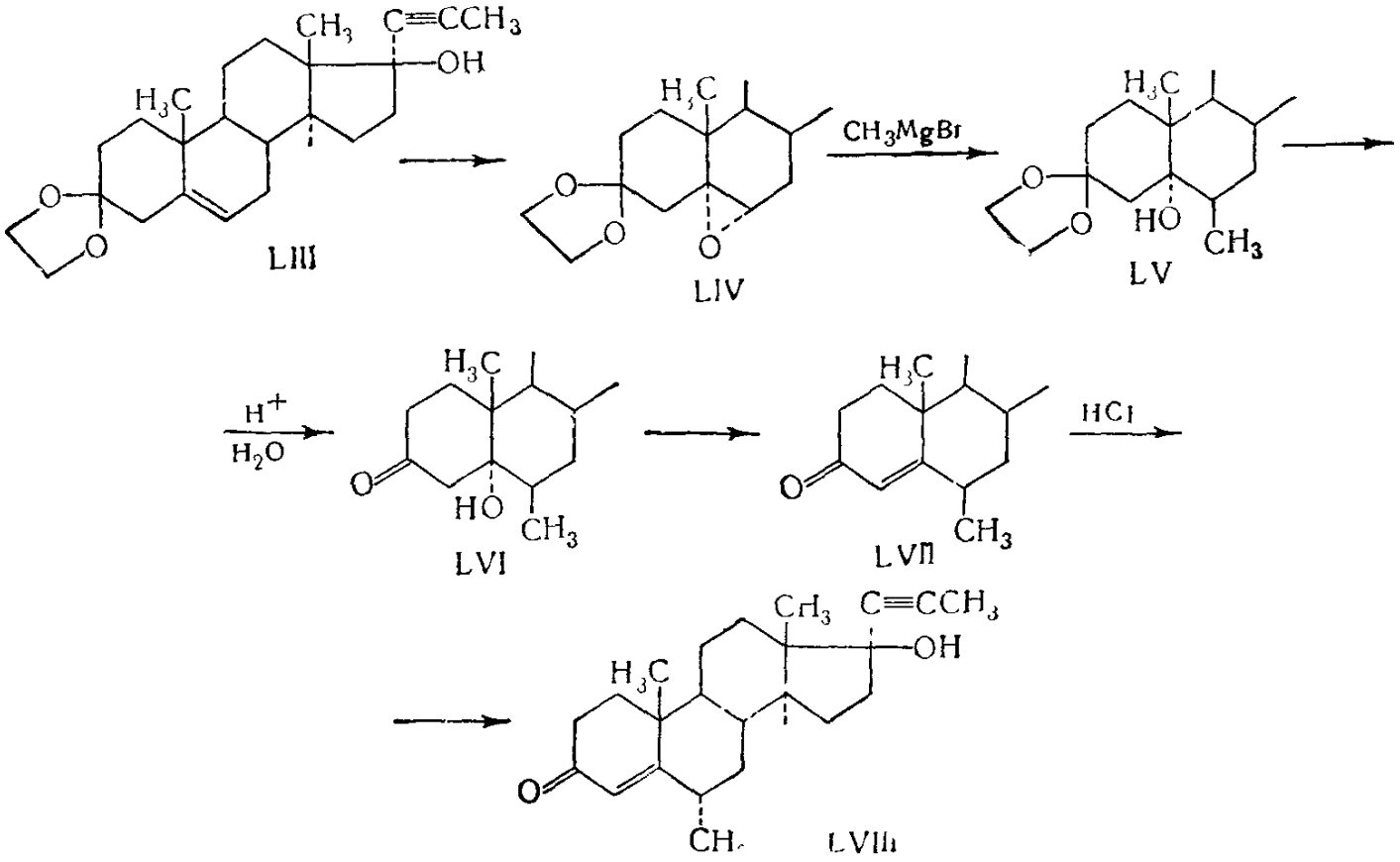
Полученный таким образом дипиранилдиол (LI) обрабатывался последовательно бутиллитием, а затем иодистым метилом, что привело (после гидролиза) к пропинилдиолу (LII). Окислением диола (LII) по



XII L LI LII LIII

Оппенауэру был получен соотв. кетон, а из него этиленкеталь (LIII). При действии надфталевой кислоты на кеталь (LIII) получается соответствующая окись (LIV), которая реагирует с магнийметилбромидом с разрывом окисного кольца и образованием гликоля (LV).

Гликоль (LV) далее подвергается обычной цепи превращений, описанных ранее. Так кислым гидролизом он превращается к кетодиол (LVI), который под действием едкого натра в пиридине дегидратируется в кетон (LVII).



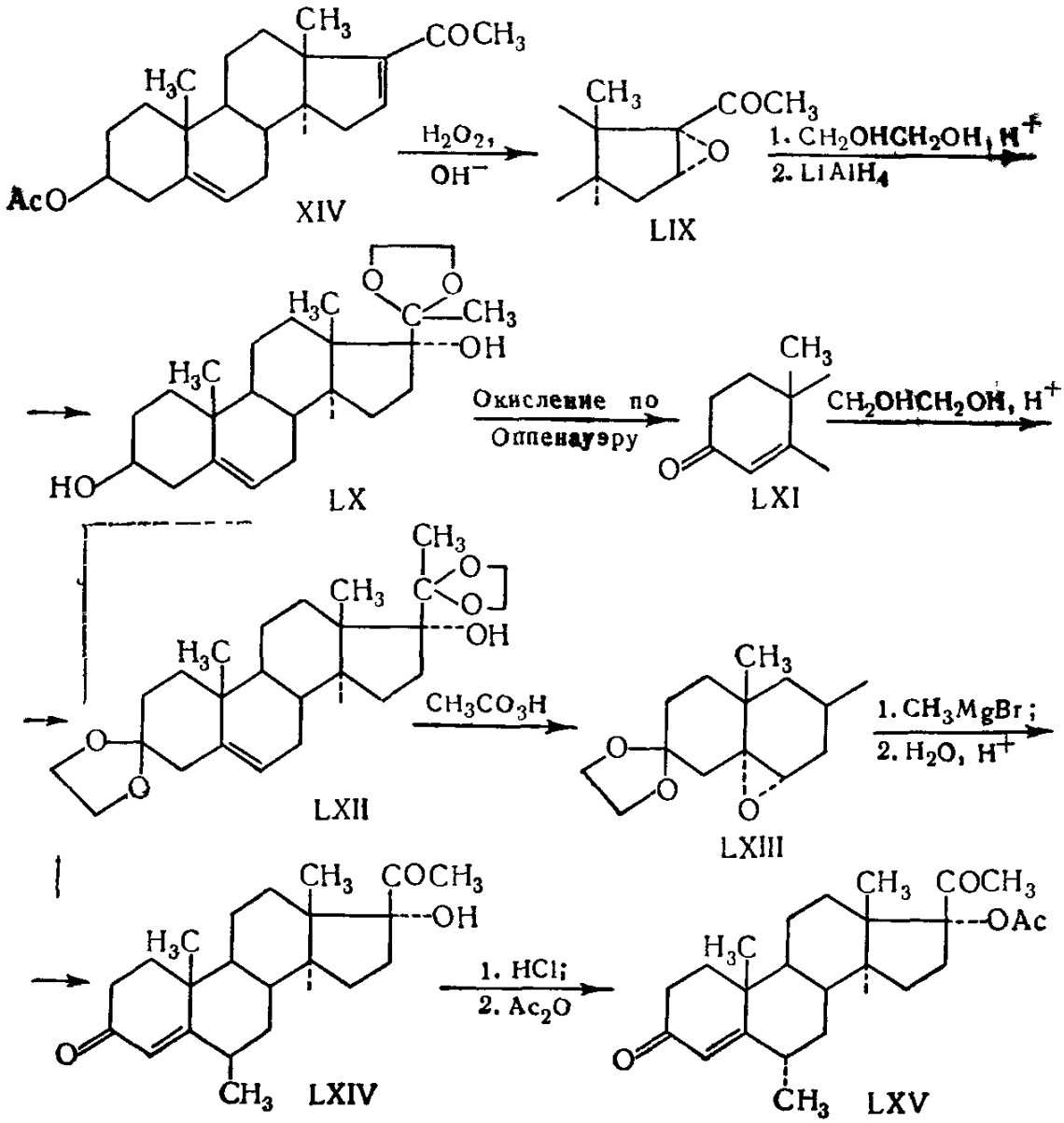
LIII LIV LV LVI LVII LVIII

Последней операцией является действие хлористого водорода, эпимеризующего кетон (LVII) в искомое 6α-соединение (LVIII), которое, как упоминалось, в 12 раз активнее прегнина. Интересно, что эпимерный кетон (LVII) такой активностью не обладает

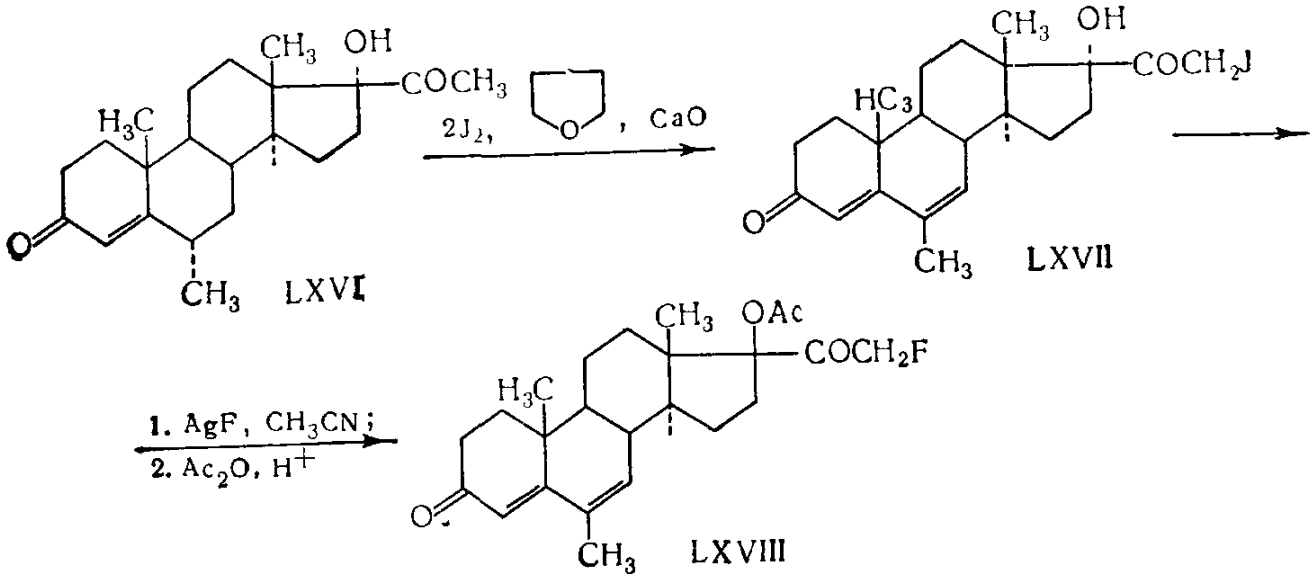
В 1958—1959 гг. был опубликован ряд синтезов аналогов 17-оксипрогестерона еще более повышенного действия.

Группа американских химиков во главе с Хоггом, получила ацетат 6α-метил-17α-оксипрогестерона, который оказался в 50—60 раз активнее прогрестерона и в 100—300 раз активнее прегнина при оральном введении. Исходным соединением для этого препарата служил дегидропрегненолон (XIV), получаемый деградацией соласодина При действии перекиси водорода на дегидропрегненолон в щелочной среде образуется α-окись (LIX). Далее 3-кетогруппу в этом соединении защищают обычным способом действием этиленгликоля и соответствующий кеталь восстанавливают алюмогидридом лития. При этом окисная связь разрывается и образуется 17-оксисоединение (LX). Дальше окислением по Оппенауэру получается непредельный кетон (LXI), причем вся группировка в 17-м положении остается незатронутой.

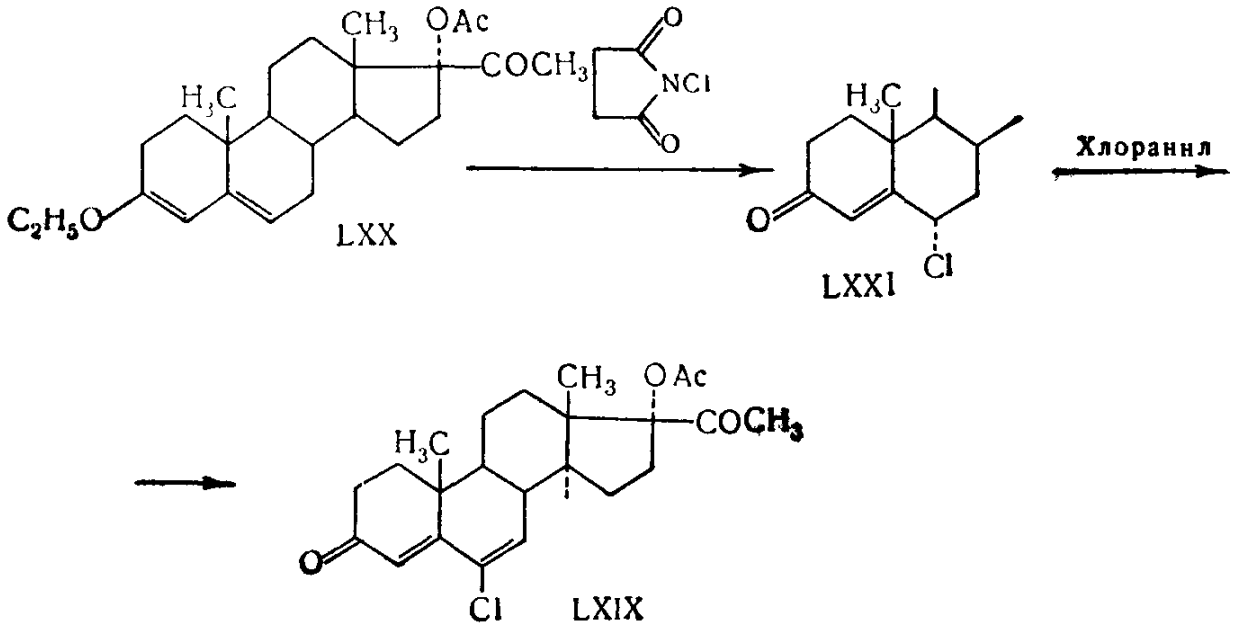
Введение 6-метильной группы было проведено точно таким же образом, как описано у В. Петрова: кетализация этиленгликолем с передвижением двойной связи в соединение (LXII), окисление надуксусной кислотой, действие магнийметилбромида на образовавшуюся окись (LXIII), гидролиз, дегидратация в дикетон (LXIV), изомеризация и ацетилирование.



Если в полученное соединение (LXV) ввести атом фтора в положение 21 и двойную связь в положение 6, то его активность увеличивается еще в три раза (Додсон). Для этого 6α-метил-17α-оксипрогестерон (LXVI) иодируют в присутствии окиси кальция в тетрагидрофуране. В этих условиях одновременно проходит галоидирование и отщепление иодистого водорода, а полученное 21-иодпроизводное (LXVII) при взаимодействии с фтористым серебром в ацетонитриле превращается в 21-фторпроизводное, которое при ацетилировании дает ацетат 21-фтор-6-метил $\Delta^{4\ 6}$-прегнадиенол-17α-диона-3,20 (LXVIII).



Другая группа химиков во главе с Рингольдом (США) синтезировала ацетат 6-хлор-6-дегидро-17α-оксипрогестерона (LXIX), гестагенное действие которого оказалось в 50 раз сильнее (по тесту Клауберга в 8 раз) действия 19-норпрегнина (норлутина). Для этого енольный эфир ацетата 17α-оксипрогестерона (LXX) обрабатывали N-хлорсукцинимидом, а образовавшийся ацетат 6α-хлор-17α-оксипрогестерона (LXXI) дегидрировали нагреванием с хлоранилом.



Гестагенные препараты применяются прежде всего при расстройствах нормального течения беременности, для предупреждения выкидыша, при болезнях матки и при маточных кровотечениях. Они рекомендуются также для рассасывания опухолей, которые могут быть вызваны неумеренным употреблением эстрогенов.

Следует заметить, что прогестерон, кроме гестагенной активности, обладает еще небольшой кортикоидной активностью. В частности, он сохраняет жизнь животным, у которых были удалены надпочечники.

В последнее время установлено, что ряд гестагенов повышенной активности, например, прегнин, 19-норпрегнин (норлутин) и $\Delta^{5,10}$-изомер последнего (эновид) с успехом можно применять как противозачаточные средства, так как они действуют (в больших дозах) на овуляцию.

ЛИТЕРАТУРА

И. Н. Назаров, Л. Д. Бергельсон. Химия стероидных гормонов. М., Изд-во АН СССР, 1955, стр. 200—262.

Л. Физер, М. Физер Химия природных соединений фенантренового ряда. М, Изд-во АН СССР, 1953, стр. 364—376.

J C. Babcock, E. S. Gutsell, M. E. Herr, J. A. Hogg, J. C. Stucki, L. E. Barnes, W. E. Dulin J Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 2904. Chemical and Engineering News, 1959, 28, N 12, 30.

A. David, F. Harstley, D. R Millson, V. Petrow. Pharmacy and Farmacology, 1957, 9, 929.

J Döry, G. Szabo Acta chim. Acad scient. hung, 1959, 19, 243.

H J. Rindgold, E. Batres, A. Bowers, J Edwards, J. Zderic. J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 3485.

P. B. Sollman, R. L. Elton, R M. Dodson. J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 4435.

Глава 7

КОРТИКОИДНЫЕ ГОРМОНЫ, КОРТИКОСТЕРОН, ДЕЗОКСИКОРТИКОСТЕРОН И ЕГО АНАЛОГИ

Значение функций коры надпочечников было известно уже во второй половине прошлого столетия. Удаление их, например у собак, вызывает смерть на седьмой — восьмой день, у кошек — на десятый — одиннадцатый день, птицы погибают через несколько часов. Животное с удаленными надпочечниками становится вялым и слабым; температура тела понижается, животное становится нечувствительным к болевым ощущениям и в конечном итоге погибает от расстройства обмена. При введении экстракта надпочечников все симптомы снимаются.

Дополнительные и очень важные данные о природе гормонального действия надпочечников дало изучение аддисоновой болезни, которая наступает при туберкулезе надпочечников, т. е когда действие надпочечников ослабевает или прекращается. Болезнь с внешней стороны характеризуется желтым цветом кожи, переходящим даже в коричневый; человек худеет, мышцы становятся вялыми и потом атрофируются; наблюдается ослабление сердечной деятельности, кишечные расстройства. До того, как нашли действенные методы лечения, смерть наступала через шесть месяцев, самое большое через два года. Постепенно установили, что если давать больному раствор соли и вводить в кровь экстракты надпочечников, то можно продлить жизнь в разных случаях на разные сроки.

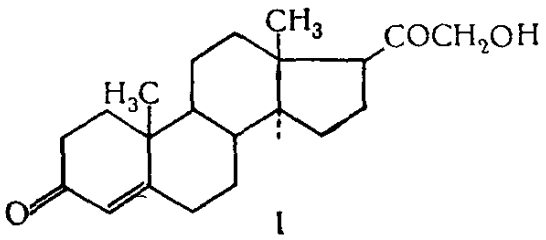
Все это привело к выводу, что в гормонах надпочечеников существует два ряда веществ, одни из которых действуют на солевой обмен, т. е. удерживают соли натрия, необходимые организму, и выводят соли калия, вредные для организма, а другие регулируют углеводный и белковый обмен.

Действительно, когда эти гормональные вещества были выделены в чистом виде, то оказалось, что одни из них действуют преимущественно на солевой обмен, другие на обмен углеводов. Правда, есть и промежуточные соединения, которые действуют и тем и другим образом.

Вещества, влияющие на солевой обмен, были названы минералокортикостероидами, вещества, действующие на углеводный обмен,— глюкокортикостероидами.

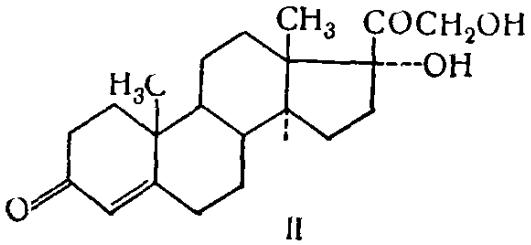
До сих пор из коры надпочечников выделено до 30 веществ, но только немногие из них обладают гормональной активностью. Ниже перечислены эти соединения.

Дезоксикортикостерон (I) или Δ^4-прегненол-21-дион-3,20



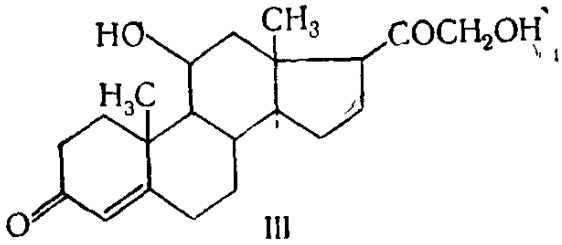
I

Δ^4-Прегнендиол-17α, 21-дион-3,20 или так называемое вещество *S* Рейхштейна (II), имеющее по сравнению с дезоксикортикостероном лишнюю 17-оксигруппу



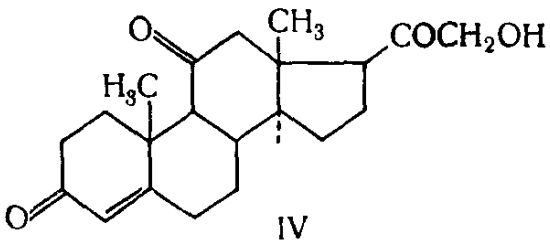
II

Кортикостерон (III) или Δ^4-прегнендиол-11β, 21 **дион-3,20.**



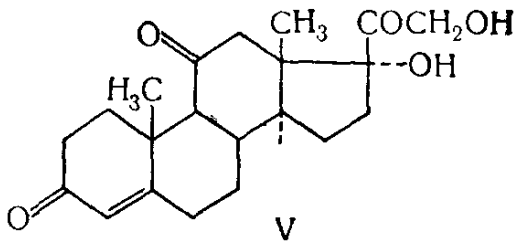
III

11-Дегидрокортикостерон (IV)



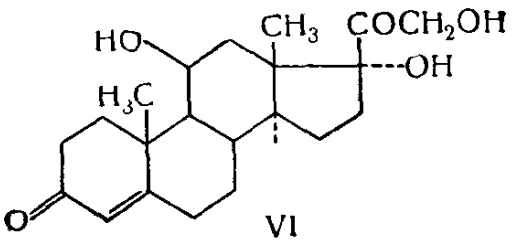
IV

Кортизон



V

Гидрокортизон

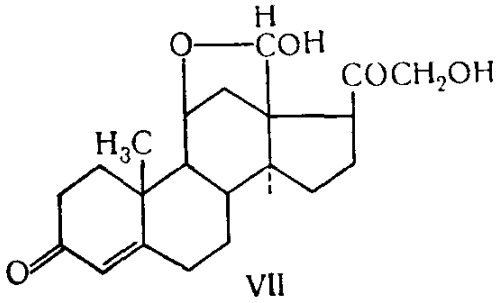


VI

Кортизон (V), отличается от 11-дегидрокортикостерона только наличием гидроксильной группы в положении 17, его гидрированное производное — гидрокортизон (VI) имеет 11β-оксигруппу.

Первые три вещества являются типичными минералокортикостероидами. Из них самым активным является дезоксикортикостерон Два последних являются типичными глюкокортикостероидами. Что касается 11-дегидрокортикостерона и отчасти кортикостерона, то они по своему действию находятся где-то посредине: они являются слабыми глюкокортикостероидами и минералокортикостероидами

Несколько отлично от всех этих соединений стоит альдостерон (VII), у которого имеется полукетальная группировка за счет внутримолекулярного взаимодействия 11β-оксигруппы и альдегидной группы в положении 18, откуда он и получил название альдостерон. Он представляет собой мощнейший минералокортикостероид (в 100 раз сильнее дезоксикортикостерона), но является и глюкокортикостероидом (его действие составляет $^1/_3$ действия кортизона). Поставить его в этот ряд, следовательно, несколько затруднительно.



VII

Следует сказать несколько слов относительно методов испытания этих соединений на активность

Эти методы довольно сложны, во всяком случае сложнее, чем методы аналогичных испытаний андрогенных и гестогенных гормонов. Большинство этих опытов проводится с животными, у которых предварительно удаляют надпочечники.

1. Самый простой метод — это проба (или тест) на выживаемость. У мышей удаляют надпочечники и, примерно, через пять дней после операции начинают вводить вещество, активность которого желают узнать. Мышиной единицей считается то наименьшее количество вещества, при котором 80% мышей остается живыми. Разумеется, обязательно должна быть и контрольная группа мышей.

Есть еще вариант этой пробы на выживаемость и рост, так называемая проба Гролльмана. Она основана на том, что молодые животные, у которых удалены надпочечники, начинают непрерывно терять в весе Однако, если сразу же после операции этим животным вводить активное вещество, то они не только остаются живыми, но и прибавляют в весе.

2. Проба на мышечную усталость. Эту пробу проводят с крысами, с задней лапки которых снимают миограмму. Если подобрать соответствующий ритм раздражения, мышца нормальной здоровой крысы может работать часами Однако если у этой крысы удалить надпочечники, то обычно после трех-четырех раздражений миограмма явно изменяется Уменьшается амплитуда, мышца все слабее и слабее реагирует на включение тока и, наконец, совершенно перестает отвечать на раздражение Если крысе при этом вводить активное вещество, то мышца будет отвечать на раздражение гораздо дольше

3 Проба на плавающих крысах. Обычно, если крысу пустить в воду с грузом 2 *г*, привязанным к хвосту, то она плавает 30—60 минут. Если

удалить ей надпочечники, она плавает лишь 3—4 минуты. При введении активного вещества крыса, лишенная надпочечников, продержится на воде около 10 минут (при минимальной дозе).

4. Проба на отложение гликогена в печени мышей. Если у мышей удалить надпочечники, то отложение гликогена в печени прекращается. Поэтому пробу производят таким образом. Перед опытом мышей заставляют голодать, чтобы содержание гликогена было минимальным, удаляют надпочечники и затем дают активное вещество и, кроме того, вводят глюкозу. Через некоторое время мышей забивают, взвешивают печень и определяют, сколько прибыло гликогена. Возрастание количества гликогена говорит об активности вещества.

5. Проба на выделение натрия. При этом у животных можно не удалять надпочечников, так как показателем активности вещества служит резкое снижение выделения натрия при инъекции испытуемого соединения. Если давать животным радиоактивный натрий, то определение вообще очень упрощается. К сожалению, эта проба пригодна только для определения активности минералокортикостероидов. Что же касается глюкокортикостероидов, то для определения их активности больше всего подходит проба на отложение гликогена, а иногда и проба на мышечную усталость. Все эти пробы отличаются различной чувствительностью. Проба на выделение натрия позволяет обнаружить 10 γ ацетата кортикостерона, а проба на выживаемость обнаруживает примерно 300 γ дезоксикортикостерона.

Кроме этих тестов описано много других. Дело в том, что по одной пробе вещество может быть активным, а по другой — неактивным, поэтому соединение иногда приходится подвергать самым различным тестам и лишь на основании суммы данных определять его активность.

Обычно в литературе встречаются пробы на выживаемость, на отложение гликогена и проба на мышечную усталость, хотя они и не совсем точны.

Как легко видеть, сам ход исследования кортикостероидов значительно более сложен, чем ход исследования андрогенных и эстрогенных гормонов. Поэтому они начали изучаться значительно позже, примерно с 1935 г., а установление их строения в деталях было закончено только к 1947 г.

Исходным материалом для выделения кортикостероидов служили надпочечники крупного рогатого скота. Схема обработки была следующей. Надпочечники экстрагировались 80%-ным ацетоном, который извлекал, конечно, не только гормоны, но и жировые вещества и недеятельные стерины.

Поэтому этот экстракт после упаривания обрабатывался петролейным эфиром, и органический слой отбрасывался. Дальше водно-ацетоновый экстракт экстрагировался дихлорэтаном и водный слой также отбрасывался.

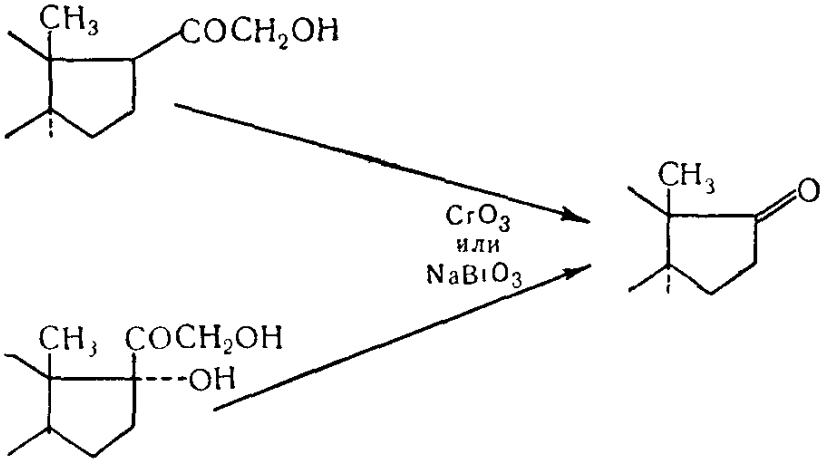
После упаривания дихлорэтановый экстракт экстрагировался смесью 30%-ного водного метанола и петролейного эфира. Водно-метанольный слой после упаривания экстрагировался этилацетатом (см. стр. 345).

Этилацетатный экстракт содержал основное количество гормонов. Таким образом, из 450 *кг* надпочечников было выделено 9 *г* смеси кортикостероидов (Казинг). Для такого количества потребовались надпочечники 10 тысяч голов скота. Выделенные 9 *г* вещества необходимо было разделить на индивидуальные вещества, что было достигнуто комбинацией кристаллизации и хроматографирования как самих кортикостероидов, так и их ацетильных производных. Исследователи вынуждены были ограничиться 20—30 *мг* вещества. Тем не менее, удалось



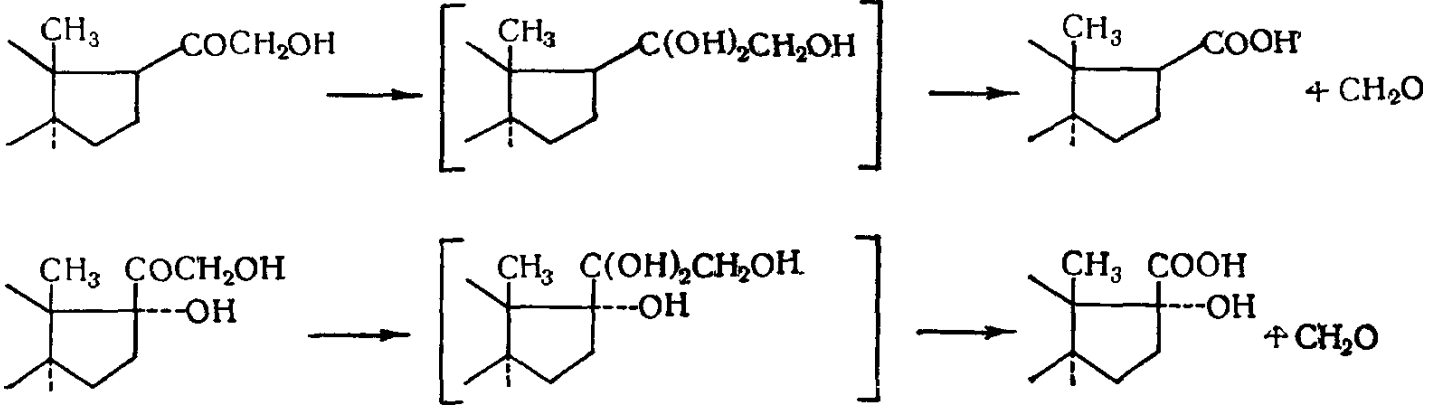
определить строение веществ и даже показать их взаимные превращения. Естественно, что непредельную кетогруппировку в этих кортикостероидах сразу обнаружили спектрально. Гораздо труднее было определить строение боковой цепи и установить наличие кислородной функции в положении 11.

Для этого применялись различные методы окисления. Так, действием хромового ангидрида или висмутата натрия на кортикостероиды можно превратить последние в 17-кетостероиды.



Весьма полезной оказалась обработка иодной кислотой. Иодная кислота является специфическим реактивом для расщепления гликолей, причем образуются карбонильные производные. Если гликоль вторичный, то получаются альдегиды, если вторично-третичный, то образуются альдегид и кетон.

При действии HJO_4 на оксикетоны происходит аналогичное расщепление, которое особенно наглядно, если представить себе кетонную группу в гидратной форме В этом случае расщепление идет преимущественно между карбонильной и оксиметильной группами и в результате получается кислота (в случае диоксикетона — оксикислота).

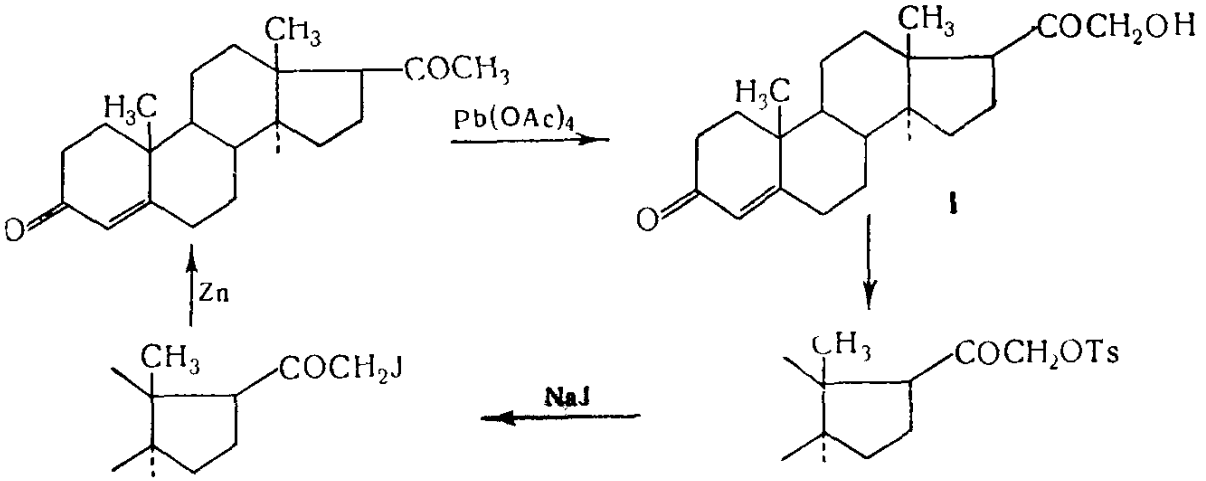


Отметим еще одно важное обстоятельство: и в том и в другом случае выделяется молекула легко идентифицируемого формальдегида.

Эти общие замечания относительно того, как можно определить строение кортикостероида и прежде всего его боковой цепи. Разберем конкретно каждый отдельный случай.

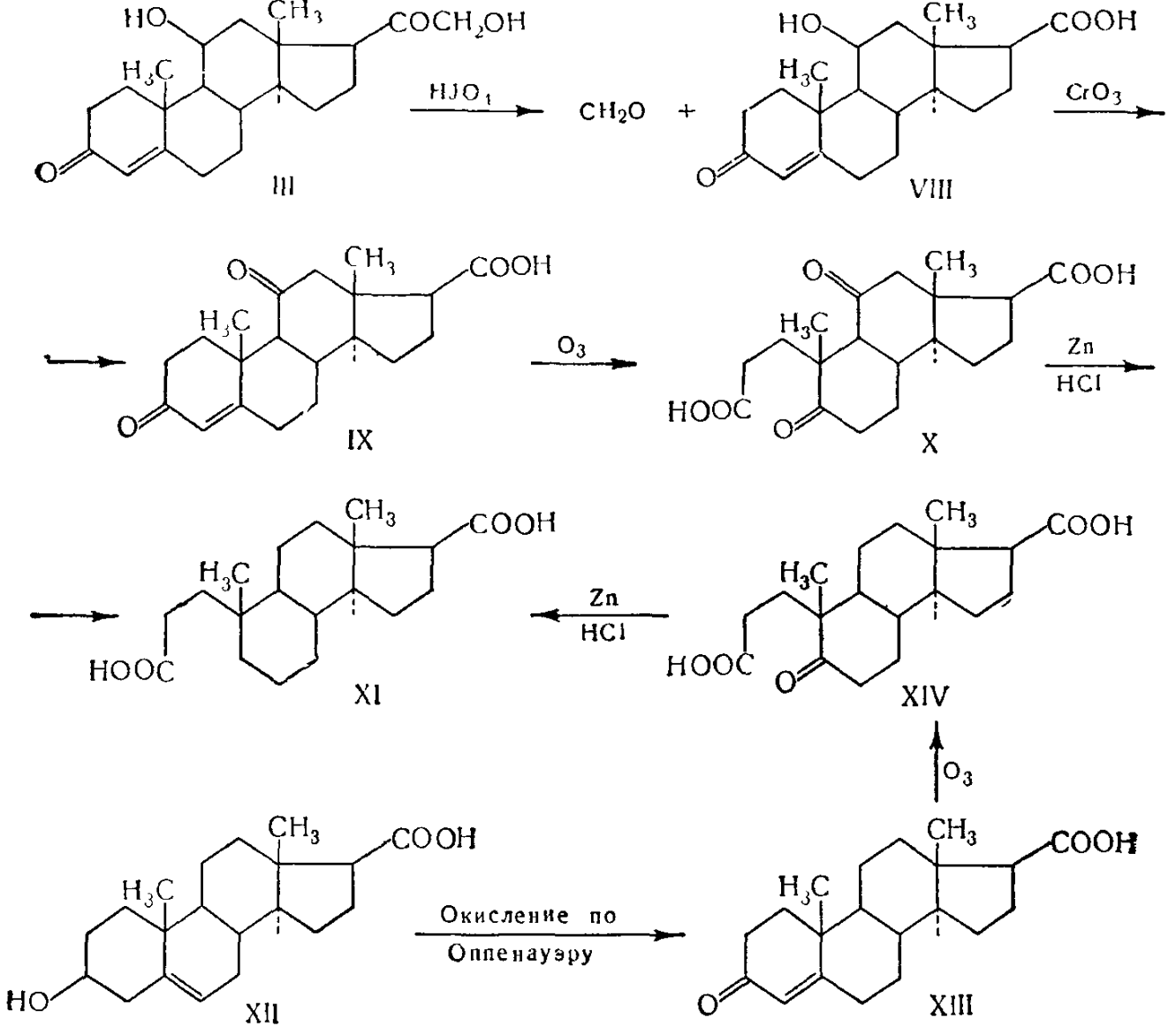
Строение дезоксикортикостерона было доказано синтетически. Он был получен из прогестерона, очень простым путем, именно действием тетраацетата свинца, который интересен тем, что действует на группировку, находящуюся непосредственно рядом с кетогруппой.

Имелось и другое доказательство обратного характера: действием *n*-толуолсульфохлорида был получен паратолуолсульфонат (иначе тозилат) дезоксикортикостерона. При действии на него иодистого натрия получилось иодистое производное, а при дальнейшем действии цинком образовался прогестерон.



Таким образом, строение дезоксикортикостерона было доказано очень легко. Труднее обстояло дело с кортикостероном и кортизоном, т. е. с теми кортикостероидами, у которых кислородная функция находится в положении 11.

Окислением кортикостерона иодной кислотой была получена одна молекула формальдегида и карбоновой кислоты (VIII). Это говорит о том, что в боковой цепи кортикостерона имеется оксиацетоновая группа. Дальнейшее окисление (хромовым ангидридом) привело к непредельной дикетокарбоновой кислоте (IX), а озонирование последней к дикетодикарбоновой кислоте (X). Восстановлением кислоты (X) по Клемменсену была получена кислота (XI), оказавшаяся идентичной с уже известной кислотой, полученной ранее из холестерина через Δ^5-3β-оксиэтиеновую кислоту (XII), кетокислоту (XIII) и двуосновную кислоту (XIV).



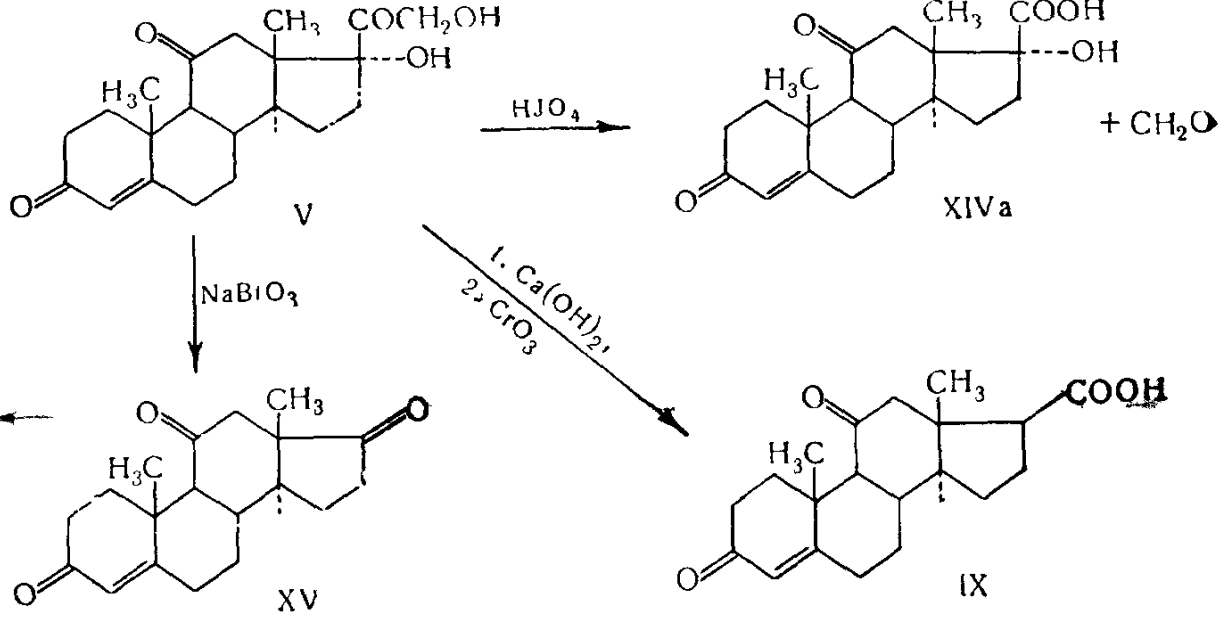
Таким путем было доказано, что в кортикостероне мы имеем боковую цепь в положении 17 и кетогруппу в положении 3, и что боковая цепь представляет из себя оксиацетоновую цепь.

При исследовании кортизона было установлено следующее: если на него действовать иодной кислотой, то получается оксикислота (XIVa) и формальдегид. Это совершенно явно говорило за то, что боковая цепь должна быть не оксиацетоновая, а диоксиацетоновая. Если кортизон обработать щелочью, то боковая цепь изменяется, перегруппировывается и образуется ряд соединений. При действии на продукт щелочной обработки хромовым ангидридом была выделена та же самая кислота (IX), которая получилась в результате распада кортикостерона.

Следовательно, строение кортикостерона и кортизона в принципе одинаково и вся разница заключается в том, что в кортикостероне имеется оксиацетоновая, а в кортизоне диоксиацетоновая боковая цепь; в кортикостероне — гидроксильная группа, а в кортизоне на ее месте (на каком пока неизвестно) кетонная группа (см. стр. 348).

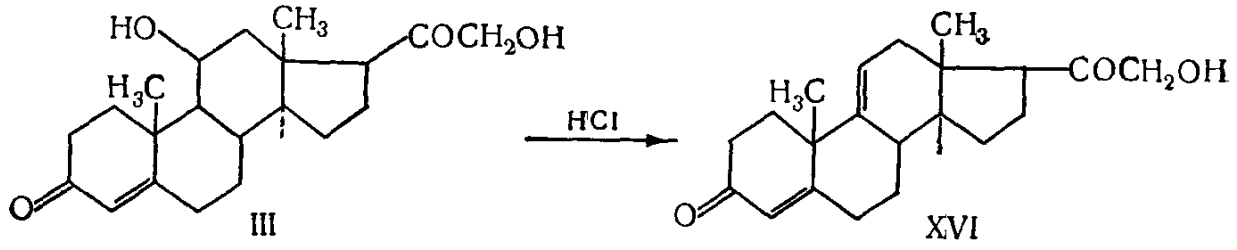
Действием висмутата натрия из кортизона был получен так называемый адреностерон (XV). Интересно, что кортизон и адреностерон, содержащие по три кетогруппы, дают лишь дисемикарбазоны. Вначале думали, что третий кислород входит в третичную гидроксильную группы, но от этого быстро отказались, потому что кортизон получается при окислении кортизола, а последний тоже дает дисемикарбазон.

Возник вопрос о положении этой кетогруппы. Он был решен следующим образом. Если предположить, что кетогруппа находится в положении 1, то кортизон и адреностерон должны были бы обладать свойства-

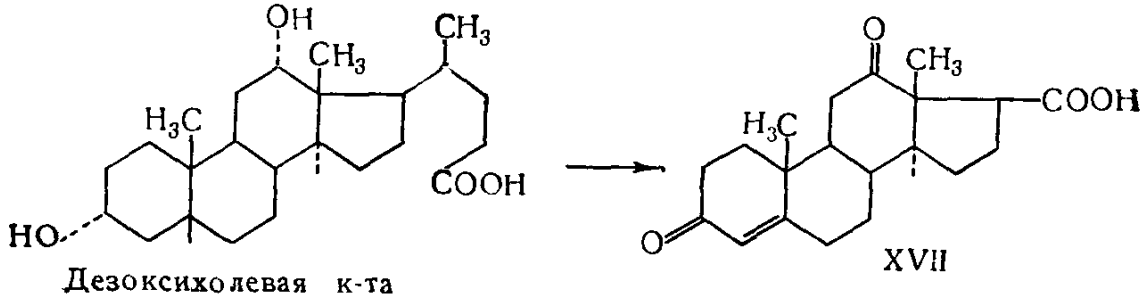


ми β-дикетонов и растворяться в щелочах. Этого не наблюдается и, следовательно, предположение о том, что кетогруппа занимает положение 1 отпадает. Если CO-группа стоит в положении 2, то соединение будет α-дикетоном и должно быть окрашенным. Но кортизон и адреностерон бесцветны. В положениях 15 и 16 CO-группа не может находиться, так как тогда адреностерон должен быть либо β-дикетоном, либо α-дикетоном. Остаются положения 6, 7, 11 и 12. Известно, что 6-, 7-, и 12-кетостероиды легко дают производные по кетогруппе. Этот факт говорил о том, что CO-группа в кортизоне занимает положение 11.

В подтверждение этого мнения были получены дополнительные данные. Кортикостерон при обработке кислотами, прежде всего соляной кислотой, легко дегидратируется и дает дикетон (XVI) с двумя двойными связями, которые не сопряжены между собой, что было легко установлено по спектральным данным. Если считать, что кислородная функция во всех этих соединениях, т. е. в кортикостероне, кортизоне и кортизоле находится в положении 6, то при дегидратации обязательно должен был бы получиться кетон с сопряженными двойными связями. Следовательно, и положение 6 исключается. Остаются положения 7, 12 и 11.



В дальнейшем для выяснения вопроса о положении CO-группы использовали синтез. Из дезоксихолевой кислоты путем расщепления боковой цепи после ряда превращений была получена кислота (XVII),



которая оказалась не идентичной изомерной кислоте (IX), полученной из кортикостерона и кортизона. Кислота (XVII) содержит кетогруппу безусловно в положении 12, следовательно положение 12 СО-группы в кортизоне тоже исключается. Остаются положения 11 и 7.

Положение 7, как уже указывалось, казалось мало вероятным, потому что 7-кетостероиды очень легко теряют кетонную группу при реакции по Кижнеру, между тем как кетонная группа в положении 11 удаляется по Кижнеру чрезвычайно трудно.

Суммируя этот накопленный материал, пришли к выводу, что строение кортикостероидов отвечает формулам приведенным выше.

Стереохимия кортикостероидов весьма проста. Боковая цепь находится в β-положении, потому что из холестерина и кортикостерона получаются одни и те же соединения, а положение боковой цепи в первом было строго доказано.

Оставался еще вопрос о 11-гидроксильной группе в кортикостероне. Ей придали β-конфигурацию на основании следующих соображений. Известно, что при обработке кислотами кортикостерона происходит легкая дегидратация, что, как известно, должно быть при транс-элиминировании элементов воды. Поскольку положение водорода при C_9 было известно раньше, то гидроксильная группа должна стоять в β-положении.

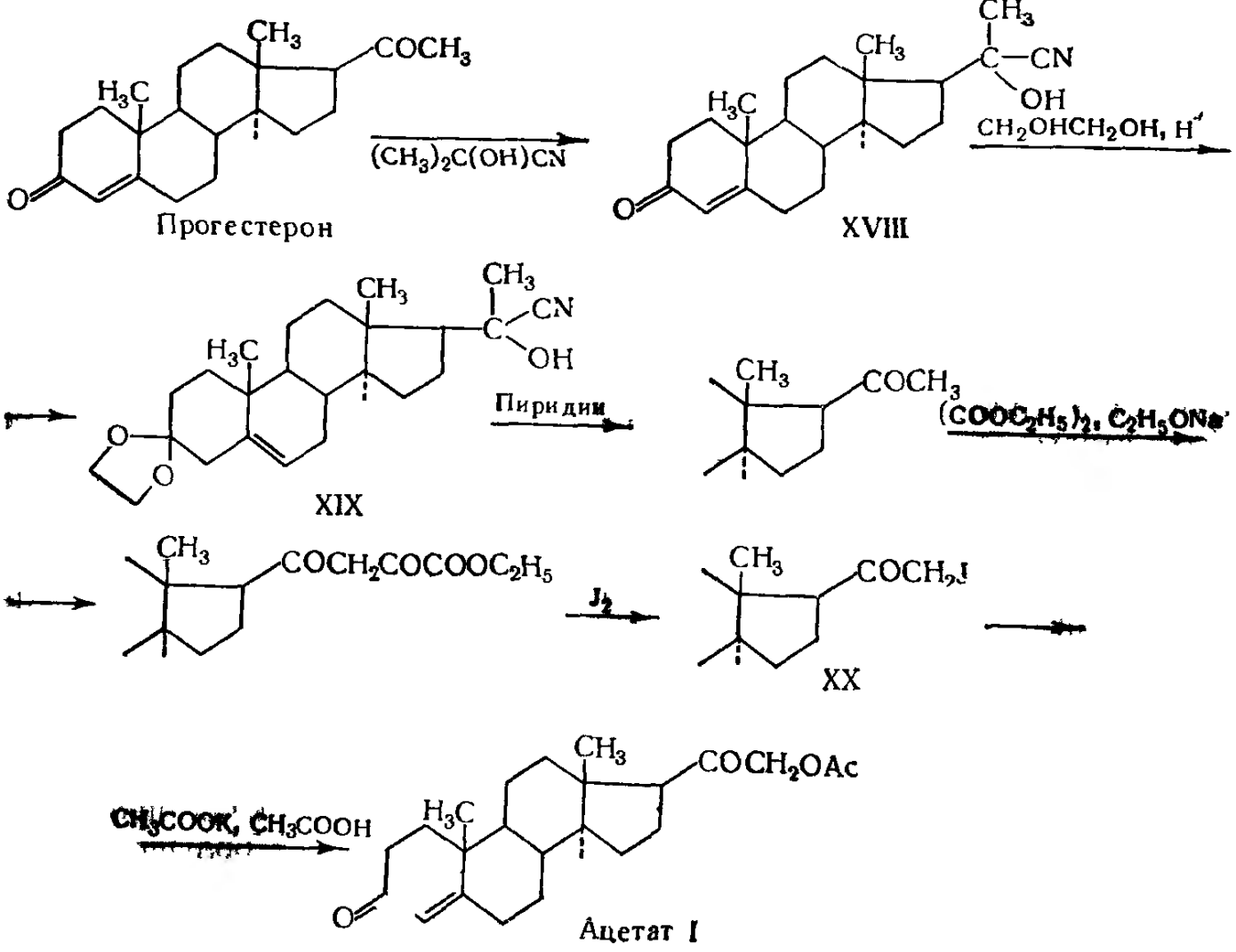
В кортикостероне имеются две гидроксильные группы, из которых лишь одна легко ацетилируется, именно первичная группа, тогда как должны были бы ацетилироваться обе. Из рассмотрения пространственной модели видно, что 11β-ОН-группа испытывает большое экранирующее действие со стороны метильной группы, что также говорит о том, что гидроксильная группа должна находиться в β-положении.

Теперь следует перейти к синтезам различных кортикостероидов, прежде всего дезоксикортикостерона из прогестерона, поскольку последний достаточно доступен.

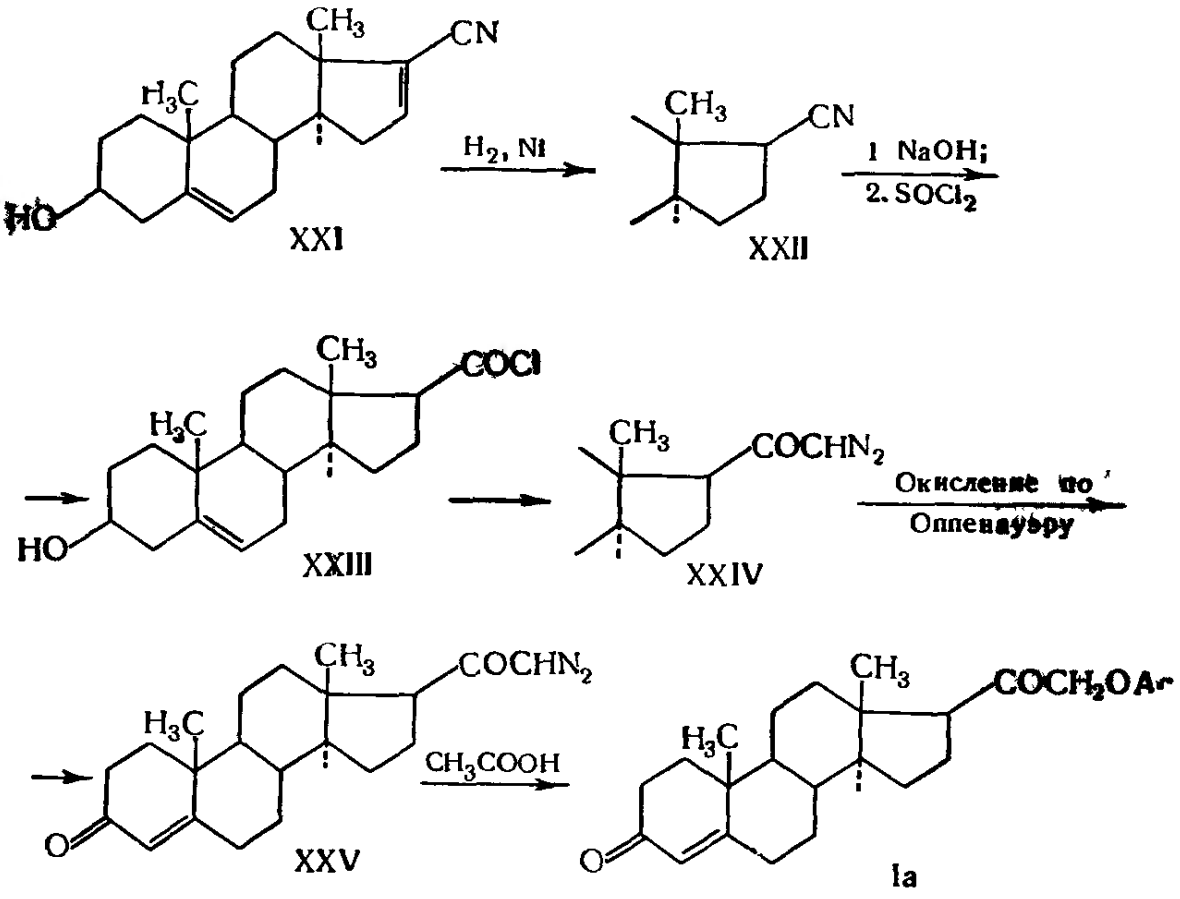
В предыдущей главе был приведен синтез 21-фторпрогестерона. Подобный синтез предложен Эрколи для дезоксикортикостерона с некоторыми весьма важными деталями, которые определяют направление реакции. Действием ацетонциангидрина на прогестерон получают 20-оксинитрил (XVIII), причем 3-кетогруппа не вступает в реакцию. Действием этиленгликоля на оксинитрил получают 3-кеталь (XIX), который при нагревании с пиридином отщепляет элементы цианистоводородной кислоты (см. стр. 350).

Дальше следует конденсация с щавелевым эфиром и действие иода, приводящее к 21-иодпроизводному (XX). Действие ацетата калия в уксусной кислоте дает реакцию обмена иода на ацетоксигруппу. Одновременно происходит удаление кетальной группировки. Общий выход ацетата дезоксикортикостерона при применении этого способа составляет 36%, считая на прогестерон.

До сих пор имеет практическое значение синтез дезоксикортикостерона из дегидроэпиандростерона. Действием хлорокиси фосфора и пиридина на оксинитрил дегидроэпиандростерона получают, как и при синтезе прогестерона, непредельный нитрил (XXI). Нитрил (XXI) гидрируют в присутствии никеля, причем присоединение водорода идет по сопряженной двойной связи с образованием нитрила (XXII). Этот нитрил омыляют в кислоту, из которой получают хлорангидрид (XXIII), а на хлорангидрид действуют диазометаном, причем образуется диазокетон (XXIV). Диазокетон окисляют по Оппенауэру в дикетон (XXV). Интересно отметить, что диазокетоны как правило очень неустойчивы, однако, если последнюю реакцию проводить при комнатной температуре,

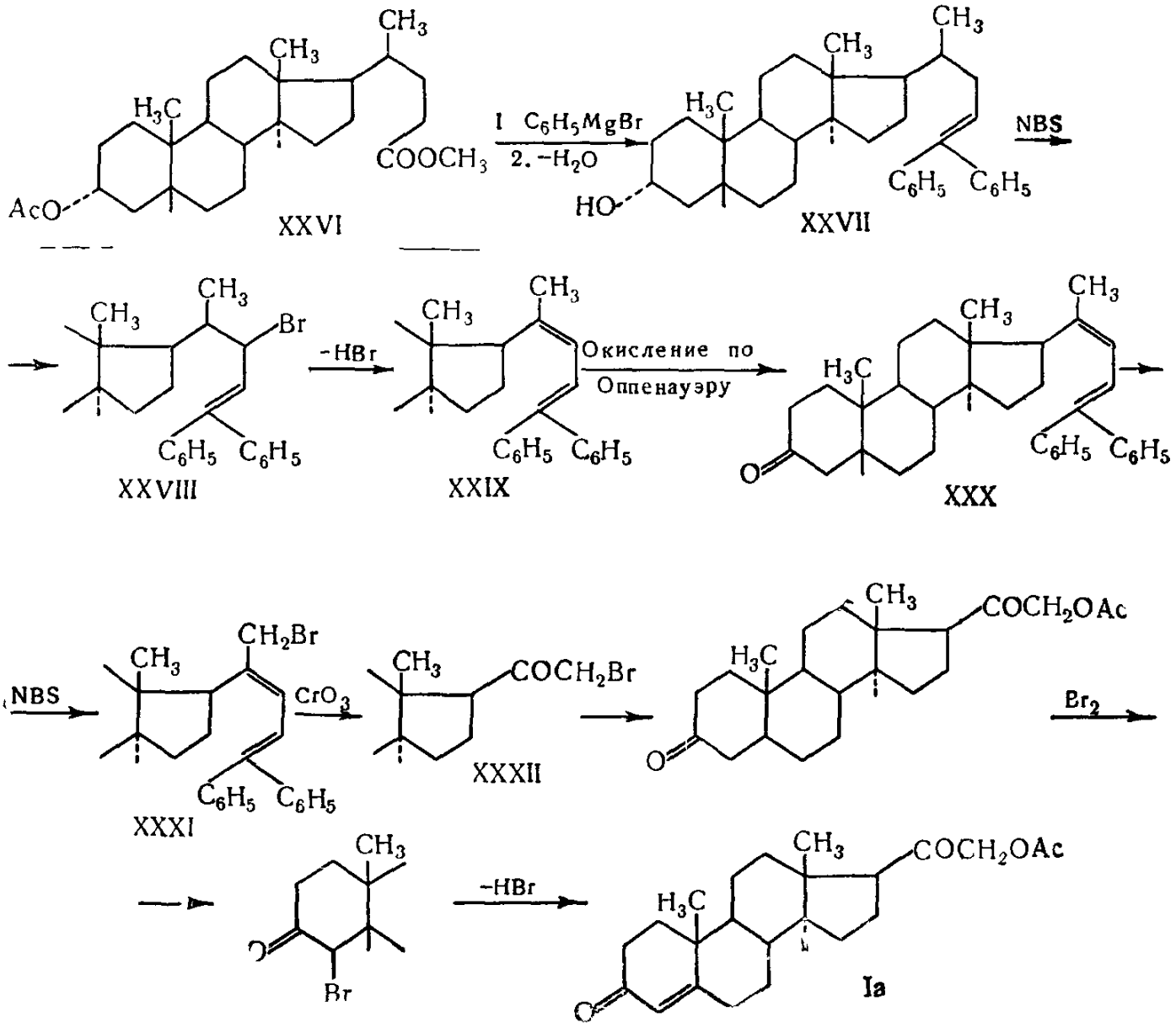


то его выход составляет около 70%. Дальше действием уксусной кислоты на дикетон (XXV) получают ацетат дезоксикортикостерона (Ia).



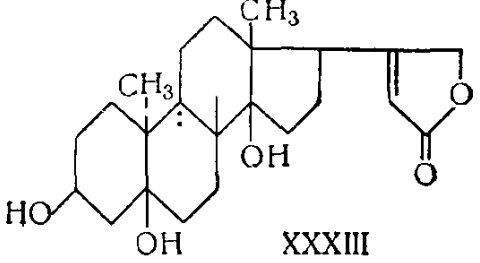
Интересен (хотя едва ли практически приемлем) синтез дезоксикортикостерона из желчных кислот, прежде всего из литохолевой кислоты.

Этот синтез очень схож с соответствующим синтезом прогестерона (см стр. 330) и включает такие же стадии Действием магнийбромфенила на метиловый эфир ацетата литохолевой кислоты (XXVI) с последующей дегидратацией получают фенильное производное (XXVII), которое обрабатывают N-бромсукцинимидом.



Отщеплением HBr от бромпроизводного (XXVIII) получают диен (XXIX), окисляемый по Оппенауэру в кетон (XXX). При обработке последнего N-бромсукцинимидом происходит вторичное аллильное бромирование Полученный бромкетон (XXXI) окисляют в производное прегнана (XXXII) и действием ацетата калия вводят ацетоксигруппу. Дальше остается только ввести двойную связь в кольцо *A*, что достигается бромированием и дегидробромированием. Бромирование в кольце *A* идет здесь в положении 4, поскольку в желчных кислотах имеется цис-сочленение колец *A* и *B*. Последующим отщеплением бромистого водорода коллидином или, еще лучше, динитрофенилгидразином получают ацетат дезоксикортикостерона (Ia) с общим выходом 15%.

Заслуживает упоминания синтез дезоксикортикостерона из сердечного аглюкона — периплогенина (XXXIII), который находится в растениях, в большом количестве произрастающих в некоторых районах Средней Азии, и возможно в ближайшее время будет настолько доступен, что станет исходным сырьем для получения кортикоидных гормонов.

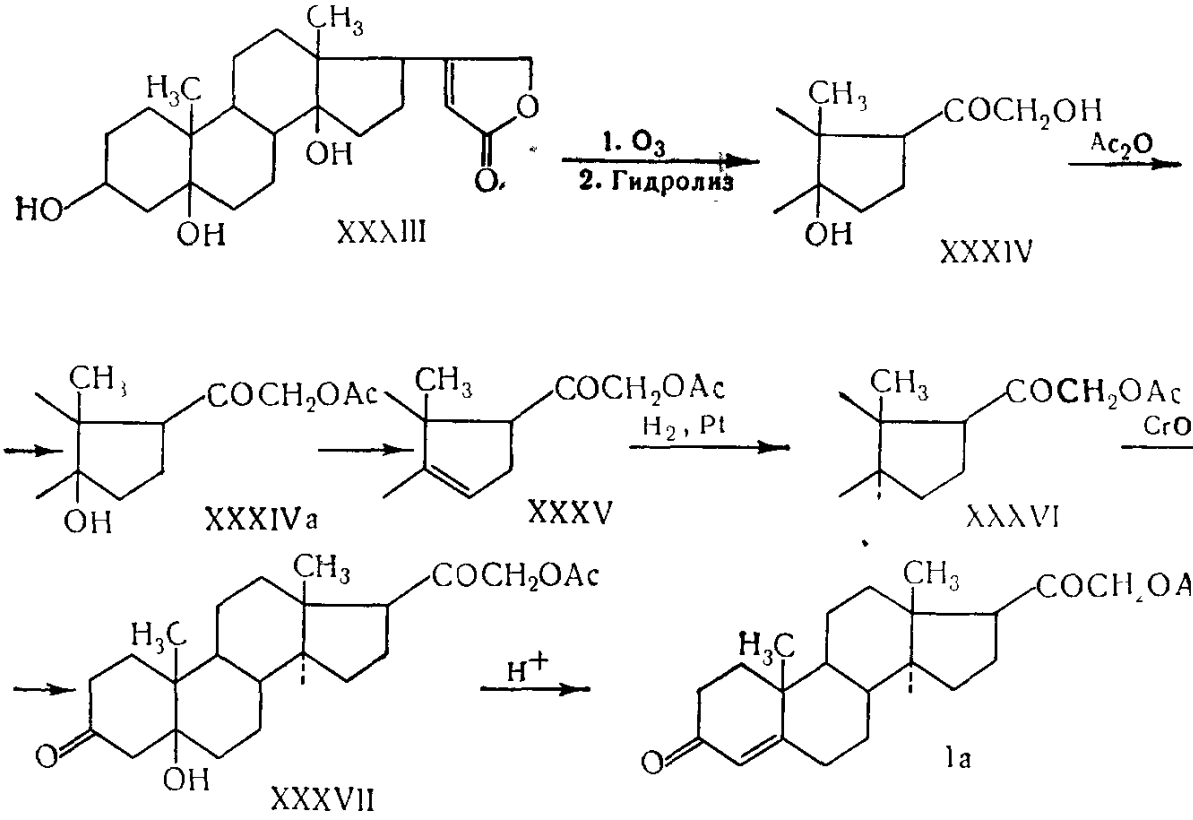


XXXIII

Периплогенин имеет довольно сложное строение, но он содержит элементы, которые очень выгодны для синтеза Так, при дегидратации третичной гидроксильной группы (между кольцами *A* и *B*) образуется двойная связь; двойная же связь в лактонном кольце при окислении должна дать боковую оксиацетоновую цепочку Правда, имеется «лишняя» гидроксильная группа между кольцами *C* и *D*, но ее, как будет видно, удалить довольно легко. Первой стадией синтеза является озонирование с последующим гидролизом, что приводит к тектраоксикетону (XXXIV).

Прежде чем приступить к дальнейшим превращениям, необходимо защитить 21-гидроксильную группу, очень чувствительную к окислению и действию щелочей, что удается осуществить ацетилированием в моноацетат (XXXIV*a*).

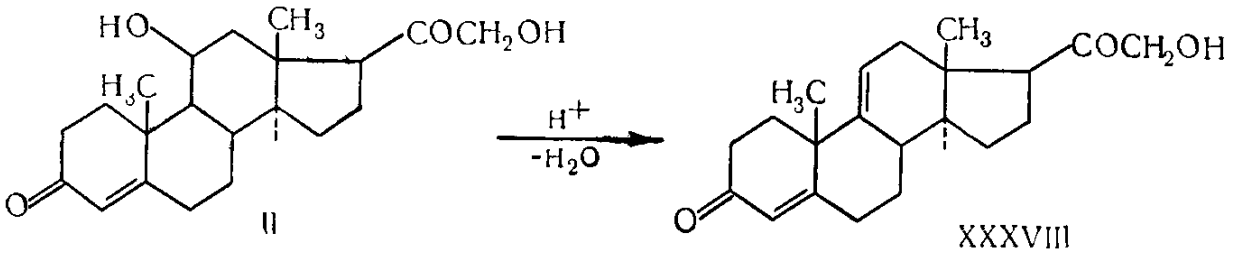
Далее действием HCl отщепляют 14-гидроксильную группу, а образовавшийся непредельный кетон (XXXV) гидрируют, причем образующийся кетон (XXXVI) имеет уже транс-сочленение колец *C* и *D*



Окислением хромовым ангидридом получают дикетол (XXXVII), причем третичная гидроксильная группа остается незатронутой, что характерно для всех третичных спиртов Наконец, при действии кислоты происходит легкое отщепление элементов воды от β-кетола и образуется ацетат дезоксикортикостерона. Выходы в литературе указаны не на всех стадиях. В предыдущем синтезе из желчных кислот выход составлял 15%. Здесь по однозначной оценке он должен быть равен примерно 30%.

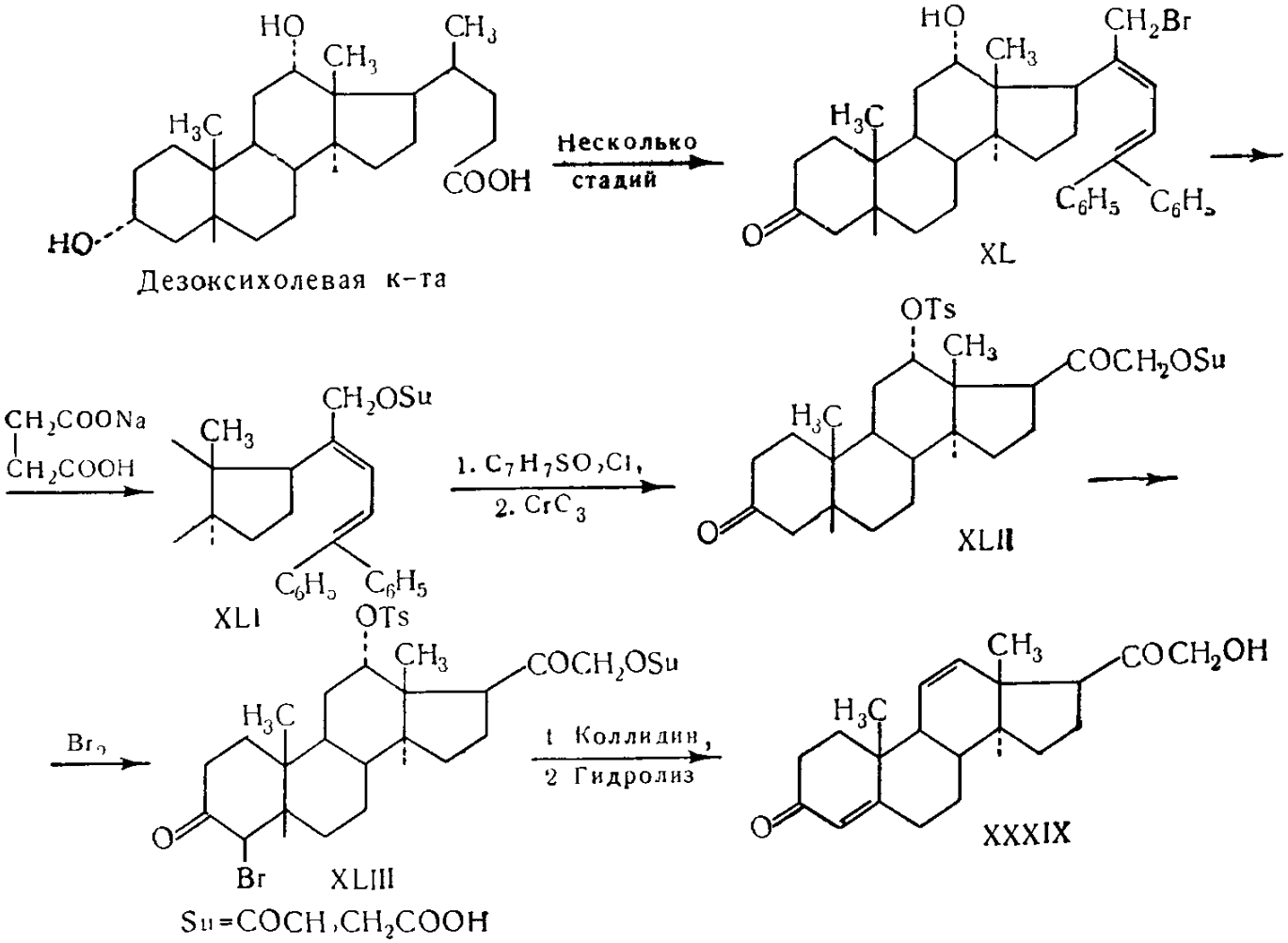
В 1954 г. появилось сообщение Веттштейна и Мейстра (Швейцария) о микробиологическом методе, который позволяет ввести гидроксильную группу в прогестерон и получить дезоксикортикостерон в одну стадию под влиянием особого вида бактерий *Ophiolobus herpotrichus*. Если данные о высоких выходах подтвердятся, то это будет наиболее простой и дешевый метод получения дезоксикортикостерона.

Теперь несколько слов об аналогах и гомологах дезоксикортикостерона и их физиологическом действии. Гидрирование двойной связи дезоксикортикостерона полностью уничтожает его физиологическое действие. Влияние дополнительной двойной связи зависит от ее положения. Так, соединение (XXXVIII) с дополнительной Δ^9-связью примерно в два раза сильнее дезоксикортикостерона. Это соединение получается чрезвычайно легко из кортикостерона дегидратацией под действием кислот.



Если ввести двойную связь в соседнее положение 11, то физиологическое действие такого Δ^{11}-соединения (XXXIX) также сильно и тоже примерно в 2—3 раза сильнее физиологического действия дезоксикортикостерона.

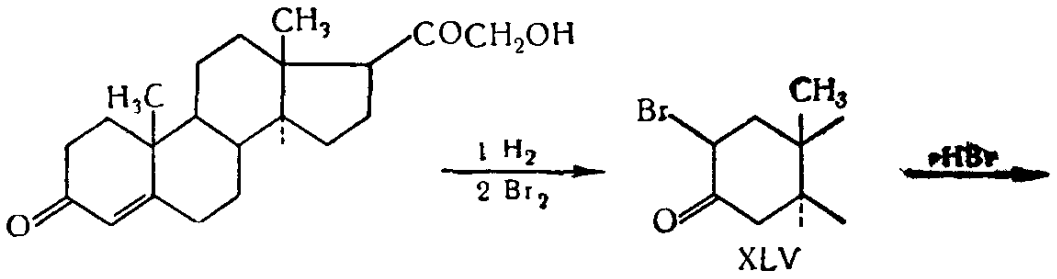
Это соединение получается из дезоксихолевой кислоты.



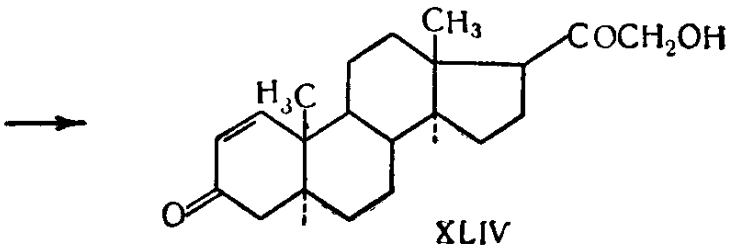
В этой схеме повторяются те же стадии, что и при синтезе дезоксикортикостерона из литохолевой кислоты, в результате чего приходят к соединению (XL). Действием натриевой соли янтарной кислоты полу-

чают полуэфир этой кислоты (сукцинат) (XLI). Остаток янтарной кислоты вводят только потому, что в дальнейшем при этом получается больший выход. Действием *n*-толуолсульфохлорида защищают гидроксильную группу в кольце *C* и далее окисляют хромовым ангидридом до производного прегнана (XLII). Последующее бромирование дает 4-бромпроизводное (XLIII), которое при кипячении с коллидином отщепляет сразу элементы бромистого водорода и *n*-толуолсульфокислоты. Гидролиз полученного соединения приводит к Δ^{11}-дезоксикортикостерону (XXXIX). Наиболее слабое место в этом синтезе — дегидробромирование, потому что выход при этом составляет 30%; остальные стадии проходят более или менее удовлетворительно.

Изомер дезоксикортикостерона (XLIV) с двойной связью в положении 1,2 обладает 0,1 активности дезоксикортикостерона.



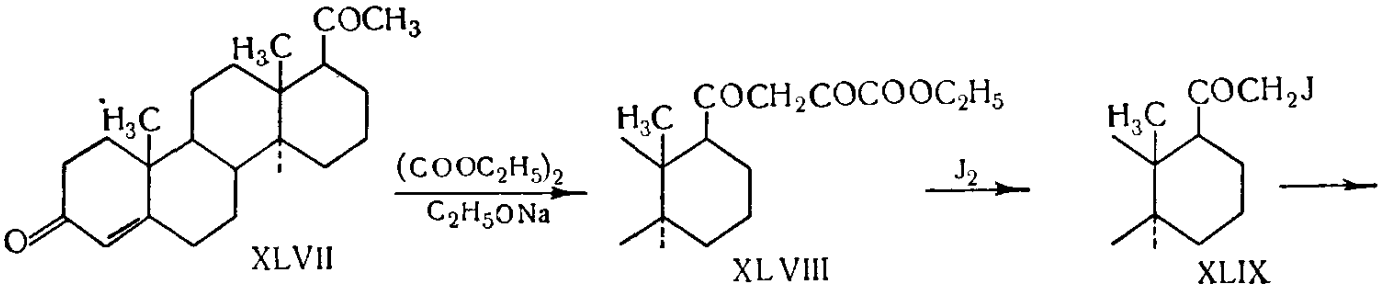
XLV



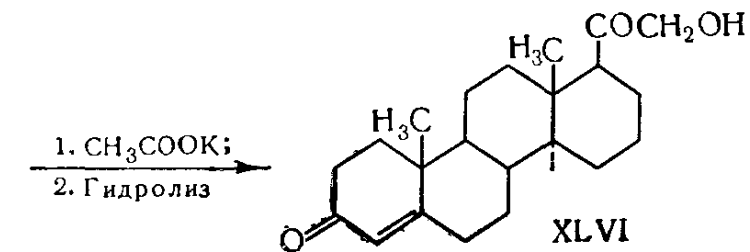
XLIV

Он легко получается из дезоксикортикостерона. Гидрированием получают дигидросоединение с транс-сочленением колец *A* и *B*, затем последнее бромируют в бромсоединение (XLV), причем атом брома становится в положение 2. После отщепления бромистого водорода получают Δ^1-изомер дезоксикортикостерона (XLIV).

Интересно влияние замены пятичленного кольца *D* шестичленным на физиологические свойства. Активность при этом снижается, но не исчезает; так *D*-гомодезоксикортикостерон (XLVI) в 3—5 раз слабее дезоксикортикостерона. Это соединение было получено из соответствующего аналога прогестерона (XLVII) одним из методов введения 21-оксигруппы, именно действием щавелевого эфира в присутствии этилата натрия [причем образуется эфир (XLVIII)], а затем иода, который замещает оксалильную группу.



XLVII XLVIII XLIX

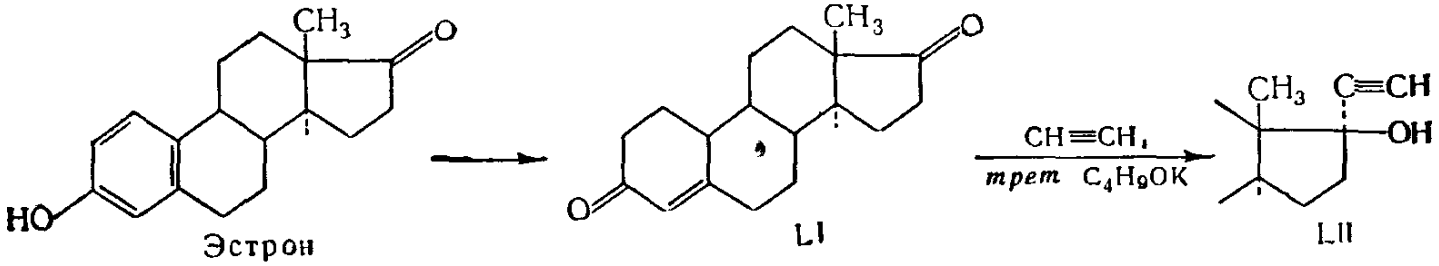


XLVI

Действием ацетата калия на иодкетон (XLIX) с последующим гидролизом получается *D*-гомодезоксикортикостерон (XLVI).

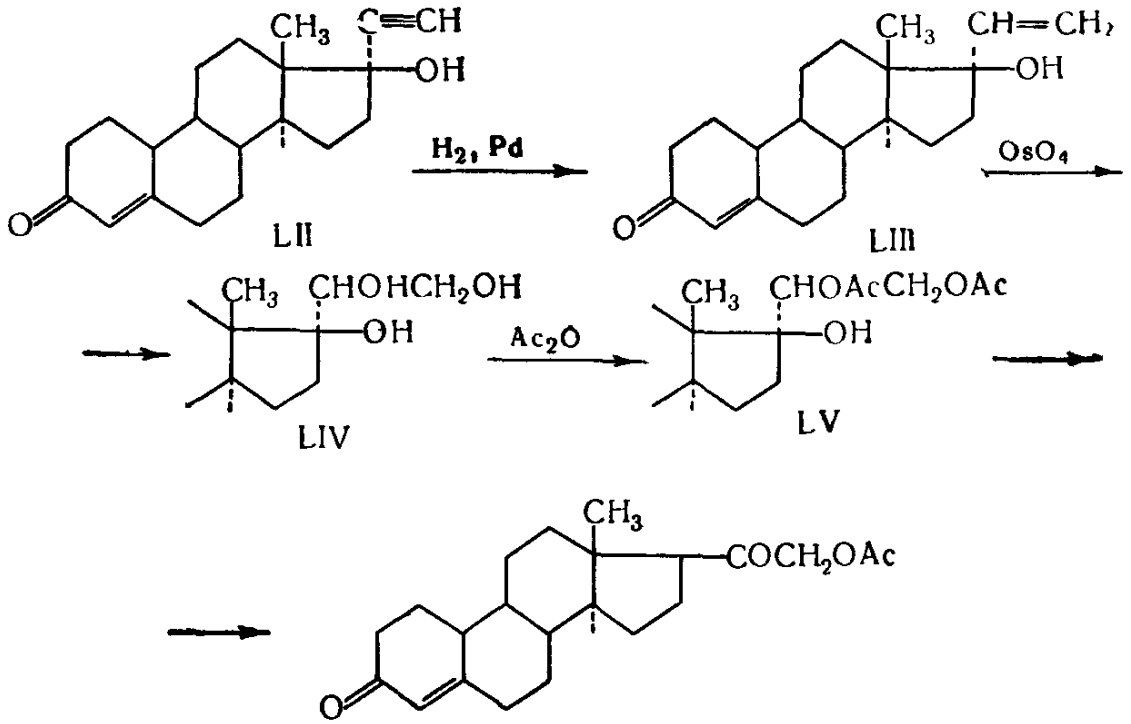
Как и у гестагенных гормонов, удаление 19-CH_3-группы повышает физиологическую активность и 19-нордезоксикортикостерон (L) значительно сильнее дезоксикортикостерона 19-нордезоксикортикостерон получается (как и 19-норпрогестерон) из норандростендиона (LI), который в свою очередь легко образуется из эстрона восстановлением по Берчу (с последующим гидролизом и окислением).

Согласно уже описанной схеме (см. главу о гестагенных гормонах) из 19-норандростендиона (LI) получается 19-норпрегнин (LII).



Эстрон LI LII

На первый взгляд переход от 19-норпрегнина (LII) к 19-нордезоксикортикостерону (L) осуществить трудно, поскольку боковая цепь в первом соединении находится в α-положении, а для физиологического действия необходимо, чтобы она была в β-положении. Для достижения цели селективно восстанавливают этнильную группу каталитическим гидрированием до винильной и затем действуют осмиевым ангидридом. Осмиевый ангидрид, равно, как и перманганат, переводит образовавшийся винилкарбинол (LIII) в гликоль (LIV). Известно, что осмиевый ангидрид действует преимущественно на винильную группу, но не на двойную связь, сопряженную с карбонильной группой. Такое селективное действие наблюдается и на других примерах.

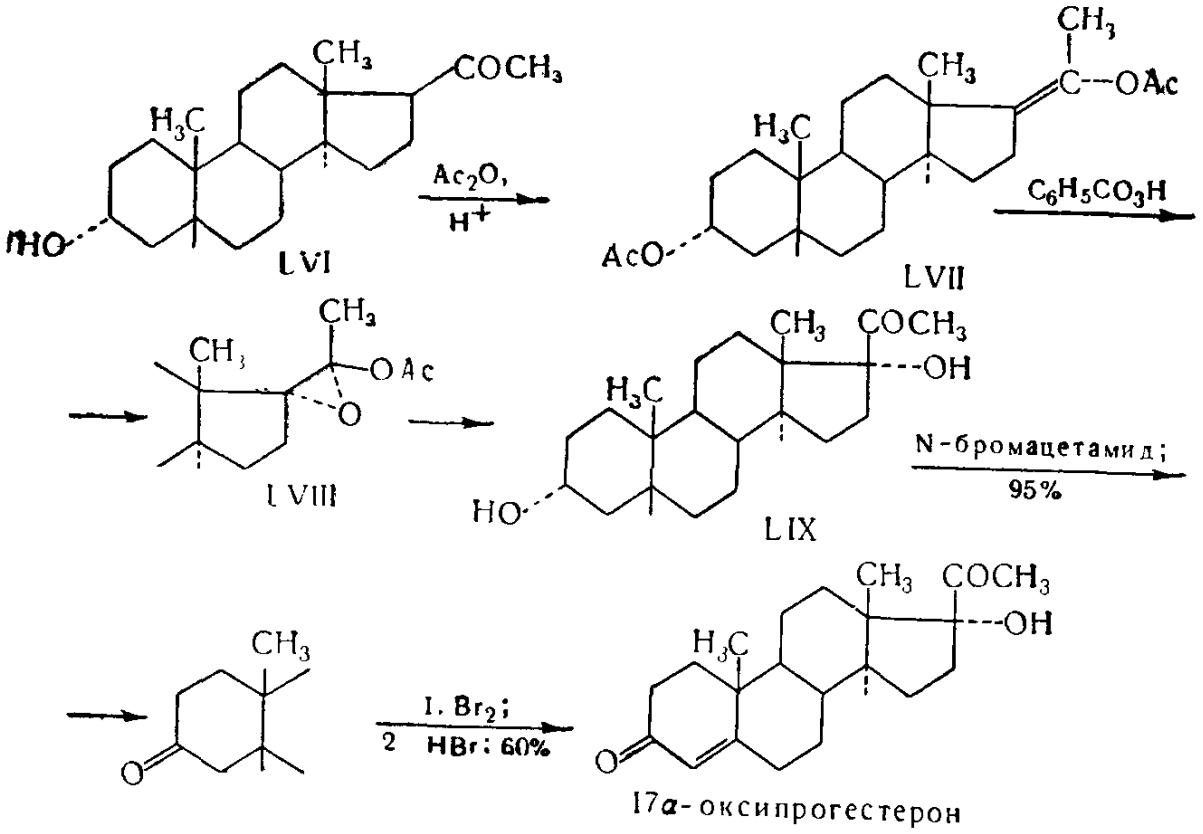


Далее триол (LIV) ацетилируют (третичная ОН-группа ацетилируется всего труднее и остается незатронутой) до диацетата (LV) и последний нагревают с цинком. При этом происходит перегруппировка, приводящая сразу к образованию оксиацетоновой цепи в β-положении, т. е. к ацетату 19-нордезоксикортикостерона. Это так называемая реакция Серини похожа на реакцию дегидратации, сопровождающуюся

перегруппировкой, только в данном случае отщепляется молекула уксусной кислоты.

В отличие от дезоксикортикостерона 17α-оксипрогестерон сам не имеет практического значения (хотя его ацильные производные и, особенно, капроат являются гестагенными препаратами), но тем не менее методы его синтеза важны, потому что они применяются при получении более важного соединения — кортизона. Исходными соединениями служат такие же промежуточные продукты, что и для синтеза дезоксикортикостерона.

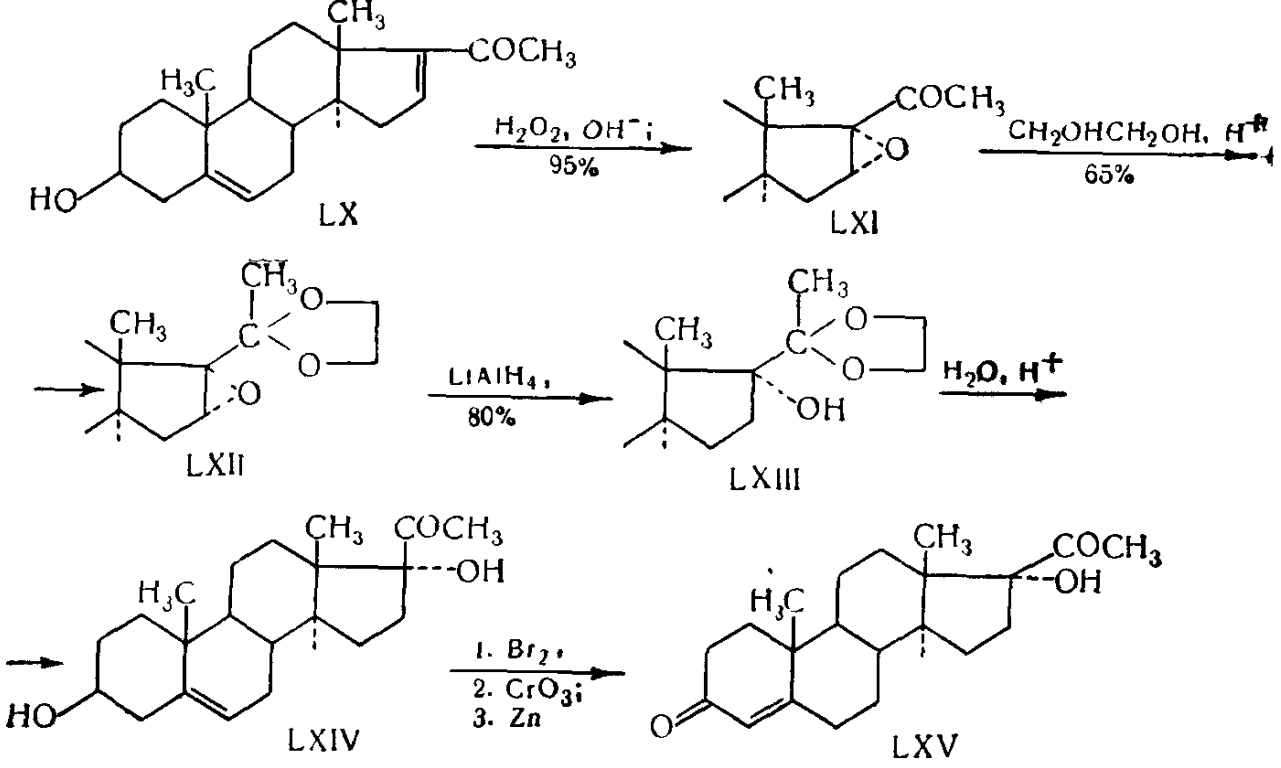
Классический метод введения 17α-оксигруппы был разработан на прегнанолоне (LVI) Кричевским и Галлахером.



17α-оксипрогестерон

При действии больших количеств уксусного ангидрида в присутствии кислот получается ацетат енольной формы кетона (LVII), причем двойная связь образуется в положении 17—20, а не 20—21. Вместо уксусного ангидрида можно воспользоваться также изопропенилацетатом. Далее необходимо окислить двойную связь, что лучше всего удается с помощью надбензойной кислоты. Гидролиз образовавшейся окиси (LVIII) приводит к кетодиолу (LIX). Действием на него N-бромацетамида в присутствии воды и третичного бутилового спирта получают дикетон, бромирование и дегидробромирование которого дает 17α-оксипрогестерон. Можно использовать также и весьма доступный 16-дегидропрегненолон (LX), получаемый из соласодина, упоминавшийся в предыдущих главах.

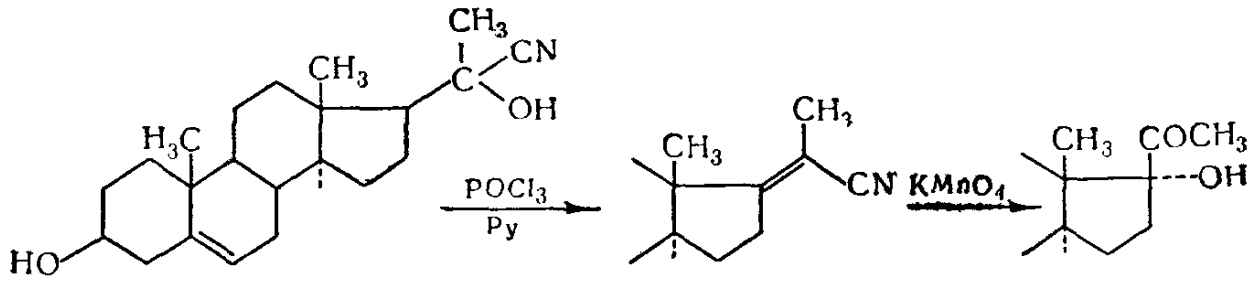
Решающей стадией в этом синтезе является окисление Δ^{16}-двойной связи, без затрагивания Δ^5-двойной связи. Это достигается действием перекиси водорода в щелочной среде, причем образуется кетоокись (LXI). Далее действием этиленгликоля защищают кетогруппу и полученный кеталь (LXII) восстанавливают алюмогидридом лития, причем окисная связь разрывается, а остальные группы остаются нетронутыми. Гидролизом кеталя (LXIII) получают диол (LXIV), действием на последний брома защищают Δ^5-связь, окисляют хромовым ангидридом и, наконец, дебромируют цинковой пылью в 17α-оксипрогестерон (LXV).



Соединение (XLI) не может быть просто окислено по Оппенауэру, так как под действием изопропилата алюминия соединения с оксикетонной боковой цепью перегруппировываются в *D*-гомосоединения. С такого рода перегруппировкой пятичленного кольца в шестичленное мы встретимся и позже.

Приведенный метод часто называют эпоксидным. По другому (так называемому цианги дринному) методу, также получившему большое распространение, исходят из производных 20-кетопрегнанов.

Так, действием синильной кислоты или цианги дрина ацетона на прегненолон вначале образуется оксинитрил, из которого дегидратацией хлорокисью фосфора в пиридине получают непредельный нитрил. Окисление последнего марганцовокислым калием приводит (с выходом около 50%) к соединению с оксиацетоновой цепью нужной конфигурации.

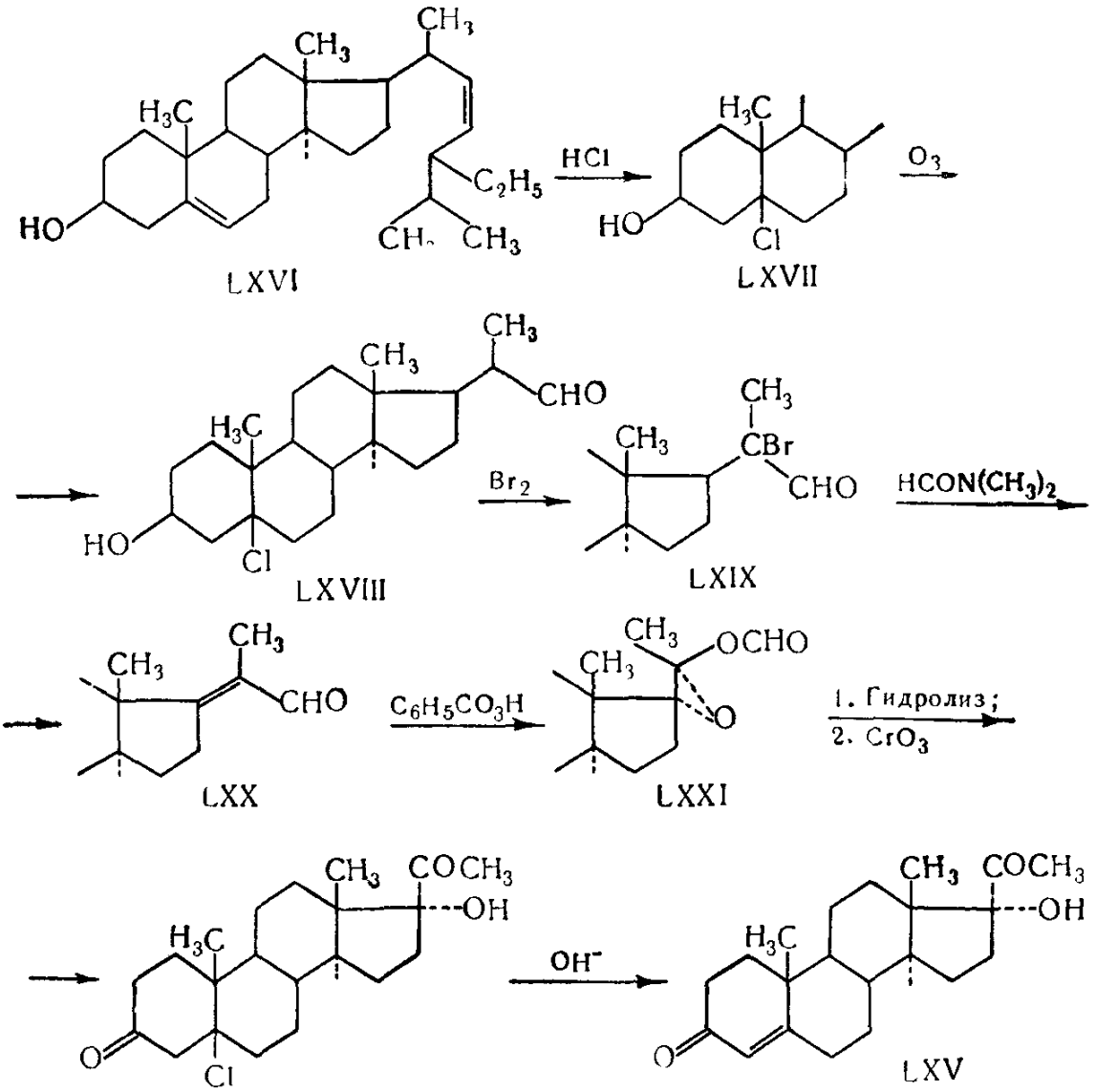


Механизм этой реакции не совсем ясен. По-видимому, вначале образуется гликоль, а затем удаляются элементы синильной кислоты, однако непонятно, почему они удаляются столь легко.

Интересно, что при окислении Δ^5-двойная связь не затрагивается или, вернее, затрагивается частично. В дальнейшем можно перейти к 17-оксипрогестерону, учитывая замечания, сделанные при описании предыдущего синтеза.

Следует остановится на синтезе 17-оксипрогестерона из стигмастерина (LXVI), так как в этом синтезе есть своеобразные, интересные детали. Первой ступенью его является укорочение боковой цепи с одновременной защитой Δ^5-двойной связи от окислителей. Это достигается

действием хлористого водорода, который присоединяется именно к этой двойной связи Далее следует озонирование хлорспирта (LXVII) в альдегид (LXVIII)



Альдегид (LXVIII) бромируют, причем бром встает в α-положение к альдегидной группе. Третичный бром в бромальдегиде (LXIX) чрезвычайно неустойчив и легко элиминируется с образованием непредельного альдегида (LXX). Наилучший выход получается при действии диметилформамида.

Дальше напрашивается эпоксидирование надбензойной кислотой. Оно выполняет двойную функцию, так как при этом не только образуется оксид, но еще вводится кислород между альдегидной группой и углеродным атомом. На первый взгляд необычная эта реакция является вариантом реакции Байера — Виллигера, которая характерна для альдегидов и кетонов.

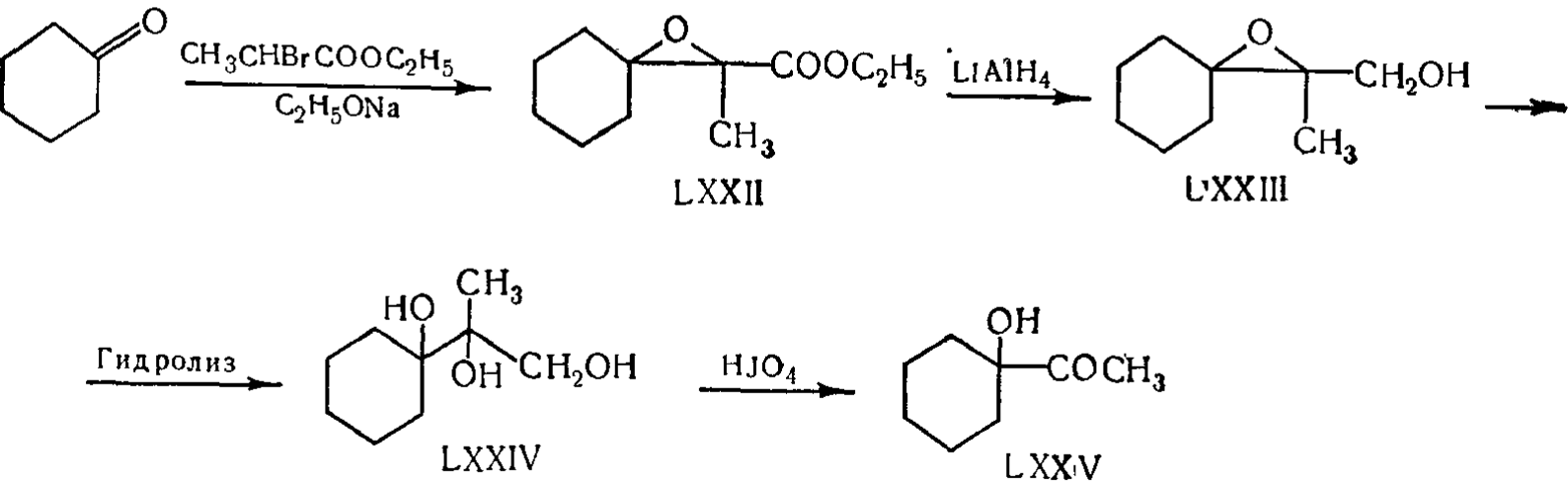
Дальше процесс протекал сравнительно просто: гидролиз эпоксида (LXXI), окисление хромовым ангидридом и, наконец, обработка щелочами. Все стадии, вплоть до окисления хромовым ангидридом проходят с хорошим выходом (70—90%), на последних же двух стадиях выходы низкие, так как окислители частично разрушают боковую цепь. Известно также, что все кортикостероиды очень чувствительны к щелочам.

Следует упомянуть еще об интересном способе, предложенном Н. Н. Суворовым. Этот способ отработан пока только на циклогексаноне, но, по-видимому, его можно применять и для более сложных соединений, в частности 17-кетостероидов. Автор конденсирует циклогексанон с α-бромпропионовым эфиром в присутствии этилата натрия. Это

самая обыкновенная реакция Дарзана которая приводит к образованию глицидного эфира (LXXII). Последний при восстановлении алюмогидридом лития сбразует карбинол (LXXIII). Интересно отметить, что в первую очередь атакуется карбэтоксильная, а не эпоксидная группа.

Карбинол (LXXIII) омыляется действием разбавленной уксусной кислоты до триола (LXXIV), который окисляется иодной кислотой. Иодная кислота, как известно окисляет α-гликоли.

В данном случае имеются две возможности расщепления: между третичной и вторичной и между вторичной и первичной OH-группами. Но если взять строго определенное количество иодной кислоты, происходит отщепление первичной карбинольной группы и получается соединение (LXXV) оксиацетоновой боковой цепью. Все стадии проходят с хорошими выходами.



ЛИТЕРАТУРА

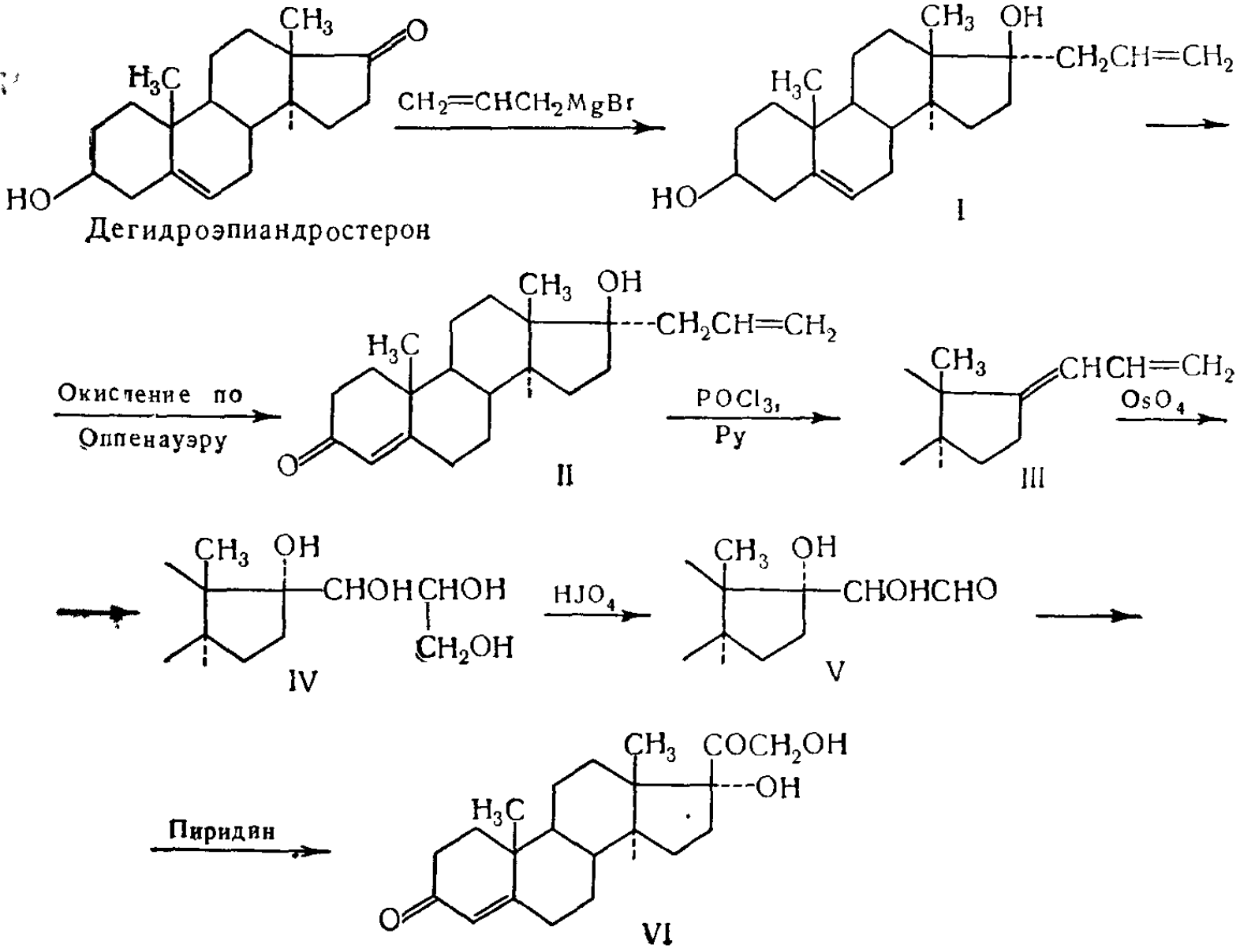
И Н. Назаров, Л. Д. Бергельсон. *Химия стероидных гормонов.* **М., Изд-во АН СССР, 1955, стр. 280—328.**

Глава 8

КОРТИКОИДНЫЕ ГОРМОНЫ. ВЕЩЕСТВО S РЕЙХШТЕЙНА

Следующий важный представитель кортикостероидов — 17,21-диоксипрогестерон был впервые выделен и охарактеризован Рейхштейном, почему его часто называют веществом S Рейхштейна. Этот же ученый впервые и синтезировал его, исходя из дегидроэпиандростерона, который в 30-е годы был, пожалуй, единственным доступным промежуточным продуктом.

Рейхштейн конденсировал дегидроэпиандростерон с магнийаллилбромидом. Аллильная группа, как и при реакции с ацетиленом, входит в соединение (I), образуя α-боковую цепь



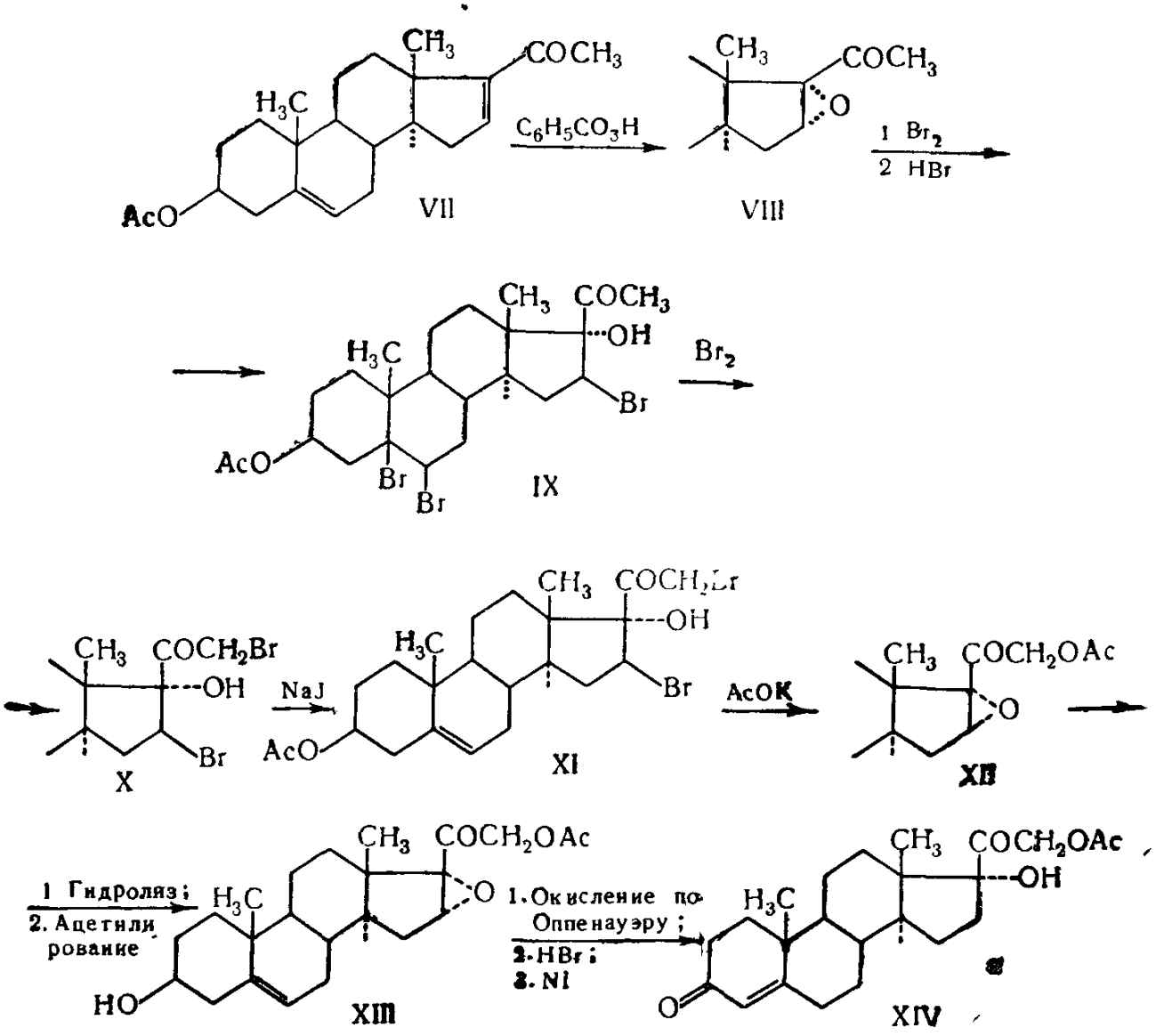
Окислением по Оппенауэру Рейхштейн ввел нужную группировку в кольцо А, а действием хлорокиси фосфора и пиридина на кетол (II)

отщепил гидроксильную группу, получив таким образом довольно необычный диен (III).

До сих пор все эти реакции шли с хорошими выходами, но далее начались осложнения. Окислением диена (III) четырехокисью осмия он получил тетраол (IV) с выходом 10—13%, но уже с нужной конфигурацией. Далее он действовал иодной кислотой, и так же как при синтезе по Суворову (стр. 359), подобрал такие условия, что отщеплялся только один углеродный атом. Таким образом, было получено соединение (V) с боковой цепью, но на первый взгляд не той, которая нужна. Здесь Рейхштейн использовал известную перегруппировку глицеринового альдегида в диоксиацетон, которая была открыта в 90-х годах прошлого столетия Лобри де Брюином в ряду углеводов Действительно, при нагревании в пиридине соединение (V) было превращено в вещество S (IV) с выходом 30%. Общий выход вещества S, считая на дегидроэпиандростерон, составил 1,8%, что даже в лабораторных условиях неприемлемо.

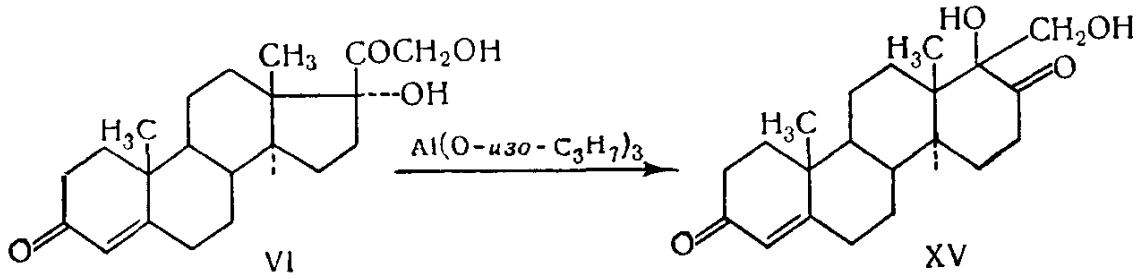
Практически приемлемый способ в 1950 г. предложил Джулиан (США), который исходил из неоднократно упоминавшегося выше ацетата 16-дегидропрегненолона (VII). Он окислял его перекисью водорода или надбензойной кислотой в окись (VIII), которую затем бромировал для защиты Δ^5-двойной связи.

Действием HBr Джулиан расщепил оксидное кольцо и образовавшийся бромкетол (IX) снова обработал бромом, причем произошло замещение при C_2. Затем действием иодистого натрия на соединение (X) он удалил бром у двойной связи.



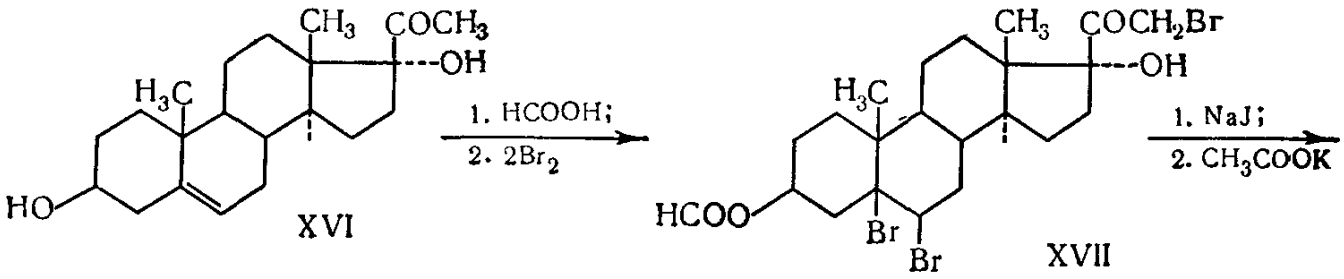
Полученный дибромкетол (XI) Джулиан обработал ацетатом калия. Его целью было заместить 21-бром на ацетоксигруппу, но одновременно произошла и другая реакция, и в результате он получил окись (XII), очень сходную с окисью (VIII). Затем он провел гидролиз обеих ацетоксигрупп и осуществил частичное ацетилирование 21-ОН-группы. После окисления карбинола (XIII) по Оппенауэру окисное кольцо было расщеплено действием бромистого водорода. Бром удалялся действием никеля Рэнея, и в результате был получен ацетат вещества S (XIV).

Несмотря на многочисленность стадий, общий выход у Джулиана составил около 20%. Следует обратить внимание на то, что Джулиан применял реакцию Оппенауэра до того, как была создана диоксиацетоновая цепь, потому что здесь, так же как у 17-оксипрогестерона, очень легко проходит перегруппировка в соединения с шестичленным кольцом *D*. Так, при действии изоприпилата алюминия на вещество S, оно превращается в *D*-гомосоединение (XV) с выходом 46%.

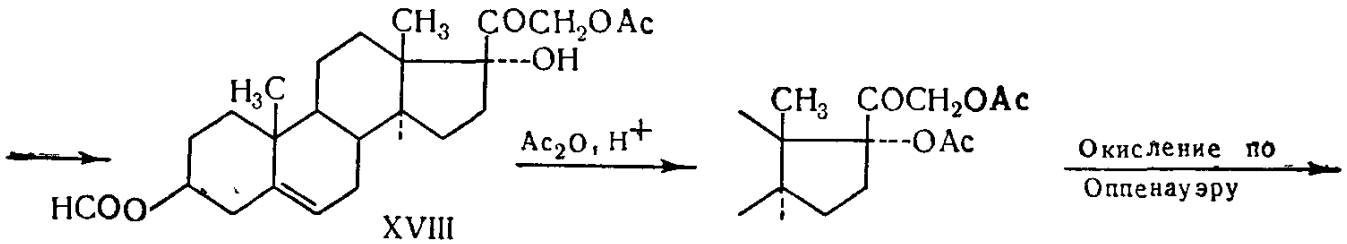


VI XV

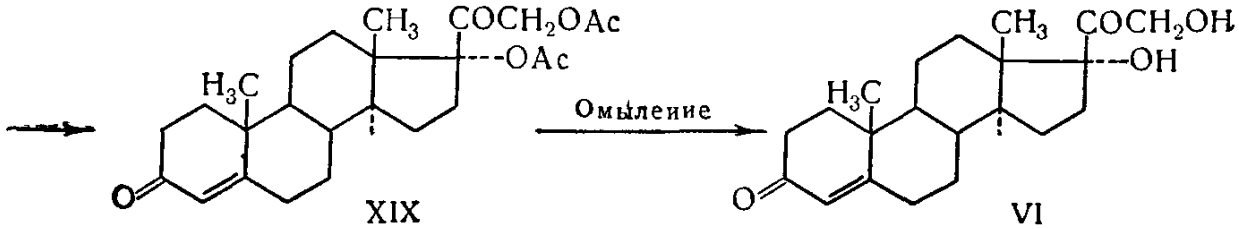
Практически весьма удобен способ получения вещества S из 17-оксипрегненолона (XVI), который, в свою очередь, легко получается из дегидропрегненолона (см. главу о гестагенных гормонах). Это соединение подвергают формилированию и полученный формиат бромируют, причем в реакцию вступают две молекулы брома и образуется трибромпроизводное (XVII). Последнее обрабатывают иодистым натрием, который удаляет бром, причем вновь создается двойная связь. Это свойство иодистого натрия часто используется в химии стероидных соединений. Затем действуют ацетатом калия, и таким образом заменяют 21-бром на ацетоксигруппу.



XVI XVII



XVIII



XIX VI

Далее ацетилируют третичную гидроксильную группу в соединении (XVIII). Известно, что таковые ацетилируются трудно, однако, если действовать уксусным ангидридом на холоду в присутствии кислот, реакция протекает гладко. На первый взгляд кажется странным, зачем прибегать к таким сложным процессам, как ацетилирование 17-ОН-группы (ведь ацетильную группу все равно придется удалять), и формилирование (а не ацетилирование) 3-ОН-группы. Все это становится понятным, когда переходят к следующей стадии — реакции Оппенауэра, в результате которой образуется дикетон (XIX). Если бы гидроксильную группу защитить любым другим ацетильным остатком, реакция бы не пошла. Единственное исключение представляют формиаты, с которыми реакция идет. Формилирование же необходимо потому, что иначе в дальнейшем 3-ОН-группа будет проацетилирована вместе с 17-ОН-группой. В свою очередь, ацетилирование последней вызвано тем, что оксиацетоновая группировка, как указывалось выше, весьма чувствительна к реакции Оппенауэра. Омылением кетона (XIX) получается вещество S (VI), общий выход которого, несмотря на большое количество стадий, составляет свыше 50%.

Если дезоксикортикостерон подвергнуть действию грибков *Moniliacea* (например *Ophiolobus herpotriches*), то также получается вещество S с выходом 20% (по другим данным 35%). Выход невелик, но так как получение нужного вещества происходит в одну стадию, а способы получения дезоксикортикостерона прекрасно разработаны, то эта реакция привлекает внимание.

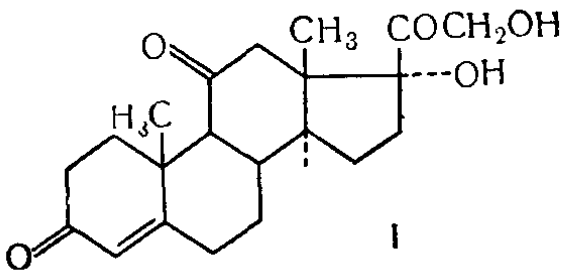
ЛИТЕРАТУРА

И Н Назаров, Л. Д. Бергельсон. Химия стероидных гормонов. М., Изд-во АН СССР, 1955, стр. 328—338.

Глава 9

КОРТИЗОН И ГИДРОКОРТИЗОН

Главным представителем этого класса является **кортизон** (I).

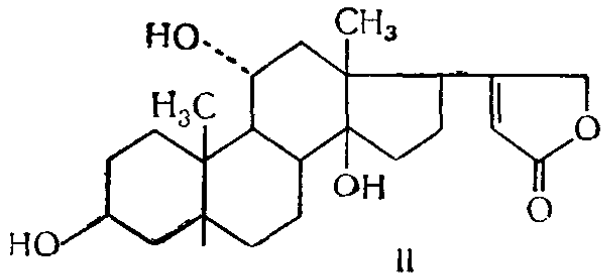


I

В свое время он ничем не выделялся из гаммы других кортикостероидов, выделенных из надпочечников. Но примерно 10 лет назад было обнаружено, что он является замечательным лечебным средством против ревматоидных артритов, которыми больны миллионы и десятки миллионов людей (по данным статистики США ревматоидными артритами в различной форме, от легкой до тяжелой, больны около 7 млн. человек).

Это вызвало сенсацию и огромнейший интерес к химии кортизона и кортикоидов вообще. Крупные фирмы, громадные лаборатории направили усилия именно на синтез кортизона. Накопленный химиками опыт позволял вести Δ^4-3-CO-группировку в молекулу любого стероида, цепь любой длины в положение 17 и т. д. Однако самым трудным оказалось введение кислородной функции в положение 11.

При синтезе кортизона казалось логичнее всего исходить из соединений, которые бы уже имели эту функцию в молекуле. Среди природных стероидов в этом отношении привлекателен сарментогенин, сердечный аглюкон, имеющий строение (II).



II

Действительно, сарментогенин обладает всеми необходимыми элементами для построения из него молекулы кортизона. Он имеет кислородную функцию в положении 11, цис-сочленение колец *A* и *B*, что важно для введения двойной связи, и непредельную лактонную группировку, которую легко превратить в оксиацетоновую простым озонированием.

Сарментогенин встречается в различных видах строфанта, растущих в тропиках; большое число видов строфанта имеется в Африке. Была организована специальная экспедиция для поисков наилучших видов этих растений, чтобы извлечь из них сарментогенин. Выяснилось, что содержание сарментогенина в наилучших образцах растений составляет 0,1—0,3%, что выращивать эти растения очень трудно и что содержание в них сарментогенина, в зависимости от условий выращивания и климата, сильно колеблется, главным образом, в сторону понижения.

Поскольку к этому времени были разработаны пути синтеза кортизона из других соединений, гораздо более доступных и дешевых, эта работа не получила развития. Но в дальнейшем, если селекционерам удастся вывести какие-либо особые сорта строфанта, эти соединения, может быть, и получат практическое применение. Поэтому стоит, прежде всего, остановиться на синтезе кортизона из сарментогенина.

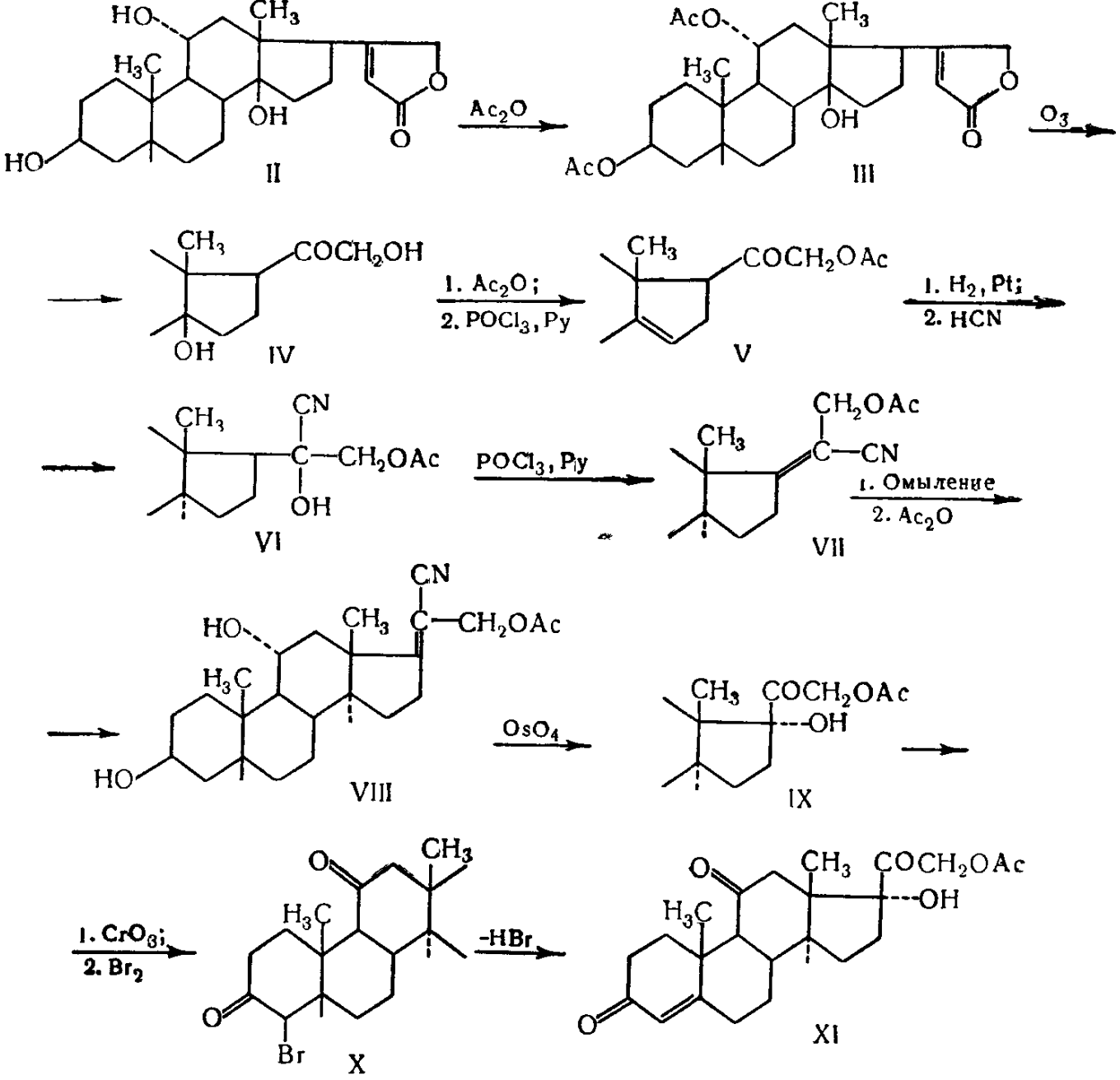
Сарментогенин ацетилируют и его диацетат (III) подвергают озонолизу. Полученное соединение с оксиацетильной боковой цепью (IV) вновь ацетилируют и дегидратируют с помощью хлорокиси фосфора в пиридине. При этом третичная гидроксильная группа удаляется и образуется непредельное соединение (V), которое при гидрировании дает стероид с нормальным транс-сочленением колец *C* и *D*. Дальше действием синильной кислоты получают оксинитрил (VI) и вновь действуют на него хлорокисью фосфора.

На этой стадии триацетат (VII) подвергают омылению (на последующих стадиях это будет трудно), причем омыляют все три ацетоксигруппы и после частично ацетилируют их с тем, чтобы защитить 21-оксигруппу. Полученный непредельный нитрил (VIII) окисляют четырехокисью осмия в соединение (IX). Ранее уже упоминалось, что окисление можно вести не только четырехокисью осмия, но в некоторых случаях и перманганатом в присутствии лишь следов четырехокиси осмия. Затем соединение (IX) окисляют хромовым ангидридом, причем обе вторичные спиртовые группы переходят в кетонные, а полученный дикетон бромируют (см. стр. 366).

При этом образуется 4-бромпроизводное, из которого после отщепления HBr получают ацетат кортизона (XI). Схема состоит (если учесть все реакции ацетилирования) из 11 стадий. Некоторые из них, например стадии гидрирования и ацетилирования, идут количественно.

Очень слабым местом является окисление хромовым ангидридом, так как при этом легко задеть и отщепить боковую цепь. Другим слабым местом является отщепление бромистого водорода. Бромистый водород можно отщеплять нагреванием с основаниями, пиридином или коллидином. Но лучше действовать динитрофенилгидразином или семикарбазидом, а затем пировиноградной кислотой. В этом случае выход ацетата кортизона составляет около 80%. Этот способ сейчас является общепринятым. Лишь в последнее время он начинает вытесняться другими способами, в частности, для отщепления HBr используют бромистый литий.

Практически важным оказался способ получения кортизона из дезоксихолевой кислоты, где имеется функциональный заместитель в кольце С., правда, не в положении 11, а в положении 12. В этом соединении можно сравнительно легко провести деградацию боковой цепи (этот процесс уже описывался, когда рассматривались способы получения прогестерона и дезоксикортикостерона) и легко окислить OH-группы; трудность заключалась только в том, чтобы кислородную функцию перевести из положения 12 в положение 11. Попутно возник и вопрос, в какой последовательности проводить превращения, т. е. следует ли сначала удалить боковую цепь, ввести кетонную группу, а введением



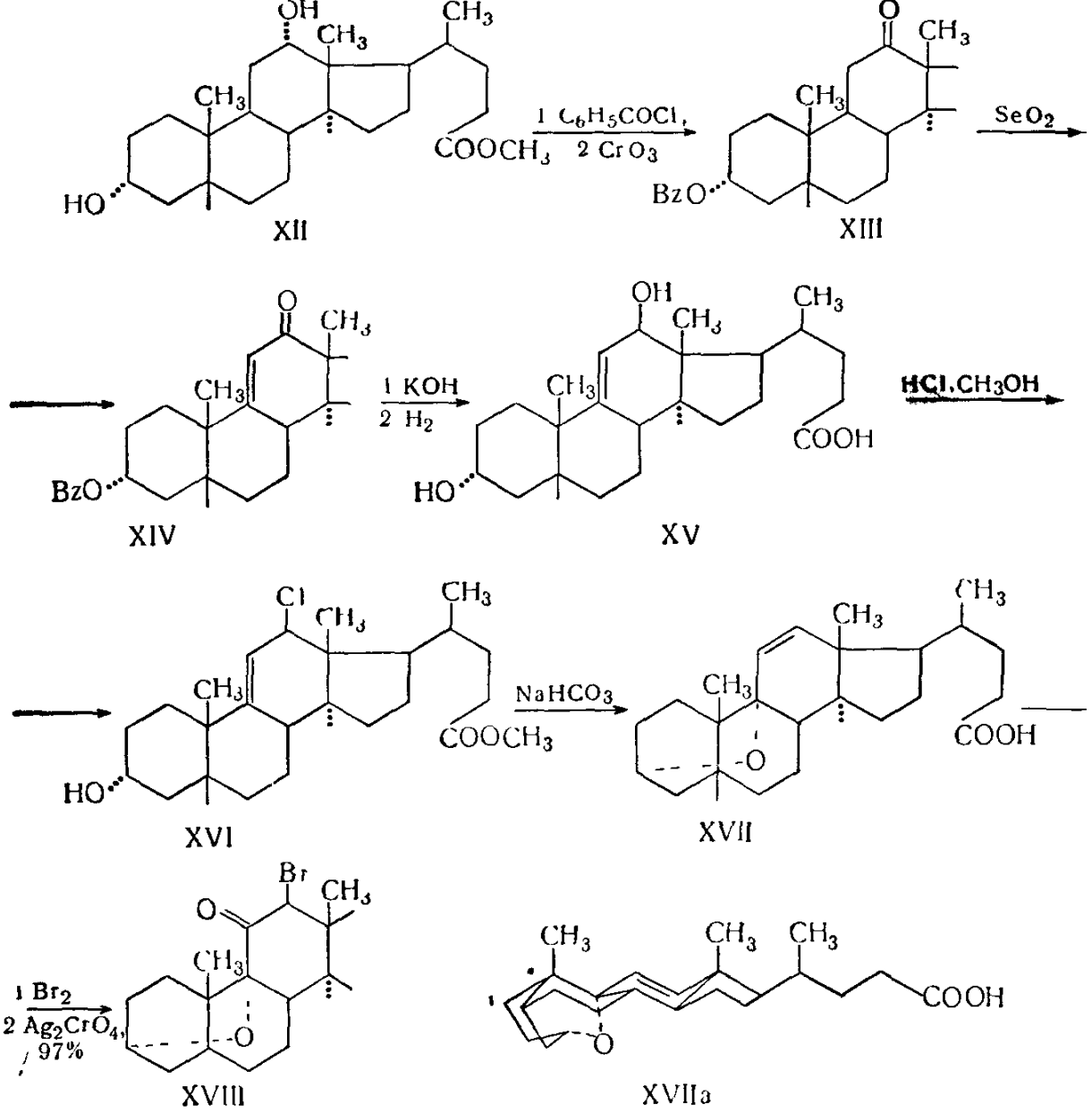
кислородной функции заниматься потом, или прежде всего ввести кислородную функцию в положение 11?

Эти вопросы встали перед исследователями, которые вели работу в самых разнообразных направлениях. Рамки книги не дают возможности коснуться и одной десятой части этих работ, и придется ограничиться лишь описанием способа фирмы «Мерк» (США), который получил промышленное завершение.

По этому способу исходили из метилового эфира дезоксихолевой кислоты (XII), бензоилированием защищали 3-оксигруппу и окислением вводили кетогруппу в положение 12. Полученный кетон (XIII) обрабатывали двуокисью селена в хлорбензоле при кипячении, причем с высоким выходом протекала реакция дегидрирования в непредельный кетон (XIV). Действием едкого кали на последний удалялась бензоильная группа и соединение гидрировалось в полициклический аллиловый спирт (XV); при этом двойная связь сохранялась незатронутой.

Затем действием метилового спирта и хлористого водорода 12-гидроксильная группа заменялась на хлор (см. стр. 367).

Далее следовала замечательная реакция. При действии бикарбоната на хлорид (XVI) отщеплялся хлористый водород и образовывалась циклическая окись (XVII) необычного строения с двойной связью в положении 11—12, удобной для последующих химических превращений.



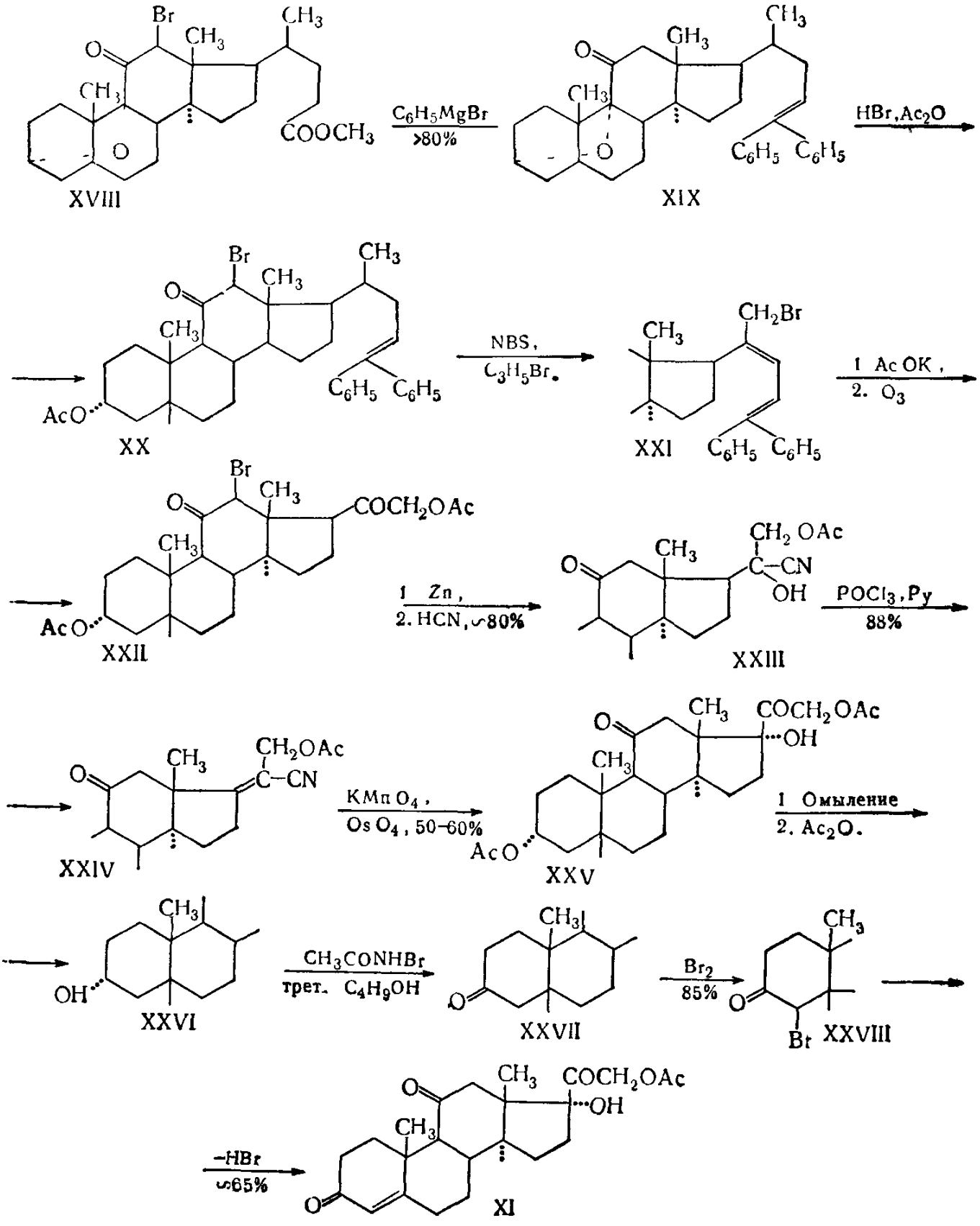
На этой стадии выход конечного продукта, считая на дезоксихолевую кислоту, составил около 60%.

Необходимо остановиться на некоторых свойствах окиси (XVII). На первый взгляд кажется, что углеродные атомы $C_{(3)}$ и $C_{(9)}$ расположены далеко один от другого и образование окиси должно быть затруднено, если вообще оно возможно. Хорошо известно, что шестичленные кольца в стероидах в нормальном положении имеют форму кресла. Однако в условиях химической реакции креслообразная форма кольца *A* легко может переходить в ваннообразную. Тогда атомы $C_{(3)}$ и $C_{(9)}$ сближаются, в результате аллильной перегруппировки двойная связь передвигается в положение 11—12 и образование окиси (XVIII) становится возможным. Как видно из формулы (XVII а), положения 3 и 9 не так далеко одно от другого, и окись имеет вполне нормальное ненапряженное строение.

Последовательным бромированием и действием хромовокислого серебра окись (XVII) перевели в бромкетон (XVIII), который, как оказалось, имеет кетогруппу именно в положении 11. На этой стадии уже можно было приступить к деградации боковой цепи. После этерификации продукт обрабатывали фенилмагнийбромидом по обычному методу деградации Барбье — Виланда, который уже рассматривался выше. Интересно, что фенилмагнийбромид, действуя на карбоксильную группу, не действовал на кетонную, но зато удалял бром. Окисное кольцо оставалось не тронутым и в результате получалось соединение (XIX).

Казалось, следуя классическому способу Барбье — Виланда, надо бы далее получать карбоновую кислоту, этерифицировать ее, снова действовать фенилмагнийбромидом, снова окислять и т. д., пока не останется цепь из двух углеродных атомов. Практически это оказалось ненужным, так как по мере укорочения боковой цепи окисное кольцо размыкается все труднее.

Объяснения этому факту до сих пор не найдено.



На этой стадии пришлось расщепить кольцо действием бромистого водорода и уксусного ангидрида. Казалось бы, при этом должно получиться 9-бромсоединение, но вследствие перегруппировки образуется 12-бромсоединение (XX). На последнее действуют N-бромсукциними-

дом в присутствии аллилбромида Аллилбромид очень легко присоединяет молекулу бромистого водорода и выполняет ту же роль, какую выполняет пиридин или хинолин Таким образом, в одну стадию происходит аллильное бромирование, дегидробромирование и вновь аллильное бромирование, в результате чего с выходом 60—65% образуется соединение (XXI). Дальше действуют ацетатом калия и затем озоном, причем приходят к производному прегнана (XXII). Что касается брома в положении 12, который здесь является совершенно лишним, то его легко удалить цинком, не затрагивая остальных частей молекулы. После этого остается ввести лишь 17-оксигруппу, по способу, приведенному выше в синтезе кортизона из сарментогенина действием синильной кислоты с последующей дегидратацией образовавшегося циангидрина (XXIII) хлорокисью фосфора.

Полученный непредельный нитрил (XXIV) окисляют. Способ окисления его в соединение (XXV) точно не описан, но, вероятно, он заключается в реакции с OsO_4 или марганцевокислым калием в присутствии OsO_4.

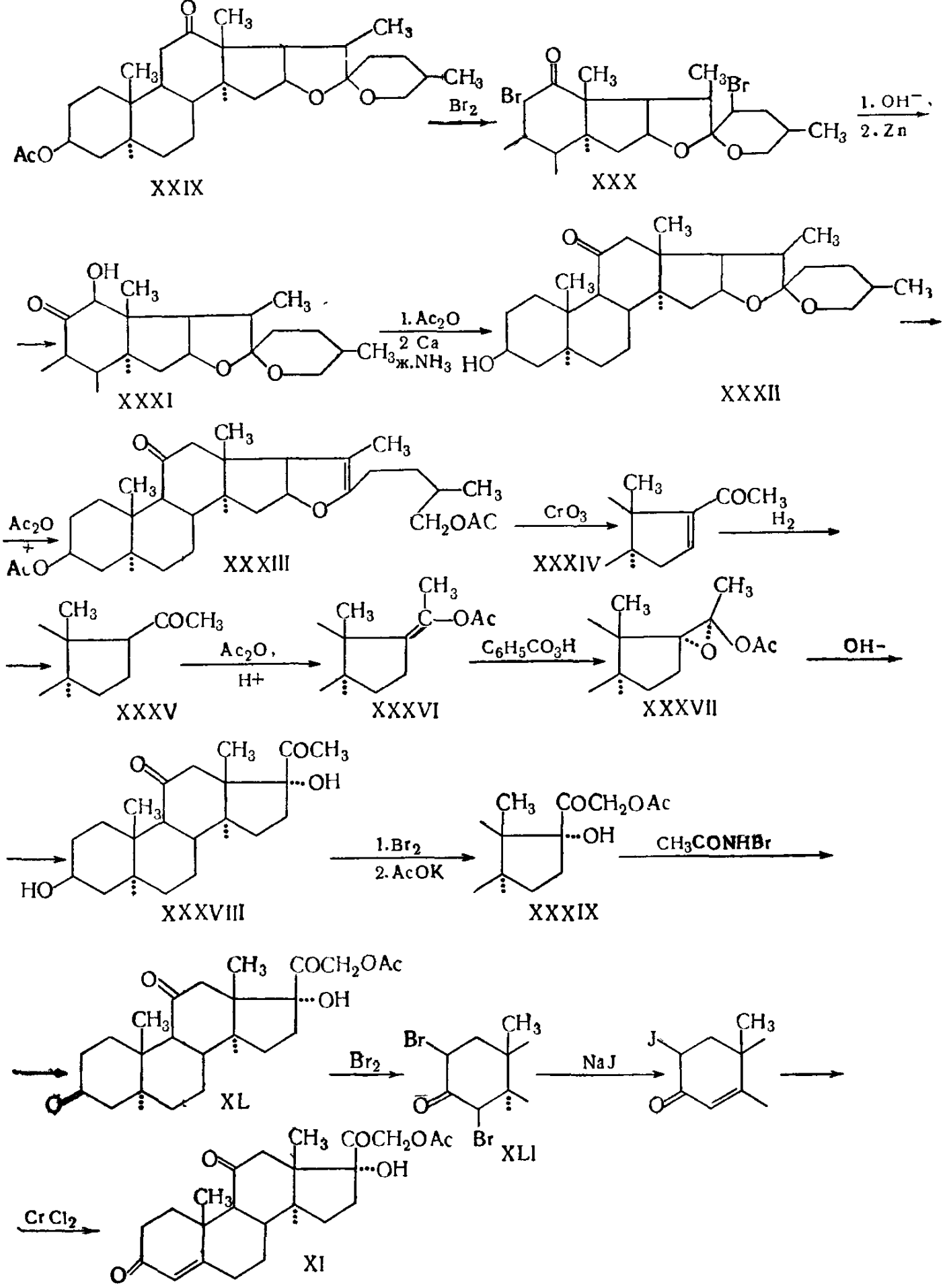
Дальше остается только омылить 3-ацетоксигруппу, окислить в полученном диоле (XXVI) 3-ОН-группу до карбонильной и ввести двойную связь. Все это делается по тем методам, которые были изложены раньше.

В качестве окислителя обычно употребляют не хромовый ангидрид (он действует на все функциональные группы и, главное, на боковую цепь), а N-бромацетамид в третичном бутиловом спирте. Дальше следует бромирование трикетона (XXV) и дегидробромирование 4-бромпроизводного (XXVIII) теми способами, о которых говорили выше, в результате чего получается кортизонацетат (XI) Общий выход, считая не дезоксихолевую кислоту, составляет 3—5%. Всех стадий свыше 30 (сейчас имеются данные, что по улучшенной схеме выход превышает 10%).

Даже такой малый процент выхода дал возможность выпустить на рынок кортизон, который является важнейшим терапевтическим средством. Этим способом были приготовлены тонны кортизона. Однако огромный спрос на него вскоре выявил нехватку исходного сырья, и поэтому продолжались работы по превращению других природных соединений в кортикоидные гормоны.

Интересен синтез кортизона из гекогенина, имеющего, как и дезоксихолевая кислота, кислородную функцию в положении 12. Преимущество этого соединения в том, что оно имеет не оксигруппу, а кетогруппу, и расщеплять спиртокетальную цепь гораздо проще, чем боковую цепь дезоксихолевой кислоты. Правда, гекогенин имеет кольца *A* и *B* сочлененными в транс-положении, но это не смутило химиков, так как к этому времени был разработан способ введения двойной связи в нужном положении также и для *A* — *B*-транс-стероидов.

Первой стадией этого синтеза является бромирование ацетата гекогенина (XXIX). Естественно, бром становится в α-положение к кетогруппе, а, кроме того, еще в спирокетальную цепь в положение 23. Это дибромсоединение (XXX) омыляли щелочью, причем проходила не только замена брома на гидроксил, но и прототропная перегруппировка, в результате чего с выходом свыше 60% образовалось 11-кетосоединение которое дебромировали цинком в кетол (XXXI). При восстановлении диацетата (XXXI) щелочными металлами 12-ацетоксигруппа элиминировалась и был получен 11-кетотигогенин (XXXII) с выходом 85%. Столь высокие выходы предопределили внедрение этого способа в промышленность. Надо отметить, что восстановление самого кетола (XXXI) приводит в основном к 11,12-диолу.



Следующей стадией было расщепление спирокетальной группировки, что достигалось нагреванием (XXXII) с уксусным ангидридом или любым другим достаточно высоко кипящим ангидридом.

Продукт расщепления (XXXIII) сразу же, без выделения из реакционной смеси, окисляли в дикетон (XXXIV), чрезвычайно сходный с дегидропрегненолоном, но имеющий 11-CO-группу. Напрашивалось само собой эпоксидировать Δ^{16}-двойную связь, затем расщепить окисное

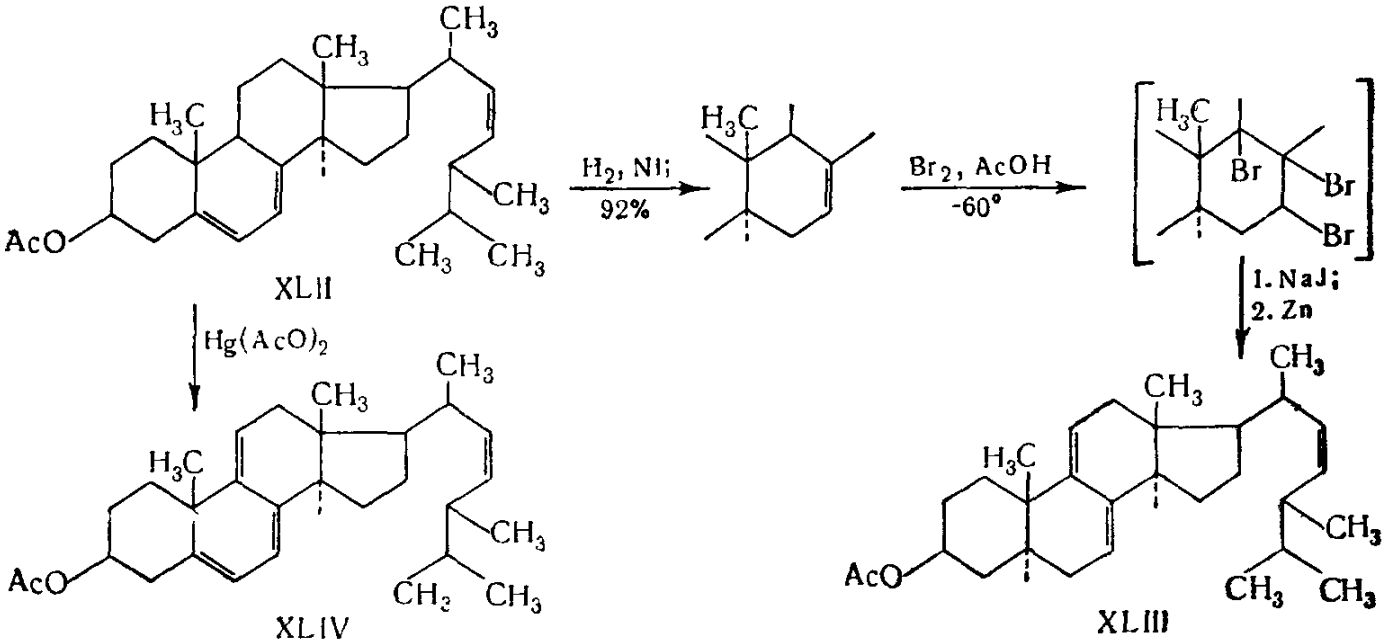
кольцо и ввести таким образом 17-ОН-группу. Однако это не было сделано Согласно цитируемой работе, дикетон (XXXIV) гидрировали, гидрированный дикетон (XXXV) обрабатывали уксусным ангидридом, взятым в большом избытке, в присутствии кислоты, причем образовался соответствующий ацетат (XXXVI). На него действовали надбензойной кислотой, а на образовавшийся эпоксид (XXXVII) — щелочью, причем окисное кольцо раскрывалось. Кетон (XXXVIII) бромировали одной молекулой брома, который преимущественно входил в метильную группу боковой цепи, и бромкетон обрабатывали ацетатом калия. Образовавшийся ацетоксидикетон (XXXIX) окисляли с помощью N-бромацетамида (или хромовым ангидридом в ацетоне) в дигидрокортизон (XL).

При бромировании этого соединения в присутствии бромистого водорода бром встает прежде всего в положение 2, а потом только в положение 4, в результате чего получается дибромпроизводное (XLI). Последнее обрабатывали иодистым натрием, который отнимает элементы бромистоводородной кислоты с образованием Δ^4-связи и, кроме того, заменяет 2-бром на иод. Иод может быть легко удален действием тиосульфата или, по другим данным, действием хлористого хрома. В результате был получен кортизонацетат (XI). Этот способ получил промышленное осуществление в 1955 г. в Англии.

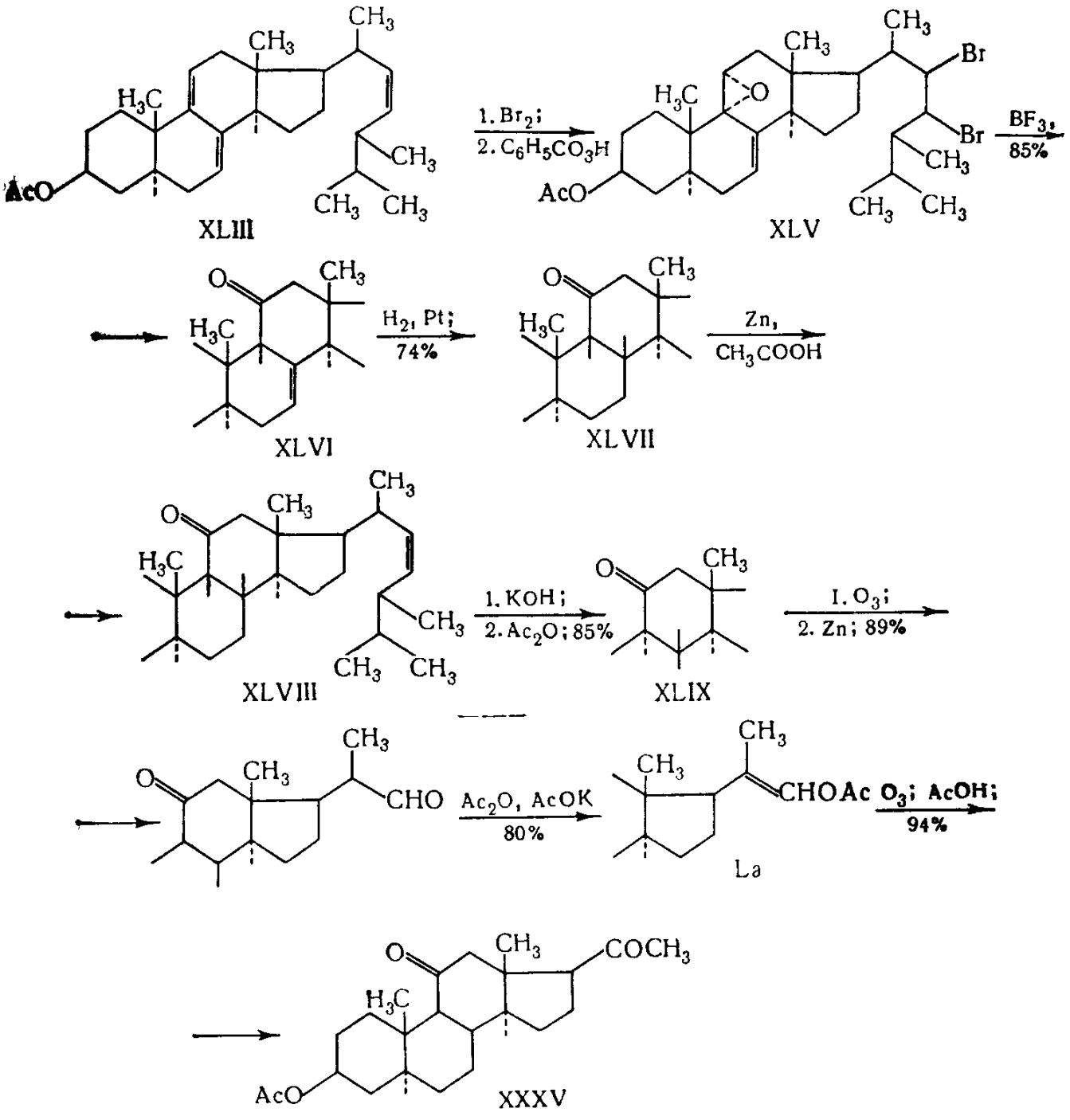
К этому же времени относится и ряд работ, в которых предлагалось исследовать в качестве исходного сырья ацетат эргостерина (XLII), т. е соединение, которое не содержит заместителя в кольце *C*.

Это соединение привлекло внимание потому, что различными и очень простыми путями оказалось возможным ввести двойную связь в положение 9—11. Так, при бромировании ацетата 5,6-дигидроэргостерина при —60° получается полибромид, строение которого пока не выяснено (при этой реакции, по-видимому, имеет место аллильное бромирование). В результате последовательной обработки полибромида иодистым натрием и цинком отщепляется молекула бромистого водорода и с выходом 65% образуется ацетат эргостатриенола (XLIII) с двойной связью в кольце *C*, которую можно использовать затем для введения кислородной функции.

Еще более простой способ заключается в окислении эргостерина ацетатом ртути. При этом сразу вводится двойная связь и образуется тетраенол (XLIV) с выходом 45%. Оба соединения (XLIII и XLIV) были предложены для синтеза кортизона.



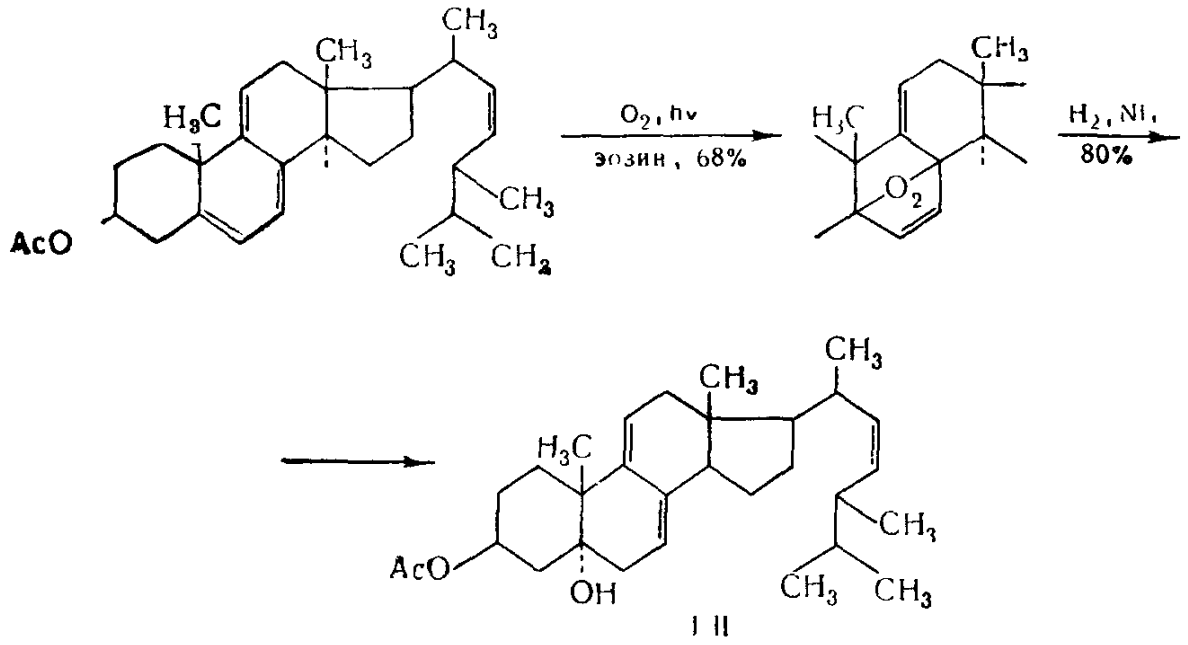
При получении кортизона из триенола (XLIII) вначале защищают бромом двойную связь в положении 22—23, а затем действуют надбензойной кислотой, причем из оставшихся двух двойных связей реагирует преимущественно связь 9—11 и образуется соответствующая α-окись (XLV). При действии трехфтористого бора эта α-окись изомеризуется в кетон (XLVI), причем кетогруппа входит в положение 11. Надо подчеркнуть, что при этом водород при С занимает не α-положение, как в природном соединении, а β-положение Дальше проводят гидрирование с платиной под давлением и удаляют Δ^7-двойную связь. Образовавшийся кетон (XLVII) обрабатывают цинком и изомеризуют нагреванием со щелочью. При этом так же, как и в классическом случае с цис-декалоном, цис-кетон (XLVIII) изомеризуется в транс-кетон (XLIX), из которого при озонировании получается альдегид (L). Действием уксусного ангидрида его превращают в енолацетат (La) и озонируют вторично. Обе реакции озонирования протекают с прекрасным выходом — свыше 90%. В результате получается тот же самый промежуточный продукт (XXXV), который мы уже имели при получении кортизона из гекогенина.



XLIII XLV XLVI XLVII XLVIII XLIX La XXXV

Выход соединения (XXXV), считая на все стадии, составляет около 40%. Переход от него к кортизону был описан выше.

Не менее интересен и поучителен аналогичный синтез кортизона, из ацетата дегидроэргостерина (XLIV). При действии на последний кислорода в присутствии эозина при облучении образуется перекись, которую гидрируют в присутствии никеля Ранея, подбирая условия таким образом, чтобы не затрагивалась двойная связь боковой цепи, необходимая в дальнейших превращениях. В результате получается соединение (LII) в процессе образования которого, несомненно, протекает аллильная изомеризация



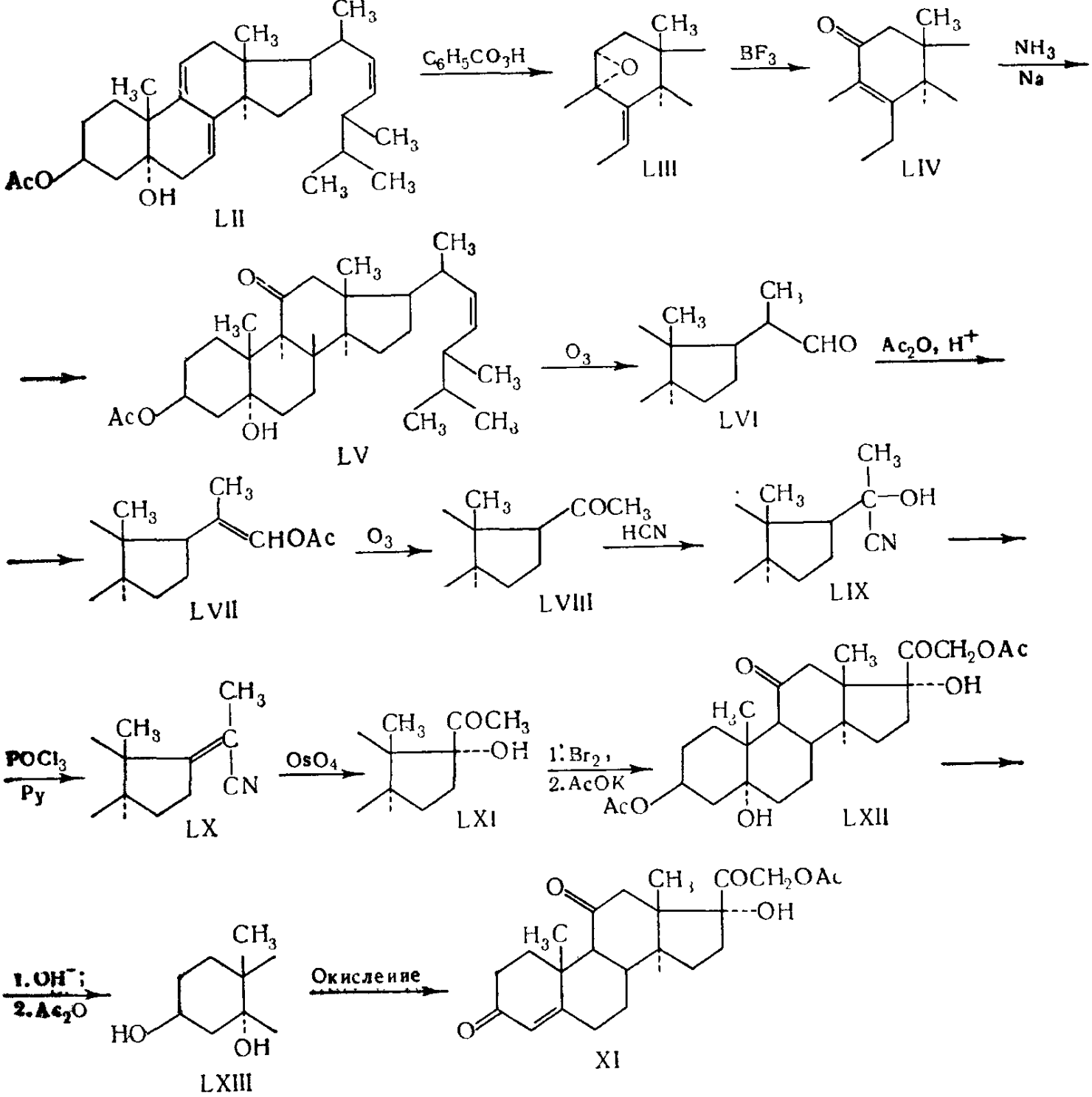
LII

Дальше следуют уже по известному пути. Действием надбензойной кислоты вводят кислородную функцию в (LII) и с помощью трехфтористого бора изомеризуют окись (LIII) в кетон (LIV). Затем $\Delta^{8/9}$-двойную связь восстанавливают натрием в жидком аммиаке, причем двойная связь в боковой цепи не затрагивается. Щелочные металлы в жидком аммиаке всегда восстанавливают двойную связь, с образованием транс-изомеров, что очень важно в данном случае. Озонированием транс-кетона (LV) получают альдегид (LVI) и затем повторяют ряд реакций, котрые мы уже рассматривали раньше. Ацетилированием получают енолацетат альдегида (LVII), а его озонированием производное прегнана (LVIII), как показано на стр. 374.

Действием синильной кислоты получают циангидрин (LIX), а его дегидратацией — непредельный нитрил (LX), который далее окисляют в кетол (LXI) с помощью четырехокиси осмия, хотя, вообще говоря, можно употреблять и другие окислители. Кетол (LXI) бромируют, полученный бромид обрабатывают ацетатом калия и получают соединение (LXII), от которого уже легко перейти к кортизону. Сначала омыляют обе ацетоксигруппы, затем частично ацетилируют, освобождая 3-оксигруппу для последующего окисления. Окисление в кислой среде приводит к промежуточному кетолу (LXIII), который легко дегидратируется в процессе реакции в ацетат кортизона (XI).

Все стадии этого синтеза проходят с хорошими выходами, но общий выход кортизона, считая на эргостерин, составляет 0,6—1%, потому что стадий довольно много.

Описан, правда, без указания выходов, другой, более короткий путь получения кортизона тоже из эргостерина. Он достоин упоминания ввиду оригинальности подхода к проблеме. Исходным веществом служит тот же самый ацетат дегидроэргостерина, как и в пре-



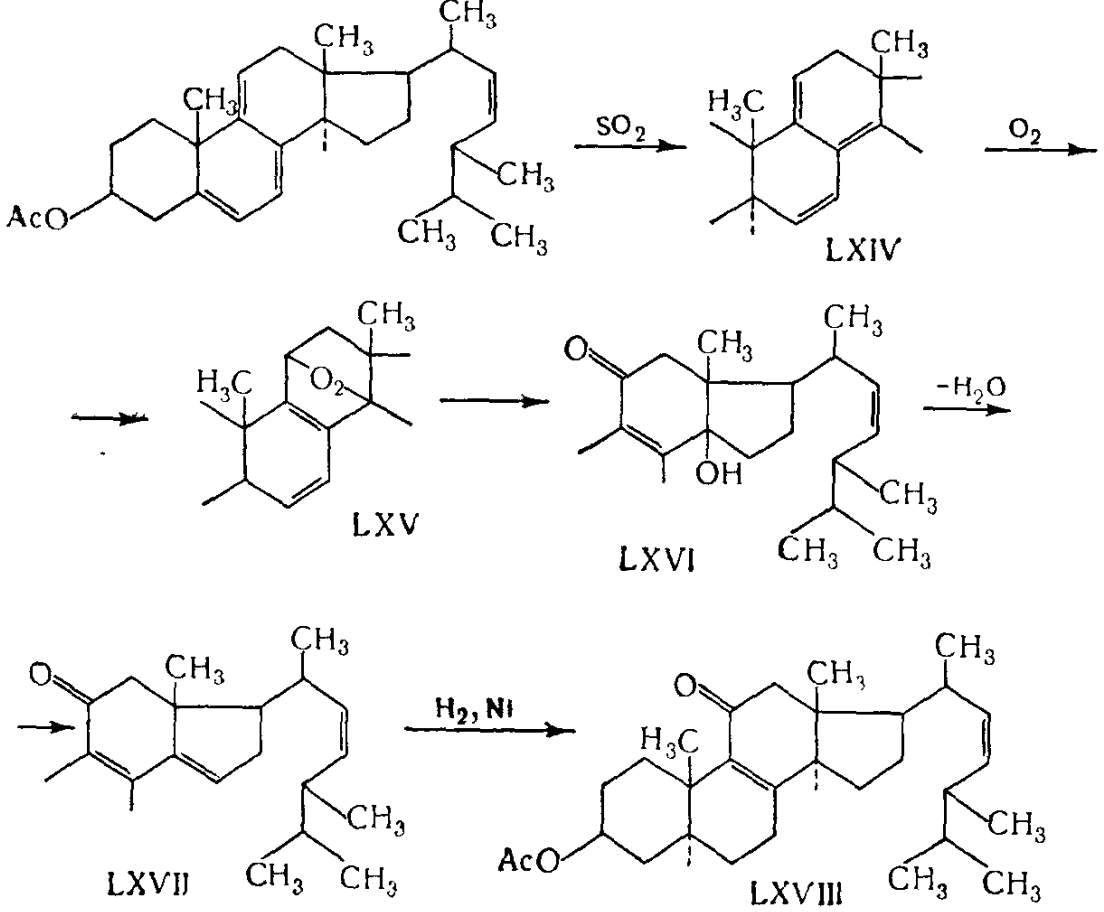
дыдущем синтезе. При растворении этого соединения в жидком сернистом ангидриде имеет место перегруппировка двойных связей и образуется триенол (LXIV).

Дальше, как и в предыдущем синтезе, действуют кислородом, который образует перекись (LXV), но не в кольце *B*, а в кольце *C* (см.. стр. 375).

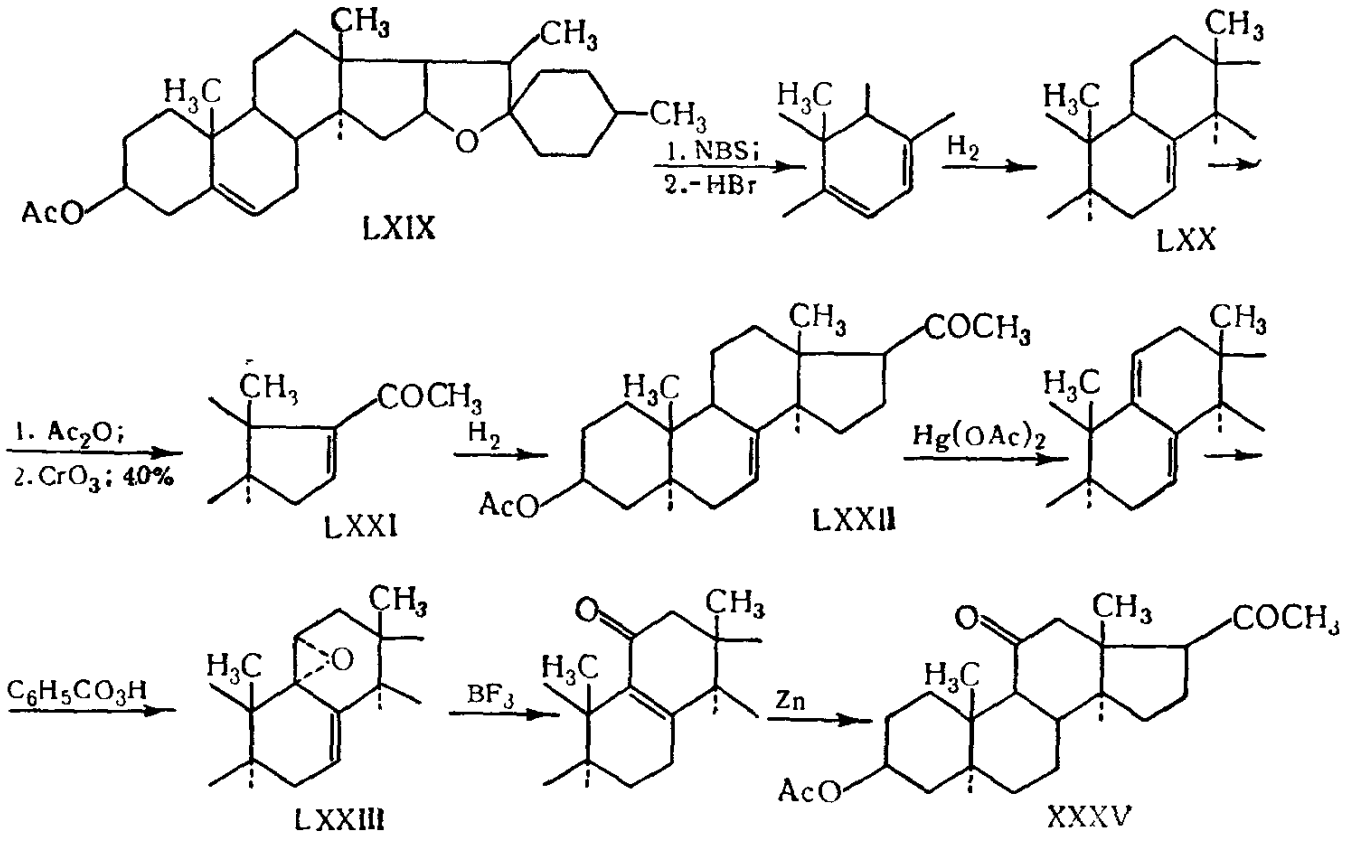
При нагревании этой перекиси в пиридине происходит изомеризация в соединении (LXVI), которое уже имеет кислородную функцию в положении 11.

Затем дегидратацией отщепляют третичный гидроксил, каким образом, авторы не указывают, но, безусловно, отщепление проходит очень легко. Полученное соединение (LXVII) гидрируется в присутствии никеля Рэнея и в результате получается 11-кетосоединение (LXVIII), от которого уже легко перейти к кортизону по схеме, указанной выше (см. также стр. 370).

Очень важен синтез кортизона из ацетата диосгенина (LXIX), не содержащего, как и эргостерин, функциональной группы в кольце *C*. При действии на него N-бромсукцинимида происходит аллильное



бромирование в кольце *B*; отщепление бромистого водорода дает соединение с таким же распределением двойных связей, как и в эргостерине, а частичное гидрирование приводит к соединению (LXX) с двойной связью в положении 7, нужном для последующего введения двойной связи в положение 9. На этой стадии проводят расщепление спирокетальной боковой цепи действием уксусного ангидрида и последующее окисление в производное прегнана (LXXI).

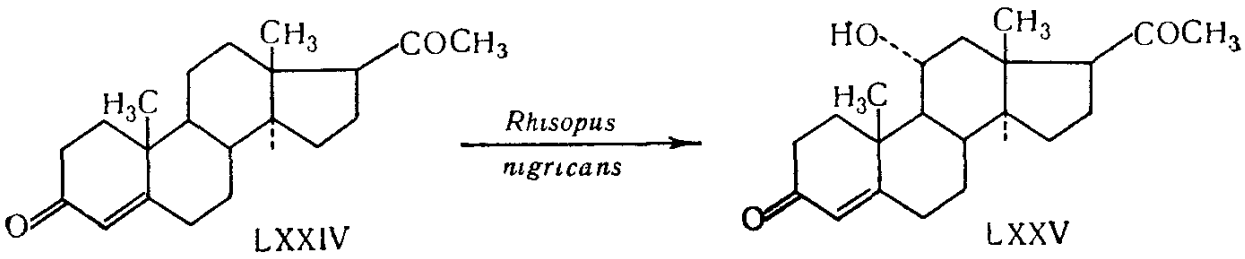


После гидрирования кетона (LXXI) получают в сущности такую же систему (LXXII), как в дигидроэргостерине, только с укороченной боковой цепью. Окислением этого соединения ацетатом ртути вводят двойную связь в положение 9—11, а действием надбензойной кислоты превращают его в 9,11-окись (LXXIII).

Последняя под влиянием трехфтористого бора изомеризуется в 11-кетосоединение, которое при восстановлении дает дикетон (XXXV). Этот же дикетон получается из гекогенина и превращение его в кортизон было описано выше (см. стр. 370).

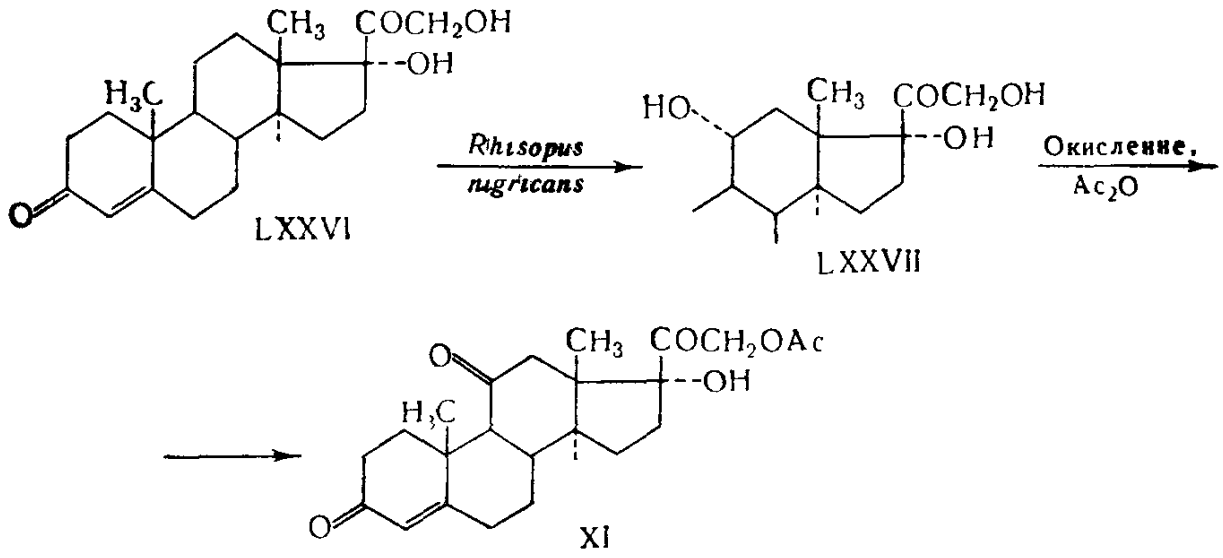
Согласно этой довольно сложной схеме, кортизон некоторое время производился в промышленном масштабе Но положение категорически изменилось с 1952 г., когда Петерсоном была открыта замечательная микробиологическая реакция окисления. Оказалось, что некоторые плесневые грибки могут окислять стероидные соединения в положение 11,— именно в то, какое нам нужно.

Так, грибок *Rhisopus nigricans* превращает прогестерон (LXXIV) в 11-оксипрогестерон (LXXV) в одну стадию, без длительной и трудной процедуры, необходимой при пользовании чисто химическими методами. Вначале выход составлял 10—15%, а потом, когда занялись селекцией, то определенные штаммы позволили увеличить выход до 80%.

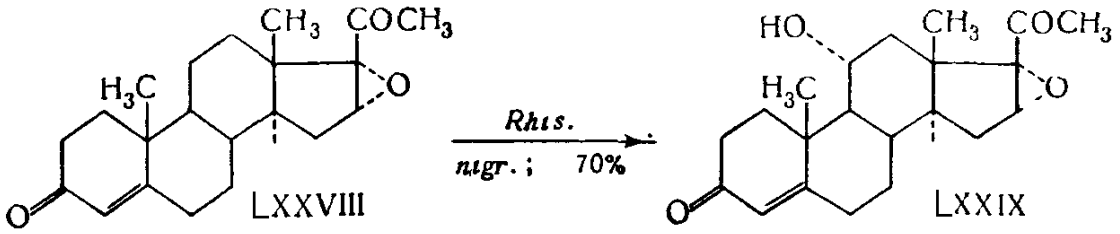


Такое открытие, конечно, коренным образом изменило всю технологию производства кортизона, поскольку прогестерон, по сравнению с другими стероидами, сравнительно доступен. Правда гидроксил при этом входит в α-, а не в β-положение, последнее было бы желательнее, потому что активны только 11β-оксистероиды. Но, имея набор химических методов, было легко справиться с такими незначительными трудностями, как превращение OH-группы в CO-группу.

В следующем, 1953 г., тот же Петерсон с сотрудниками нашел, что вещество S Рейхштейна (XXVI) в этих же условиях подвергается тому же окислительному процессу, давая 11-эпигидрокортизон (XXVII) с выходом около 60%. Окислением ацетата последнего получается кортизон-ацетат (XI); общий выход составляет 35%.



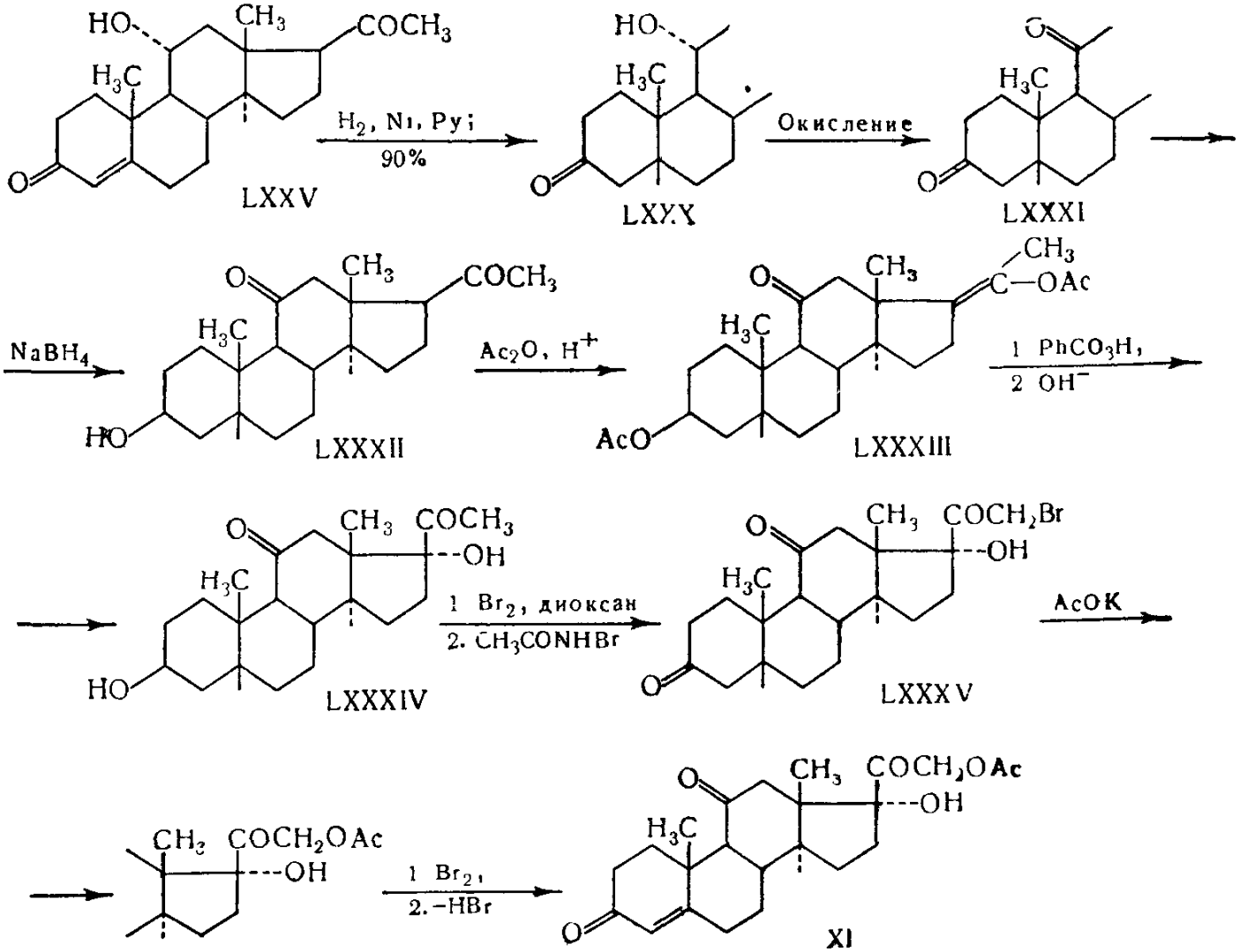
Разумеется, химики сразу начали развивать и изучать эту замечательную микробиологическую реакцию. Оказалось, что действие *Rhisopus nigricans* не зависит от вида стероидного соединения и окисление всегда идет преимущественно в положении 11. Так, например, окись дегидропрогестерона (LXXVIII), получаемая из соласодина (или диостенина) переходит в 11α-оксисоединение (LXXIX).



LXXVIII LXXIX

В настоящее время синтез кортизона и его производных осуществляется главным образом с применением микробиологических реакций

По одной из опубликованных схем исходят из прогестерона, который окисляют с помощью *Rhisopus nigricans* и полученный 11α-оксипрогестерон (LXXV), содержащий непредельную группировку, гидрируют до прегнанол-11α-диона-3,20 (LXXX). Двойную связь приходится удалять, потому что последующую стадию — бромирование — нужно проводить с соединением, не имеющим двойной связи. Выход при этом достигает 90% Дальше идет окисление в трикетон (LXXXI), который восстанавливают натрийборгидридом до дикетона (LXXXII). При этом в первую очередь восстанавливается 3-кетогруппа, а не 20-кетогруппа Затем на соединение (LXXXII) действуют уксусным ангидридом в присутствии кислоты. В результате происходит ацетилирование 3-оксигруппы и образование енолацетата (LXXXIII).

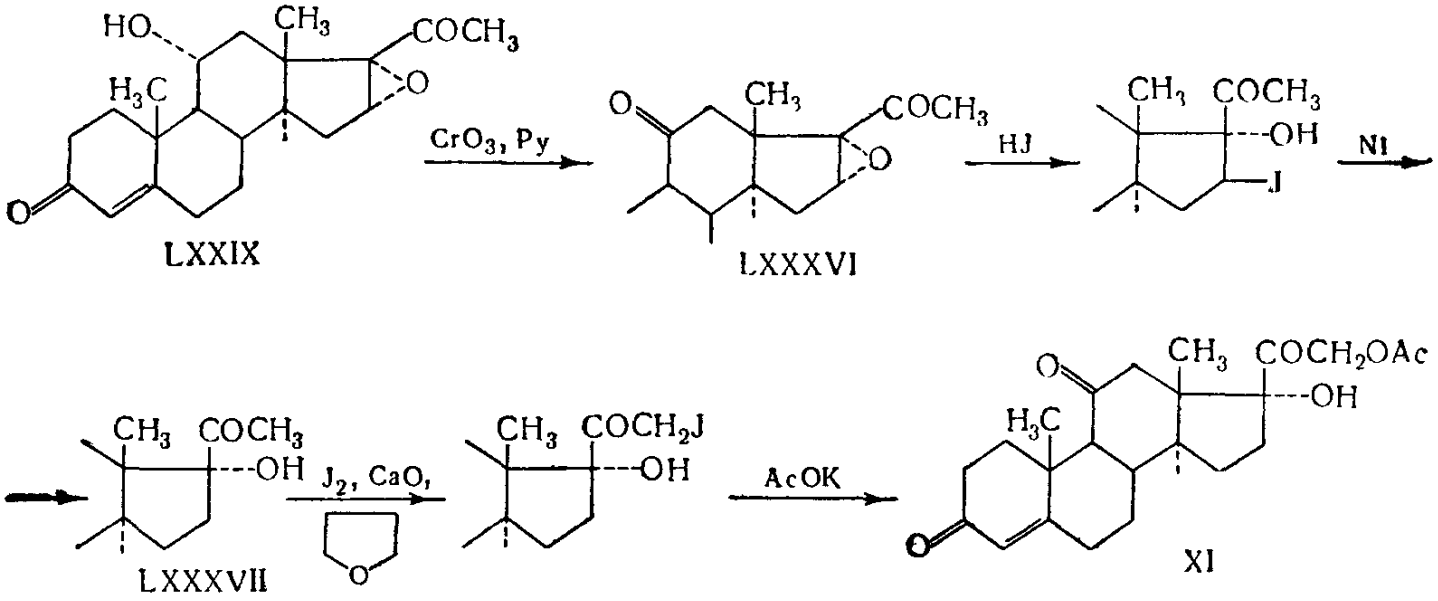


LXXV LXXX LXXXI LXXXII LXXXIII LXXXIV LXXXV XI

Последовательным действием надбензойной кислотой и щелочью получают диоксидикетон (LXXXIV). Теперь остается ввести гидроксильную группу в положение 21, окислить 3-оксигруппу до кетогруппы и ввести двойную связь. Для этого соединение (LXXXIV) бромируют, причем бромирование лучше всего осуществляется в диоксане. Полученный бромид без очистки окисляется N-бромацетамидом, который обладает замечательным свойством превращать вторичную спиртовую группу в кетонную, не затрагивая никаких других функций. Действием ацетата калия на бромид (LXXXV), как обычно, вводят кислородную функцию в положение 21, затем бромируют и, наконец отщепляют бромистый водород и получают кортизон-ацетат (XI). Отщепление бромистого водорода лучше всего производить посредством динитрофенилгидразина и последующего действия пировиноградной кислоты; выход составляет свыше 80%.

Эта схема довольно многостадийна, но выходы на всех стадиях хорошие и общий выход кортизона составляет примерно 15—18%. Однако уже первая стадия этой схемы заслуживает критики, поскольку удаляется самая ценная и самая трудносинтезируемая часть, т. е. β-непредельная кетонная группировка. Поэтому были сделаны попытки усовершенствовать этот синтез, исходя из окиси (LXXIX), о которой упоминалось выше и которая получается из соответствующего оксида микробиологическим окислением с выходом около 70%.

Окись (LXXIX) окисляют хромовым ангидридом в пиридине (так называемым реактивом Саретта) в трикетон (LXXXVI) и действуют на последний последовательно иодистоводородной кислотой, которая расщепляет эпоксидное кольцо, и затем никелем, который удаляет иод.

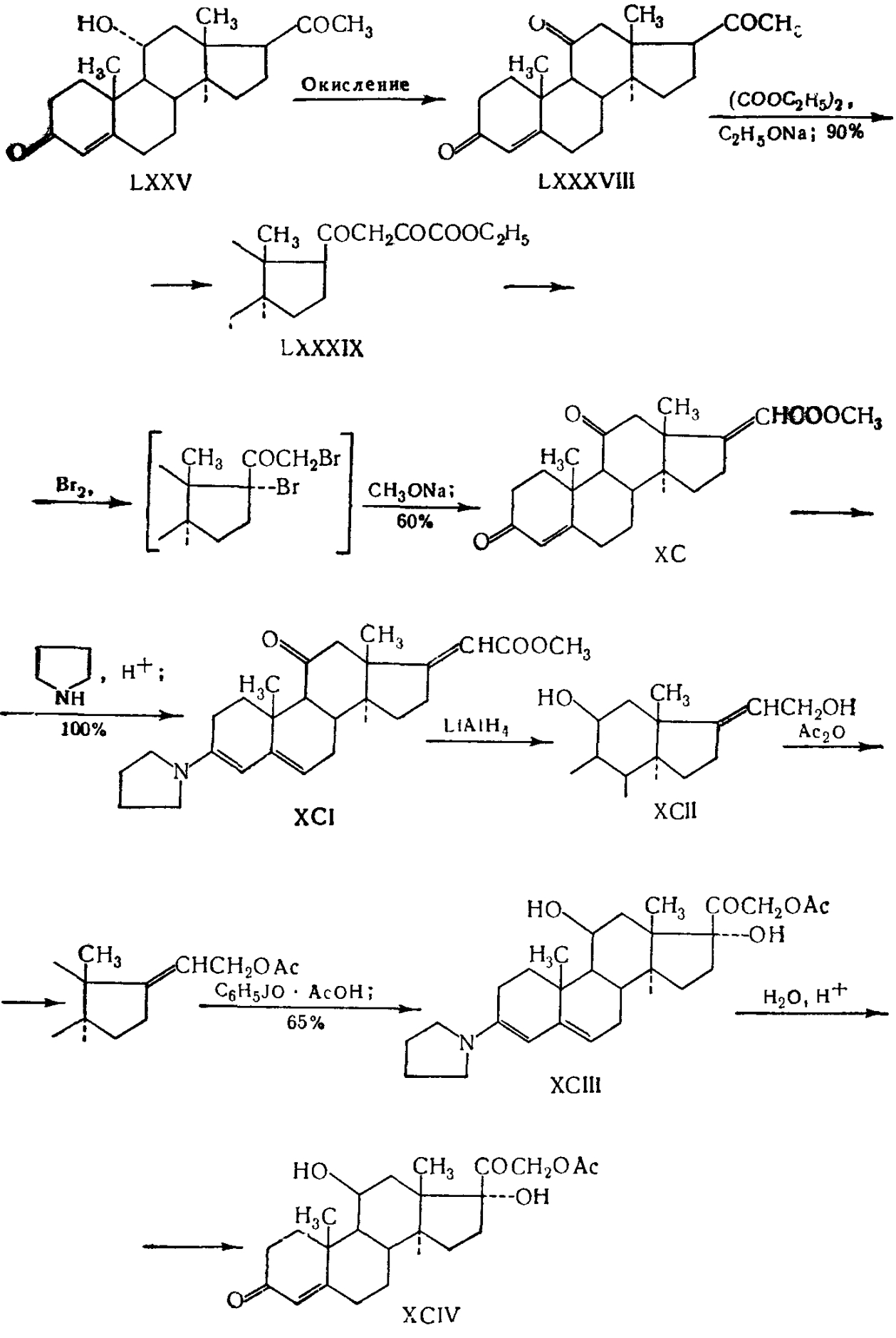


LXXIX LXXXVI LXXXVII XI

Таким образом, получается соединение (LXXXVII), отличающееся от кортизона лишь отсутствием оксигруппы в положении 21. Путем бромирования ввести эту OH-группу невозможно, так как при этом будет реагировать двойная связь, в силу чего вышеприведенный метод не имел практического значения, пока в 1958 г. Сторк (США) не нашел, что можно вводить галоид, не задевая двойной связи, если проводить реакцию с иодом в тетрагидрофуране и в присутствии окиси кальция.

Имеется и другой способ (Хогг, США), который также исходит из 11α-оксипрогестерона (LXXV). Окислением соединения (LXXV) получают трикетон (LXXXVIII), который конденсируется со щавелевым эфиром в кетоэфир (LXXXIX) с выходом 90%. При действии на последний бромом в присутствии уксуснокислого натрия образуется

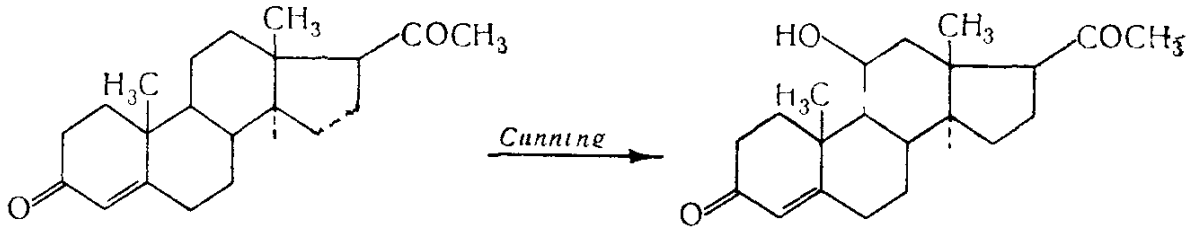
промежуточный бромид, который при обработке метилатом натрия перегруппировывается (перегруппировка Фаворского) в эфир непредельной кислоты (XC).



При перегруппировке Фаворского получают выход 60%. Затем эфир (XC) обрабатывают пироллидином, причем с выделением воды количественно образуется енамин (XCI). Интересно, что в реакцию вступает лишь кетогруппа, сопряженная с двойной связью. Такая защита

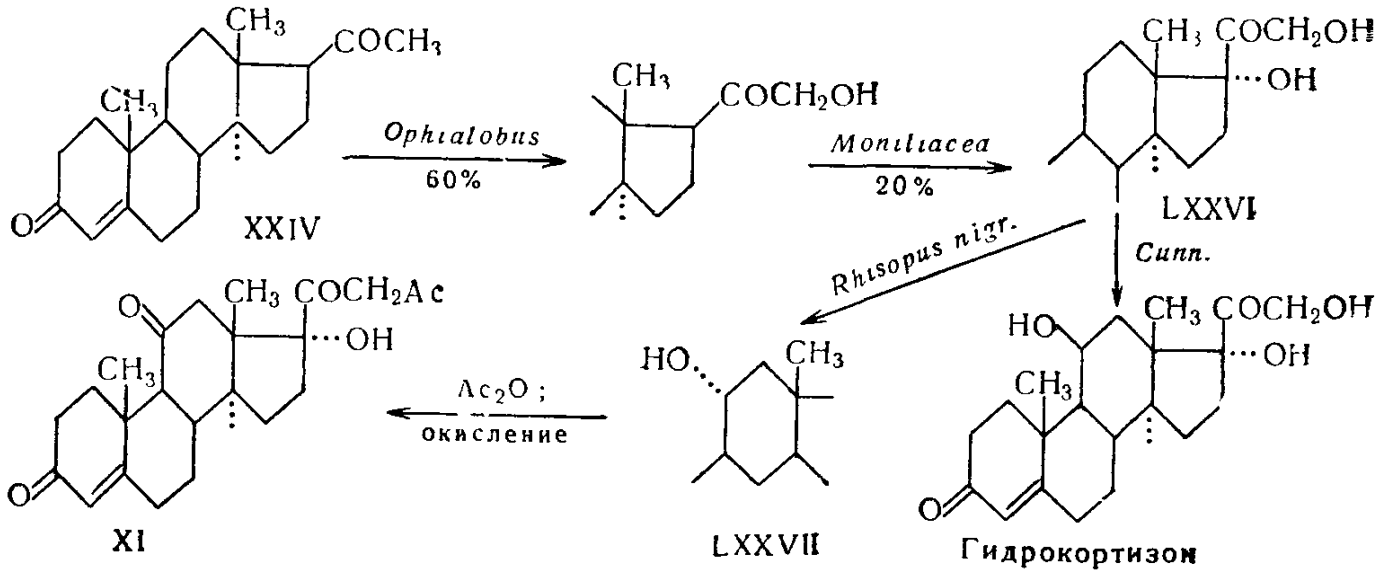
3-кетогруппы необходима потому, что далее действием алюмогидрида лития карбоксильную группу восстанавливают до первичной спиртовой группы, причем одновременно восстанавливается и 11-кетогруппа. В полученном соединении (XCII) не хватает лишь 20-кетогруппы и 17-оксигруппы. Прежде всего ацетилированием защищают 21-оксигруппу, а затем окисляют в оксикетон (XCIII). Это наиболее ответственный момент во всем синтезе Хогга. Окислителем служит ацетат иодозобензола. Можно действовать также и перекисью водорода в присутствии небольшого количества четырехокиси осмия, но при этом выход составляет лишь 30%, при действии же иодозоацетата он составляет 65%. После гидролиза получается (с общим выходом 24%) ацетат гидрокортизона (XCIV), который по терапевтическому действию выше кортизона. Вполне возможно, что этот синтез Хогга уже имеет промышленное применение.

После открытия замечательного действия грибков *Rhisopus nigricans* были предприняты обширные исследования с целью подыскать микроорганизмы, которые окисляли бы соединение, вводя сразу кетогруппу или 11β-оксигруппу. Было найдено, что прогестерон под действием микроорганизмов *Cunninghamella blakesleana* переходит в 11 β-оксипрогестерон, но выход при этом, к сожалению, не превышает 15%.



Таким же путем, исходя из вещества Рейхштейна, можно сразу получить гидрокортизон с выходом до 50% (с *Culvularia lunata*).

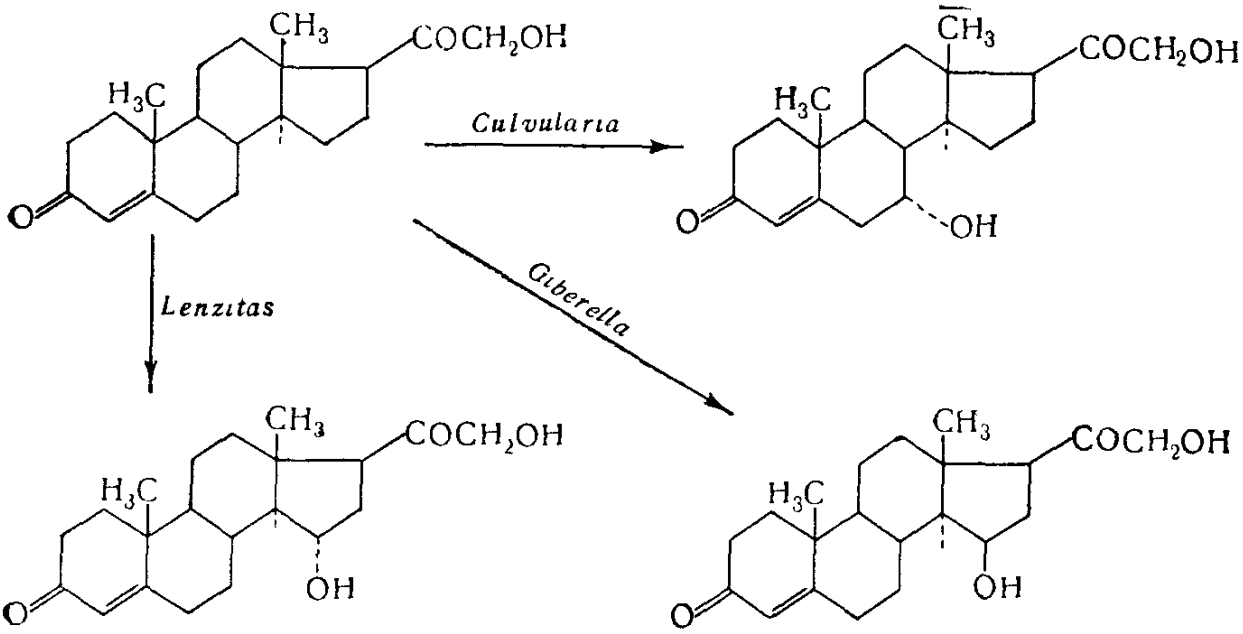
Были предложены любопытные схемы синтеза кортизона из прогестерона с применением лишь микробиологических процессов. Прогестерон окисляется в дезоксикортикостерон с помощью аскомицета *Ophialobus* с выходом 60%. Дезоксикортикостерон обрабатывают микроорганизмом *Moniliacca* и вводят 17-оксигруппу, получая вещество S (LXXVI), правда, с небольшим выходом — 20%. Дальше предлагается действовать *Rhisopus nigricans* с последующим окислением 11-эпигидрокортизона (XXVII) в кортизон или использовать *Cunninghamella* и получить гидрокортизон. В последнем случае выходы, однако, будут не особенно велики.



В этой схеме (пока, по-видимому, умозрительной) привлекает простота синтеза: в три этапа из прогестерона получается гидрокортизон.

Полезно в общих чертах рассмотреть методы микробиологического окисления вообще. Оказалось, что не только *Rhisopus nigricans,* но и *Pestalotia phoedans* обладает стереоспецифичностью окисления в положении 11. Другие микроорганизмы тоже способны окислять молекулу стероида, причем каждый вид предпочитает атаковать какое-либо определенное место.

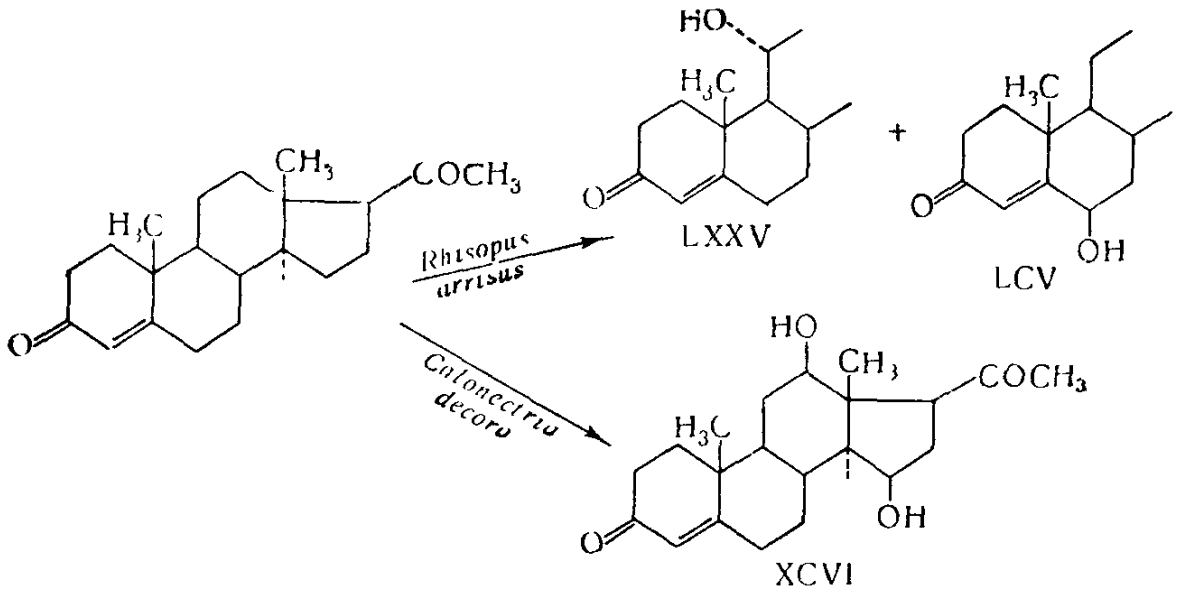
Так, *Culvularia* окисляет прогестерон в положении 7, правда, с небольшим выходом, однако если окислять дезоксикортикостерон, выход повышается до 60%.



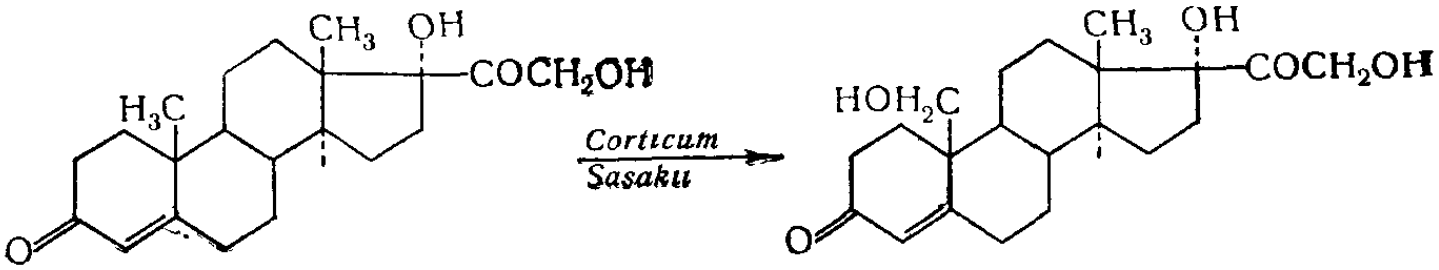
Giberella окисляет прогестерон в 15β-положение, *Lenzitas* атакует то же положение, но с образованием 15α-оксисоединения.

Окисление прогестерона с помощью *Rhisopus arrisus* приводит к двум продуктам: 11α-прогестерону (LXXV) и 6 β-оксипрогестерону (XCV), причем последний преобладает.

Calonectria decora окисляет прогестерон сразу в положение 12 и 15 до соединения (XCVI) с общим выходом 80%.



Corticum sasakii атакует ангулярную метильную группу и переводит вещество S в 17α, 19, 21-триоксипрогестерон.



Таким образом химики (и биохимики), употребляя различные микроорганизмы, имеют возможность получить самые разнообразные окисленные производные стероидов. Это отнюдь не значит, что химические методы могут быть полностью заменены биохимическими, так как исходные вещества получаются полным или частичным синтезом. Однако возможности такого микробиологического окисления огромны.

ЛИТЕРАТУРА

И Н Назаров, Л. Д. Бергельсон. Химия стероидных гормонов. М., Изд-во АН СССР, 1955, стр. 338—393.

Сб. Перспективы развития органической химии (под редакцией А. Тодда), М., ИЛ, 1959, стр. 292—296.

L. Fieser, M. Fieser. Steroids. New York, Reinold Publishing Corporation, 1959, pp. 644—678.

B. A. Hems. Chem. a. Ind., 1959, 442.

C. Meystre, E. Vischer, A Wettstein. Helv. chim. acta, 1954, **37**, 1548; **38**, 1955, 835.

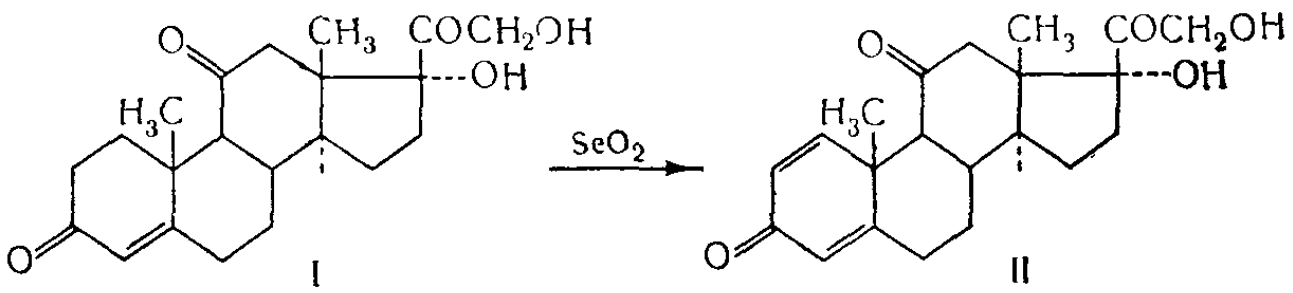
D. N. Peterson, S. N. Eppstein и др. J. Am. Chem. Soc., 1953, **75**, 408, 412, **416**.

Глава 10

ПРОИЗВОДНЫЕ И АНАЛОГИ КОРТИЗОНА

Исследование производных и аналогов кортизона, не являющихся непосредственно продуктами жизнедеятельности организма, дало интересные данные о зависимости физиологического действия от строения. Выше уже упоминалось, что гидрокортизон, где вместо 11-кетогруппы имеется β-гидроксильная группа, активнее кортизона в полтора-два раза.

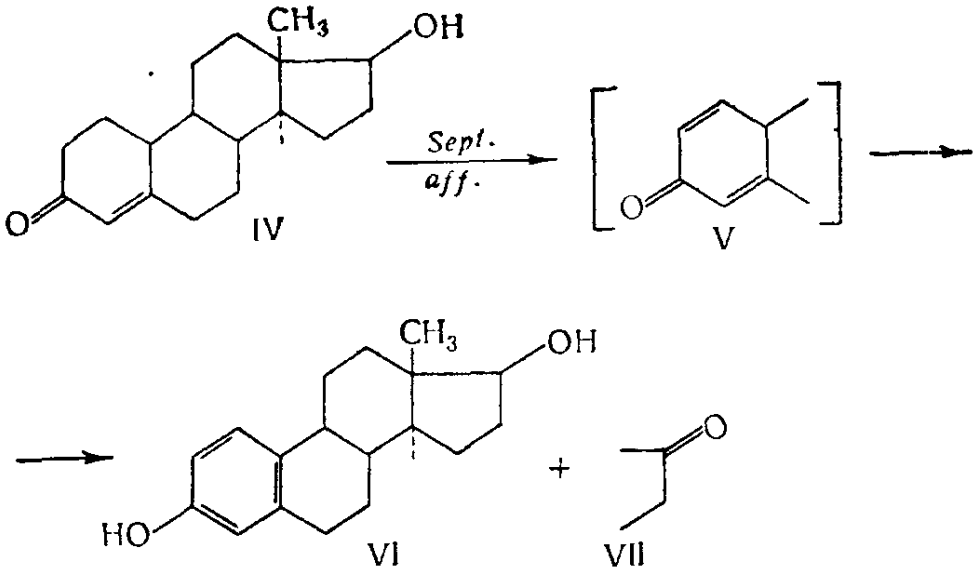
Если двойную связь в кортизоне (I) прогидрировать, то активность исчезает, если же, наоборот, ввести дополнительную двойную связь (в положении 1, 2), то активность возрастает. 1,2-Дегидрокортизон (II) вошел в клиническую практику под названием преднизона. По различным данным он в 3—5 раз активнее кортизона. Для получения 1,2-дегидрокортизона был предложен простой способ дегидрирования кортизона окисью селена в среде третичнобутилового спирта, причем, по литературным данным, выход преднизона составлял около 80%.



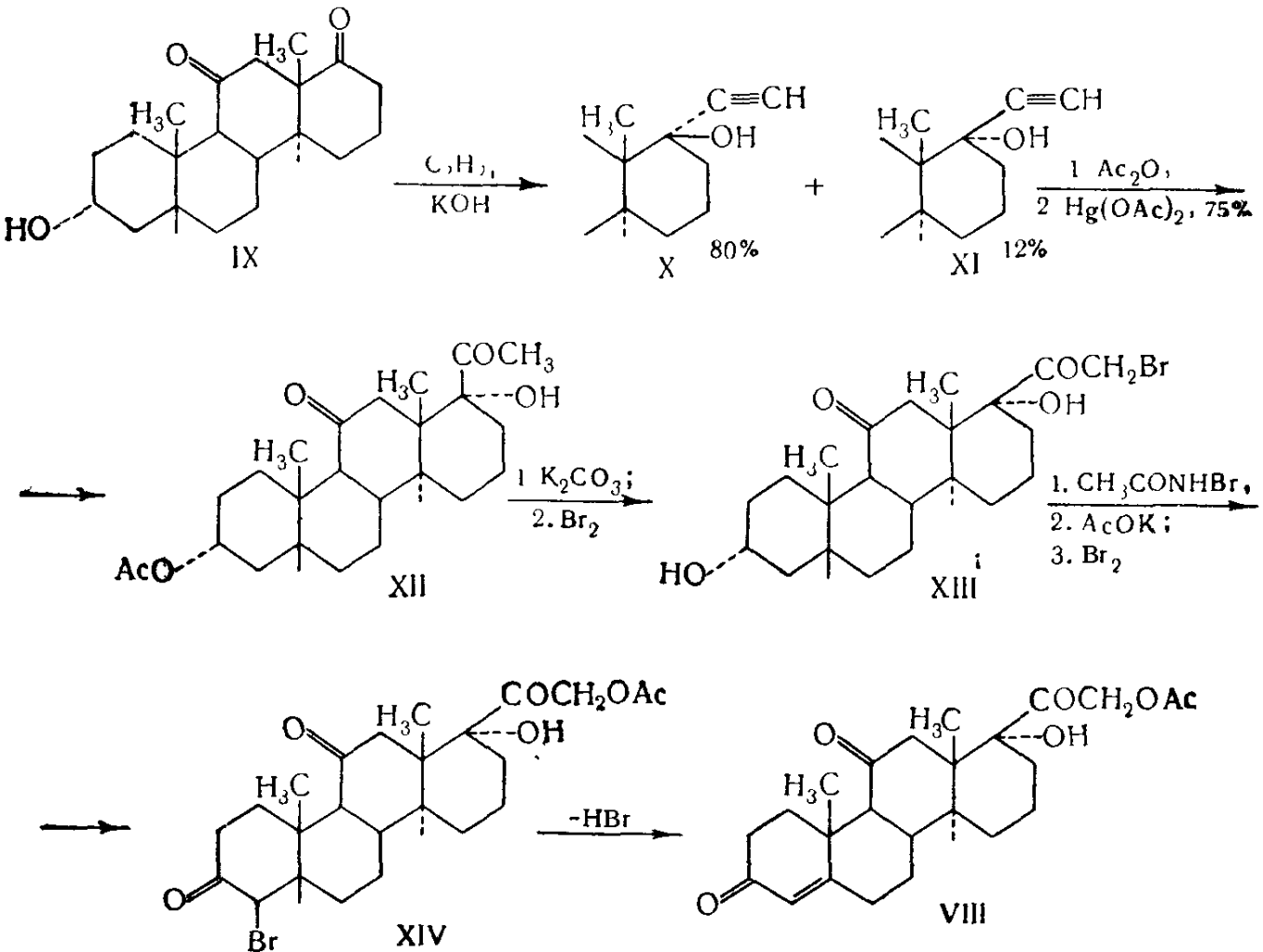
Однако при проверке этого способа было установлено, что получаемый преднизон загрязнен селенорганическими соединениями, а соответствующая очистка очень сложна. Поэтому практическое применение нашли микробиологические реакции. Так, согласно данным Гершберга (США) *Corinebacterium simplex* дает до 80% дегидрированного стероида. Из кортизона образуется преднизон, а из гидрокортизона так называемый преднизолон (III). Одновременно Шмидт-Томе в Германии предложил использовать комбинированную культуру *Rhizopus nigricans* и *Bacillus subtilis*. По его данным эта культура тоже дает до 80% Δ′-стероида В литературе упоминаются также культуры *Bacillus sphericas* и *Septomyxa affinis*. Последняя замечательна тем, что она вводит Δ′-связь, вне зависимости от того, имеется или не имеется Δ^4-двойная связь, и таким образом с ее помощью из насыщенного стероида легко получить Δ′-соединение.

С помощью микробиологического метода оказалось возможным перейти от 19-норстероидов к производным эстрона. Так 19-нортесто-

стерон (IV) при действии *Septomixa affinis* образует диенон (V), который, естественно, не может существовать в свободном состоянии и перегруппировывается сразу в фенол, т. е. эстрадиол (VI). Выход последнего невелик (12%), но одновременно происходит и образование эстрона (VII) с выходом 55%.



При замене пятичленного кольца в кортизоне на шестичленное активность уменьшается на 30—60%. Соответствующее соединение (VIII) было получено из 11-кето-*D*-гомопрегнанолона (IX) следующим образом:

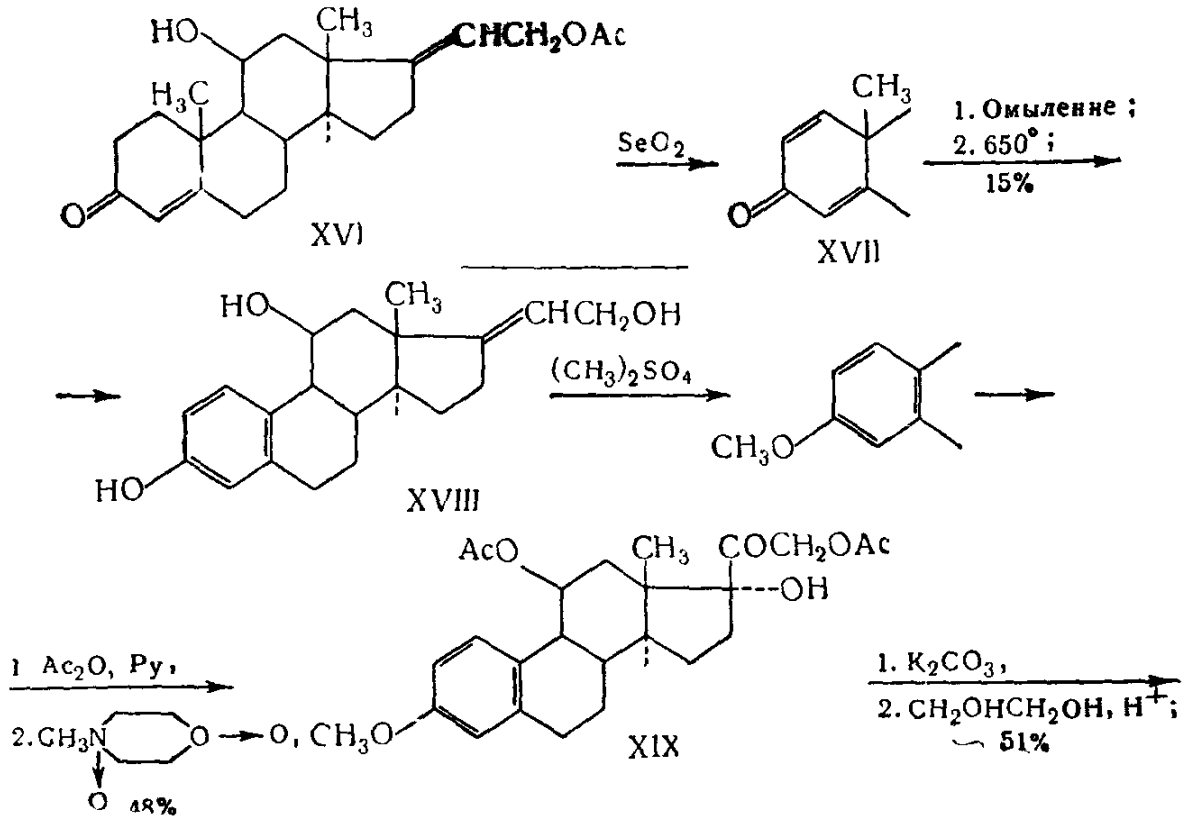


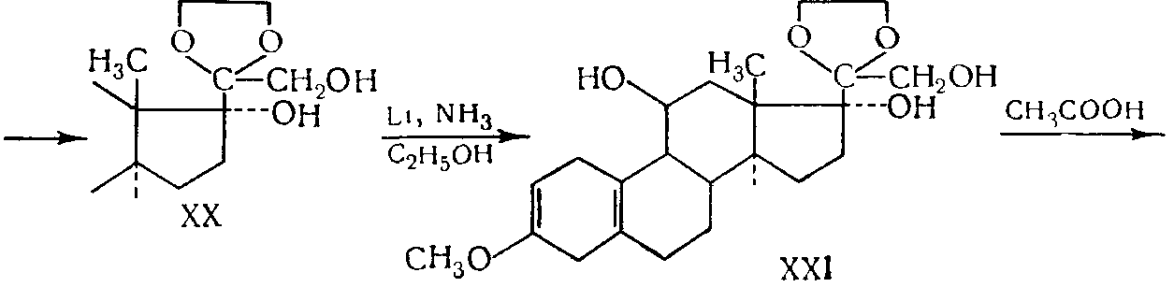
При ацетиленовом синтезе из дикетона (IX) образуются два изомера, причем можно заранее сказать, что преобладающий изомер (X, выход 80%), имеющий невыгодную конфигурацию с α-положением боковой цепи, даст физиологически неактивное вещество. Второй изомер (XI), образовавшийся в небольшом (12%) количестве, был использован для синтеза.

Прежде всего его ацилировали для того, чтобы защитить 3-ОН-группу, а затем действовали ацетатом ртути в присутствии трехфтористого бора. Реакция проходила в мягких условиях, при обычной температуре, и в результате был получен продукт гидратации ацетиленовой связи (XII). В дальнейшем это соединение омыляли поташом, т. е. освобождали 3-оксигруппу от защиты и затем бромировали, причем бром входил только в положение 21. Полученный бромид (XIII) обрабатывали N-бромацетамидом, который гладко окисляет 3-оксигруппу до кетонной. Дальше действовали ацетатом калия, заменяя бром на ацетоксигруппу и вновь бромировали, чтобы ввести бром в положение 4. Наконец, обработкой бромида (XIV) хлористым литием в диметилформамиде получили *D*-гомокортизон (VIII), оказавшийся в 2—3 раза менее активным, чем кортизон.

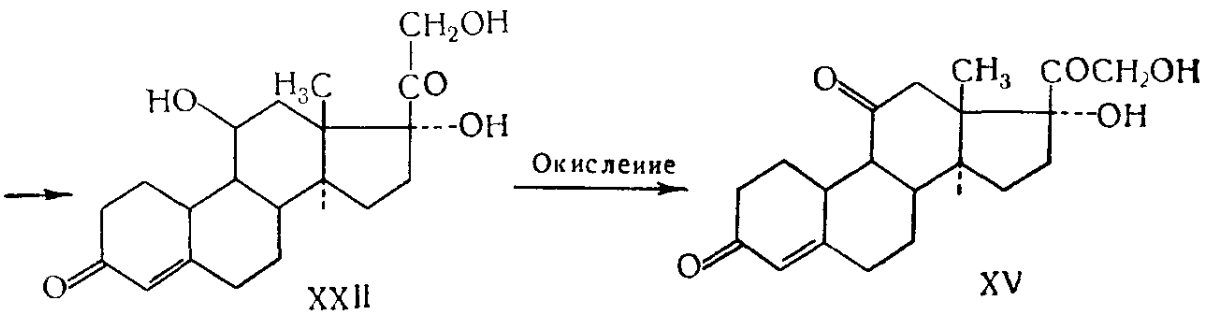
Пониженную активность показал и другой трансформированный кортикостероид — 19-норкортизон (XV). Таким образом удаление 19-метильной группы в ряду кортикоидов не дает положительного эффекта, который наблюдался при аналогичных обстоятельствах в ряде андрогенных и гестогенных гормонов.

Хогг (США), синтезировавший 19-норкортизон (XV), исходил из соединения (XVI), производное которого получено, как описано раньше (стр. 379). При дегидрировании его двуокисью селена образовалось соответствующее дегидропроизводное (XVII). Это многофункциональное соединение с двумя двойными связями и длинной цепочкой подвергали пиролизу при 650° в минеральном масле. Несмотря на столь жесткие условия, Хогг достиг своей цели и получил производное эстрона (XVIII) с выходом 15%.





XX XXI

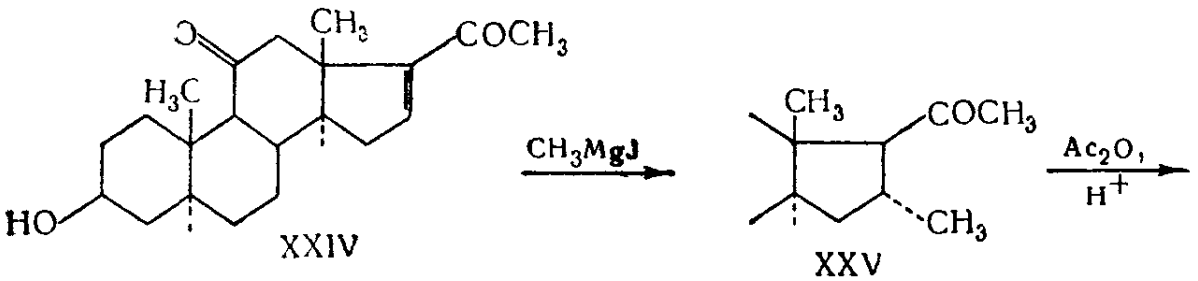


XXII XV

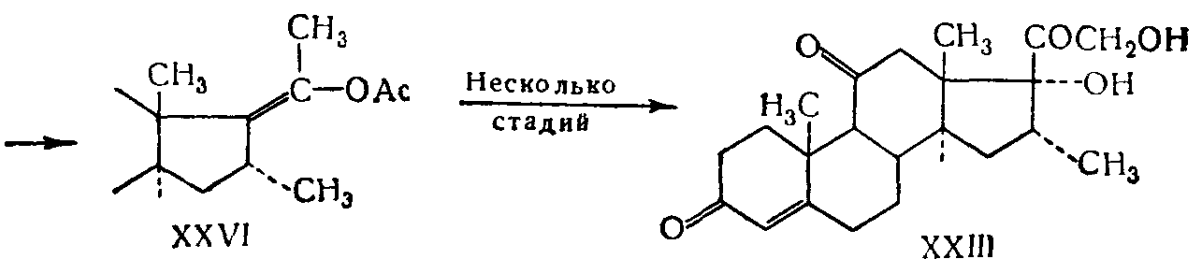
Это соединение метилировали диметилсульфатом в щелочной среде и окисляли боковую цепочку необычным реактивом — перекисью окиси N-метилморфолина, причем с выходом 48% (больше, чем при каком-либо другом способе окисления) получается соединение (XIX).

Дальше, как понятно, нужно было защитить 20-кетогруппу и восстановить ароматическое кольцо. Для этого ацетат соединения (XIX) обрабатывали этиленгликолем и соответствующий кеталь (XX) восстанавливали металлическим литием и спиртом в жидком аммиаке в соединение (XXI). Гидролизом последнего получили ацетат 19-норгидрокортизона (XXII), а его окислением и омылением 19-норкортизон (XV).

В главе о гестагенных гормонах было отмечено, что введение метильной группы или галоида в определенное место стероидной молекулы повышает физиологическую активность стероида. Оказалось, что и в молекулу кортизона можно с пользой вводить заместители. Так, Хогг обнаружил, что если ввести метильную группу в положение 16, то активность возрастает примерно на 50%. 16α-метилкортизон (XXIII) был синтезирован Хоггом из соединения (XXIV), легко получаемого из гекогенина (см. стр. 370). Действием на него метилмагнийиодида получают продукт присоединения к двойной связи (1,4-присоединение; 11-кетогруппа вследствие своей инертности реагирует очень слабо). Из соединения (XXV) получают енолацетат (XXVI), окисляют его надбензойной кислотой в окись и дальше, путем ряда известных превращений получают 16-метилкортизон (XXIII).

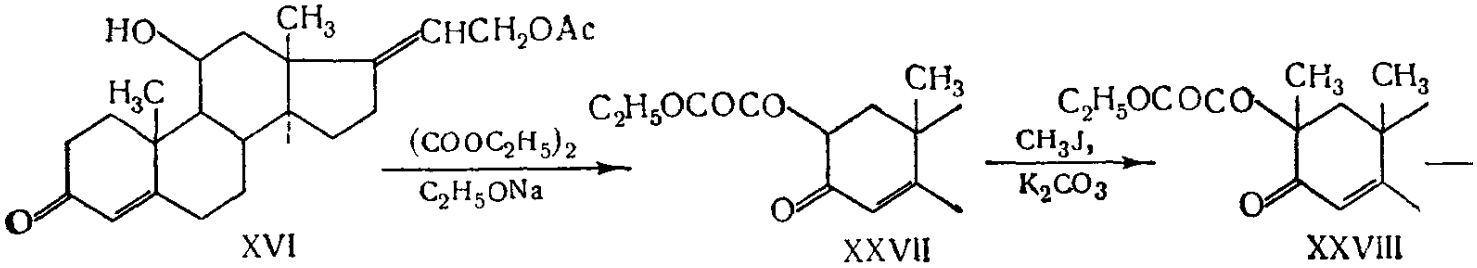


XXIV XXV

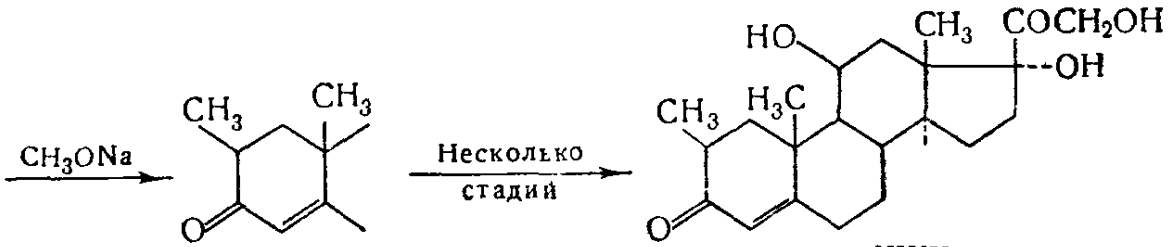


XXVI XXIII

Хогг также обнаружил, что 2-метилкортизон в несколько раз активнее кортизона. Для его получения он исходил из соединения (XVI), которое конденсировалось со щавелевым эфиром в присутствии алкоголята, причем молекула последнего вступала в положение 2. Эта стадия нужна только для активации водорода и дальнейшего алкилирования. Действительно, полученный кетоэфир (XXVII) алкилируется иодистым метилом в присутствии поташа в метильное производное (XXVIII). При нагревании последнего с метилатом натрия происходит отщепление молекулы щавелевой кислоты и образование кетона (XXIX). Общий выход на эти стадии составляет 33%.

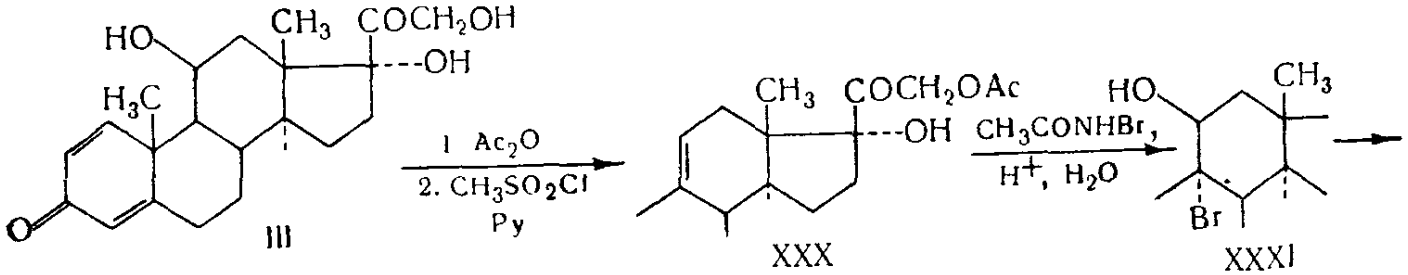


XVI XXVII XXVIII

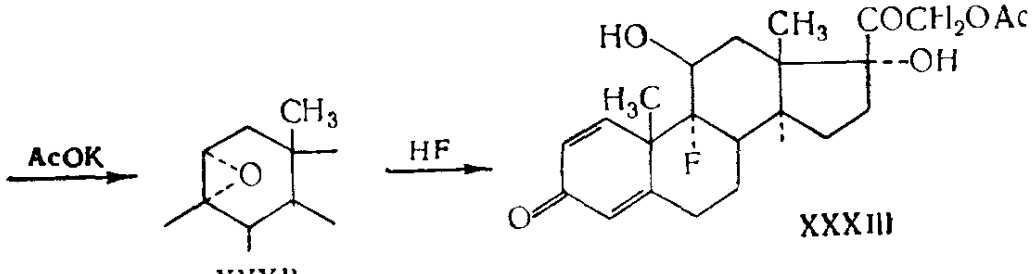


XXIX XXIXa

Дальнейшие стадии неоднократно упоминались раньше, и в результате этой цепи превращений получается 2-метилгидрокортизон (XXIXa). Его активность в 10 раз выше активности гидрокортизона. Еще удивительнее оказалось то, что введение галоида в кортизон или гидрокортизон тоже повышает их физиологическое действие. Это было открыто практически одновременно Хоггом, а также Фридом и Сабо примерно в 1955 г. Особенно интересные результаты дало введение галоида в положение 9. Обе группы химиков следовали в общем одной схеме и исходили из преднизолона (II). Ацетат последнего дегидратировали действием метансульфохлорида (Сабо) или п-толуолсульфохлорида (Хогг) в пиридине в Δ^9-соединение (XXX). Дальше при обработке этого соединения N-бромацетамидом в присутствии кислоты (обычно хлорной), происходило присоединение элементов бромноватистой кислоты, причем гидроксил входил в положение 11, а бром в положение 9.



III XXX XXXI

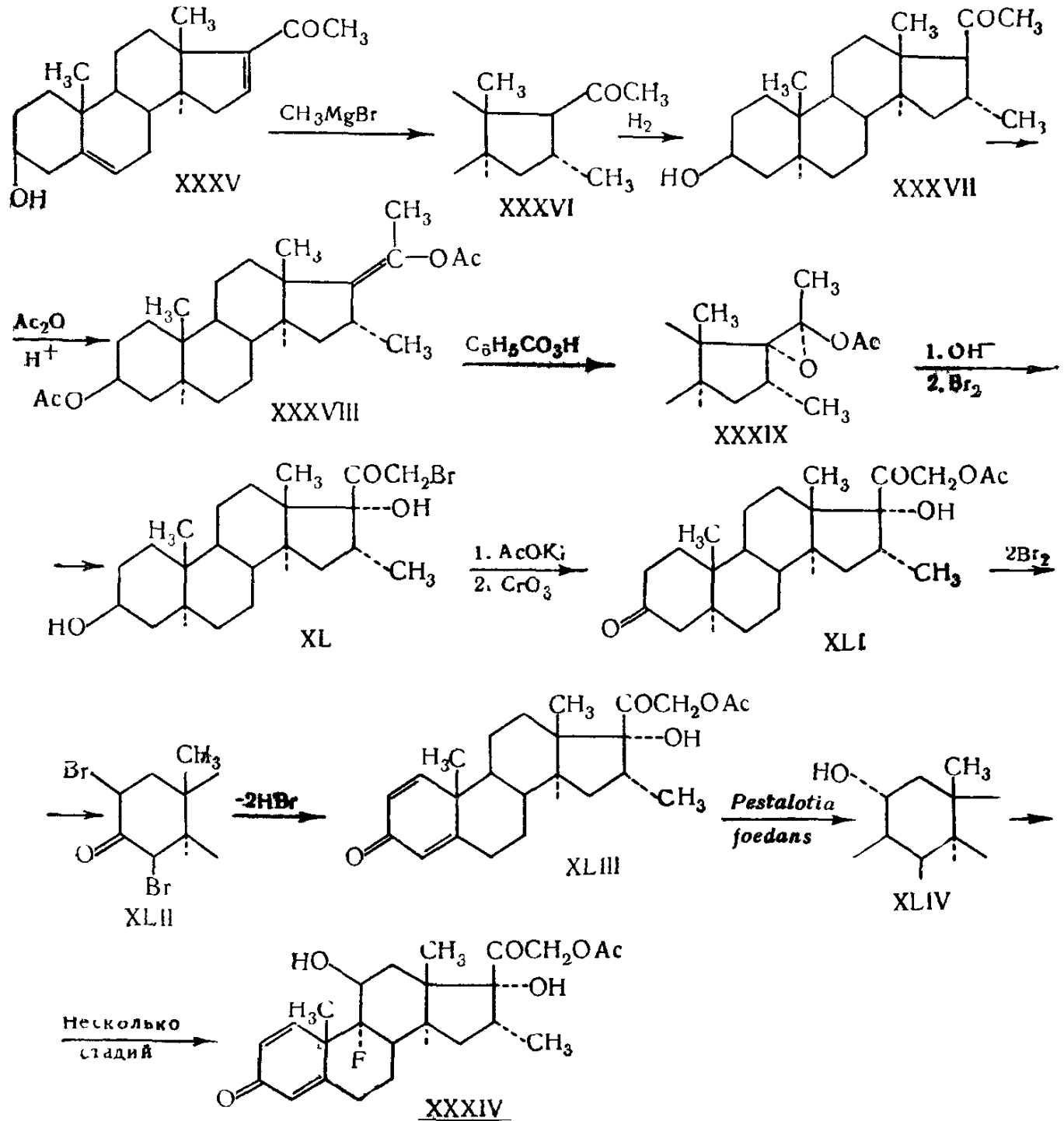


XXXII XXXIII

Бромгидрин (XXXI) гораздо активнее исходного преднизолона (по данным Фрида и Сабо в 20 раз). Действием ацетата калия бромгидрин был превращен в окись (XXXII), при реакции которой с фтористоводородной кислотой образовался ацетат 9α-фторпреднизолона (XXXIII). Это соединение по Хоггу в 50 раз активнее исходного преднизолона, а по Фриду и Сабо — только в 2,5 раза. Однако, пожалуй, надо больше верить первой цифре, потому что после Хогг опубликовал несколько работ о получении ряда таких же соединений с повышенной активностью.

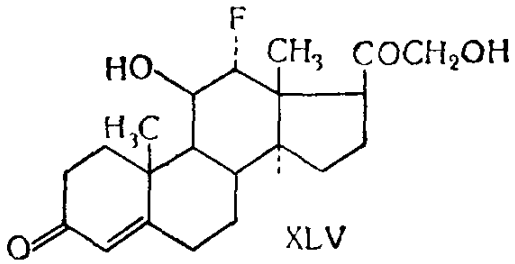
После того, как было обнаружено, что введение галоида и метильной группы повышает физиологическое действие, встала задача синтеза соединений, содержащих обе активирующие группы. Так был получен ацетат 16α-метил-9α-фторпреднизолона — дексаметазон (XXXIV), исходя из дегидропрегненолона (XXXV).

Прежде всего действием магнийметилбромида ввели метильную группу в положение 16. Полученное соединение (XXXVI) гидрировали в производное аллопрегнана (XXXVII). Дальше по обычной схеме получили енолацетат (XXXVIII), окисляли его надбензойной кислотой в окись (XXXIX), при омылении которой образовалось 17α-оксисоединение, которое бромировали до монобромпроизводного (XL).

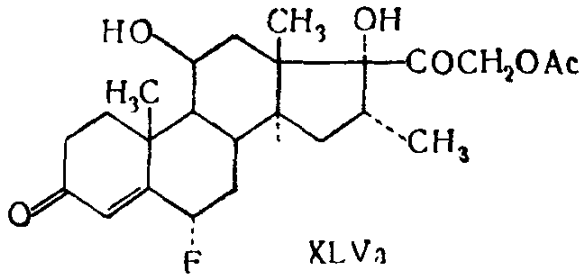


Действием ацетата калия на бромид (XL) и последующим окислением хромовым ангидридом получили дикетон (XLI), который бромировался двумя молекулами брома в дибромпроизводное (XLII). Дебромирование последнего привело к соединению (XLIII), в котором есть все элементы преднизолона, кроме 11-OH-группы, которую ввели микробиологическим путем с применением культуры *Pestalotia foedans*, давшей 11β-оксисоединение (XLIV). Введение фтора в положение 9 осуществлялось обычным путем (см. стр. 387): дегидратацией, присоединением бромноватистой кислоты, получением 9,11-окиси и расщеплением последней действием фтористого водорода. В результате был получен 16α-метил-9α-фторпреднизолон (XXXIV), который в 17 раз сильнее гидрокортизона по гликогенной пробе.

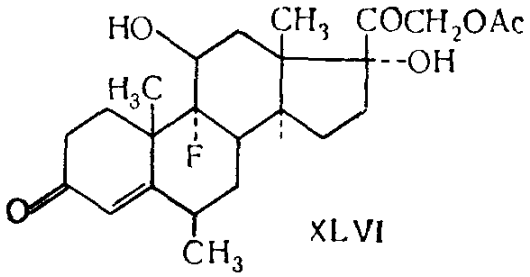
Дальнейшие исследования показали, что введение фтора в другие положения молекулы стероида также повышает его физиологическое действие. Так, 12α-фторкортикостерон (XLV) в 5 раз, а ацетат 6α-фтор-16α-метилгидрокортизона (XLVa) в 40 раз активнее гидрокортизона.



XLV



XLVa



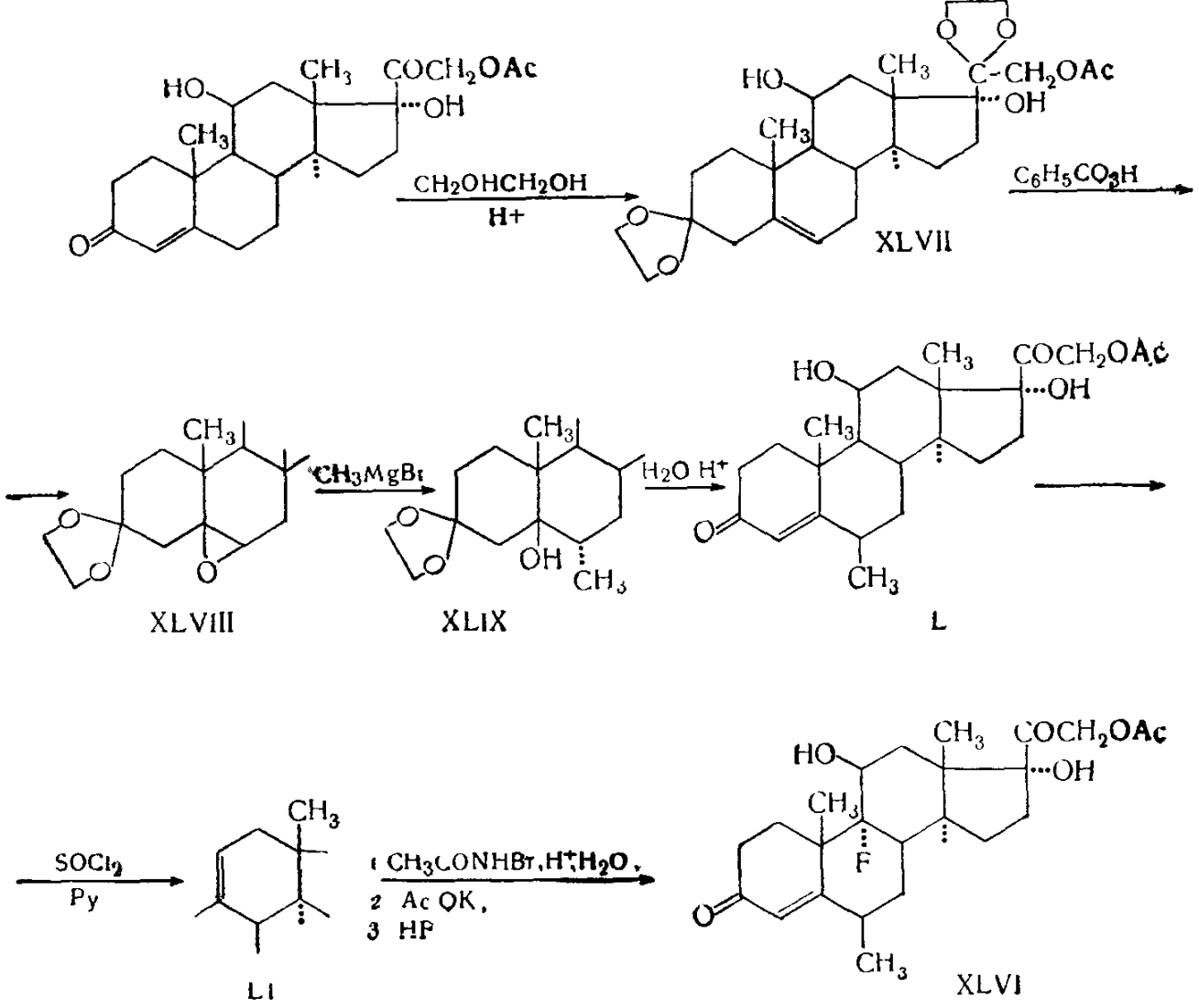
XLVI

Среди подобных трансформированных кортикоидных соединений привлекает внимание ацетат 6β-метил-9α-фторгидрокортизона (XLVI), синтезированный недавно Хоггом.

Хогг исходил из ацетата гидрокортизона. Действуя на него этиленгликолем, он получил бискеталь (XLVII) с двойной связью, уже не в положении 4—5, а в положении 5—6, который окислял надбензойной кислотой в окись (XLVIII). Последняя с метилмагнийбромидом дала 6α-метилпроизводное (XLIX). При гидролизе соединения (XLIX) гидроксильная группа исчезает, образуя 4—5 двойную связь, сопряженную с карбонилом, а α-метильная группа изомеризуется и встает в β-положение (см. стр. 390).

С образовавшимся дикетоном (L) Хогг провел те же самые операции по введению фтора, которые упоминались выше. Действием хлористого тионила в пиридине он получал дезоксисоединение (LI), затем последовательным действием N-бромацетамида в присутствии кислоты, ацетата калия и фтористого водорода синтезировал ацетат 6β-метил-9α-фторгидрокортизона (XLVI). Последний оказался в 120 раз активнее гидрокортизона.

Еще более активен ацетат 6α, 9α-дифтор-16α-метилпреднизолона (LII), который при пробе на отложение гликогена в печени оказался в 700 раз активнее гидрокортизона. По антивоспалительному действию



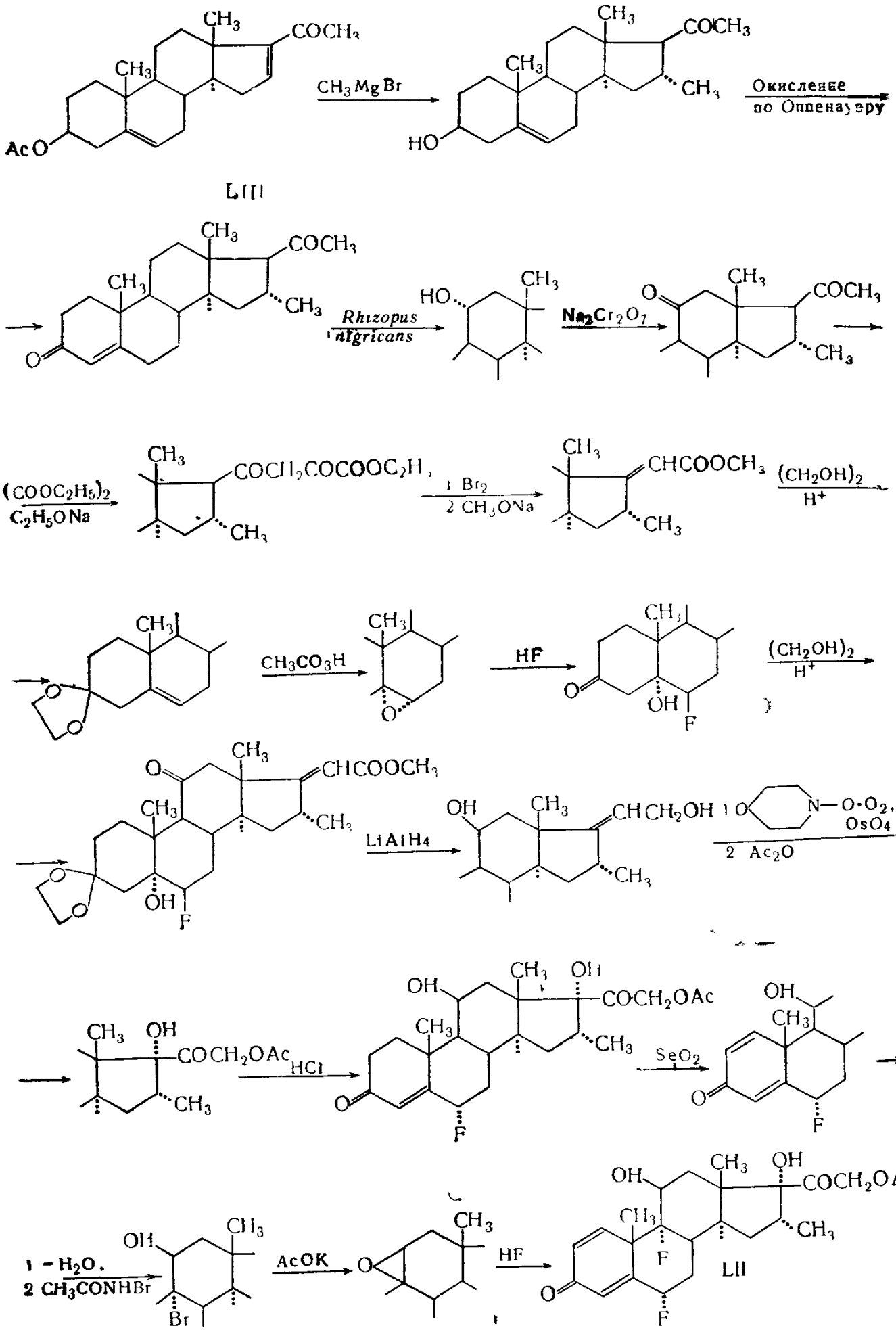
он превосходит гидрокортизон в 120 раз. Он получается из ацетата дегидропрегненолона (LIII) по схеме (см. стр. 391).

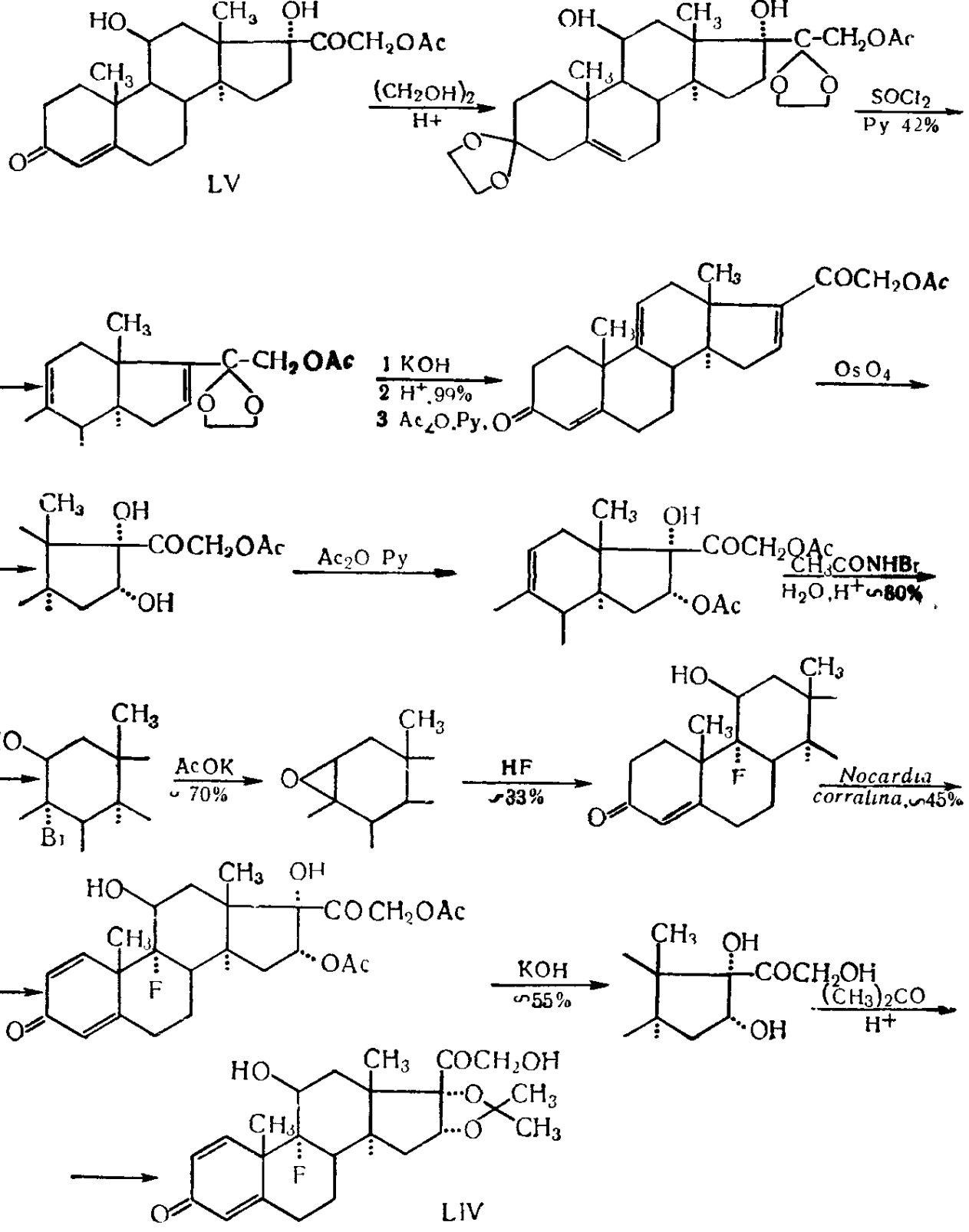
Недавно было найдено, что ацетонид 9α-фтор-16α-оксипреднизолона (так называемого триамцинолона) (LIV) почти в 100 раз активнее гидрокортизона. Он получается из ацетата гидрокортизона (LV) так, как показано на стр. 392.

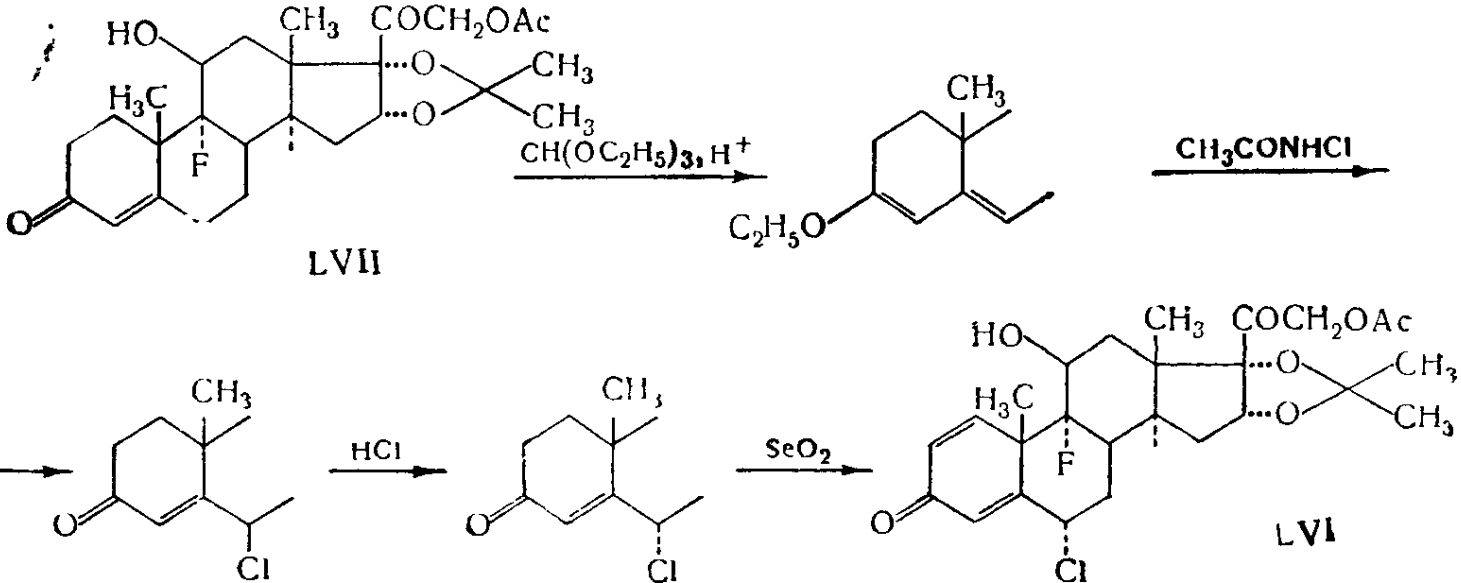
Если в полученное соединение ввести в положение 6 атом хлора, то активность соединения еще более увеличится, в частности, противовоспалительное действие станет в 200 раз сильнее действия гидрокортизона.

Соответствующее соединение — ацетат ацетонида 6α-хлор-9α-фтор-16α-оксипреднизолона (LVI) получают из ацетата ацетонида 9α-фтор-16α-оксигидрокортизона (LVII) (см. стр. 392).

Кортизон и его аналоги, как уже указывалось, исключительно широко применяются при лечении ревматоидных артритов. На мысль о таком действии кортизона (и вообще кортикоидных препаратов) навело то обстоятельство, что при беременности, когда усиливается деятельность коры надпочечников, симптомы ревматоидного артрита (если они были у больной) смягчаются. Действие кортизона было во многих случаях подобно чуду. Больные, которые были прикованы к постели в течение нескольких месяцев, а то и лет, с опухшими, искривленными суставами, получили возможность двигаться. Острые боли исчезали и люди возвращались к нормальной жизни. Однако терапия кортизоном не уничтожает причину самой болезни, и, если можно так выразиться, является лишь заместительной терапией, как, например, терапия инсулина или других подобных препаратов.


CH3
COCH3
AcO
CH3MgBr
HO
Окисление
по Оппенауэру
LIII
Rhizopus
nigricans
Na2Cr2O7
(COOC2H5)2
C2H5ONa
COCH2COCOOC2H5
1 Br2
2 CH3ONa
CHCOOCH3
(CH2OH)2
H+
CH3CO3H
HF
OH
F
LiAlH4
CH2OH
1 O
N—O·O2,
OsO4
2 Ac2O
COCH2OAc
HCl
SeO2
1 – H2O.
2 CH3CONHBr
Br
AcOK
LII


HO
CH3
OH
COCH2OAc
CH3
O
LV
(CH2OH)2
H+
OH
CH3
OH
C-CH2OAc
CH3
O
O
O
O
SOCl2
Py 42%
CH3
C-CH2OAc
O
O
1 KOH
2 H+, 99%
3 Ac2O, Py, O
CH3
COCH2OAc
CH3
O
OsO4
CH3
OH
COCH2OAc
OH
Ac2O Py
CH3
OH
COCH2OAc
OAc
CH3CONHBr
H2O, H+ ~80%
HO
CH3
CH3
Br
AcOK
~ 70%
CH3
O
HF
~33%
HO
CH3
CH3
F
O
Nocardia
corralina, ~45%
HO
CH3
OH
CO CH2OAc
CH3
F
OAc
O
KOH
~55%
CH3
OH
COCH2OH
OH
(CH3)2CO
H+
HO
CH3
COCH2OH
O
CH3
CH3
O
CH3
F
O
LIV


HO
CH3
COCH2OAc
H3C
F
O
CH3
CH3
O
LVII
CH(OC2H5)3, H+
CH3
C2H5O
CH3CONHCl
CH3
HCl
CH3
SeO2
HO
CH3
COCH2OAc
H3C
F
O
CH3
CH3
O
O
Cl
Cl
Cl
LVI

Кортизон применяется для лечения аллергических заболеваний: бронхиальной астмы, сенной лихорадки и др. В нашей стране заболевания сенной лихорадкой очень редки, но в Америке, в особенности в ее центральной части, этой болезнью больны сотни тысяч людей.

Очень хорошее действие кортизон оказывает также при различных болезнях кожи, например, при красной волчанке. Интересно, что при тяжелых ожогах, когда задето более $^1/_3$ кожного покрова и развиваются сильные воспалительные процессы, кортизон во многих случаях спасал жизнь человека.

Установлено, что кортизон препятствует росту соединительной ткани и поэтому может применяться не во всех случаях. Так при туберкулезе применение кортизона противопоказано, потому что он будет препятствовать заживлению каверн в легких. Имеется также много сообщений о том, что кортизон препятствует росту раковых опухолей, но все эти данные еще предварительные и недостаточные.

В общем нужно сказать, что синтез кортизона является одним из самых больших достижений химии, хотя бы уже потому, что он позволяет бороться против ревматоидных артритов, которыми больны десятки миллионов человек во всем мире.

ЛИТЕРАТУРА

И Н Назаров, Л Д Бергельсон Химия стероидных гормонов М, Изд-во АН СССР, 1955, стр. 280—293.

L. Fieser, M Fieser. Steroids New York, Reinold Publishing Corporation, 1959, pp. 682—700

J Fried, A. Borman, W. B. Kessler, P. Grabowich, E. F. Sabo. J. Am. Chem. Soc, 1958, 80, 2338.

J Fried, K Florey J Am. Chem Soc, 1955, 77, 4181.

H. J. Ringold, O Mancera, C Djerassi, A Bowers J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 6464.

W. P Schneider, F. H. Lincoln, G. P. Spero, H. S. Murrey, J L. Thompson J. Am. Chem Soc., 1959, 81, 3167.

G. B. Spero, J. L. Thompson, F. H. Lincoln, W. P. Schneider, J H Hogg. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 1515.

Глава 11

ПОЛНЫЙ СИНТЕЗ СТЕРОИДОВ. СИНТЕЗЫ ЭКВИЛЕНИНА, ЭСТРОНА, ПРОГЕСТЕРОНА, ХОЛЕСТЕРИНА. СИНТЕЗ ЭПИАНДРОСТЕРОНА ПО РОБИНСОНУ

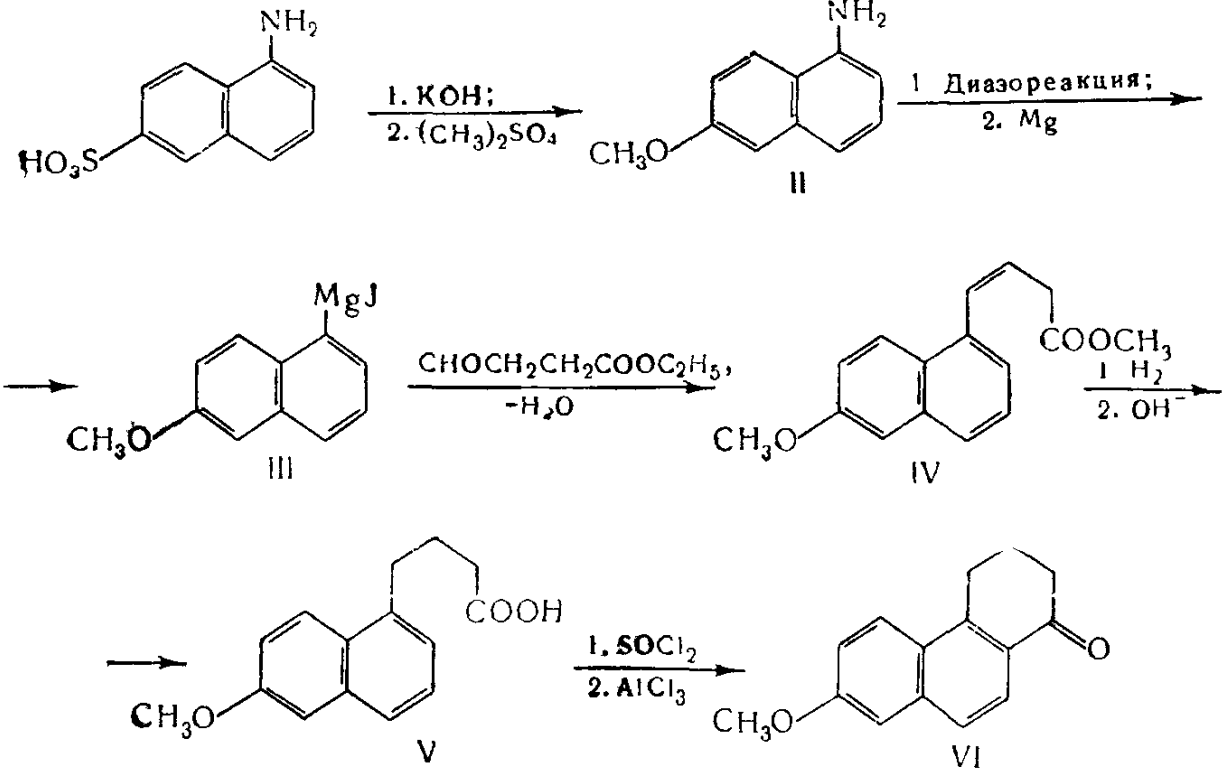
Значение полного синтеза для химии и вообще для науки чрезвычайно велико. Еще Энгельс отметил, что синтез ализарина знаменует собой победу материалистического мировоззрения. Если осуществлен полный синтез какого-нибудь соединения, то это является безусловным и точным доказательством его строения. Поскольку трансформированные стероиды с различными заместителями и дополнительными двойными связями часто оказываются активнее исходных, то напрашивается мысль, что легче провести полный синтез этих соединений, исходя не из готовой молекулы стероида, а из мелких частей и вводя соответствующие изменения в самом начале синтеза. Далее, несмотря на то что стероиды сейчас производятся в промышленном масштабе, они дороги и если бы удалось найти такой синтетический способ (до сих пор его все-таки не нашли) получения стероидов из дешевых полупродуктов, то это, конечно, было бы переворотом в химии, а потом и в гормональной терапии. К этому химики стремятся и будут стремиться

Над полным синтезом стероидных гормонов начали работать сразу же после того, как было выяснено их строение, и, конечно, усилия были направлены, в первую очередь, на синтез самого простого гормона — эквиленина. Этот эстрогенный гормон содержит два ароматических кольца и всего два асимметрических углеродных атома.

Его синтез осуществлен в 1940 г. Бахманом и был первым синтезом стероидных гормонов. Совершенно естественно, что в качестве исходного продукта Бахман взял производное нафталина, так называемую кислоту Клеве (I). При сплавлении ее с едким кали был получен аминонафтол, метилированный диметилсульфатом в эфир α-аминонафтола (II). Диазореакцией аминогруппа была замещена на иод, а из иодпроизводного получено магнийорганическое соединение (III), которое Бахман ввел в реакцию с эфиром полуальдегида янтарной кислоты. Промежуточный карбинол легко отщеплял воду с образованием эфира (IV) (см. стр 395). Последовательным гидрированием и омылением последнего была получена кислота (V). Хлорангидрид этой кислоты циклизацией в присутствии хлористого алюминия (обычная реакция внутримолекулярного ацилирования по Фриделю—Крафтсу) был превращен в трициклический кетон (VI).

Выход на всех этих стадиях составил около 8%.

Дальше надо было нарастить кольцо *D*. Бахман осуществлял это



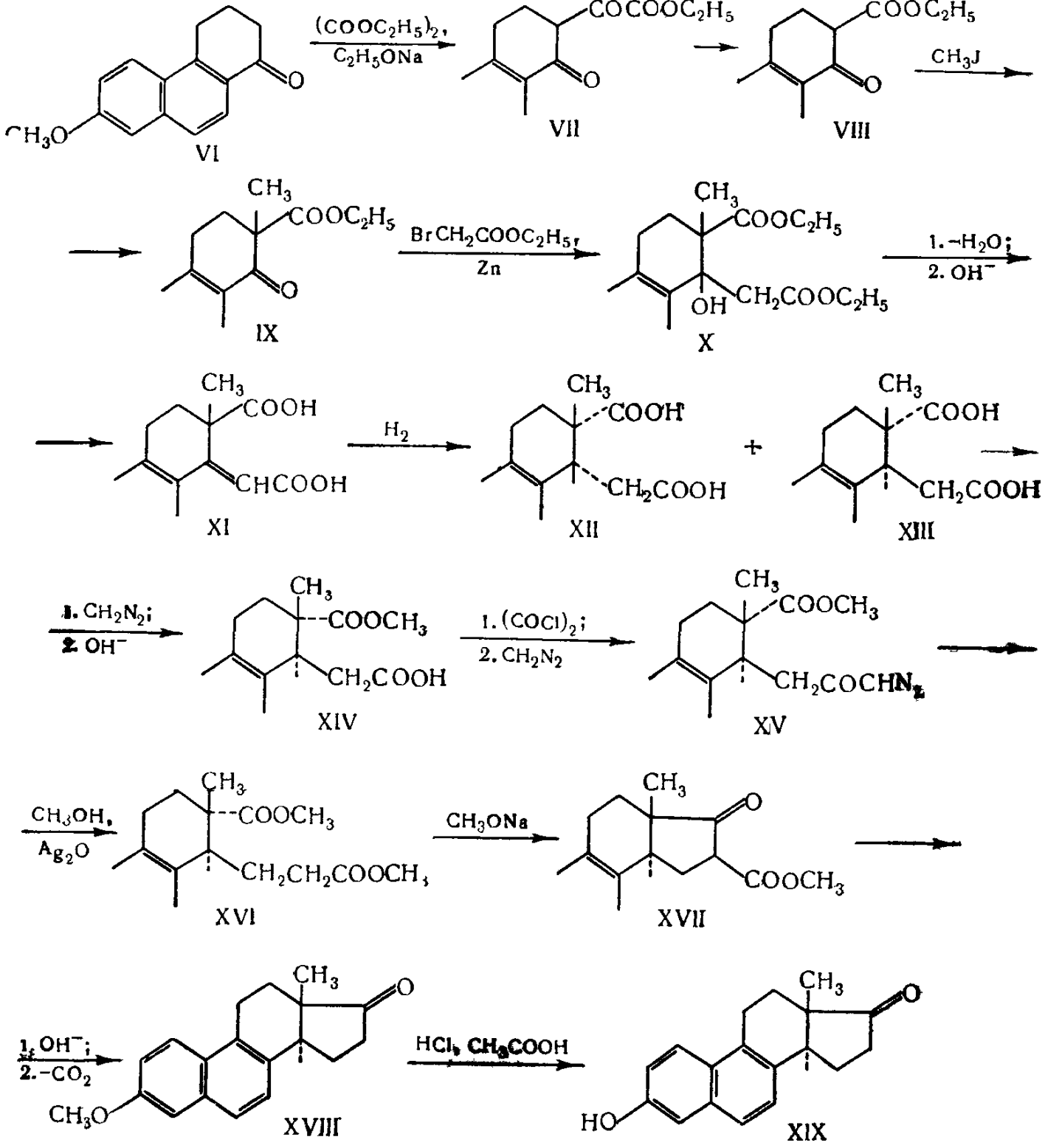
методично и постепенно, что вообще характерно для первых синтезов. Прежде всего, он решил ввести карбоксильную группу (рядом с кетонной) действием щавелевого эфира. Можно было бы применить и угольный эфир, но в то время еще не знали успешных методов введения карбоксильной группы с помощью угольного эфира. Конденсация кетона (VI) с диэтилоксалатом дала с высоким выходом дикетоэфир (VII), который при нагревании со стеклянным порошком (весьма существенная деталь!) отщеплял CO и превращался в кетоэфир (VIII). Теперь, имея систему ацетоуксусного эфира, Бахман смог приступить к введению ангулярной метильной группы и получил соединение (IX). Смысл этого синтеза, как легко видеть, состоит в том, чтобы на место кетогруппы ввести достаточно длинную цепочку с карбоксилом на конце и замкнуть образовавшийся дикарбоновый эфир.

Тогда еще не был известен метод введения цепи из трех углеродных атомов и Бахману пришлось ограничиться реакцией Реформатского с бромуксусным эфиром, т е. ввести только два углеродных атома (см. стр. 396).

Реакция Реформатского с образованием оксидиэфира (X) прошла почти количественно. Дальше следовали реакции омыления и дегидратации, в результате которых была получена непредельная кислота (XI). Ее гидрирование по двойной связи дало два стереоизомера (XII) и (XIII) примерно в равных количествах.

Далее Бахман увеличил («нарастил») цепочку у каждого стереоизомера с помощью реакции Арндта—Эйстерта. Для того, чтобы эта реакция не прошла сразу с двумя карбоксильными группами, он этерифицировал (диазометаном) кислоту до диэфира и затем частично омылил его в полуэфир (XIV), причем пространственно более затрудненная карбоксильная группа оставалась этерифицированной. Затем действием хлористого тионила или оксалилхлорида был получен хлорангидрид, который с диазометаном дал диазокетон (XV), а последний при взаимодействии с метанолом (в присутствии окиси серебра) перешел в диэфир (XVI).

Теперь Бахман мог приступить к созданию кольца *D* циклизацией, которая была проведена с хорошим выходом обычным путем, т. е. действием алкоголята. Дальше уже остались сравнительно легкие стадии,



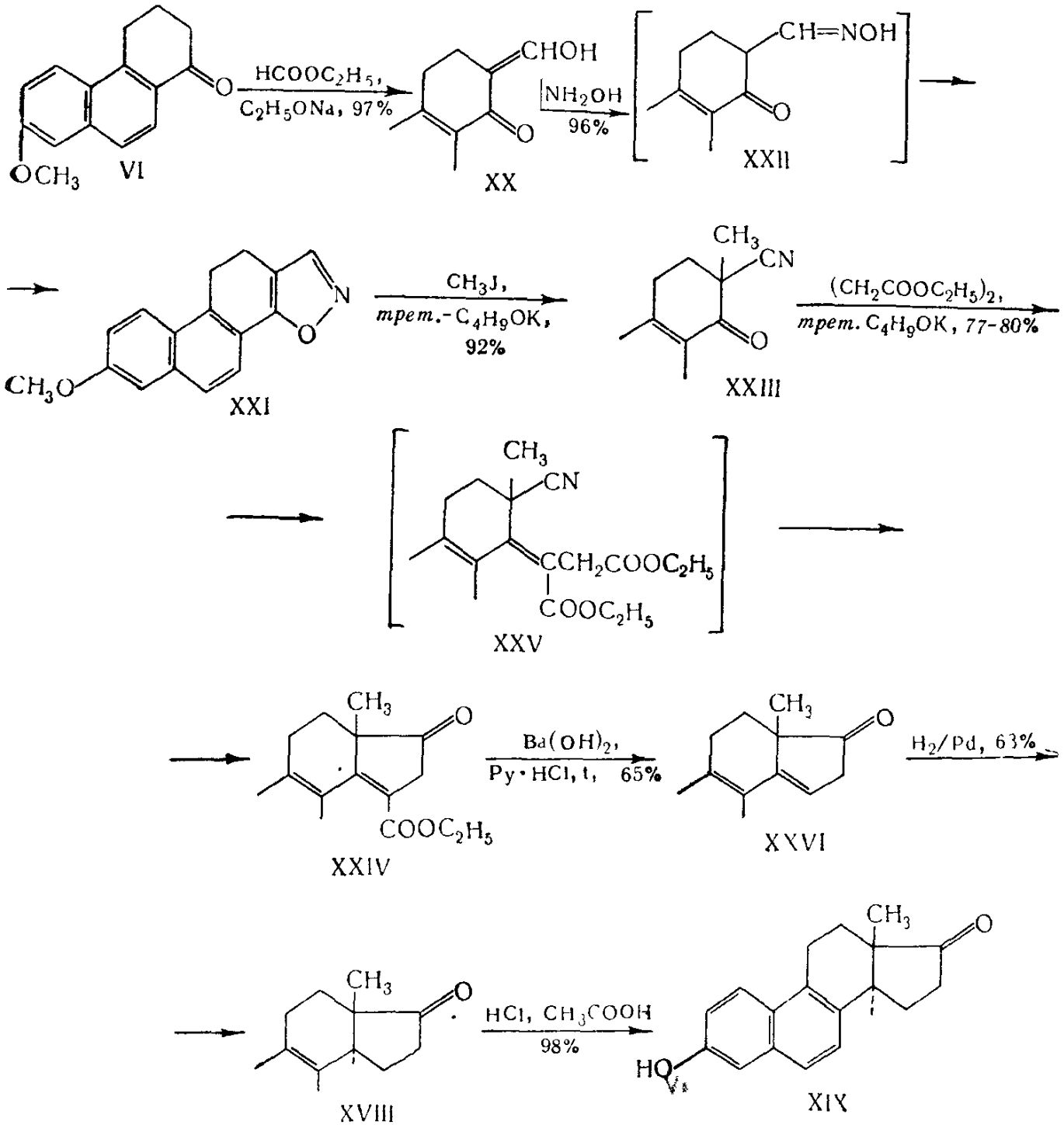
то есть омыление кетоэфира (XVII) с последующим декарбоксилированием (это все происходит в одну стадию), и, наконец, деметилирование соляной кислотой образовавшегося 3-метилэквиленина (XVIII), что было проведено нагреванием в уксусной кислоте Полученный *dl*-эквиленин (XIX) был разделен на оптические изомеры, через эфиры *l*-ментоксиуксусной кислоты обычным способом. Выход на все стадии, считая от кетона (VI), оказался сравнительно хорошим — около 20%.

В дальнейшем схема Бахмана послужила прототипом для других аналогичных синтезов Эта схема отличается постепенным наращиванием колец *C* и *D*, причем последней стадией является циклизация.

Гораздо более простой и более оригинальный синтез эквиленина с меньшим количеством стадий, чем у Бахмана, был предложен Джонсоном, который исходил из того же трициклического кетона (VI), что и Бахман, но для создания кольца *D* применил совершенно другие реакции Он конденсировал кетон (VI) с этилформиатом в кетоенол (XX) по

Клайзену и при действии на кетоенол гидроксиламина получил гетероциклическое соединение (XXI), образовавшееся, возможно, через гипотетическое промежуточное соединение (XXII). Все стадии проходят с очень хорошим выходом — свыше 90% Дальше при действии иодистого метила в присутствии третичного бутилата калия на соединение (VIII) происходит не только метилирование, но и образование нитрильной группы Выход цианокетона (XXIII) составляет около 80%. Таким образом, получается соединение, подобное кетоэфиру Бахмана, только вместо карбэтоксильной группы стоит нитрильная группа

Казалось бы, далее можно вести реакцию, как вел Бахман, т е провести реакцию Реформатского и «наращивать» полученную цепь Однако Джонсон здесь достиг успеха более коротким путем



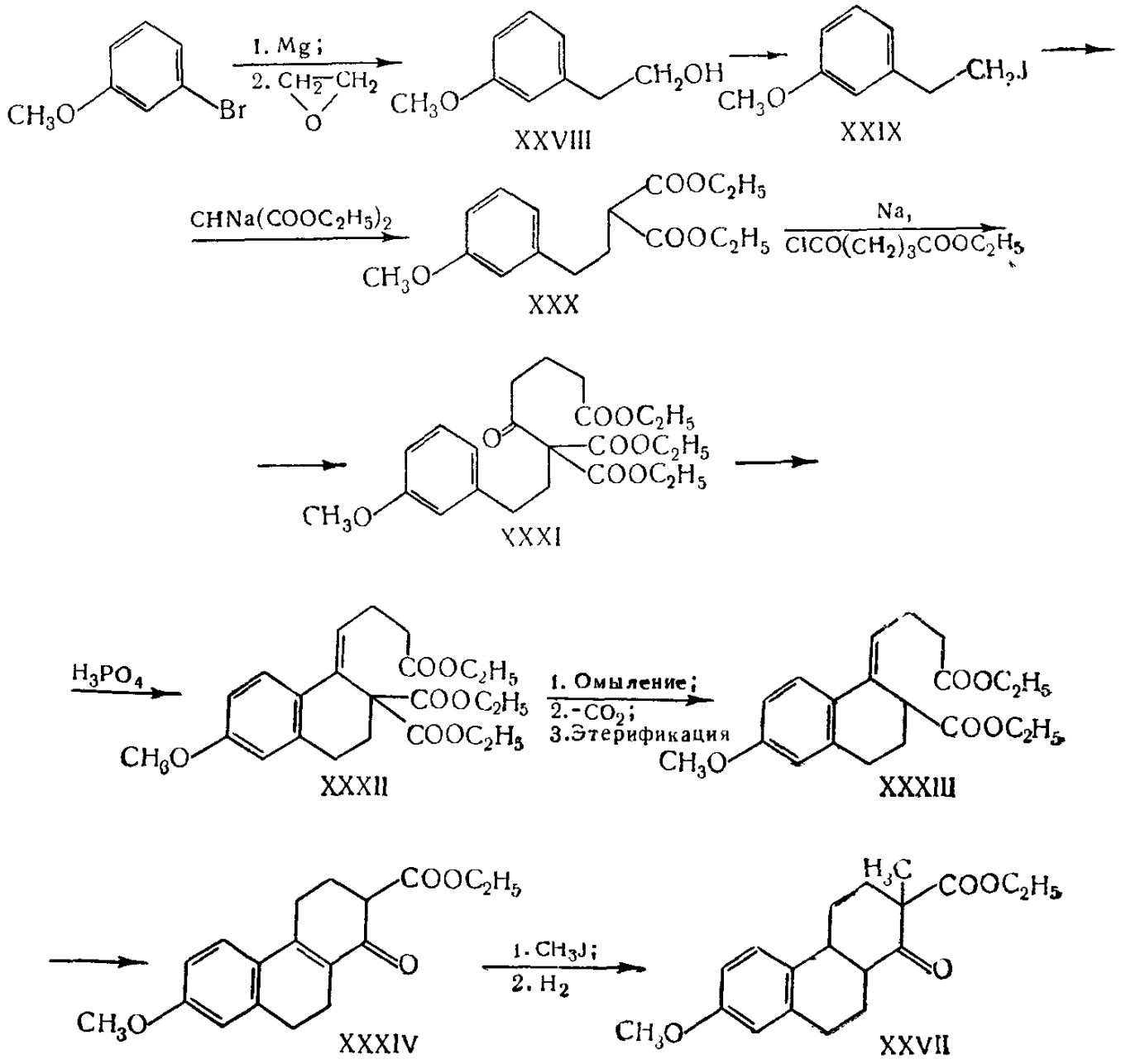
Он конденсировал цианокетон (XXIII) с янтарным эфиром, имея в виду, что в этом случае создается цепь из трех углеродных атомов, а карбоксильную группу в будущем легко удалить. Действительно, в присутствии третичного бутилата калия произошла соответствующая конденсация, причем сразу образовалось соединение (XXIV) с пятичленным кольцом. Это было большой удачей для Джонсона

Первой стадией этой замечательной реакции является реакция Штоббе с образованием промежуточного соединения (XXV). В дальнейшем под действием того же третичного бутилата калия происходит замыкание пятичленного кольца.

Теперь остается уже, в сущности, немного. Омылением соединения (XXIV) и нагреванием соответствующей кислоты с хлоргидратом пиридина удаляют карбэтоксильную группу, далее гидрируют кетон (XXVI) в присутствии палладия, продукт гидрирования (XVIII) деметилируют нагреванием с соляной кислотой в уксусной кислоте и получают эквиленин (XIX). На стадии гидрирования реакция идет неизбирательно и выход нужного изомера составляет 63%.

Следующий эстрогенный гормон — эстрон был синтезирован Мишером в 1948 г.

Мишер исходил из так называемого кетона Робинсона (XXVII), который он получил по методу Робинсона следующим образом:



Взаимодействием магнийорганического соединения из метаброманизола с окисью этилена был получен соответствующий первичный спирт (XXVIII), а из него иодид (XXXIX). Конденсацией с натрмалоновым эфиром Мишер (или Робинсон, потому что схема одна и та же) получил диэфир (XXX), на который действовал натрием и затем эфиром полухлорангидрида глутаровой кислоты. Циклизацией образовавшегося кетотриэфира (XXXI) с помощью фосфорной кислоты был по-

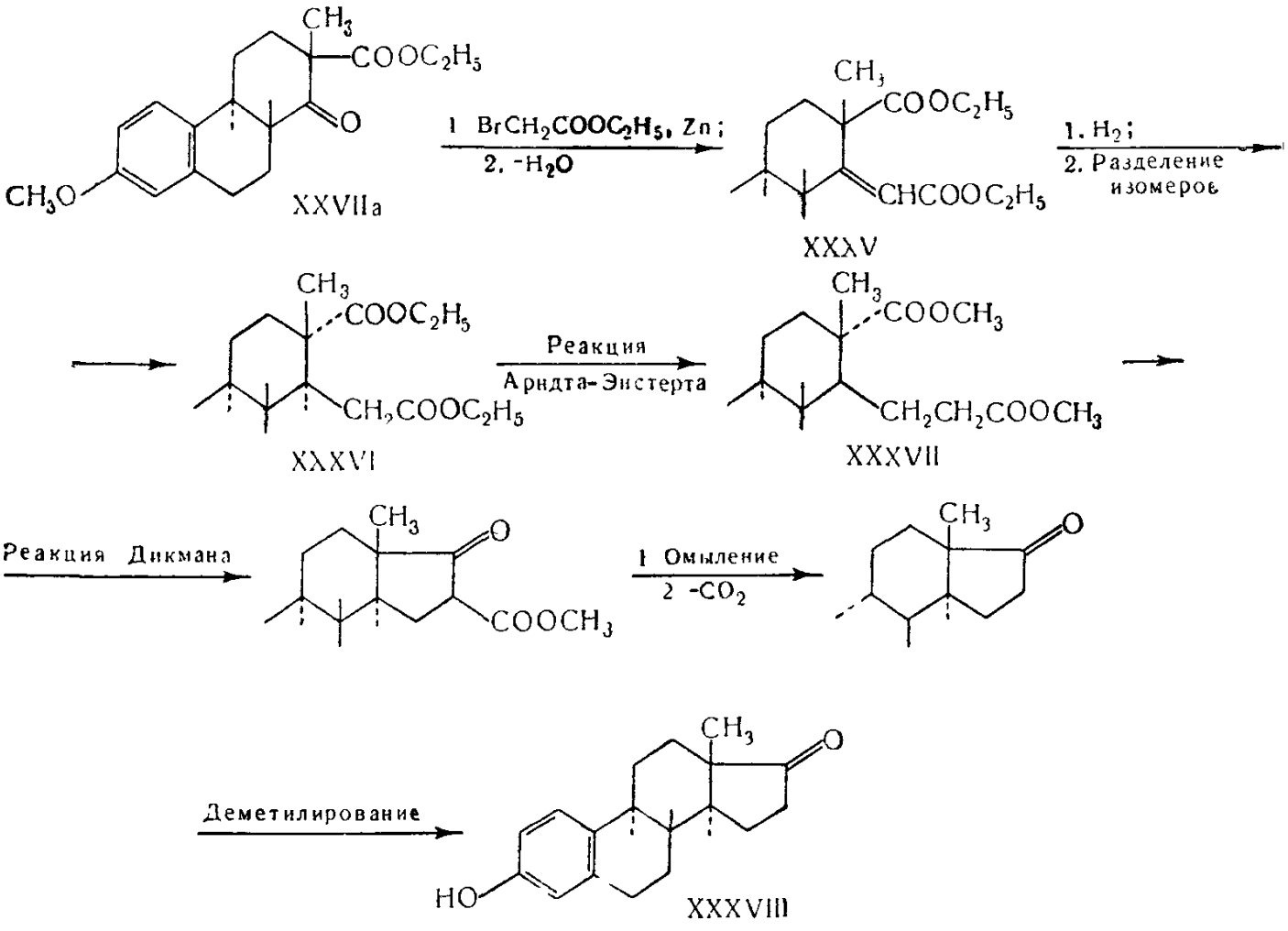
лучен бициклический триэфир (XXXII), который после омыления, декарбоксилирования и этерификации был переведен в диэфир (XXXIII).

Отдельные стадии проходят сравнительно с хорошим выходом: 60—70, а иногда 80%. Далее сама собой напрашиваегся циклизация по Дикману в трициклический кетон (XXXIV), причем двойная связь передвигается в положение между циклами. Дальше действием иодистого метила вводят ангулярную метильную группу, а затем гидрируют в кетон Робинсона (XXVII).

Поскольку в кетоне (XXVII) имеются три асимметричных углеродных атома, а предыдущие реакции идут не стереонаправленно, то кетон Робинсона представлял смесь стереоизомеров. Робинсону в дальнейшем не удалось продвинуть синтез и нарастить четвертое кольцо именно потому, что он имел дело со смесью.

Бахман повторил опыт Робинсона и ему удалось по вышеприведенной схеме получить смесь тетрациклических соединений, из которой был выделен так называемый эстрон Бахмана, оказавшийся, впрочем, не идентичным с природным эстроном.

Несмотря на эти две, казалось бы, бесполезные попытки, Мишер и Аннер решили повторить эти работы. Они начали с того, что получили кетон Робинсона в больших количествах, выделили три изомера — A, B, C, причем один из этих изомеров легко переходил в другой при обработке щелочью (очень важная деталь!). Следовательно тот, который получался при обработке щелочью, безусловно имел транс-конфигурацию. В дальнейшем швейцарские химики, следуя схеме Бахмана, подтвердили, что действительно из этого стереоизомера (XXVIIa) получается природный эстрон.



Кетоэфир (XXVIIa) обрабатывали цинком и бромуксусным эфиром, продукт конденсации дегидратировали и полученное соединение (XXXV)

гидрировали. При этом образовались два стереоизомера, один из которых (XXXVI) имел конфигурацию природного эстрона. Наращивание цепи по Арндту—Эйстерту привело к диэфиру (XXXVII), конденсацией которого по Дикману с последующим омылением, декарбоксилированием и деметилированием был получен эстрон (XXXVIII).

Так как Мишер и Аннер в своих реакциях исходили из трех стереоизомеров кетона (XXVII) и, кроме того, при гидрировании получались еще изомеры, то им удалось практически выделить пять изомеров эстрона, и каждый из них в свою очередь разделить на оптические антиподы. Синтетический эстрон оказался во всех отношениях, в том числе по физиологическому действию, идентичным с природным эстроном.

Это был первый синтез эстрона. Потом было опубликовано еще несколько синтезов, из которых следует остановиться на синтезе Джонсона и Христиансена, перспективном для промышленного оформления.

Исходным продуктом (см. схему на стр. 401) служит анизол, стоимость которого ничтожна. Конденсацией его с эфиром полухлорангидрида глутаровой кислоты образуется пара-производное (XXXIX), которое Джонсон ввел в конденсацию с янтарным эфиром. В полученном соединении (XL) имеются все элементы для образования колец *B* и *C*. Его восстановление действием алюминия в щелочной среде привело к образованию транс-изомера триэфира (XLI) (см. стр. 401).

Под действием гидрида натрия триэфир (XLI) циклизовался по Дикману в бициклический эфир (XLII). В данном случае гидрид натрия оказался более эффективным, чем метилат натрия или третичный бутилат калия. Дальше Джонсон без труда ввел метильную группу при карбоксиле и полученное соединение (XLIII) конденсировал с бромуксусным эфиром. Очевидно, чисто практические соображения заставили его прибегнуть именно к этой реакции, а не к реакции Штоббе, которая теоретически выгоднее. На этой стадии выход не особенно высок и составлят 40%. Дегидратацией оксиэфира (XLIV) получилось соединение (XLV) с двойной связью. Избирательное омыление последнего привело к кислоте (XLVI), циклизация которой по Фриделю и Крафтсу дала трициклическое соединение (XLVII).

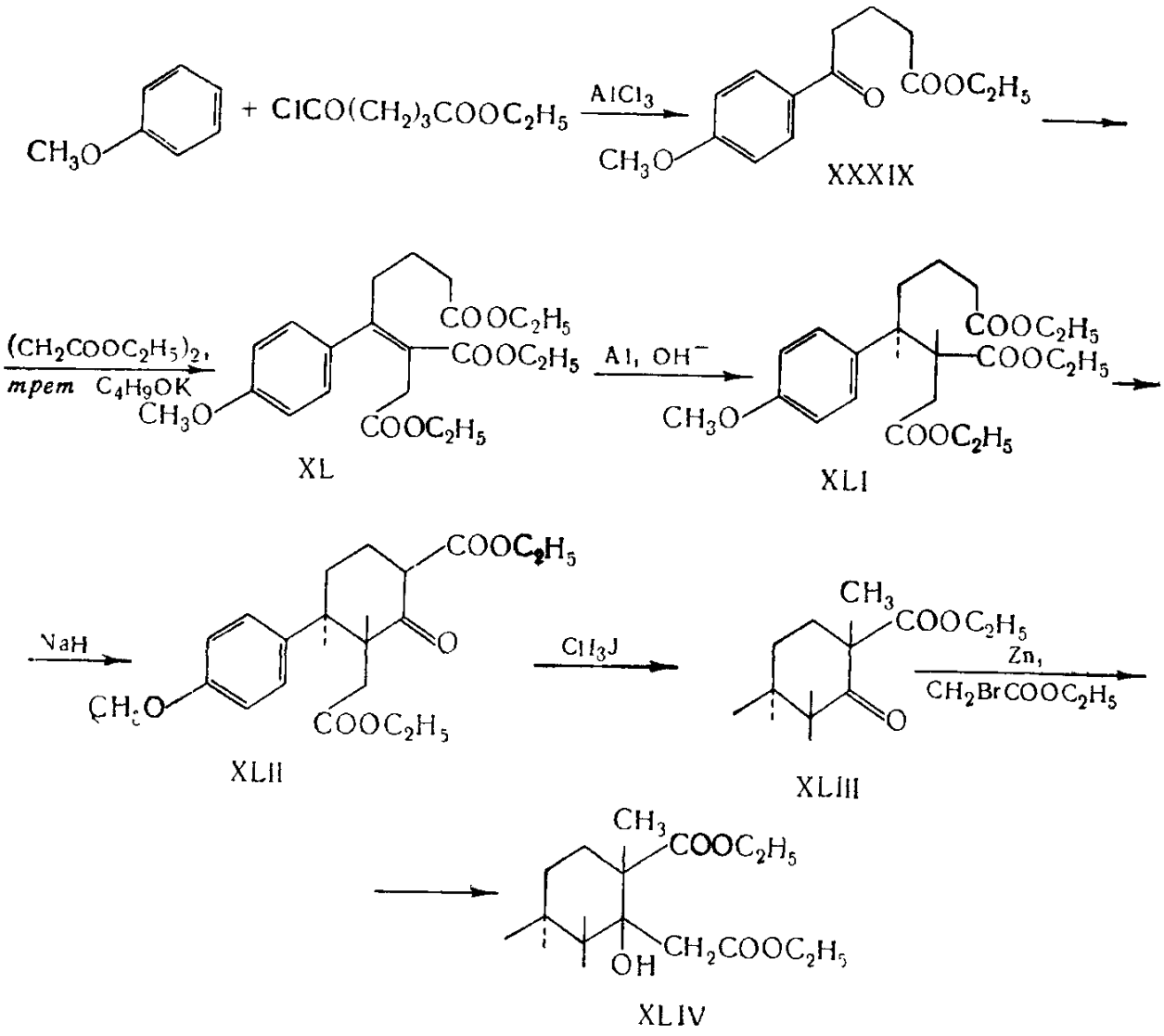
На следующем этапе Джонсону предстояло удалить кетогруппу и прогидрировать двойную связь. Первую операцию удалось осуществить гидрированием с палладием на угле в присутствии хлорной кислоты, вторая операция проходила с палладием на углекислом стронции и в результате был получен диэфир (XLVIII). Дальше синтез шел всецело по схеме Бахмана, включая реакцию по Арндту — Эйстерту, циклизацию по Дикману и, наконец, декарбоксилирование и деметилирование. В результате был получен эстрон (XXXVIII).

Этот синтез привлекателен тем, что не требует каких-либо труднодоступных исходных веществ. Отдельные его стадии достаточно просты, исключение составляет лишь реакция с диазометаном. Количество стадий (18) все же велико.

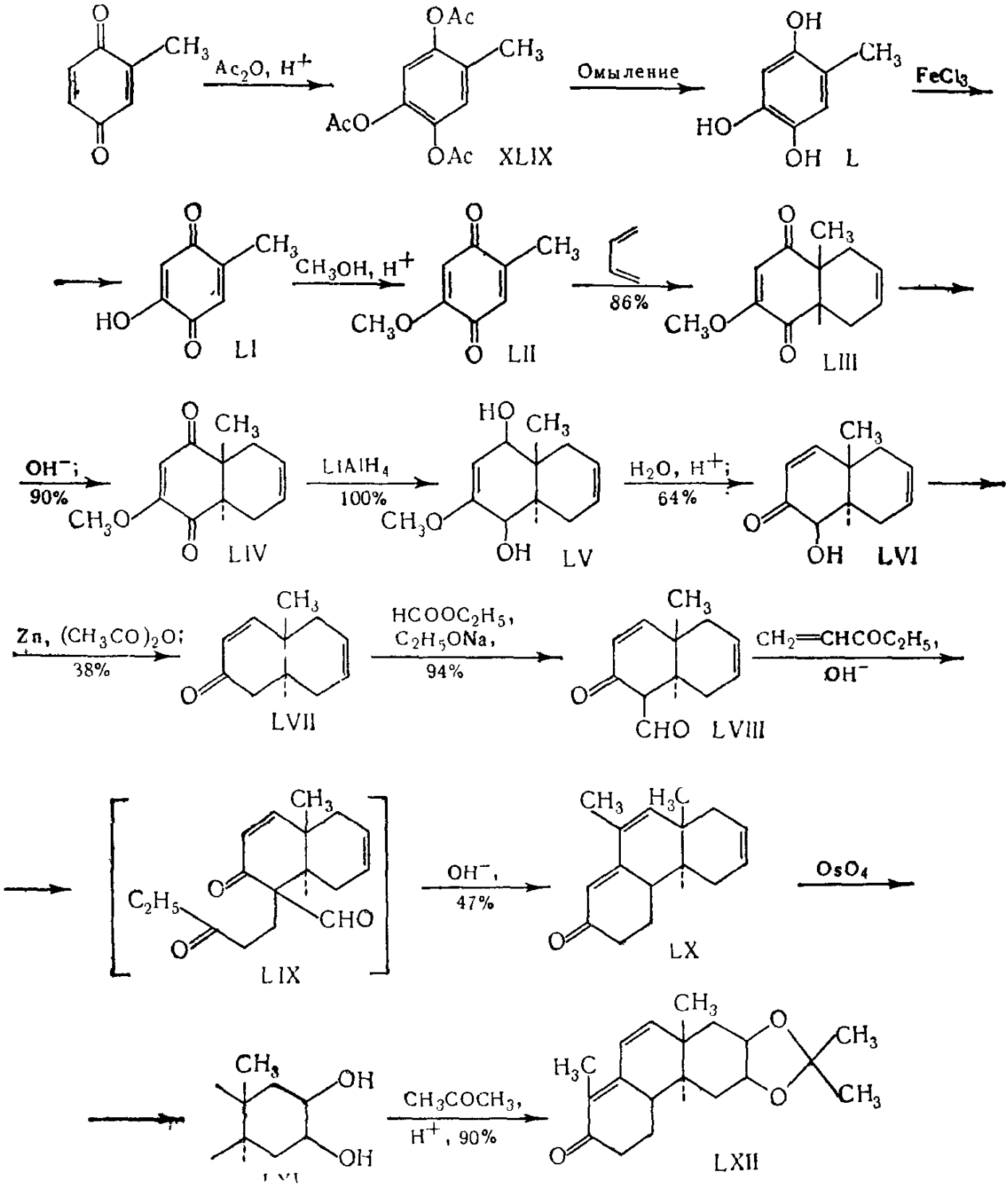
Через три года после того как Мишер закончил свои исследования эстрона, появились замечательные работы Робинсона и Вудворда, которые осуществили полный синтез почти всех стероидных гормонов.

К сожалению, за недостатком места нет возможности коснуться работ Робинсона, заслуги которого в области полного синтеза совершенно исключительны. Он получил много промежуточных продуктов, разработал оригинальные пути и его блестящие работы увенчались полным синтезом эпиандростерона (и холестанола).

Если Бахман и Мишер исходили из соединений, представляющих собой кольцо *A* и потом пристраивали кольца *B* и *C*, то Вудворд решил наоборот начать с кольца *C* и затем «нарастить» кольца *B* и *A*.


+ ClCO(CH2)3COOC2H5
AlCl3
CH3O
COOC2H5
XXXIX
(CH2COOC2H5)2,
трет C4H9OK
Al, OH−
XL
XLI
NaH
ClH3J
Zn,
CH2BrCOOC2H5
XLII
XLIII
XLIV
−H2O
OH−
XLV
XLVI
Циклизация
по Фридель-
Крафтсу
H2, Pd/C, H+;
H2, Pd/SrCO3
XLVII
XLVIII
По схеме
Бахмана
HO
XXXVIII

Он исходил из толухинона, который при действии уксусного ангидрида в кислой среде превращался в триацетоксисоединение (XLIX). Последнее омылялось в триокситолуол (L), окисленный хлорным железом в окситолухинон (LI). Его гидроксильная группа обладает кислым характером и легко этерифицируется метанолом к кислой среде в метокситолухинон (LII). Этот хинон Вудворд конденсировал с дивинилом, причем конденсация шла очень легко и дала бициклический кетон (LIII) с выходом около 90%.



Бициклический кетон (LIII) в будущем должен был представлять кольца *C* и *D*. Этот синтез был задуман с дальним прицелом, так как в дальнейшем было необходимо превратить шестичленное кольцо в пятичленное и еще ввести боковую цепь. Вудворд надеялся на то, что удастся ввести в реакцию двойную связь в кольце *D*, и эти ожидания впоследствии оправдались. Как известно, при диеновом синтезе обра-

зуется только цис-сочленение колец вместо нужного транс-сочленения. Однако, поскольку рядом с ангулярным водородом имелась кетонная группа, то система цис-декалона легко изомеризовалась в систему транс-декалона (LIV) и цель была достигнута. Таким образом, Вудворд имел в кетоне (LIV) транс-сочленение колец *C* и *D*, ангулярную метильную группу, двойную связь для преобразования кольца *D* и кетонную группу для наращивания кольца *B*. Восстановлением алюмогидридом лития был получен диол (LV), превращающийся при гидролизе в кислой среде (с отщеплением OH-группы) в бициклический кетол (LVI).

Дальше нужно было удалить «лишний» гидроксил. Это удалось сделать действием цинка в уксусном ангидриде. Эта стадия проходит не очень гладко, потому что затрагивается и кетогруппа, и общий выход кетона (LVII) составляет около 38%; на всех же остальных стадиях выходы очень хорошие и часто количественные.

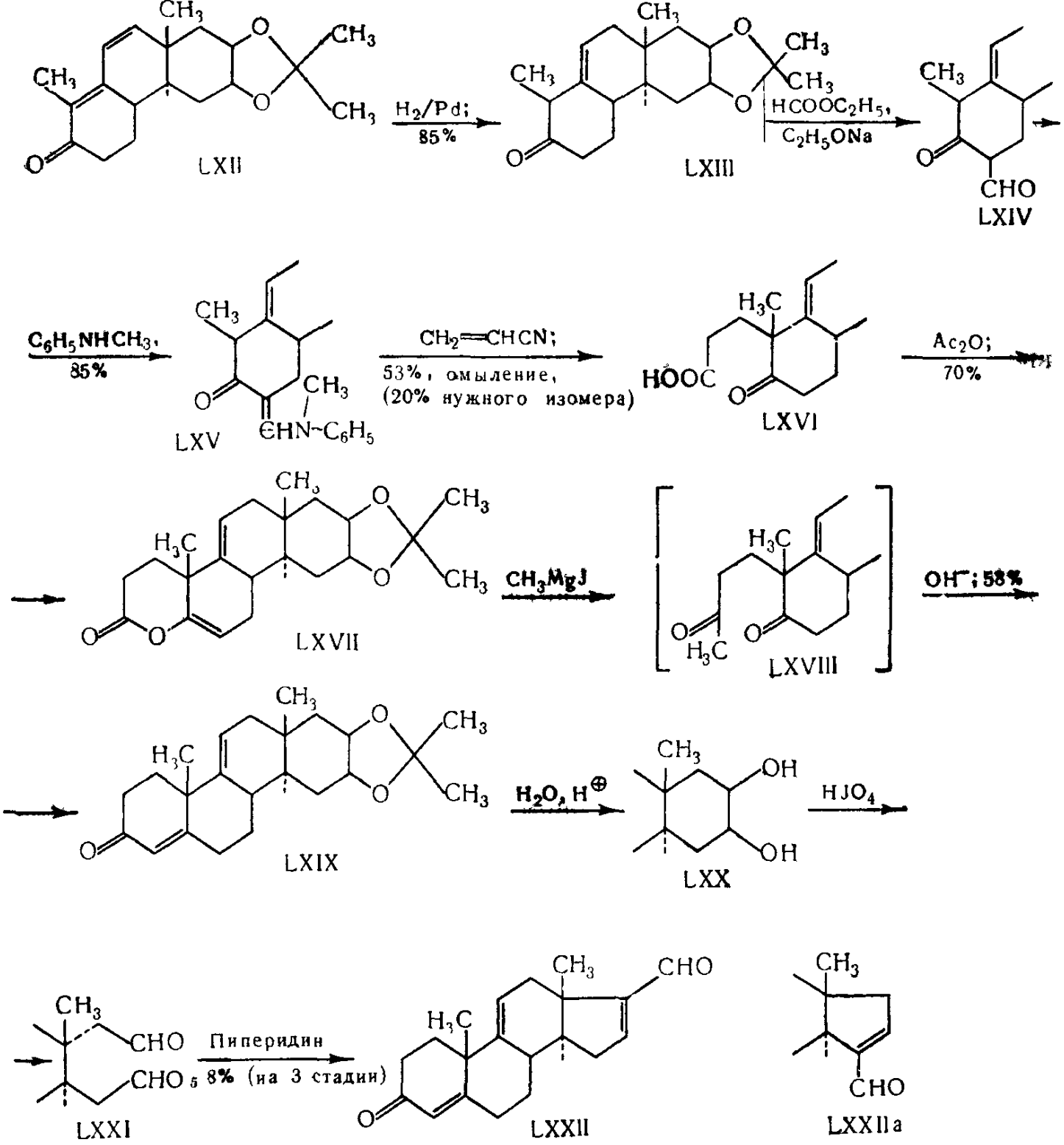
С целью наращивания кольца *B* Вудворд действовал сначала муравьиным эфиром и ввел в α-положение к CO-группе альдегидную группу, а затем провел реакцию с метилвинилкетоном в щелочной среде, причем произошла обычная конденсация Михаэля, т. е присоединение непредельного кетона к β-дикарбонильному соединению (LVIII). Продукт конденсации (LIX) не выделяется в свободном состоянии, так как происходит, во-первых, отщепление формальдегида и, во-вторых, конденсация кротонового типа в трициклический кетон (LX).

Казалось бы, таким же способом надо было наращивать и кольцо *A*. Но прежде чем приступить к этому Вудворд ввел заместители в кольцо *D*. С помощью четырехокиси осмия, действующей главным образом на изолированную двойную связь, он получил цис-диол (LXI). Поскольку присутствие реакционноспособных гидроксильных групп при всех превращениях очень неудобно, Вудворд защитил гликольную группировку ацетоном. Защита ацетоном позволяла вести реакцию в щелочной среде, так как ацетониды стойки к щелочам (см. стр. 404).

Далее селективным гидрированием ацетонида (LXII) удалили одну двойную связь, так как иначе «наращивать» другое кольцо в кетоне (LXIII) чрезвычайно трудно. Для «наращивания» четвертого кольца можно применить тот же метод, что и выше, но здесь в отличие от бициклического кетона (LVII) имеются два реакционных центра. Чтобы выключить один из них, Вудворд действием этилформиата на кетон (LXIII) получил производное (LXIV), которое с метиланилином и дало соединение (LXV). При конденсации последнего с акрилонитрилом и омылении щелочами образовалась смесь эпимерных кислот, из которой нужный стереоизомер был выделен в количестве 20%. С ним в дальнейшем и велась вся работа. Действием уксусного ангидрида был получен лактон (LXVII), на который действовали реактивом Гриньяра и реакционную смесь обрабатывали щелочью При этом получался промежуточный дикетон (LXVIII), который в щелочных условиях конденсировался по кротоновому типу в тетрациклическое *D*-гомостероидное соединение (LXIX).

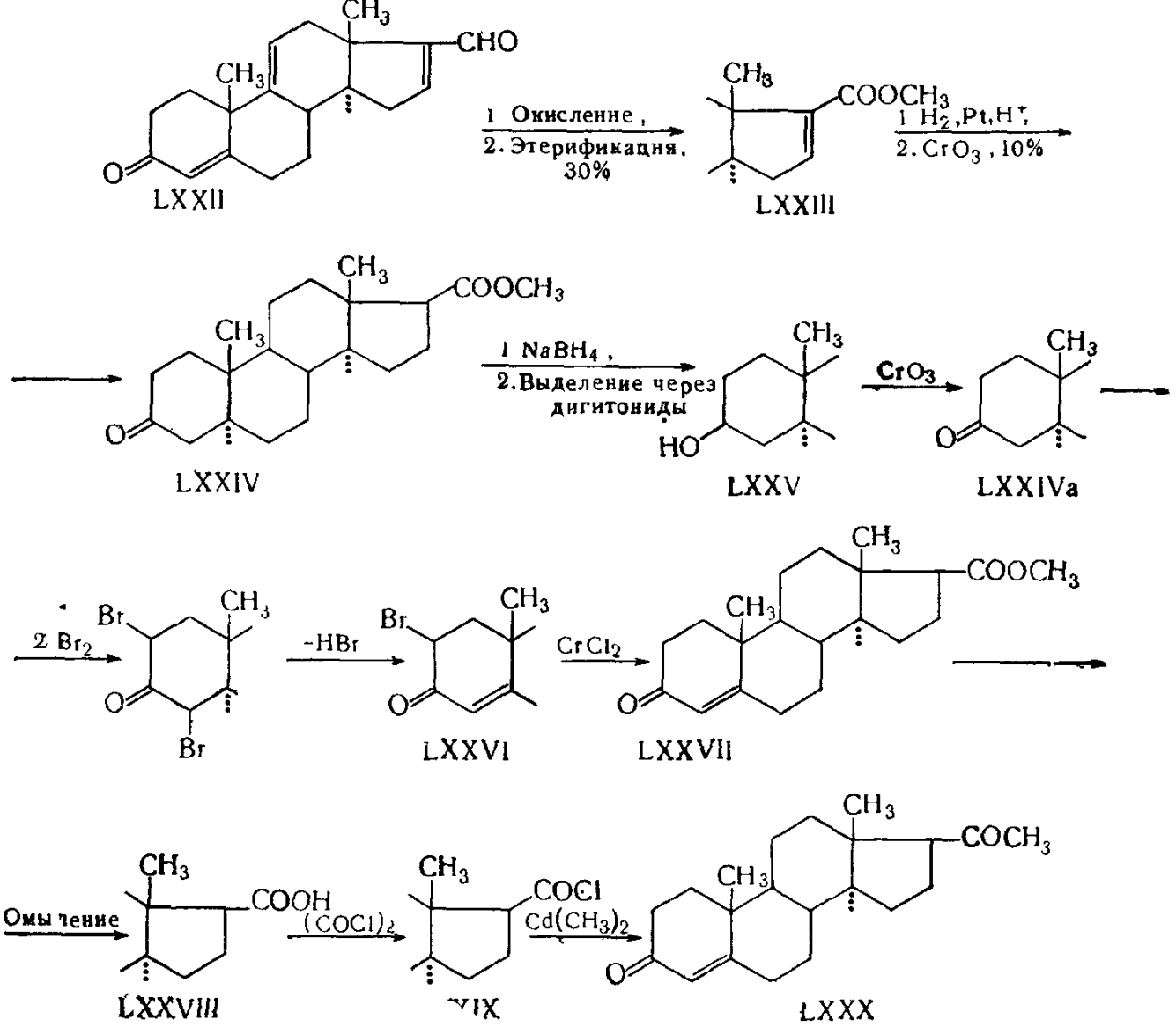
Теперь Вудворд уже мог приступить к трансформации кольца *D*. Прежде всего действием разбавленных кислот он удалил ацетоновую группу и получил гликоль (LXX), который окислил иодной кислотой. В результате получился диальдегид (LXXI), который при действии пиперидина циклизовался в стероид (LXXII) уже с пятичленным кольцом *D*. Несмотря на то, что соединение (LXXI) относительно симметрично, и кроме альдегида (LXXII) можно было ожидать образования его изомера (LXXIIa), реакция шла только по указанному пути

Окислением альдегида (LXXII) и этерификацией образовавшейся кислоты Вудворд получил соединение (LXXXIII) (см стр. 405).



Исходя из этой стероидной молекулы, Вудворд мог уже получать самые разнообразные соединения. Прежде всего он подошел к гестагенным гормонам. При гидрировании соединения (LXXIII) с платиной в уксусной кислоте и последующем омылении удалось выделить около 10% соединения (LXXIV). Все полученные до сих пор соединения были оптически неактивными, но, начиная с этой стадии, Вудворд счел удобным получить нужный оптически активный изомер. Он восстановил кетоэфир (LXXIV) боргидридом натрия в 3β-оксисоединение (LXXV) и затем подействовал дигитонином, который, будучи оптически активным соединением, образовывал комплекс только определенной оптической формы. После гидролиза этого комплекса и последующего окисления был получен тот же самый кетоэфир (LXXIVa), что и выше, но оптически активный. Потери на этих стадиях были очень велики, и Вудворду удалось получить соединение (LXXIVa) с выходом лишь 5%.

Далее Вудворд бромировал кетоэфир (LXXIVa), причем, поскольку здесь имеется транс-сочленение колец *A* и *B*, то бромирование сначала

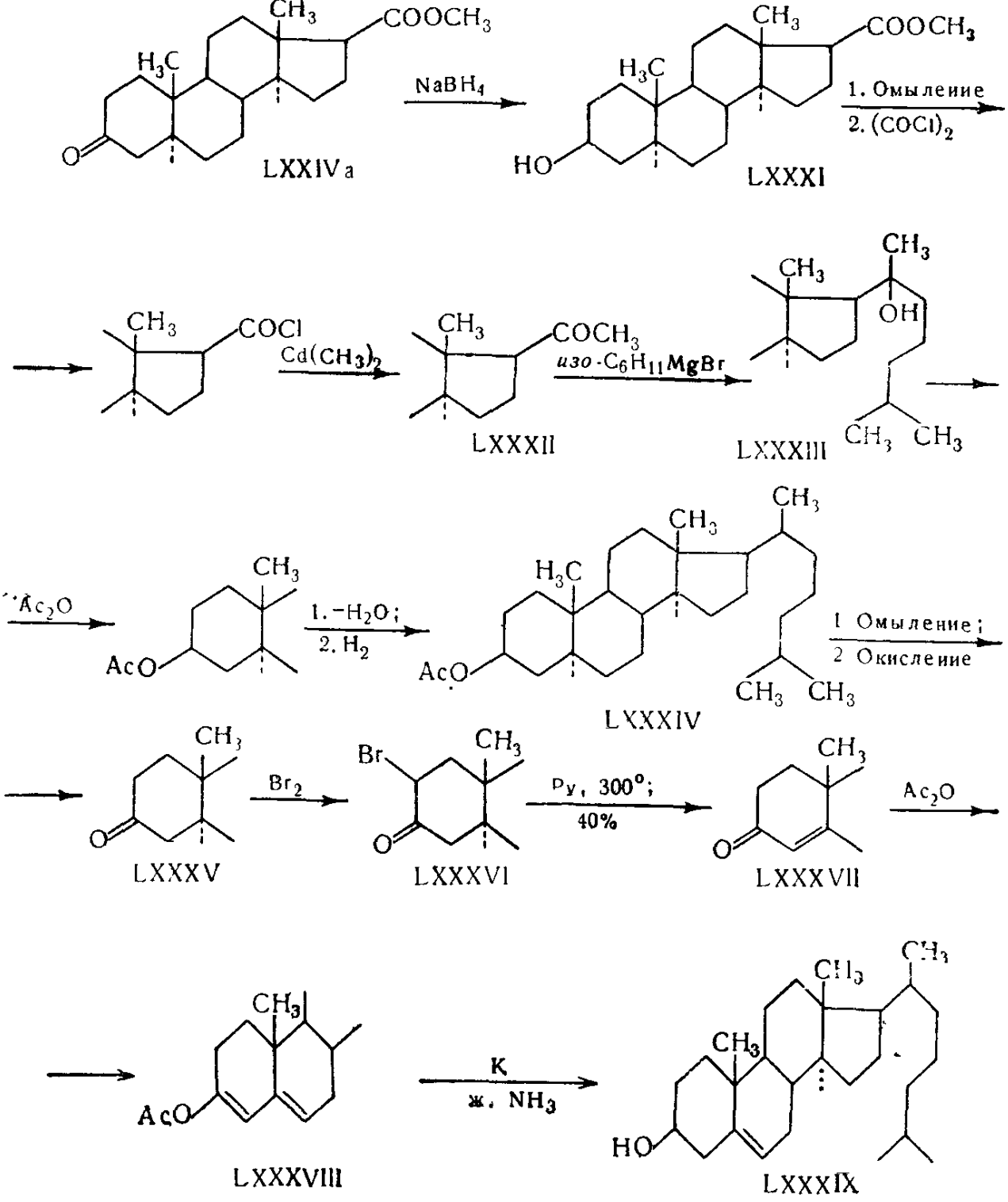


шло в положение 2 и потом в положение 4. Отщепление HBr от дибромпроизводного (LXXV) привело к 2-бромсоединению (LXXVI), от которого бром отщеплялся действием хлористого хрома. Омылением непредельного кетоэфира (LXXVII) была получена кислота (LXXVIII), и из нее (действием хлористого оксалила) хлорангидрид (LXXIX). Наконец, действием диметилкадмия на последний Вудворд получил прогестерон (LXXX). Так как раньше было известно, что прогестерон можно перевести в дезоксикортикостерон и кортизон, то полный синтез всех этих соединений также был завершен.

Исходя из того же тетрациклического соединения (LXXIVa), Вудворду удалось перейти к холестерину (см стр. 406).

Восстановлением кетоэфира (LXXIVa) боргидридом натрия он получил оксиэфир (LXXXI). Затем точно таким же приемом, как и при синтезе прогестерона, т. е. через хлорангидрид кислоты (с последующим действием диметилкадмия), он получил кетон (LXXXII). Понятно, что далее надо было действовать таким магнийорганическим соединением, которое включало бы боковую цепочку, т. е. магнийизогексил бромидом, что и привело к карбинолу (LXXXIII). Последовательным ацетилированием (причем ацетилировалась лишь вторичная гидроксильная группа), дегидратацией и гидрированием был получен ацетат холестанола (LXXXIV) — продукт гидрирования холестерина.

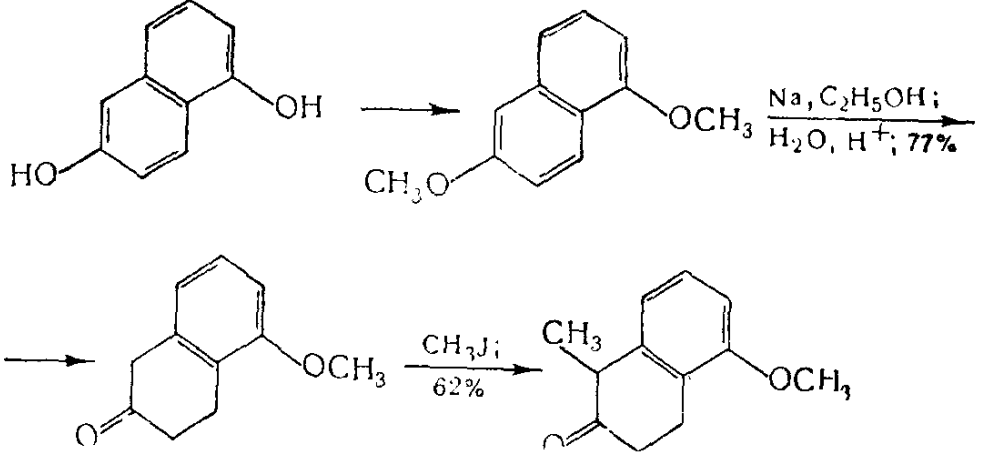
Переход от холестанола к холестерину был известен раньше. Холестанол окисляли в холестанон (LXXXV) и бромированием переводили в 2-бромсоединение (LXXXVI).



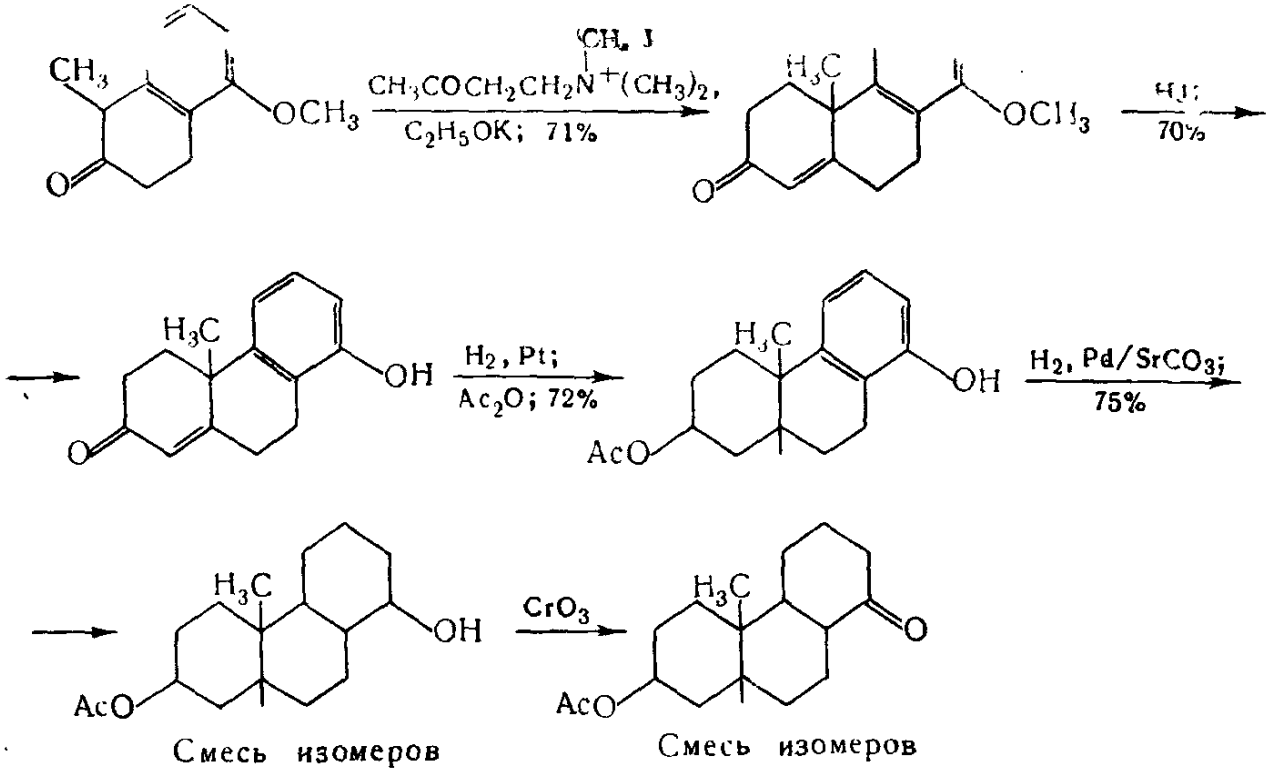
При нагревании последнего с пиридином происходила перегруппировка и получался холестенон (LXXXVII) с выходом 40%. При действии на холестенон уксусного ангидрида образовывался енолацетат (LXXXVIII), который при восстановлении калием в жидком аммиаке дал холестерин (LXXXIX). Таким образом был осуществлен синтез стерина, наиболее распространенного в животном царстве.

Синтез Вудворда имел громадное значение. Вудворд доказал во многих стадиях стерическую конфигурацию стероидной молекулы и, что, пожалуй, еще более важно, все разрозненные частичные синтезы, которые были известны до него, он объединил в одно общее гармоническое целое.

Следует подчеркнуть, что Вудворд не был единственным ученым, успешно осуществившим полный синтез стероидов. Одновременно с ним Робинсон опубликовал свой синтез холестерина, правда, гораздо более сложный, а через год последовали синтезы кортикоидов, осуществленные Сареттом (США). Робинсон исходил из доступного 1,6-диоксинафталина — скелета системы колец *B* и *C*.

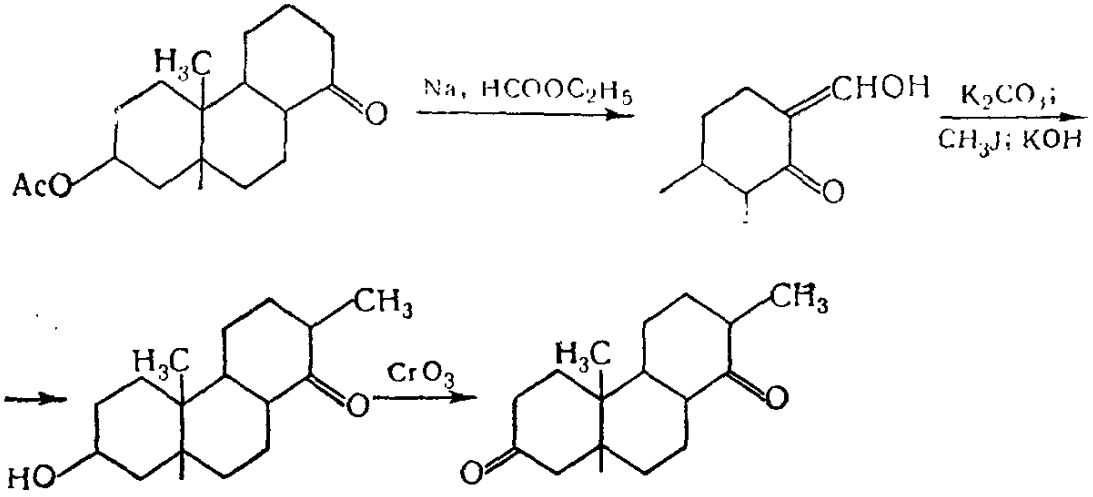


Для создания кольца *A* была применена конденсация с основанием Манниха.

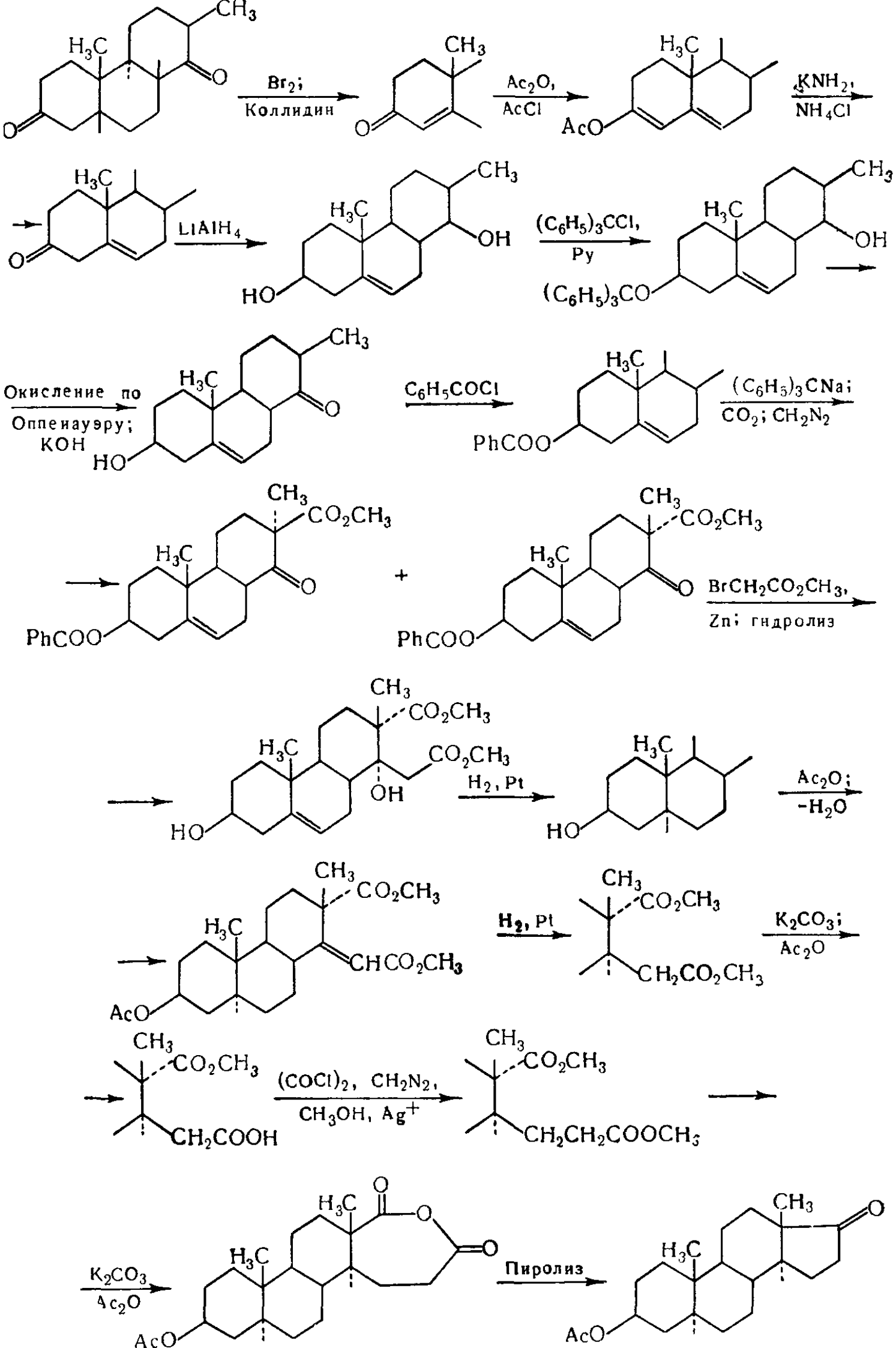


Смесь изомеров Смесь изомеров

Полученную смесь изомеров после омыления разделяли кристаллизацией кислых эфиров янтарной кислоты (выходы каждого изомера 5—10%). Выделенные в чистом виде изомерные оксикетоны, в свою очередь, разделяли на оптические антиподы через ментоксиацетаты (выходы 30—40%). С каждым оптически активным оксикетоном осуществляли следующие превращения:



Выход на все стадии 27%


Br2; Коллидин
Ac2O, AcCl
KNH2; NH4Cl
LiAlH4
(C6H5)3CCl, Py
Окисление по Оппенауэру; KOH
C6H5COCl
(C6H5)3CNa; CO2; CH2N2
BrCH2CO2CH3, Zn; гидролиз
H2, Pt
Ac2O; -H2O
H2, Pt
K2CO3; Ac2O
(COCl)2, CH2N2, CH3OH, Ag+
K2CO3 Ac2O
Пиролиз

Один из изомеров полученного трициклического дикетона оказался идентичным с продуктом, полученным из холестерина и дезоксихолевой кислоты.

Исходя из этого изомера были предприняты дальнейшие шаги, закончившиеся полным синтезом эпиандростерона. Построение кольца *D* в общем аналогично схеме Бахмана — Мишера. Оригинальным является перестройка цис-конфигурации колец *A* и *B* в транс-сочленение, осуществляемое введением и передвижной двойной связи и последующим гидрированием (см. стр. 408).

Из эпиандростерона еще раньше был синтезирован холестанол.

ЛИТЕРАТУРА

И. Н. Назаров, Л. Д Бергельсон Химия стероидных гормонов М, Изд-во АН СССР, 1955, стр 546—623.

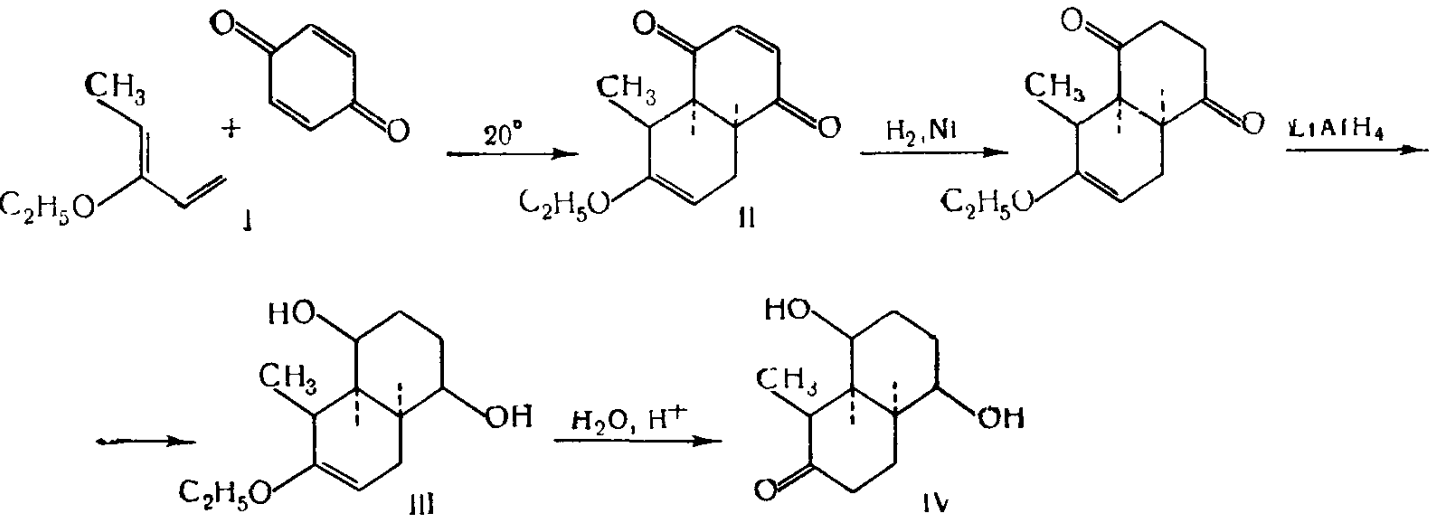
Л. Физер, М. Физер. Химия природных соединений фенантренового ряда. М, Изд-во АН СССР, 1953, стр. 327—334.

W. S. Johnson, R. G. Christiansen, R. E. Guland. J. Am Chem Soc., 1957, 79, 1995.

Глава 12

ПОЛНЫЙ СИНТЕЗ СТЕРОИДОВ. СИНТЕЗ КОРТИЗОНАЦЕТАТА, СИНТЕЗ ЭПИАНДРОСТЕРОНА ПО ДЖОНСОНУ. СИНТЕЗЫ ТЕСТОСТЕРОНА, АЛЬДОСТЕРОНА, ЭКВИЛИНА

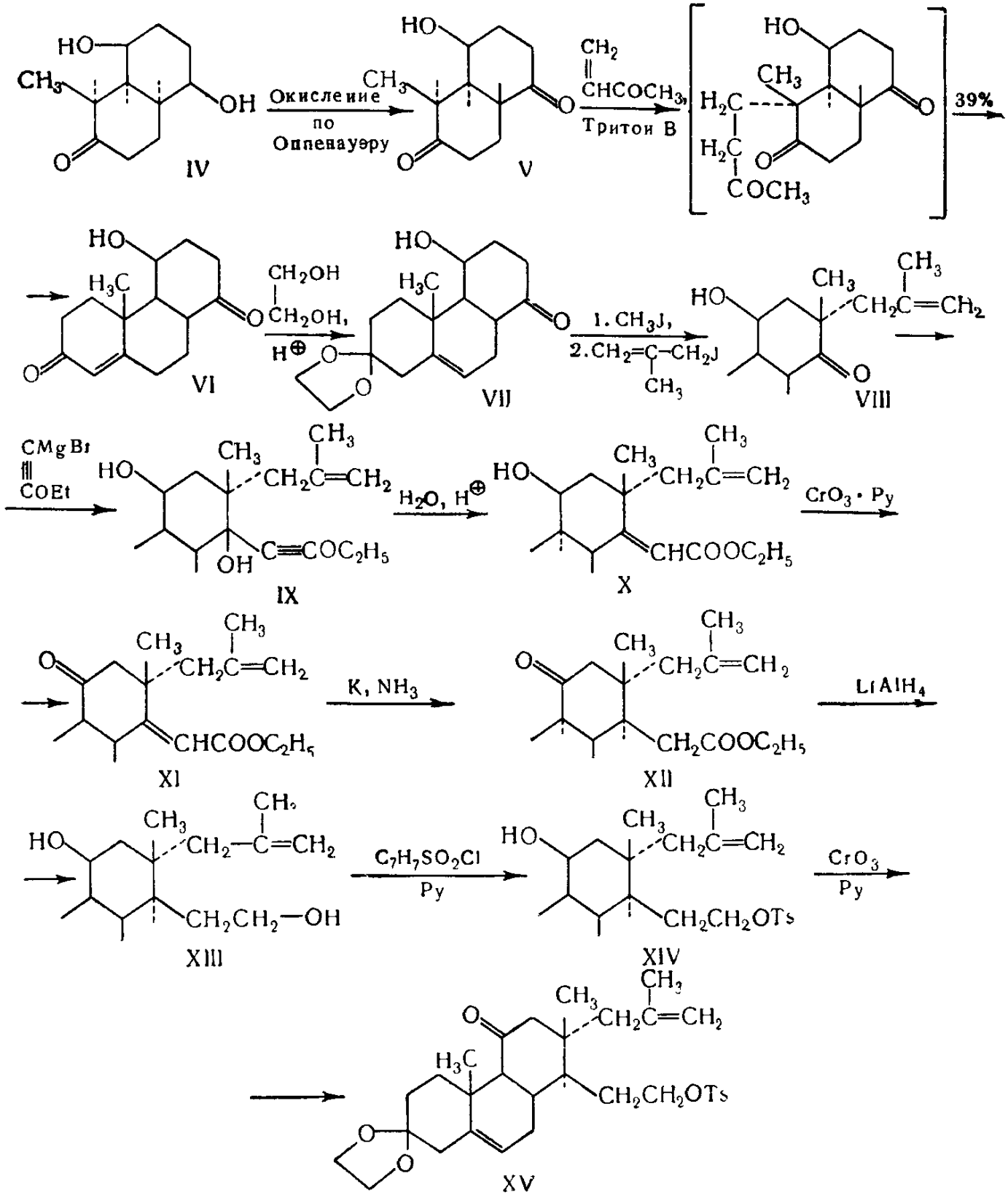
В отличие от синтеза Вудворда, где кортикостероиды с функциональной группой в положении 11 могли быть синтезированы из соединения, не имеющего кислородного заместителя в кольце *C*, Саретт на первых стадиях синтезировал соединение с функциональной группой в положении 11. Вместо того, чтобы синтезировать кольца постепенно, начиная от *A* до *D*, или, наоборот, по Вудворду, от *D* до *A*, он в первую очередь синтезировал средние кольца *B* и *C*. На первой стадии Саретт, так же как и Вудворд, использовал диеновый синтез. Конденсацией 1-метил-2-этоксибутадиена (I) с хиноном при 20° с выходом 55% был получен бициклический кетон, пространственное строение которого не вызывало никаких сомнений. Это был цис-цис-кетон (II). Дальше этот дикетон гидрировался и восстанавливался алюмогидридом лития в диол (III). Гидролиз в присутствии кислоты привел к кетодиолу (IV), нижнее кольцо которого является кольцом *B*, а верхнее — кольцом *C* будущего стероида.



Окислением кетодиола (IV) по Оппенауэру получается дикетон (V), причем инверсия происходит в положении 8 с образованием системы транс-декалина, что, как известно, и нужно для образования молекулы стероида.

Эта инверсия была доказана восстановлением дикетона (V), причем был получен кетодиол, отличный от исходного кетодиола (IV).

Дальше дикетон (V) конденсировался с метилвинилкетоном в присутствии щелочных агентов, из которых наилучшим явилась гидроокись триметилбензиламмония, так называемый тритон В. Так как конденсация может проходить по различным местам молекулы, то выход нужного продукта составляет только 39%.



При этой реакции прошло не только присоединение метилвинилкетона, но также одновременно и замыкание продукта конденсации в трициклический дикетон (VI). Кетогруппа, сопряженная с двойной связью, была защищена обычным образом с помощью этиленгликоля, и полученный кеталь (VII) явился исходным продуктом для синтеза стероидов.

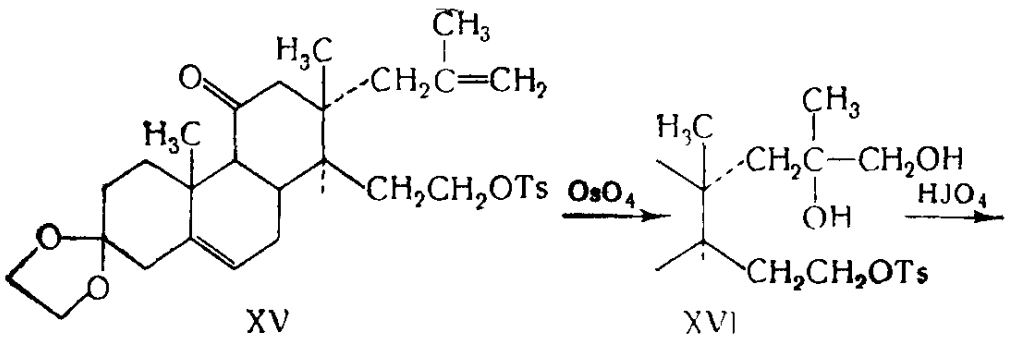
Дальше Саретт метилировал кетон (VII) иодистым метилом обычным способом, а затем — вторично алкилировал иодистым металлилом, получив соединение (VIII).

Легко заметить, что эта непредельная алкильная цепь должна стать основой для синтеза кортикоидной цепочки. Для наращивания боковой цепи внизу и для последующего замыкания кольца можно было бы провести реакцию Реформатского, как это делали и Бахман, и Мишер. Саретт, однако, употребил другой реагент, открытый А. Е. Фаворским и М. Н. Щукиной,— магниевое производное этоксиацетилена и гидролизом промежуточного карбинола (IX) пришел к непредельному эфиру (X).

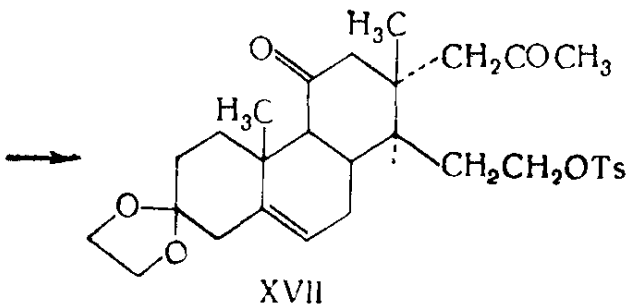
Саретт окислил соединение (X) до кетоэфира (XI) и затем восстановил двойную связь калием в жидком аммиаке, причем образовавшийся кетоэфир имел ту же конфигурацию, что и природные стероиды.

Затем кетоэфир (XII) восстанавливался алюмогидридом лития в диол (XIII). Действием паратолуолсульфохлорида в пиридине первичная спиртовая группа защищалась, и образовавшийся тозилат (XIV) окислялся хромовым ангидридом в пиридине до кетона (XV). Такой окислитель был выбран потому, что кетальная группировка чувствительна к кислотам и окислить вторичную спиртовую группу обычным путем в кислой среде не представлялось возможным.

Для создания боковой цепи кетон (XV) обрабатывали осмиевым ангидридом, который окислял двойную связь до диола (XVI). Последний при действии иодной кислоты перешел в дикетон (XVII).



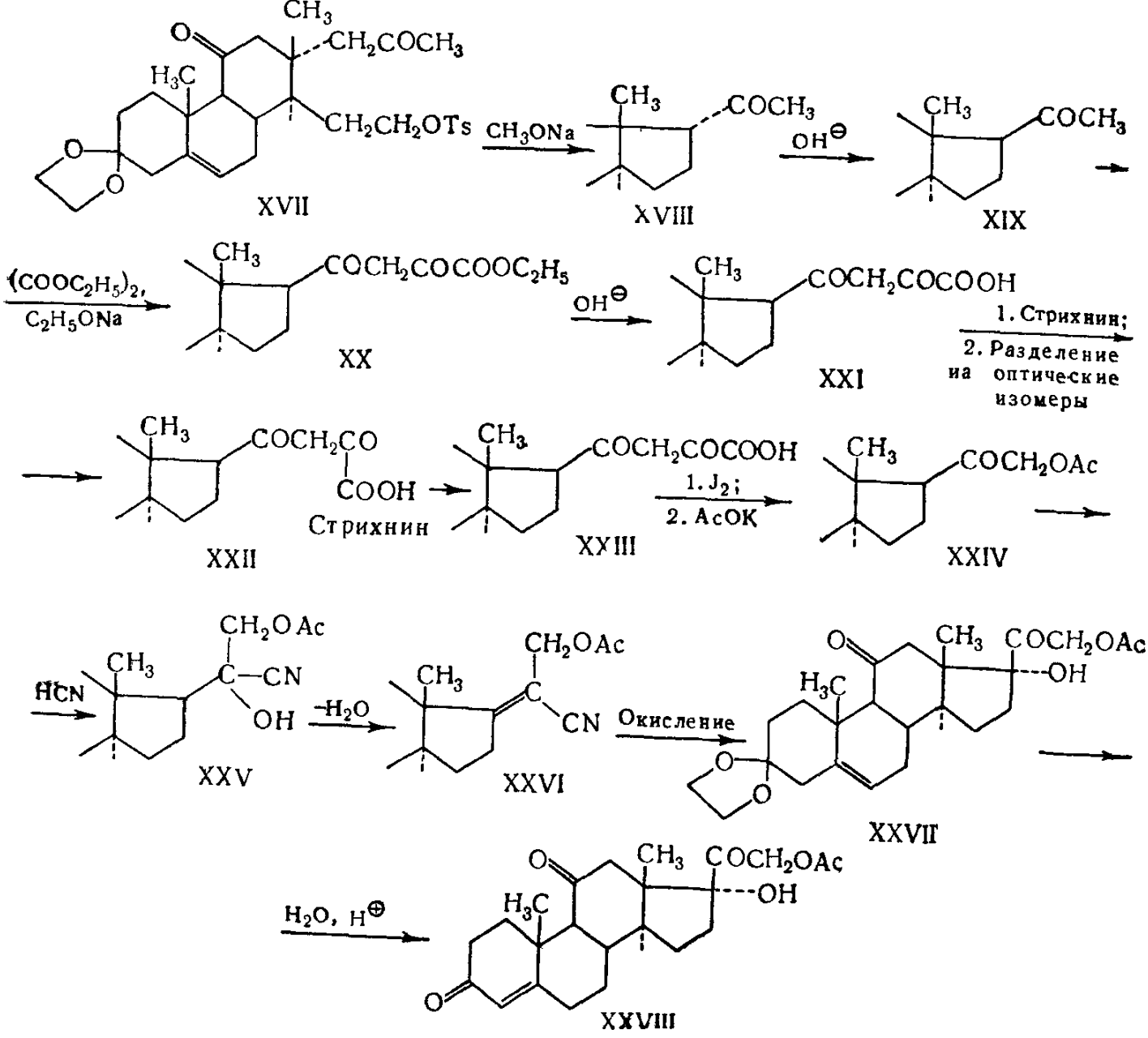
XV XVI



XVII

Известно, что γ-, δ-, ε- и прочие галоидкетоны при действии щелочных агентов циклизуются в алициклические кетоны. Тозильная группа ведет себя аналогично галоиду, и поэтому Саретту удалось обработкой метилатом натрия дикетона (XVII) перейти к стероидному дикетону (XVIII), в котором боковая цепочка имела α-конфигурацию. Это не явилось помехой, так как было известно, что стероиды с α-ориентированной цепью переходят под действием щелочей в β-изомеры и в данном случае дикетон (XVIII) был легко превращен в β-изомер (XIX).

Дальше дело уже обстояло значительно проще. Прежде всего, нужно было ввести гидроксильную группу в положение 21, для чего дикетон (XIX) конденсировали с щавелевым эфиром.



Саретт ввел остаток щавелевой кислоты в молекулу стероида еще и для того, чтобы на этой стадии разделить вещество на оптические изомеры. Вначале при конденсации он получил сложный эфир (XX), потом при осторожном омылении самую кислоту (XXI), а из нее — стрихниновую соль (XXII), которую и разделил на оптические изомеры.

Таким образом, Саретт получил исходную кислоту, но оптически активную (XXIII). Затем он действовал иодом, причем на место остатка щавелевой кислоты входил иод, а дальше действием ацетата калия получил 21-ацетоксисоединение (XXIV).

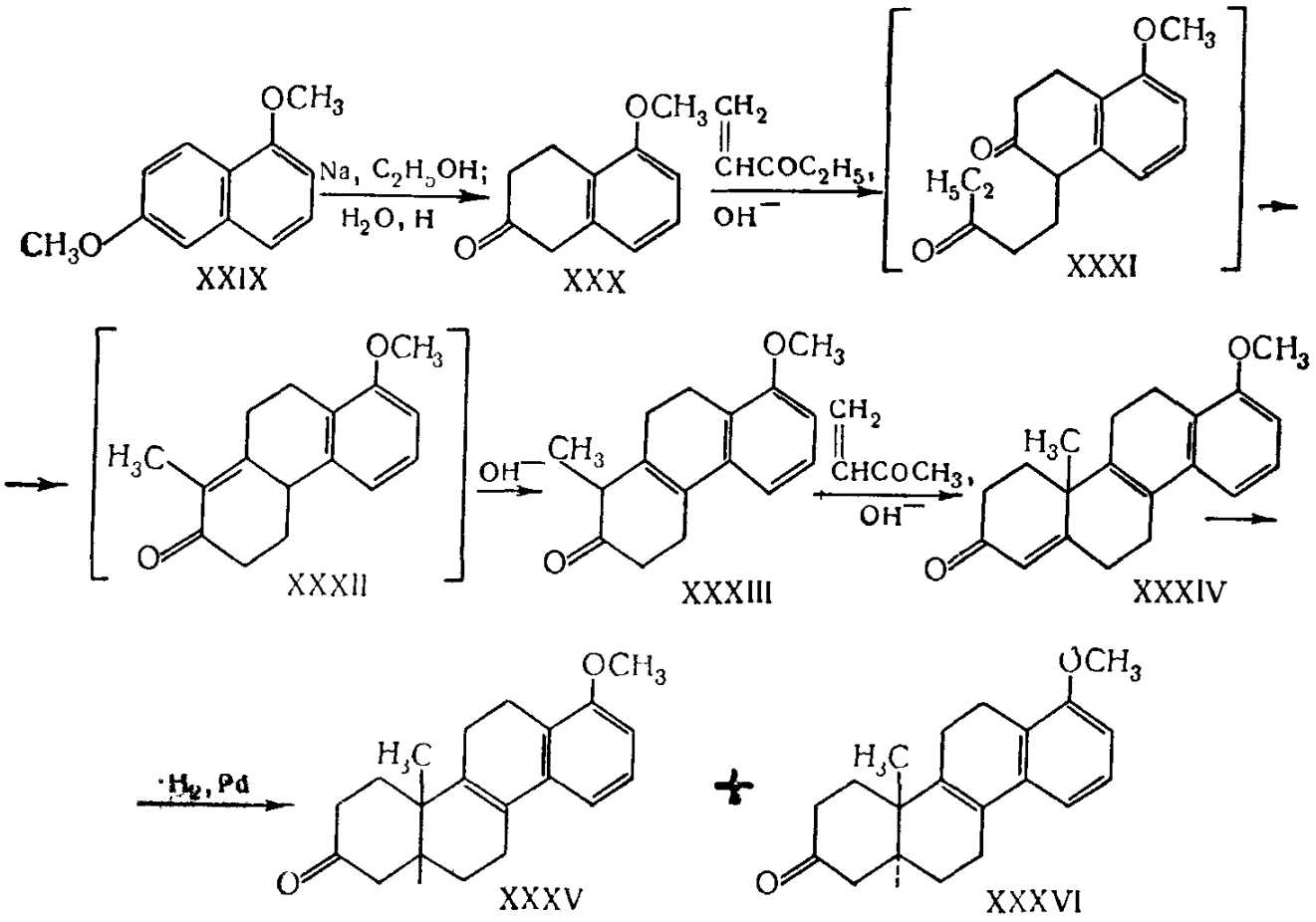
После этого оставалось ввести в положение 17 гидроксильную группу; соответствующий метод был раньше разработан самим же Сареттом и заключался в действии синильной кислоты, дегидратации образовавшегося нитрила (XXV) и, наконец, окислении непредельного нитрила (XXVI) марганцевокислым калием в присутствии небольшого количества четырехокиси осмия в 17-оксисоединение (XXVII). Гидролиз последнего в кислой среде дал кортизонацетат (XXVIII).

Хотя синтез Саретта не менее многостадиен, чем синтезы Вудворда и Робинсона, он отличается большой стройностью и в ходе его было легко установить конфигурацию промежуточных соединений Саретт получил и другие стереоизомеры кортизона и определил конфигурацию всех этих соединений.

Эта работа была продолжена швейцарскими химиками, и на основе трициклического кетона Саретта (VII) был синтезирован альдостерон, один из самых мощных кортикоидных препаратов.

Прежде чем перейти к рассмотрению альдостерона, следует остановиться на работах Джонсона по синтезу как кортикоидных, так и андрогенных гормонов.

Джонсон исходил из соединений нафталинового ряда, в которых имелась бициклическая система, использованная им для построения колец *C* и *D*. Исходное соединение — диметиловый эфир 1,6-диоксинафталина (XXIX) легко доступен, потому что соответствующие сульфокислоты нафталина являются объектом промышленного производства, а перейти от сульфокислот к фенолам и к их метиловым эфирам не составляет труда. Восстановлением эфира (XXIX) натрием в спирте был получен кетон (XXX), который конденсировали с этилвинилкетоном. В реакцию вводился не сам этилвинилкетон, а продукт присоединения к нему диметиламина и затем иодистого метила.

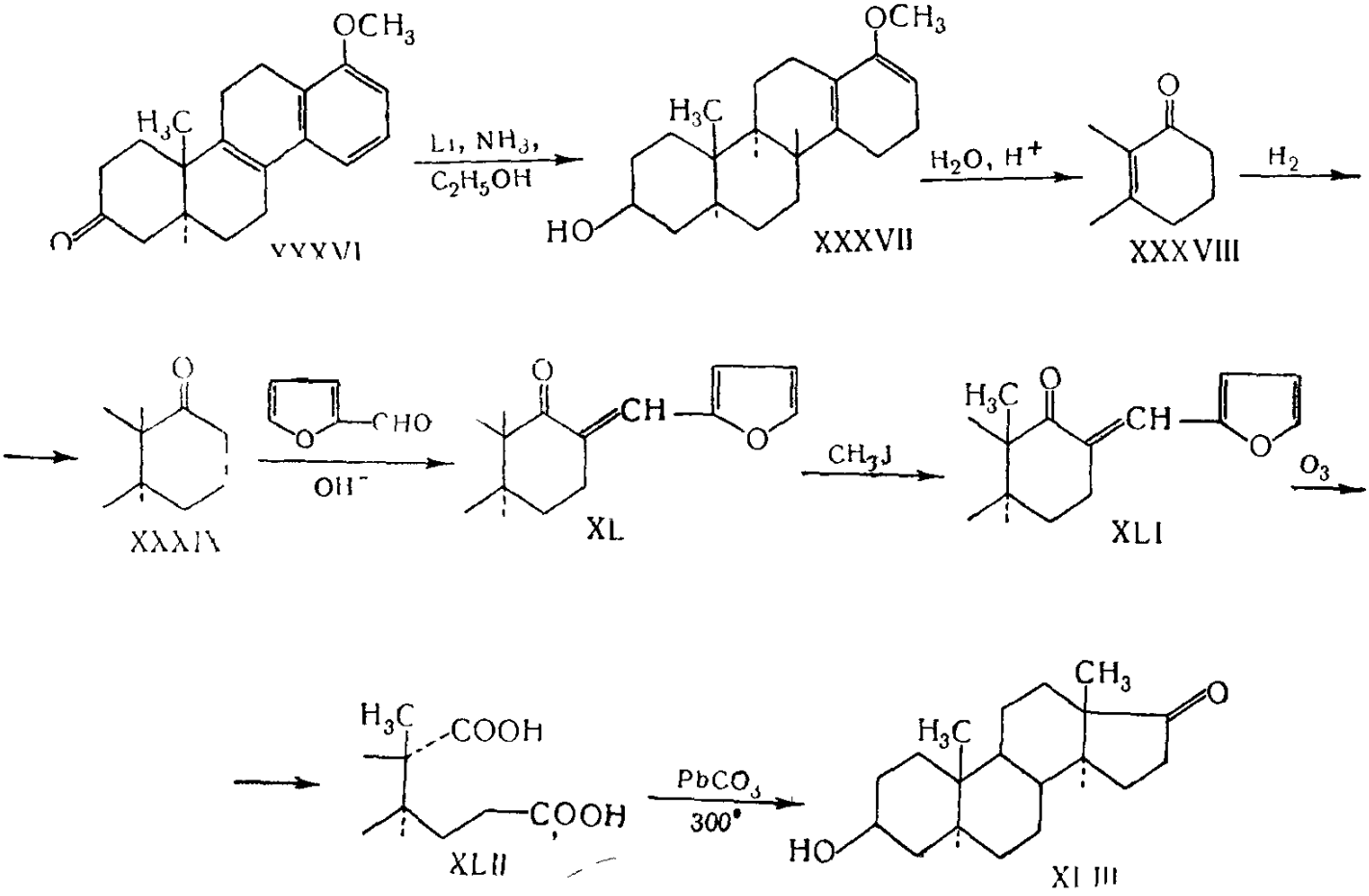


Как было установлено, этилвинилкетон присоединяется именно в α-положение нафталинового ядра. Дальше в условиях реакции (а эта реакция идет в щелочных условиях) происходит обыкновенная конденсация кротонового типа с образованием кетона (XXXIII). Первоначально образующаяся в положении α, β двойная связь переходит в сопряженное положение к ароматическому кольцу. Эта реакция протекает с выходом свыше 50%. С кетоном (XXXIII) Джонсон повторил аналогичную конденсацию, взяв уже метилвинилкетон Реакция была проведена опять-таки в щелочных условиях и привела к тетрациклическому кетону (XXXIV), причем выход здесь был значительно более скромным. Это производное гидрохризена явилось для Джонсона таким же основным продуктом, как для Саретта его трициклический кетон (VII).

В дальнейшем, естественно, напрашивалось гидрирование двойных связей При каталитическом гидрировании в данном случае получилось два изомера: один (XXXV) с цис-сочленением колец *A* и *B*, другой

(XXXVI) с транс-сочленением колец *A* и *B*; и тот, и другой пригодились для последующих синтезов.

Прежде всего Джонсон синтезировал эпиандростерон, исходя из транс-изомера (XXXVI). Действуя на последний литием в жидком аммиаке, он получил смесь продуктов, из которых ему удалось выделить соединение (XXXVII), а из него гидролизом кетон (XXXVIII). Гидрирование этого кетона привело к смеси стереоизомеров, один из которых (XXXIX) имел транс-сочленение колец *C* и *D*.

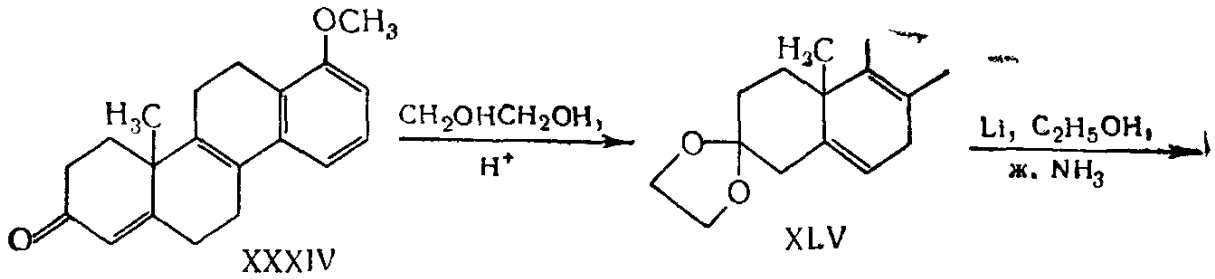


Теперь оставалось ввести ангулярную метильную группу и превратить шестичленное кольцо в пятичленное. Для защиты стерически доступных α-атомов водорода Джонсон конденсировал кетон (XXXIX) с фурфуролом, поскольку реакции с ним идут с более высокими выходами, чем с другими альдегидами, и обработка в дальнейшем чрезвычайно проста. Затем он метилировал фурфурилиденовое производное (XL) в метильное производное (XLI). При этом получается несколько изомеров, так как метильная группа, несмотря на совершенно определенную β-ориентацию водорода, встает также и в α-положение, что часто бывает при реакциях метилирования. Джонсону удалось выделить нужный изомер со скромным выходом и осуществить в дальнейшем остальные превращения.

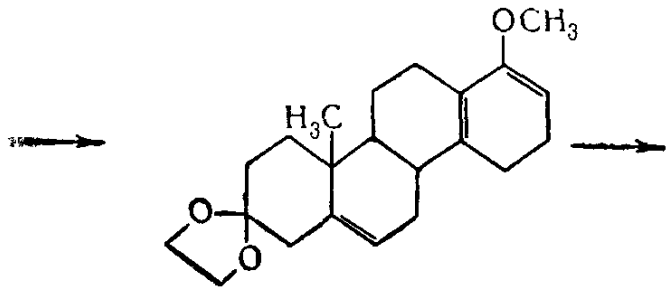
Для построения пятичленного кольца было проведено окислительное расщепление кольца *D*. Джонсон осуществил это двумя способами озонированием и действием перекиси водорода, причем озонирование во многих случаях давало лучшие результаты Нагреванием образовавшейся дикарбоновой кислоты (XLII) с углекислым свинцом при 300° или этерификацией и затем циклизацией по Дикману был синтезирован эпиандростерон (XLIII).

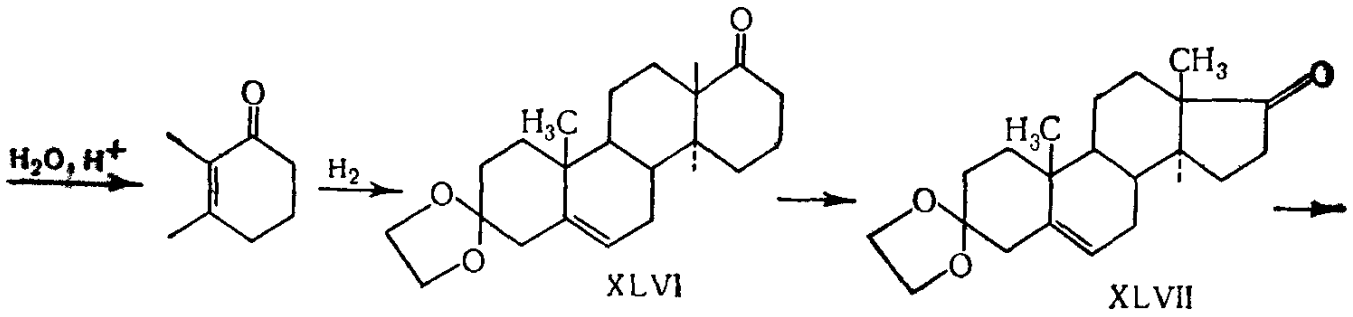
Исходя из кетона (XXXIV), Джонсон осуществил примерно таким же образом синтез тестостерона (XLIV). Поскольку в тестостероне требуется сохранить двойную связь в кольце *A*, Джонсон вначале дей-

ствием гликоля защитил кетогруппу и перевел двойную связь в кольцо *B*, сделав ее таким образом чрезвычайно инертной. Затем действием на кеталь (XLV) литием и спиртом в жидком аммиаке с последующим гидролизом и гидрированием он перешел к кетону (XLVI). Таким же точно путем, который уже был описан выше, он ввел метильную группу, превратил шестичленное кольцо в пятичленное и получил кеталь андростендиона (XLVII).

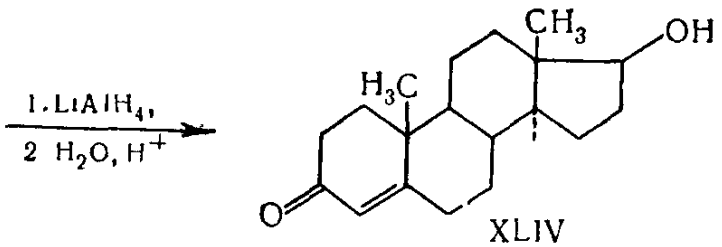


XXXIV XLV





XLVI XLVII

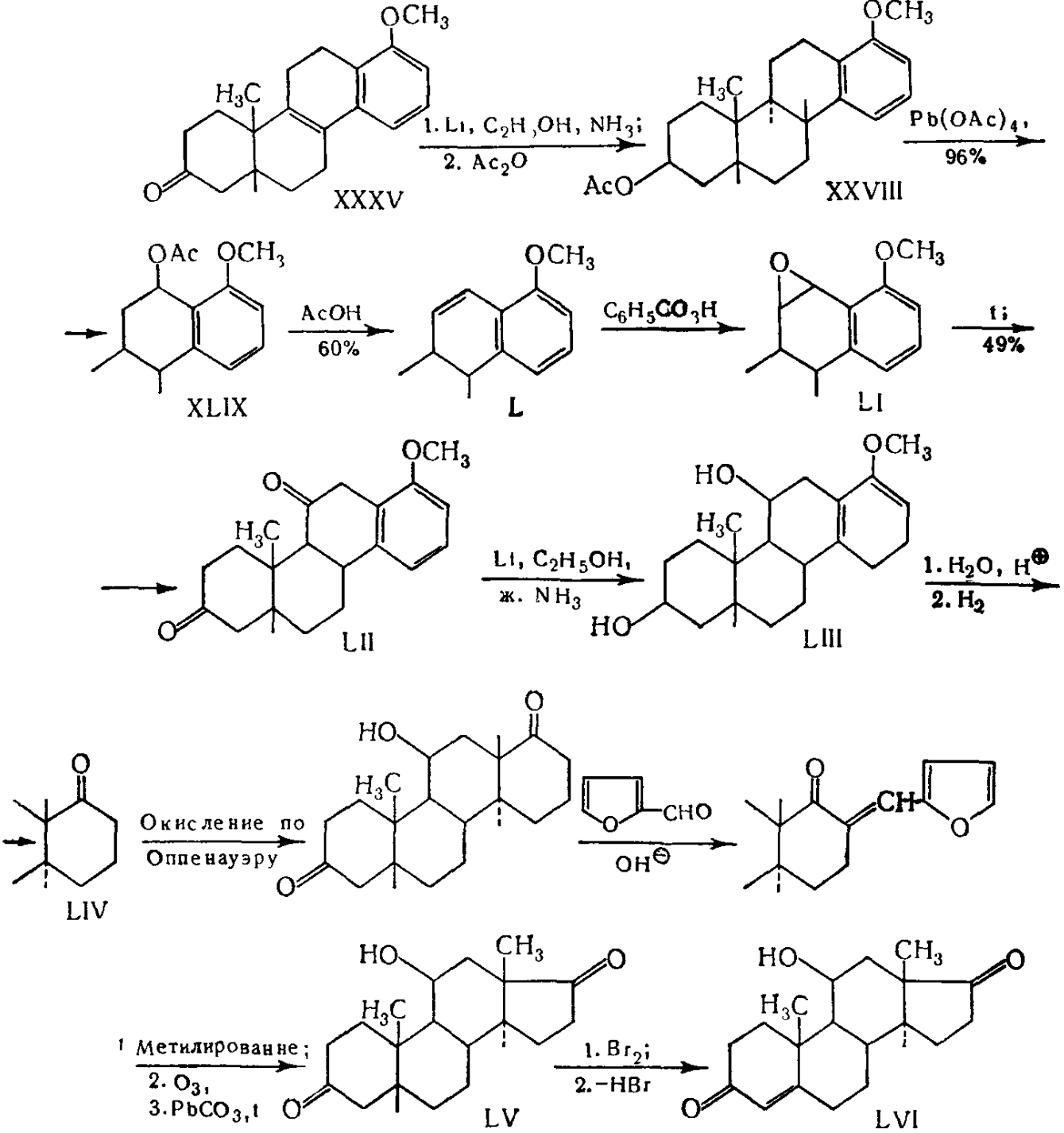


XLIV

Восстановлением алюмогидридом лития была введена гидроксильная группа, а последующий гидролиз в кислой среде привел к тестостерону (XLIV).

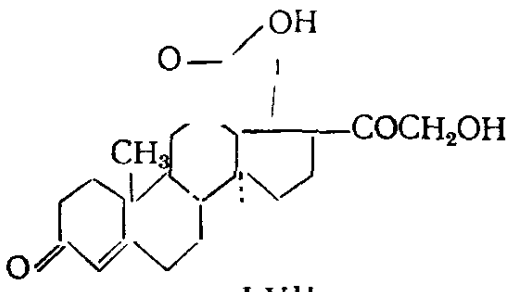
Для синтеза кортикоидов Джонсон использовал кетон (XXXV), который при восстановлении и последующем ацетилировании дал ацетат (XLVIII). Последний был окислен тетраацетатом свинца в диацетат (XLIX), причем оказалось, что этот агент окисляет кольцо *C* в положении 12 (см. стр. 417).

Дальше нагреванием с уксусной кислотой Джонсон удалил 12-ацетоксигруппу, а образовавшееся производное (L) окислил надбензойной кислотой в окись (LI). Пиролизом последней Джонсон получил соединение (LII) с CO-группой в положении 11. Восстановление его литием в жидком аммиаке в присутствии спирта привело к соединению (LIII). Дальше последовал гидролиз, гидрирование в кетон LIV [выход последнего составлял 15%, считая на кетон (XXXV)] и те же самые стадии,



которые были приведены выше с одной только усложняющей подробностью, что 3-гидроксильную группу нужно было заменить на кетонную реакцией Оппенауэра и ввести двойную связь, характерную для кортикоидных гормонов. Шестичленное кольцо, как обычно, было переведено в пятичленное, и затем путем бромирования дикетона (LV) и дегидро бромирования была введена двойная связь. Исходя из соединения (LVI) или (LV), можно было перейти к любым кортикоидным гормонам.

Большой заслугой Джонсона явилось также и то, что исходя из производных хризена, он перешел к альдостерону (LVII).

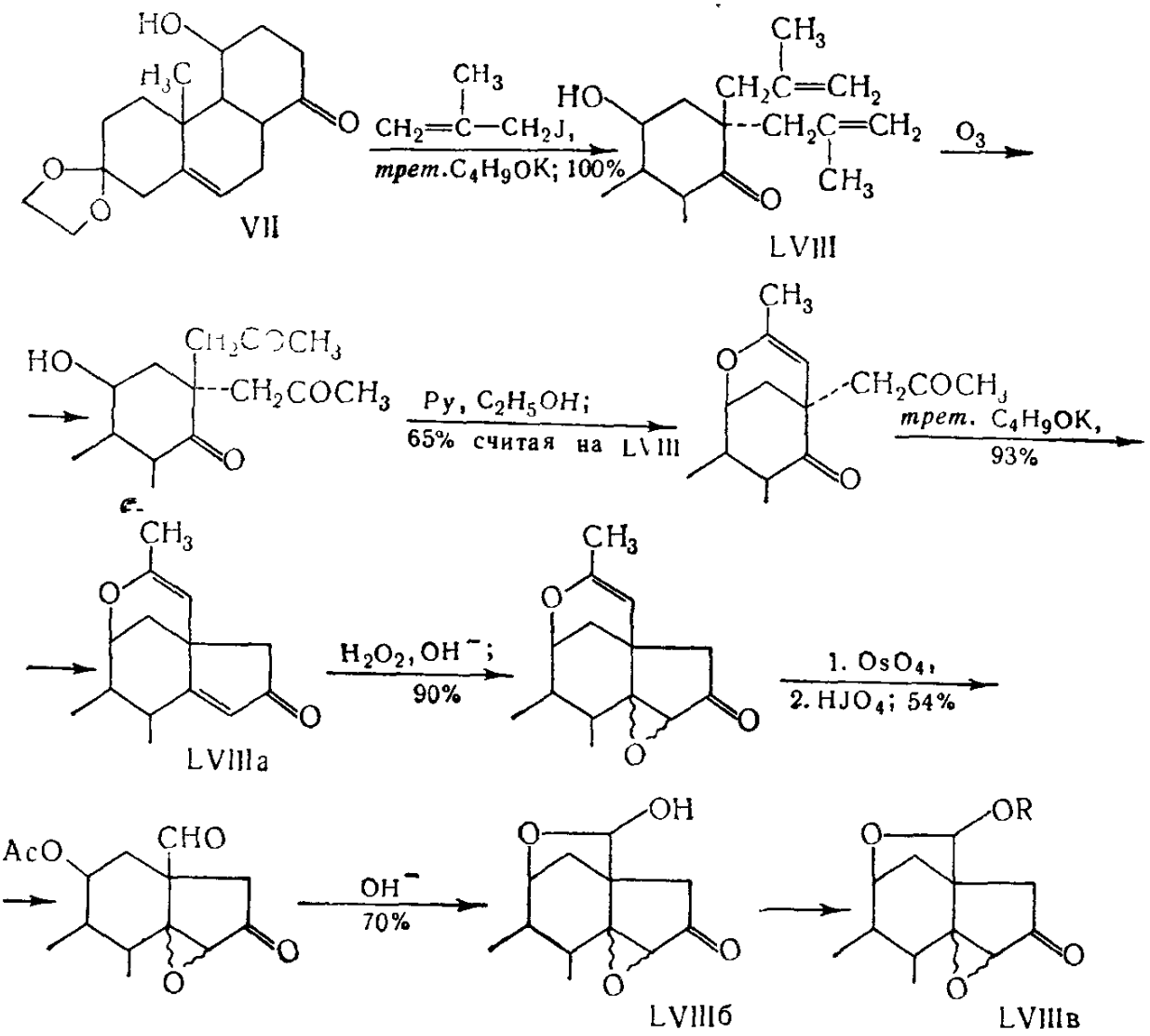


LVII

Этот гормон интересен тем, что вместо 19-метильной группы в нем находится альдегидная группа, которая с пространственно близкой ей гидроксильной группой образует полуацеталь.

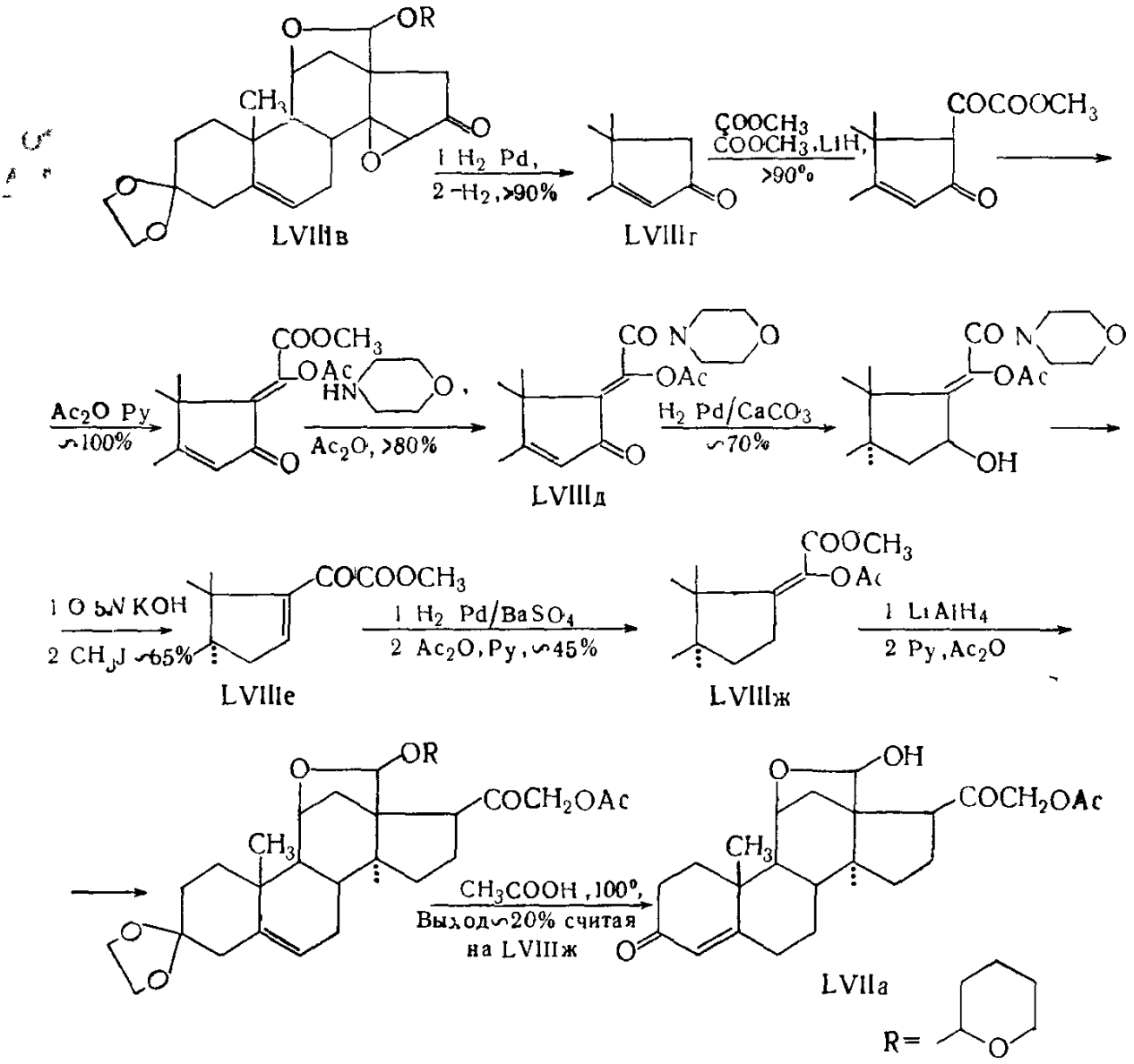
Как видно, подход к синтезу такого соединения не легок, так как введение альдегидной группы в положение 19 является трудной задачей. Эту задачу удалось решить одновременно Джонсону в США и Рейхштейну и Ветштейну в Швейцарии.

Ветштейн исходил из кетона Саретта (VII), который алкилированием с помощью металлилиодида был превращен в кетон (LVIII). Озонированием последнего и циклизацией полученного трикетона был получен кетон (LVIIIа), который после эпоксидирования, окисления и омыления дал полукеталь (LVIIIб).



Гидрированием пиранильного производного кетола (LVIIIв) с последующей дегидратацией образовавшегося β-кетола был получен непредельный кетон (LVIIIг), который конденсировали с диметилоксалатом. Продукт конденсации при ацетилировании дал енолацетат, превращенный в морфолид (LVIIIд). Последовательное гидрирование, омыление (с одновременной дегидратацией) и метилирование позволило перейти от морфолида (LVIIIд) к кетоэфиру (LVIIIе), из которого рядом реакций восстановления был получен ацетат альдостерона (LVIIа) (см. стр. 419).

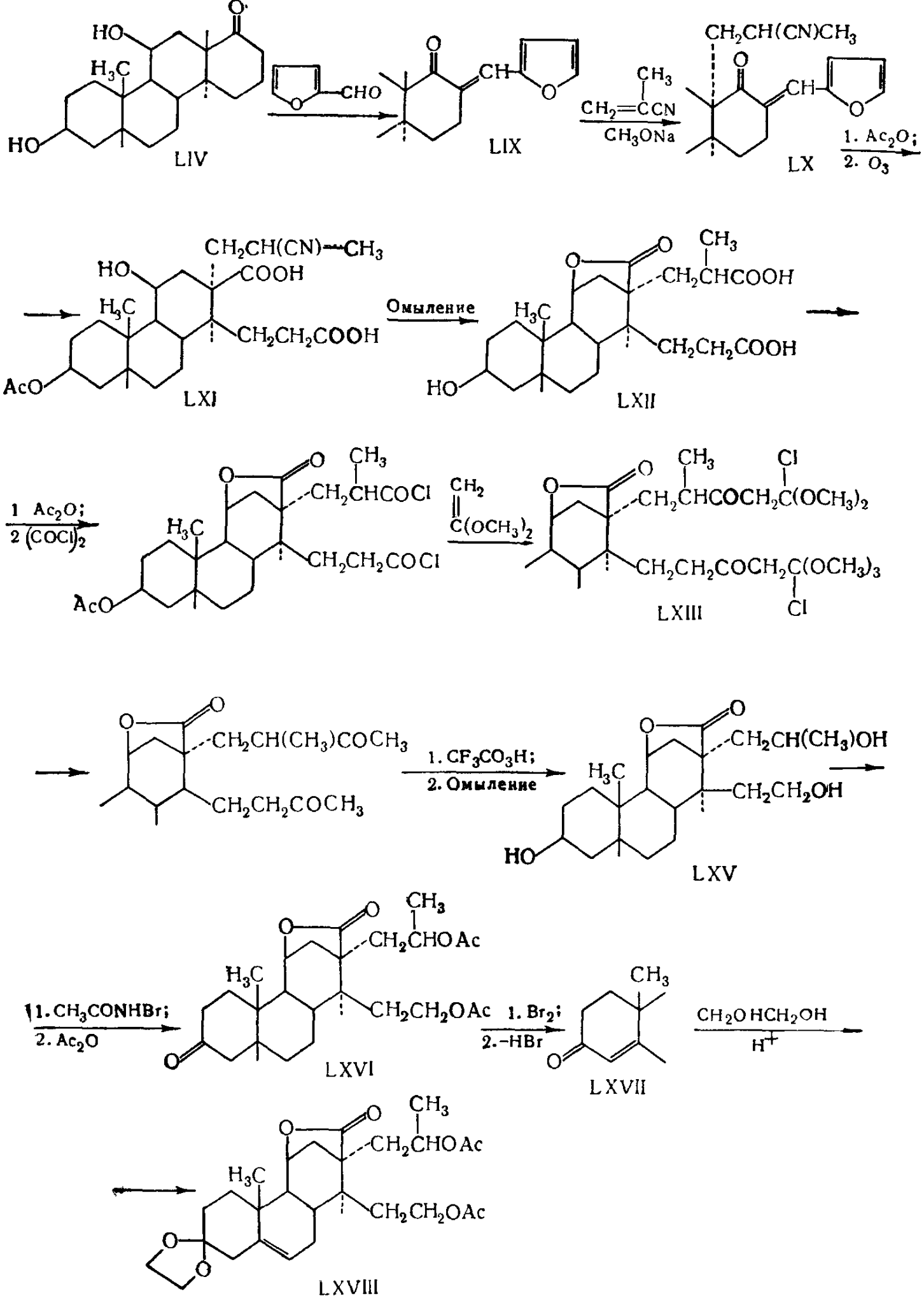
Джонсон исходил из описанного выше кетона (LIV). Конденсацией его с фурфуролом он получил производное (LIX), которое ввел в реакцию Михаэля с метилакрилнитрилом, причем с инверсией при C_{13} обра-



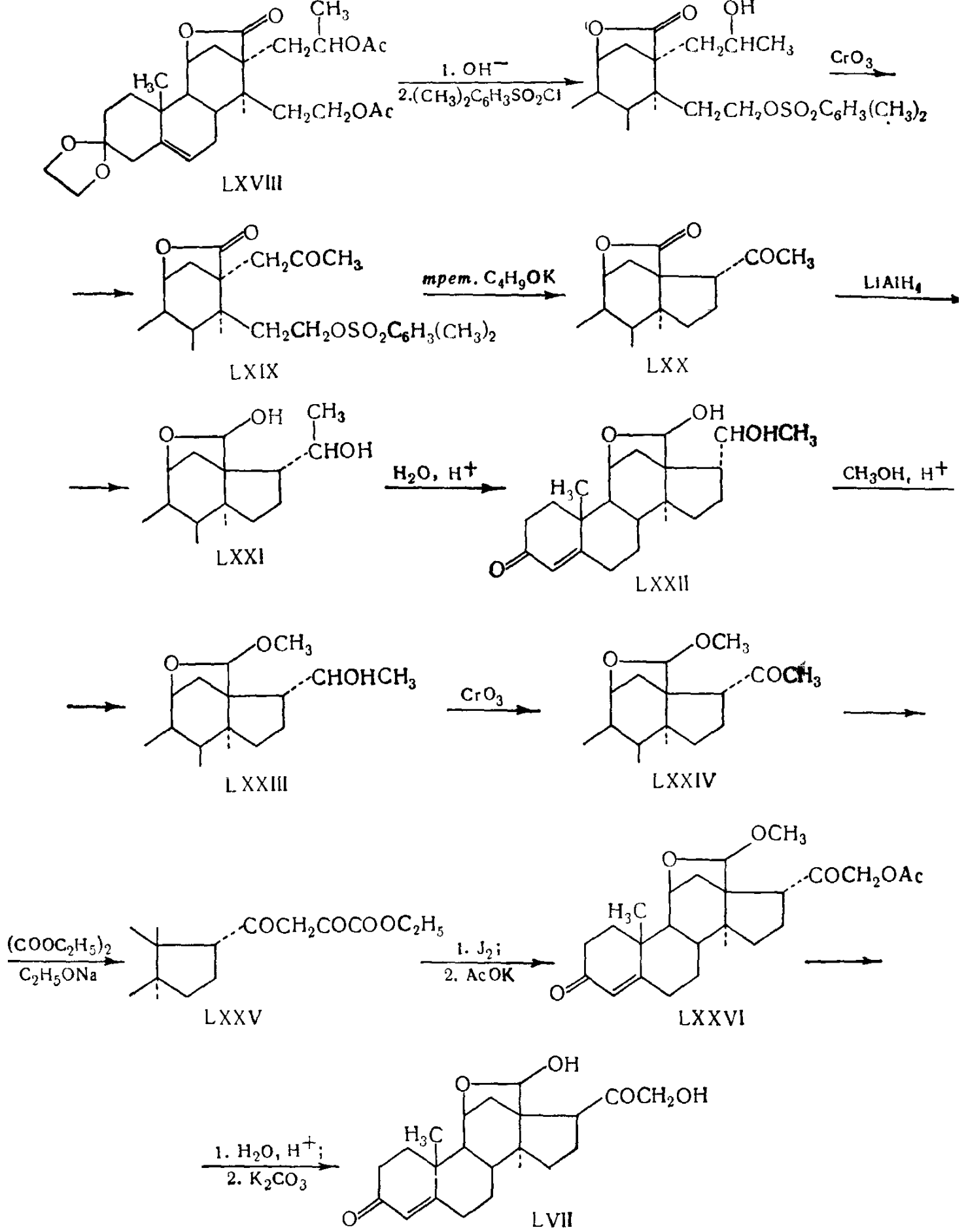
зовалось соединение (LX). Озонированием этого соединения он получил дикарбоновую кислоту (LXI) и затем (после омыления) лактонокислоту (LXII) Действием уксусного ангидрида и затем хлористого оксалила он перевел последнюю в хлорангидрид и затем подействовал диметилкеталем кетена, в результате чего вместо хлора встала метильная группа Возможно, что реакция проходит через образование производного β-кетокислоты (LXIII) путем присоединения кеталя к реакционноспособной связи Остается неясным, почему Джонсон применил именно эту реакцию, а не какую-нибудь другую Так, для введения метильной группы можно было взять магнииодметил или диметилкадмий

Полученный таким путем дикетон (LXIV) был окислен трифторнадуксусной кислотой по известной реакции Байера — Виллигера в триол (LXV) Окисление последнего N-бромацетамидом в водноспиртовой среде и ацетилирование привело к кетолактону (LXVI). Последовательным бромированием и дегидромированием была введена двойная связь, а непредельный кетон (LXVII) действием этиленгликоля превращен в кеталь (LXVIII), как это показано на стр 420

После омыления, защитив первичную спиртовую группу обработкой параксилолсульфохлоридом, Джонсон окислил вторичную спиртовую группу до кетонной и пришел к соединению (LXIX) с той же самой группировкой, какую имел Саретт перед построением кольца *D* в синтезе кортизона (см стр 412) При действии бутилата калия на кетон (LXIX) образовался стероидный кетолактон (LXX), восстановление которого алюмогидридом лития привело к полуацеталю (LXXI), а



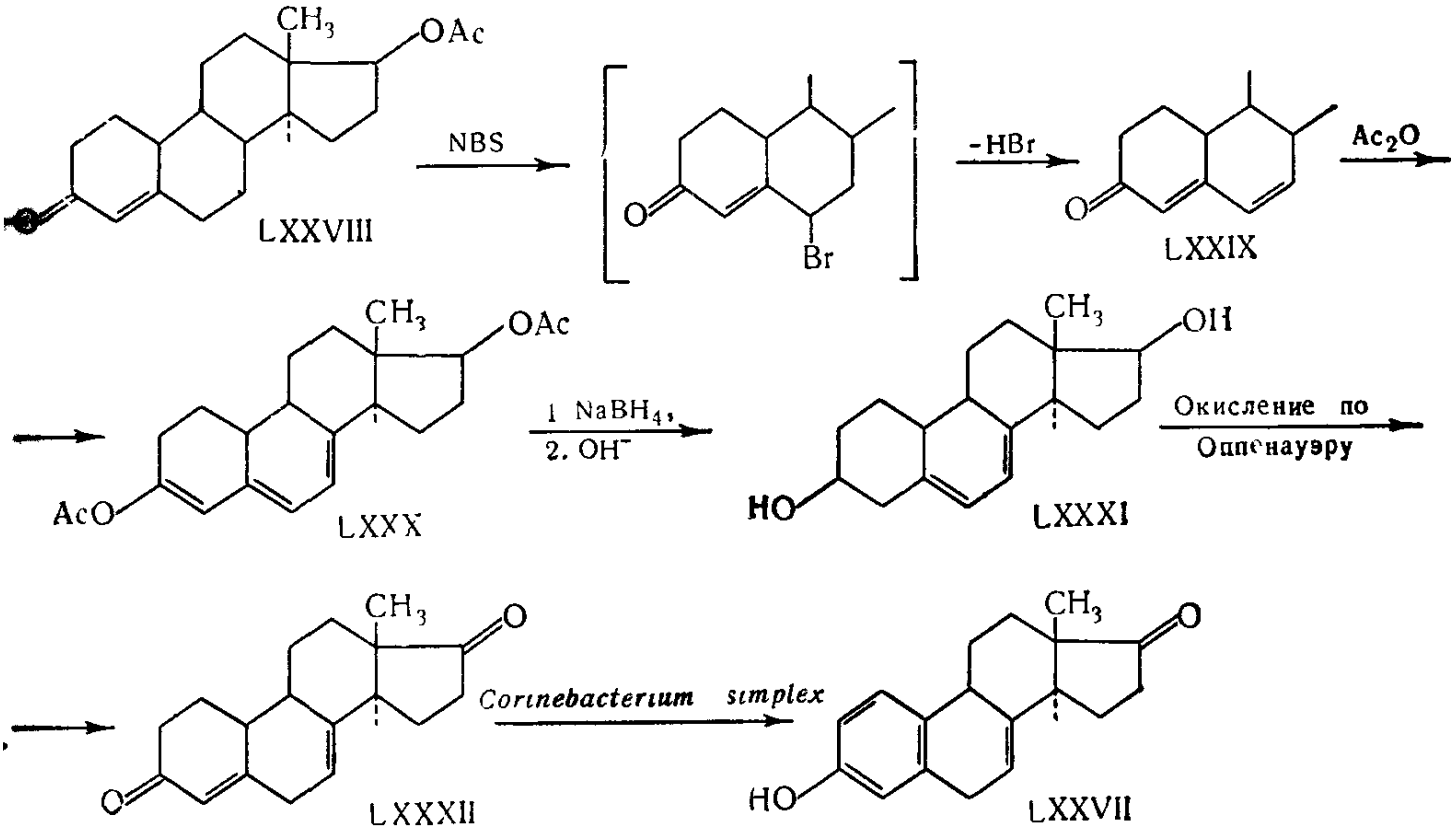
последующий гидролиз — к кетону (LXXII). Защитив ацетальный гидроксил метанолом, Джонсон окислил кетол (LXXIII) в дикетон (LXXIV), который он далее конденсировал с щавелевым эфиром в кетоэфир (LXXV).



Полученный кетоэфир при обработке иодом и затем ацетатом калия был превращен в 21-ацетоксипроизводное (LXXVI). Кислый гидролиз и изомеризация под влиянием поташа (с одновременным омылением ацетоксигруппы) привели в результате к альдостерону (LVII)

Работа Джонсона была опубликована лишь в виде краткого сообщения, детали синтеза и выходы не приводятся.

Среди работ по полному синтезу стероидов особо стоит синтез эквилина (LXXVII). Эквилин чрезвычайно прост по строению и отличается от эстрона только наличием лишней двойной связи. Несмотря на это долгое время все попытки его синтеза кончались неудачей, так как при введении двойной связи в кольцо *B* эстрона неизбежно шло дегидрирование всего кольца. Только в 1958 г., после того как был осуществлен синтез кортизона и альдостерона, т. е. всех наиболее сложных стероидных систем, удалось осуществить и синтез эквилина (Джерасси, США), исходя из ацетата 19-нортестостерона (LXXVIII). При бромировании его N-бромсукцинимидом получалось 6-бромпроизводное, а после дегидробромирования — диенон (LXXIX). Енолацетат последнего (LXXX) при восстановлении натрийборгидридом дал диол (LXXX), превращенный окислением по Оппенауэру в дикетон (LXXXII).



Выше, в разделе о микробиологических методах окисления, упоминалось, что микроорганизмы *Corinebacterium* и другие обладают замечательным свойством вводить двойную связь рядом с кетогруппой. Дикетон был подвергнут микробиологическому дегидрированию, в результате чего образовалась дополнительная двойная связь, однако поскольку в соединении отсутствует ангулярная метильная группа, то полученный диенон не был способен к существованию и моментально изомеризовался в эквилин (LXXVII) Двойная связь в кольце *B* в этих условиях остается нетронутой.

ЛИТЕРАТУРА

И Н. Назаров, Л Д Бергельсон. Химия стероидных гормонов М, Изд-во АН СССР, 1955, стр. 546—623.

Сб Перспективы развития органической химии (под ред А Тодда) М, ИЛ, 1959, стр 119

W. S. Johnson. J Am Chem Soc, 1956, 78, 6278

W. S Johnson, B. Bannister, R Pappo, J E Pike. J. Am Chem. Soc, 1955, 77, 817.

W S Johnson, J C Collins, R Pappo, M B Rubin J Am Chem Soc, 1958, 80, 2585

G. I. Poos, R. M Lukes, G E Arth, L H. Sarett J. Am Chem Soc, 1954, 76, 5031

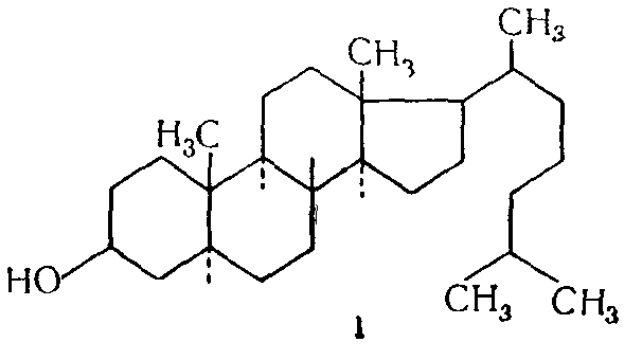
J. Schmidlin, G. Anner, J. R. Billiter, K Heusler, H. Ueberwasser, P. Wieland, A. Wettstein. Helv. Chim. Acta, 1957, 40, 2291; 1959, 42, 1586

J. A. Zderic, A Bowers, H Carpio, C Djerassi J Am Chem Soc, 1958, 80, 2596.

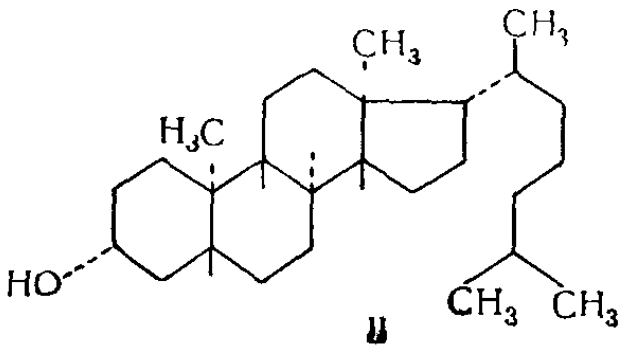
Глава 13

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АБСОЛЮТНОЙ КОНФИГУРАЦИИ СТЕРОИДОВ

Все структурные формулы, с которыми мы имели дело до сих пор, носили известную печать условности Считалось, что в молекуле холестанола ангулярные метильные группы находятся в β-положении (т. е. над плоскостью чертежа) и по отношению к ним уже устанавливалось пространственное расположение всех остальных групп и колец (формула I) Однако вполне естественно предположить, что ангулярные метильные группы в действительности находятся в α-положении (т. е. за плоскостью чертежа) и тогда положение других групп соответственно изменится (формула II).



I



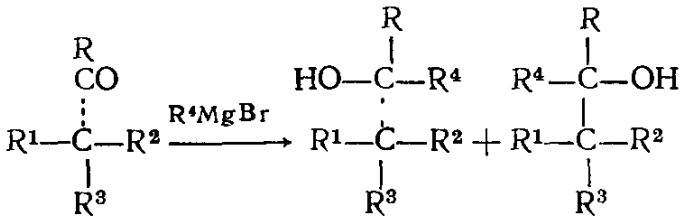
II

Какая же из этих формул, являющихся зеркальными отображениями одна другой, заслуживает предпочтения, иначе говоря, какова абсолютная конфигурация стероидов?

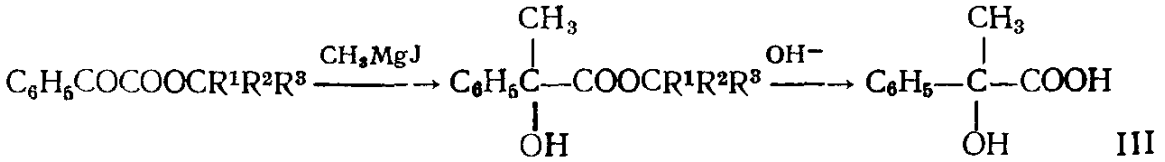
Вопрос об абсолютной конфигурации — это один из интереснейших и сложнейших вопросов органической химии. Конфигурации сахаров и полисахаридов уже известным образом скоррелированы, «привязаны» к оптическим изомерам глицеринового альдегида. Установлены конфигурации всех аминокислот, но в отношении конфигурации стероидов до 1953 г. ничего определенного не было известно. Отдельные попытки, предпринятые Рейхштейном, не дали удовлетворительных результатов. Только в 1953 г. благодаря работам Прелога (Швейцария) в этот вопрос внесена полная ясность. Прелог начал исследование с асимметрического синтеза Марквальда и Маккензи, повторил в больших масштабах их опыты и пришел к интересным выводам.

Вспомним принцип асимметрического синтеза. Если молекула имеет асимметрический атом углерода и на известном удалении от него карбонильную группу, то при действии реактива Гриньяра вообще получаются два стереоизомера. Когда карбонильная группа находится близко (в лучшем случае рядом с асимметрическим углеродным атомом), то образуется преимущественно один изомер. Если же расстояние между карбонильной группой и асимметрическим углеродным атомом велико, то

количество второго изомера возрастает и при достаточно большом расстоянии получаются практически равные количества обоих изомеров



Прелог выбрал для работы эфиры оптически активных спиртов и фенилглиоксиловой кислоты. При действии на них магнийметилиодида получались эфиры так называемой атролактиновой кислоты (III), а при последующем омылении — сама атролактиновая кислота, по оптическому вращению которой устанавливалась ее принадлежность к D- или L-ряду (абсолютная конфигурация атролактиновой кислоты была ранее точно установлена).

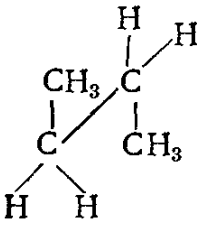


Следовательно, зная абсолютную конфигурацию исходного спирта, можно заранее предсказать конфигурацию атролактиновой кислоты и, наоборот, по знаку оптического вращения последней судить о конфигурации спирта. Для этого надо было как-то учесть пространственное влияние заместителей в молекулах спирта и кислоты. Прелог предложил следующую концепцию.

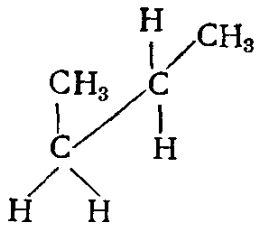
Если мы имеем сложный эфир оптически активного спирта с тремя заместителями R^1, R^2, и R^3, причем R^1 меньше R^2, а R^2 меньше R^3, то молекула магнийорганического соединения атакует его с наиболее выгодной в пространственном отношении, т. е. с наименее экранированной, стороны. Эта бесспорно логически правильная мысль сразу же потребовала известных дополнений. Если остаток спирта может вращаться совершенно свободно вокруг связи С—О, то мы вообще не будем иметь никакого асимметрического синтеза.

Следовательно, существует известная заторможенность вращения и одна из конформаций сложного эфира преобладает.

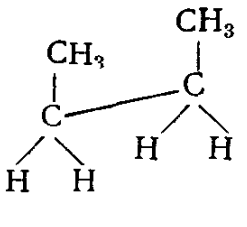
Прежде чем перейти к рассмотрению этого сложного случая Прелога, возьмем более простой пример. Так, для бутана теоретически могут существовать три конформации, различающиеся взаимным расположением метильных групп: транс-конформация, скошенная конформация и заслоненная конформация.



Транс-конформация



Скошениая конформация

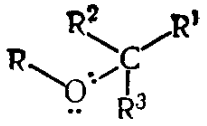


Заслоненная конформация

Подробные расчеты взаимного отталкивания водородных и углеродных атомов привели к совершенно ясному заключению, что транс-конформация безусловно более предпочтительная, и что даже для перехода ее в заслоненную конформацию нужна дополнительная энергия 0,8 *кал*. Это величина небольшая, но достаточная для того, чтобы при обычных

температурах бутан состоял преимущественно из молекул с транс-конформацией

Эти рассуждения, как легко видеть, одинаково справедливы для любой цепи атомов, соединенных простыми связями, и могут быть приняты при рассмотрении конфигурации эфиров глиоксиловой кислоты, если рассматривать атом кислорода как углерод, у которого вместо атомов водорода имеются две пары электронов, т. е. в пространственном смысле — ничего.

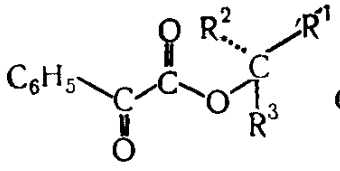


, где $R=C_6H_5COCO$

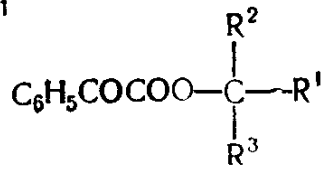
IV

Несомненно, что преобладающей конформацией молекулы эфира будет являться конформация (IV).

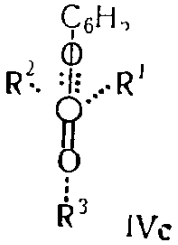
Из данных рентгеноструктурного и спектрального анализов известно также, что карбонильные группы в алифатических α-дикарбонильных соединениях находятся в энергетически выгодном транс-положении. Поэтому окончательно молекула эфира глиоксиловой кислоты выглядит следующим образом:



IVa

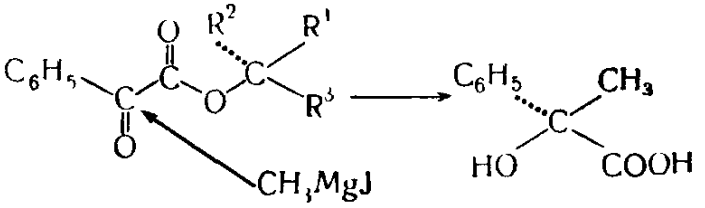


IVб

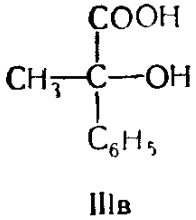


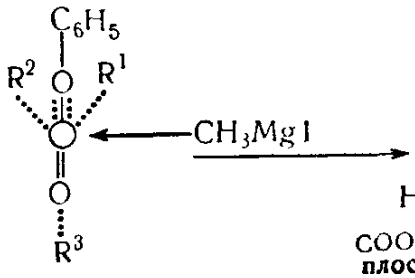
IVc

Здесь эфир глиоксиловой кислоты изображен тремя способами: в обычной проекции (IVa), в проекции Фишера (IVв) и в проекции Ньюмана (IVc). Первые два способа не требуют пояснений, при проекции Ньюмана наблюдатель смотрит на молекулу вдоль одной связи тетраэдра, в данном случае, вдоль связи O—C. Теперь рассмотрим, с какой стороны магнийметилиодид будет атаковать молекулу глиоксилового эфира. Поскольку атака направляется на углеродный атом карбонильной группы перпендикулярно к связи C—O (что было точно доказано ранее на простых примерах), то могут быть лишь две возможности: атака со стороны радикалы R^1 и со стороны радикала R^2. Несомненно, более вероятна атака со стороны радикала меньшего объема, т. е со стороны R^1.

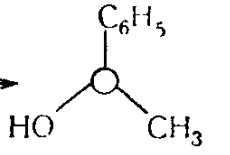


IVa IIIa иначе





иначе

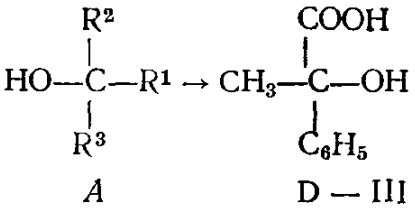


IIIв

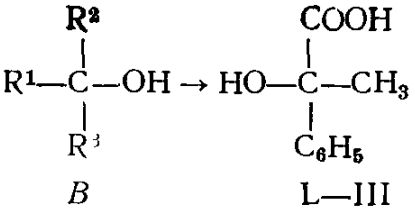
COOH-группа сзади плоскости чертежа

IVc IIIc

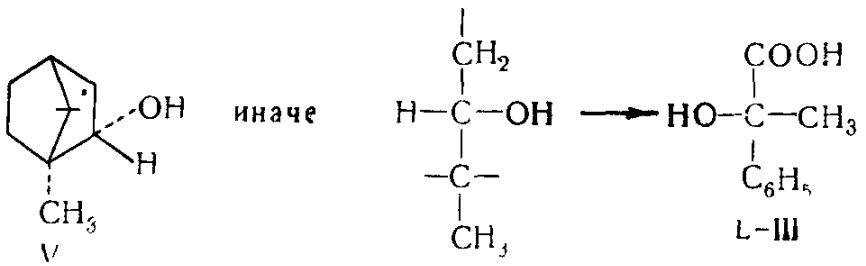
В результате (после омыления) преимущественно образуется атролактиновая кислота указанного строения (IIIa — обычная проекция, IIIв — проекция Фишера, IIIс — проекция Ньюмана). Это хорошо видно как из обычных проекционных формул, так и на проекции Ньюмана. Таким образом, если исходный спирт имеет абсолютную конфигурацию (A), то получается D-атролактиновая кислота (D-III).



Если же мы возьмем оптический антипод спирта с конфигурацией (B), то придем к -атролактиновой кислоте (L-III)



Прелог проверил свои рассуждения на опытах с карбинолами, абсолютная конфигурация которых известна совершенно точно. Так, если исходным веществом является борнеол (V), конфигурация которого, как легко видеть, принадлежит к типу (B), была получена L-атролактиновая кислота (L-III)

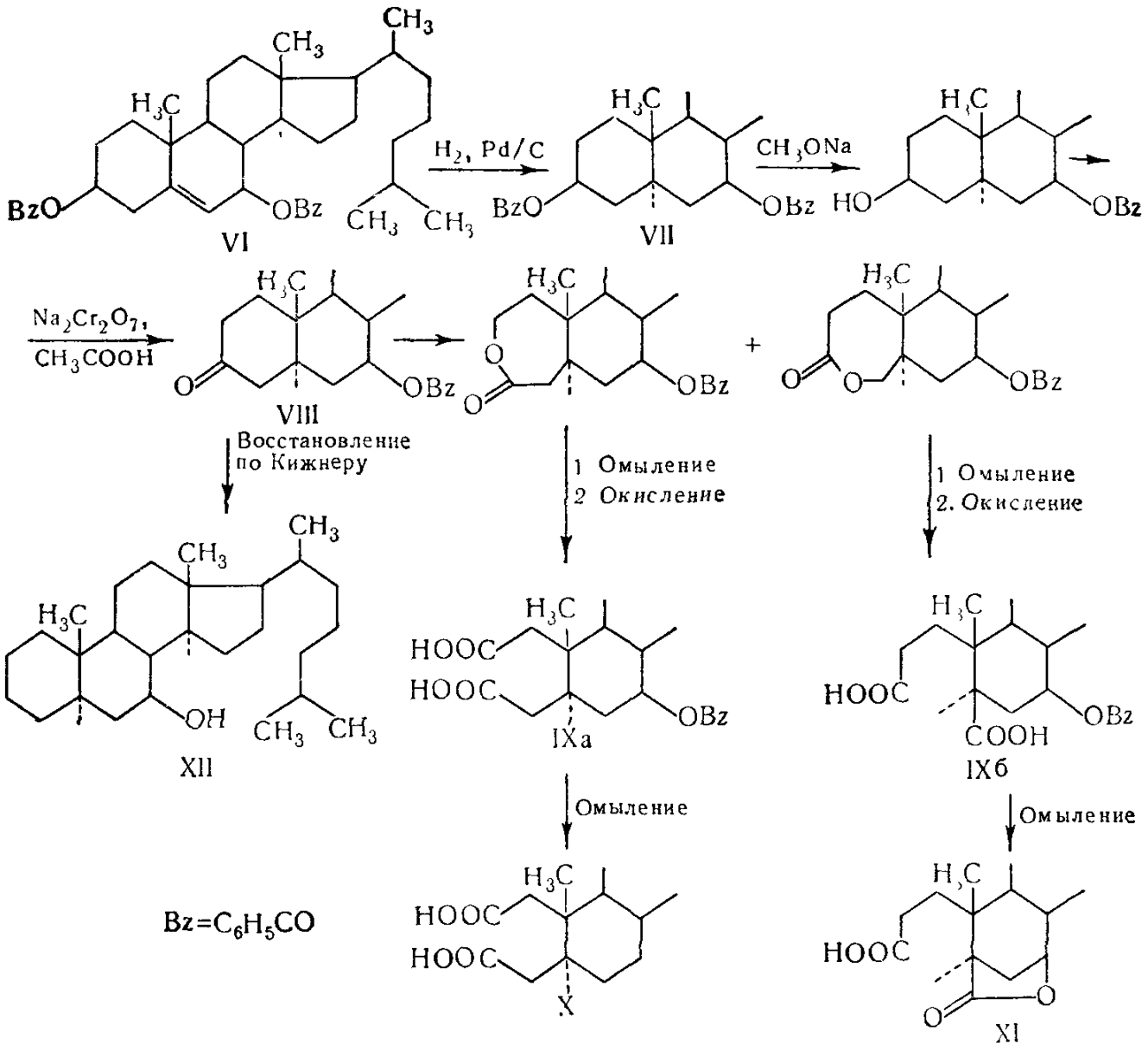


Ожидаемые результаты были получены также на изоборнеоле, ментоле и некоторых простых карбинолах. Непосредственное применение асимметрического синтеза к холестанолу было малообещающим, так как из трех замещающих радикалов (CH_2, CH_2 и H) два незначительно отличались по объему. Надо было выбрать такой стероидный спирт, радикалы которого сильно различались бы между собой, а конфигурация стероида была бы связана с конфигурацией других представителей этого класса.

Такая связь была доказана Физером на примере 7β- и 3β-холестанолов.

Дибензоат Δ^5-холестендиола-3β, 7β (VI), легко получаемый из холестерина, дает при гидрировании дибензоат холестендиола-3β, 7β-диола (VII), из которого частичным омылением получают 7-бензоат холестендиола-3β, 7β. В результате окислительного расщепления последнего были получены две изомерные бензоксидикарбоновые кислоты (IXа) и (IXб). Одна из них (IXа) после омыления, окисления и восстановления по Кижнеру дала известную 2,3-секохолестандикарбоновую кислоту (X), строение которой, как транс-кислоты, было известно ранее. Другая кислота (IXб) при омылении дала оксидикарбоновую кислоту. Так как последняя образует лактон (XI), то карбоксильная группа в положении 5 и

гидроксильная группа в положении 7 должны находиться в цис-положении. Поскольку промежуточный бензоксикетон (VIII) при восстановлении по Кижнеру дает холестанол-7β (XII), то ясно, что если ОН-группа в кольце *A* имеет β-ориентацию, то и ОН-группа в кольце *B* также должна иметь β-ориентацию. Таким образом, доказательство абсолютной конфигурации холестанола-7β автоматически определило бы конфигурацию самого холестанола



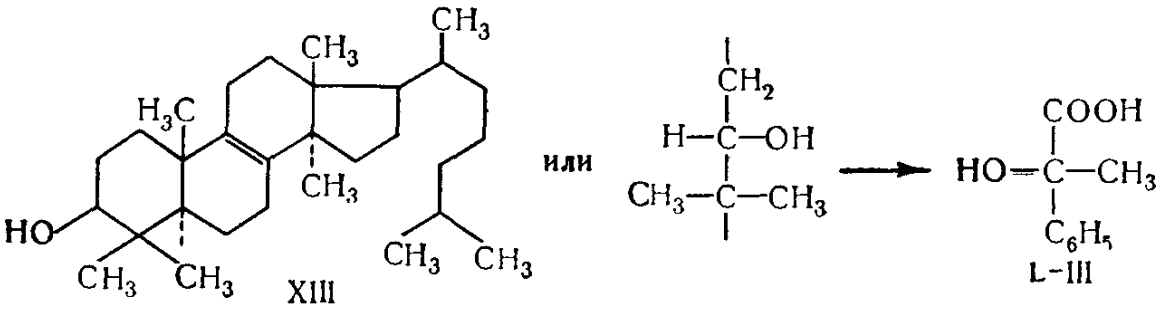
Прелог выбрал холестанол-7β (XII) именно потому, что в нем в отличие от холестанола, замещающие радикалы при $C_{(7)}$ различны по объему (H, CH_2 и $CH\langle^{C}_{C}$). В результате асимметрического синтеза была получена L-атролактиновая кислота (L-III), что подтвердило принадлежность холестанола-7β к спиртам типа B и, следовательно, β-ориентацию ОН-группы.

При проведении реакции с холестанолом-7α получалась D-атролактиновая кислота. Результат этой работы однозначно доказал, что сам холестанол имеет гидроксильную группу в β-положении, а значит все формулы, которыми до сих пор пользовались химики, оказались абсолютно точными.

Аналогичный асимметрический синтез, исходя из андростанолов-17β и -17α, также подтвердил их конфигурацию Из β-изомера была получена L, а из α-изомера — D-атролактиновая кислота.

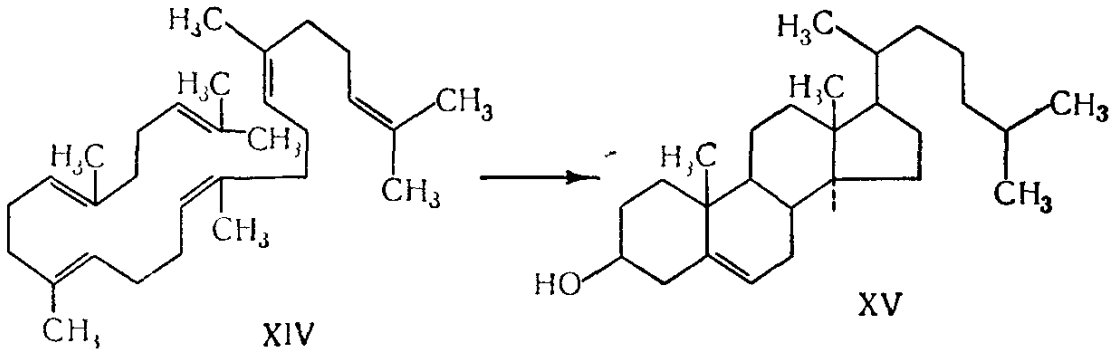
Прелог не остановился на стероидах. Имея в руках такой верный способ определения абсолютной конфигурации, он применил его и для определения конфигурации других природных соединений, прежде всего к тритерпеноидам.

Здесь дело обстояло проще, чем в ряду стероидов, так как тритерпеновые спирты имеют 4,4-диметильную группировку и таким образом C_3-атом оказался соединенным с тремя заместителями резко различного объема (H, CH_2 и $C(CH_3)_2$). В опыте с ланостенолом (XIII) Прелог получил L-атролактиновую кислоту, что говорит о принадлежности его к спиртам типа B, т. е. что конфигурация его одинакова с конфигурацией холестанола.

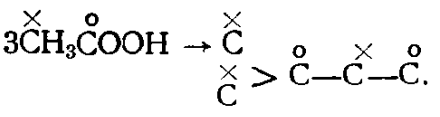


Оказалось, что и другие тритерпены, как-то амирин, эйфол и лупеол имеют такую же конфигурацию и, следовательно, их биогенез должен быть одинаковым. Несколько слов о биогенезе стероидов.

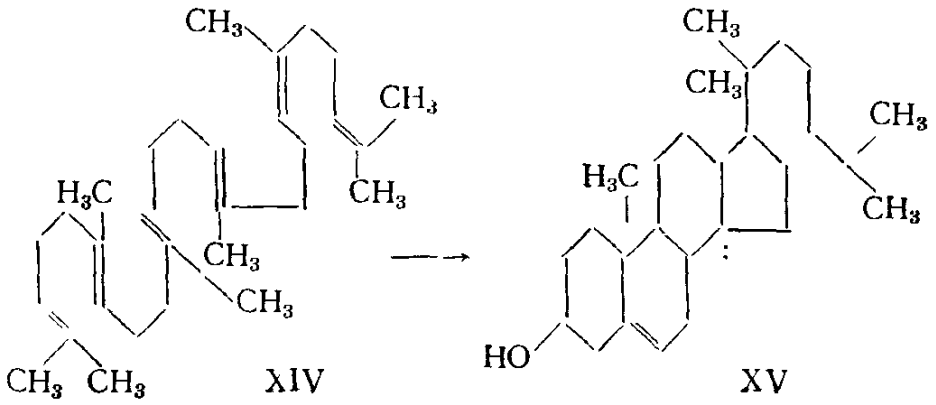
В 1934 г. Робинсон выдвинул плодотворную гипотезу об образовании холестерина (XV) (а равно и тритерпеноидных спиртов) из изопреноидного углеводорода сквалена (XIV).



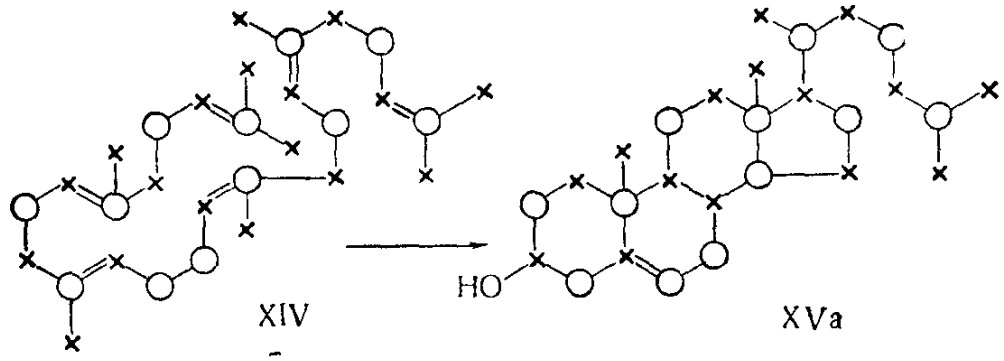
Сквален был выделен из организма некоторых рыб, а затем найден также в дрожжах, пальмовом масле и в сыворотке крови человека, т. е. оказалось, что он широко распространен в растительном и животном царстве. Сейчас точно доказано, что холестерин действительно образуется в организме животных из сквалена, который в свою очередь образуется из уксусной кислоты. Так, при кормлении крыс скваленом и солями меченой уксусной кислоты ($C^{14}H_3COOH$) из тканей животных были выделены радиоактивные сквален и холестерин. При деградации боковой цепи последнего (окислением и далее расщеплением по Барбье — Виланду) было установлено, что атомы $C_{(22)}$, $C_{(24)}$, $C_{(26)}$ и $C_{(27)}$ образовались за счет метильной группы уксусной кислоты, т. е. изопреновое звено образуется из нее по схеме

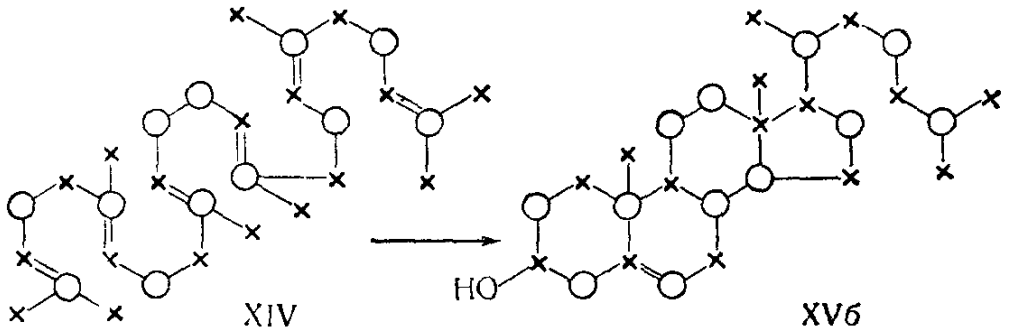


В 1952 г. Вудворд и Блох выдвинули несколько иную, чем у Робинсона, схему биосинтеза стероидов из сквалена, которая также отвечала всем известным фактам.



Вопрос о выборе между предлагаемыми схемами был решен следующим образом. Холестерин, полученный биосинтезом из $C^{14}H_3COOH$, был подвергнут окислению хромовой кислотой по Куну — Роту. При этом, как известно, сохраняются лишь метильные группы, выделяемые в виде уксусной кислоты. Согласно схеме Робинсона, при этом должна выделиться лишь $C^{14}H_3COOH$ (за счет $C_{(10)}$, $C_{(13)}$, $C_{(20)}$ и $C_{(25)}$ и связанных с ними радиоактивных CH_3-групп). Согласно же схеме Вудворда, кроме $C^{14}H_3COOH$ должна образоваться и $C^{14}H_3C^{14}OOH$ (за счет радиоактивных $C_{(13)}$ и $C_{(18)}$; последний образовался за счет миграции одной из CH_3-групп).

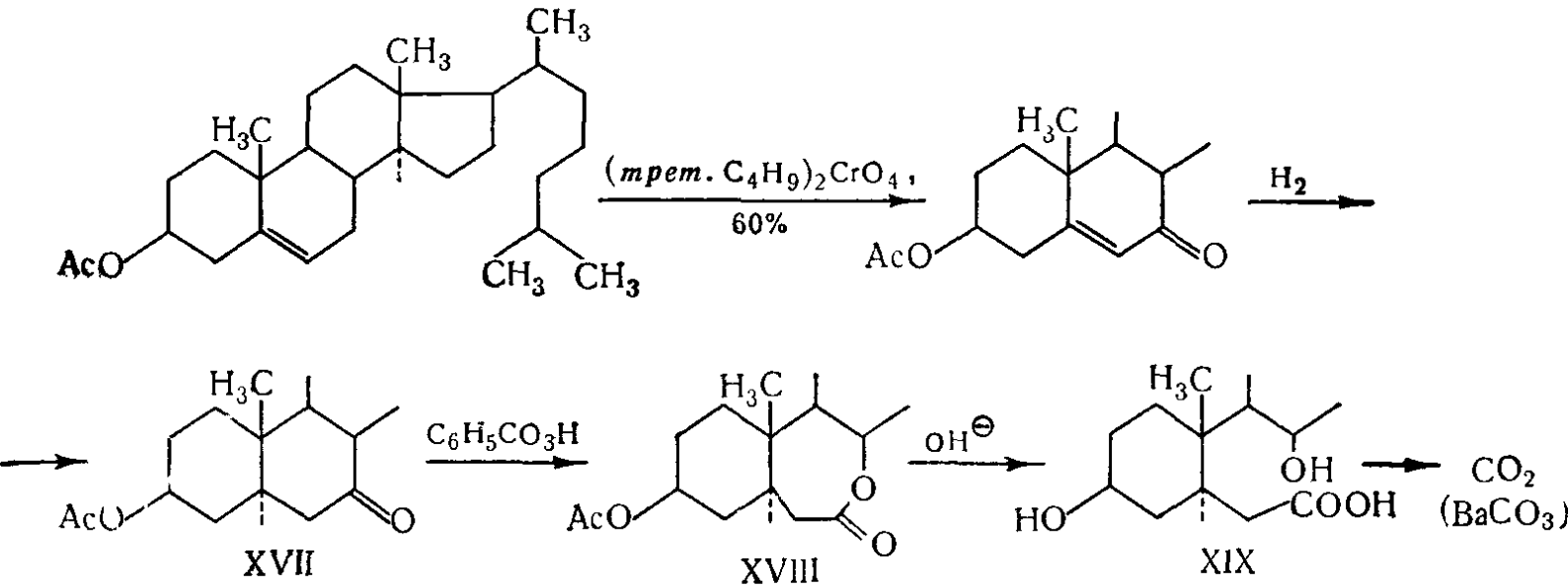




Опыт подтвердил схему Вудворда, так как CO_2, полученный по реакции Шмидта из уксусной кислоты, обладал активностью, даже несколько большей, против рассчитанной (по схеме Робинсона CO_2 должен быть неактивным).

Как видно из формул меченого холестерина (XVa и XVб) образованного по обеим схемам, в холестерине (XVб) атом $C_{(7)}$ должен быть активным, тогда как в холестерине (XVa) он неактивен. Это различие было также использовано для дополнительного доказательства правильности второй схемы.

Ацетат меченого (из $C^{14}H_3COOH$) холестерина дал при окислении третичным бутилхроматом ацетат Δ^5-холестенол-3β-она-7 (XVI). Гидрирование последнего привело к ацетату холестанол-3β-она-7 (XVII), окислением которого надбензойной кислотой получен лактон (XVIII) и далее диоксикислота (XIX). Нагревание кислоты (XIX) со смесью H_2SO_4 и HN_3 (реакция Шмидта) дало CO_2, который улавливался в виде углекислого бария. Последний оказался радиоактивным, что находится в полном согласии со схемой Вудворда.



XVII XVIII XIX

В дальнейшем было дополнительно установлено, что биосинтез холестерина из уксусной кислоты протекает через образование 3,5-диокси-3-метилпентановой (мевалоновой) кислоты

ЛИТЕРАТУРА

И Н Назаров, Л. Д Бергельсон Химия стероидных гормонов М. Изд-во АН СССР, 1955, стр. 52—56, 269—271

L. F. Fieser, M Fieser Steroids New York, Reinold Publishing Corporation, 1959, pp. 403—420.

Раздел четвертый

СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ БЕЛКА

ВВЕДЕНИЕ

Прежде чем начать последовательное изложение химии белковых веществ, целесообразно остановиться на тех индивидуальных особенностях, которые заставляют выделять белок из всей многомиллионной массы органических соединений. Это выделение пожалуй такого же порядка, как и выделение углерода из всей остальной группы элементов.

Следует начать с того, что белки занимают особое положение в биологии. Животный организм содержит примерно 70% воды и 30% сухого остатка. Почти половину этого остатка составляют белки. Но не это главное. Белки составляют материальную основу жизненных процессов. Основные процессы, происходящие в живой клетке,— обмен веществ, деление и размножение связаны с клеточными белками. Все те химические превращения, которые протекают в живом организме, осуществляются в результате деятельности катализаторов — ферментов, которые сами представляют собою белковые вещества.

Таким образом, белки являются основой всей химической активности живой клетки. Многие гормоны — регуляторы процессов жизнедеятельности организма, биологические яды — токсины и инициаторы многих инфекционных заболеваний — вирусы представляют собою различные белковые соединения.

Мысль о первостепенном значении белка блестяще выразил Ф. Энгельс еще во второй половине XIX века: «Жизнь есть форма существования белковых веществ».

В животном организме белки выполняют еще ряд других функций — опорные и защитные. Так, коллаген — составная часть костей, кожи и сухожилий обеспечивает прочность скелета, кератин — белок кожи защищает расположенные под кожей ткани от механических повреждений, миозин образует волокна, обусловливающие мышечные движения и т. д.

Как же осуществляются в природе такие многообразные функции белков при монотонности их строения, позволяющей относить безграничное число соединений к одному определенному классу?

Обратимся к химии: монотонность, единообразие белков обусловлено тем, что все они построены из α-аминокислот, число которых ограничивается двадцатью двумя.

Единообразие выражается еще и в том, что в основном аминокислоты в белках связаны одна с другой одинаково, через амидообразную (пептидную) связь с образованием цепей различной длины.

$$\ldots . NH—CO—CH—NH—CO—CH. \ldots .$$

По 20 аминокислот могут образовать бесконечно большое число возможных комбинаций остатков в пептидной цепи Оно представлено ниже, и при 20 аминокислотах столь велико, что становится почти непроизносимым.

Число аминокислотных остатков	Число пептидов
2	2
3	6
4	24
5	120
6	720
7	$5 \cdot 10^3$
8	$4 \cdot 10^4$
9	$2 \cdot 10^5$
10	$3 \cdot 10^6$
20	$2 \cdot 10^{18}$

Уже одно изменение последовательности и соотношения аминокислотных остатков в пептидной цепи может явиться причиной многообразия белков Но белок может быть построен из одной или нескольких пептидных цепей разной длины, эти цепи могут образовывать циклы, тоже отличающиеся по размерам. Наконец цепи могут связываться одна с другой по разным участкам и разными группами. Если к этому еще добавить, что огромное число природных белков связано с другими органическими и неорганическими соединениями, то станет понятно их многообразие в природе.

Пептидная связь является в белке доминирующей, но не единственной. Известно, что белки содержат дисульфидные S—S мостики.

У некоторых гормонов — полипептидов, например, актиномицинов обнаружены эфирные мостики и т. д. Полипептидные цепи связаны в белках не только ковалентными, но и водородными и ван-дер-Ваальсовыми связями.

Такие более лабильные связи вызывают определенное пространственное расположение пептидных цепей, заставляют их соединяться в пучки, волокна, или свертываться в клубки, образовывать так называемые глобулярные белки.

Белки характеризуются поэтому структурной и оптической изомерией и, кроме того, пространственной конфигурацией молекулы, возникающей в результате определенного складывания пептидных цепей. Такая пространственная конфигурация молекул получила название конформации. Вероятно, конформацией молекулы объясняется еще одна особенность белков — их повышенная лабильность (неустойчивость), легкость превращения глобулярных белков в фибриллярные, легкость денатурации, выражающаяся в потере белком способности растворяться.

К сказанному следует добавить, что белки обладают очень высокой специфичностью. Не только разные белки выполняют разные функции в организме, но белки, выполняющие одни и те же функции, у разных животных различны. Исследования показали, что инсулин (гормон, регулирующий углеводный обмен), выделенный из поджелудочной железы барана, не идентичен с гормоном быка, лошади, свиньи, причем это различие вызвано заменой только одной из 51 входящих в молекулу аминокислоты.

Исключительная роль белков в живом организме подчеркивается и его названием «протеин» от греческого слова «протеус» — первичный Это название было предложено в начале XIX века Мульдером

По химическому составу белки принято разделять на две группы:

А — простые белки или протеины, состоящие из одних аминокислот;

Б — сложные белки или протеиды, в которых собственно белковая молекула соединена с другими компонентами, например, металлами, кислотами, углеводами, красящими веществами, нуклеиновыми кислотами и т. д.

В соответствии с пространственной конфигурацией молекулы белков их принято разделять на фибриллярные, в которых молекулы вытянуты в виде волокна, и глобулярные, в которых молекулы представляют сферические образования

Современные методы исследования позволяют не только устанавливать строение белков, но и синтезировать если не высокомолекулярные белки, то простейшие биологически активные вещества — полипептиды. Так, недавно был синтезирован ряд гормонов и антибиотиков. Недалеко, по-видимому, и то время, когда будут синтезированы и первые белки — инсулин и рибонуклеаза.

Часть I

АМИНОКИСЛОТЫ

Началом изучения строения молекулы белка следует считать 1820 г., когда Браконно впервые применил при исследовании белков гидролиз кислотой и выделил из желатины первую аминокислоту — гликоколь. Все проводившиеся до этого времени исследования устанавливали некоторые свойства белков и продуктов их частичного распада, но решающим оказался метод гидролиза. Вслед за Браконно ряд исследователей, пользуясь тем же методом гидролиза, выделили и другие аминокислоты. К 1935 г. было полностью завершено установление качественного состава белков (история открытия отдельных аминокислот приведена в табл. 1). В результате этих работ было выяснено, что все белки

Таблица 1

История выделения аминокислот из белков

Аминокислота	Белок	Год	Исследователь
Глицин	Желатина	1820	Браконно
Лейцин	Шерсть, мышечная ткань	1820	Браконно
Тирозин	Казеин	1849	Бопп
Серин	Шелк	1865	Крамер
Глутаминовая кислота	Глиадин	1866	Ритхаузен
Аспарагиновая кислота	Конглютин	1868	Ритхаузен
Фенилаланин	Ростки люпина	1881	Шульце и Барбиери
Аланин	Фиброин шелка	1881	Вейль
Лизин	Кораллы	1889	Дрексель
Аргинин	Рог	1895	Гедин
Гистидин	Казеин, стурин	1896	Гедин и Коссель
Цистин	Рог	1899	Мернер
Валин	Казеин	1901	Фишер
Пролин	»	1901	Фишер
Триптофан	»	1901	Гопкинс и Коле
Оксипролин	Желатина	1902	Фишер
Изолейцин	Фибрин крови	1904	Эрлих
Метионин	Казеин	1922	Мюллер
Оксилизин	Желатина	1925	Шрайвер, Бастон
Треонин *	Казеин	1935	Мак-Кой, Мейер и Роуз

* Треонин (оксиаминомасляная кислота) впервые был обнаружен в гусиных перьях Н. Д. Зелинским и В. С. Садиковым

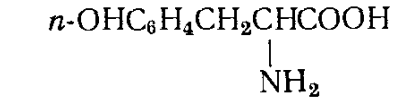
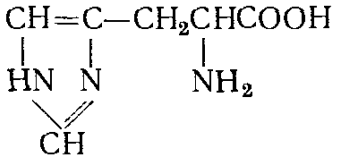
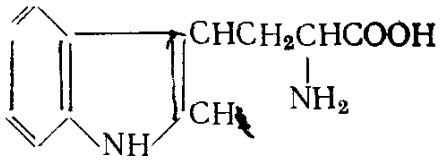
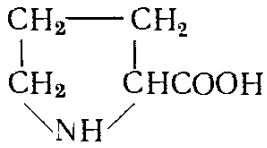
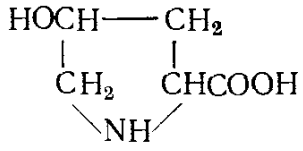
строятся из 22 α-аминокислот, относящихся к L-ряду Гечетически, за исключением первой в ряду аминокислоты — аминоуксусной, их можно рассматривать как производные α-аминопропионовой кислоты — аланина.

$$CH_3—\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}—COOH$$

Таблица 2

Аминокислоты, выделенные из белков

Класс	Аминокислота	Формула	Сокращенное обозначение	Примечания
Алифатические	Глицин (гликоколь)	NH_2CH_2COOH	глиц	
	Аланин	$CH_3CH(NH_2)COOH$	ал	
	Валин	$CH_3-CH(CH_3)-CH(NH_2)COOH$	вал	
	Лейцин	$CH_3-CH(CH_3)CH_2CH(NH_2)COOH$	лейц	
	Изолейцин	$C_2H_5-CH(CH_3)-CH(NH_2)COOH$	изл	
	Цистеин	$HSCH_2CH(NH_2)COOH$	—	Серасодержащие
	Цистин	$(SCH_2CH(NH_2)COOH)_2$	—	Серасодержащие
	Метионин	$CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	мет	Серасодержащие
	Серин	$HOCH_2CH(NH_2)COOH$	сер	β-оксиаминокислоты
	Треонин	$CH_3CH(OH)-CH(NH_2)COOH$	тр	β-оксиаминокислоты
	Аспарагиновая кислота	$HOOCCH_2CH(NH_2)COOH$	асп	вещества кислого характера
	Глутаминовая кислота	$HOOCCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	глут	вещества кислого характера
	Лизин	$CH_2(NH_2)CH_2CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	лиз	Основания
	Оксилизин	$CH_2(NH_2)-CH(OH)-CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	—	Основания
	Аргинин	$NH=C(NH_2)NHCH_2CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	арг	Основания
Ароматические	Фенилаланин	$C_6H_5CH_2CH(NH_2)COOH$	фал	Основание

Класс	Аминокислота	Формула	Сокращенное обозначение	Примечания
	Тирозин		тир	
	Гистидин		гис	**Основание**
Гетероциклические	Триптофан		трипт	
	Пролин		прол	
	Оксипролин		окспр	

Путем замены водорода в метильном радикале разными другими остатками и образуются все аминокислоты в белках.

Их можно классифицировать, во-первых, по классам органических соединений, как алифатические, ароматические и гетероциклические, во-вторых, по физическим свойствам как амфотерные, кислые и основные, и наконец, по добавочным функциональным группам, например, серасодержащие аминокислоты, оксиаминокислоты, диаминокислоты и т. д.

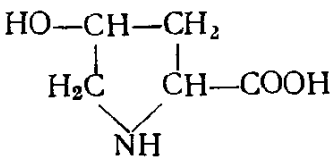
По биохимической классификации все аминокислоты разделяются на заменимые и незаменимые

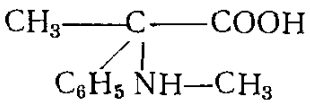
Заменимыми аминокислотами называются те, которые животный организм может синтезировать сам, незаменимыми — те, которые он должен получать в пище. Все аминокислоты представлены в табл. 2. Интересно отметить, что у алифатических аминокислот число углеродных атомов скелета не превышает шести. Среди них нет аминомасляной и нормальных аминовалериановой и аминокапроновой кислот, которые найдены в других природных соединениях.

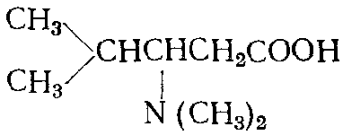
До недавнего времени аминокислоты, приведенные в табл. 2, настолько доминировали в изученных природных соединениях, что все другие аминокислоты рассматривались исследователями как «неприродные», «редкие» или «случайные». В дальнейшем было обнаружено, что белки некоторых бактерий, а также ряд природных физиологически активных веществ содержат и другие аминокислоты. Некоторые другие аминокислоты были найдены и в свободном состоянии в растениях и в животных организмах (см. табл. 3). Они отличаются гораздо более широким ассортиментом функциональных групп, многие из них относятся к D-ряду. Вероятно, номенклатура аминокислот, входящих в состав белков, вряд ли подвергнется серьезному изменению, что же касается списка аминокислот, найденных в физиологически активных

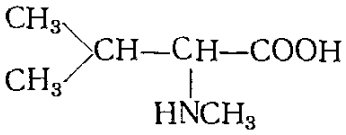
Таблица 3

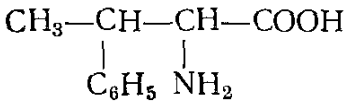
Редкие амиокислоты и аналоги аминокислот, встречающиеся в природных соединениях

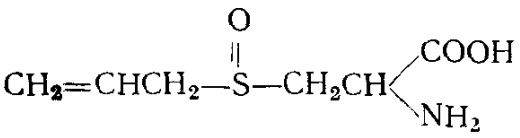
Аминокислота	Формула	Источник получения
γ-Аминомасляная кислота	$NH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	Широко распространены. Образуются соответственно путем α- и γ-декарбоксилирования глутаминовой кислоты
α-Аминомасляная кислота	$CH_3CH_2CH(NH_2)COOH$	
α, γ-Диаминомасляная кислота	$NH_2CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	Антибиотики полимиксины
α, β-Диаминопропионовая кислота	$NH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	Антибиотик виомицин
α-Аминоизомасляная кислота	$(CH_3)_2C(NH_2)COOH$	Антибиотики
β-Аланин	$H_2NCH_2CH_2COOH$	Паитотеновая кислота и коэнзим А
α, ε-Диаминопимелиновая кислота	$HOOC(NH_2)HCCH_2CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	Мезо- и L,L-изомеры в коринобактериях
γ-Оксиглутаминовая кислота	$HOOCCH(OH)CH_2CH(NH_2)COOH$	Флоксы, лен
γ-Окси-γ-метилглутаминовая кислота	$HOOC-C(OH)(CH_3)-CH_2CH(NH_2)COOH$	
γ-Метиленглутаминовая кислота	$HOOC-C(=CH_2)-CH_2-CH(NH_2)COOH$	
γ-Метилглутаминовая кислота	$HOOCCH(CH_3)CH_2CH(NH_2)COOH$	
N^2-Оксилизин	$HONH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$	Микобактерии
β-Оксилейцин	$(CH_3)_2CHCH(OH)CH(NH_2)COOH$	Антибиотик теомицин
D-Алло-оксипролин		Антибиотик этамицин

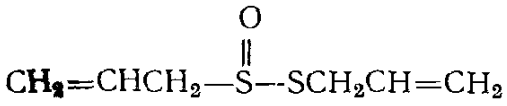


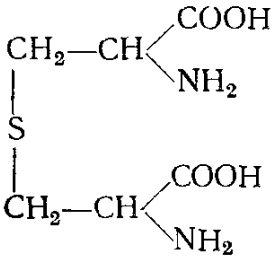




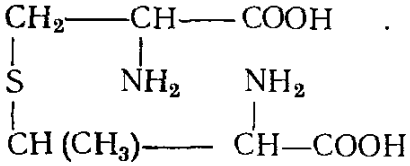


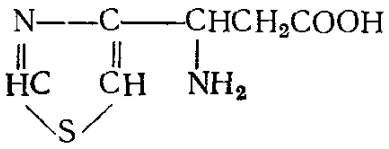


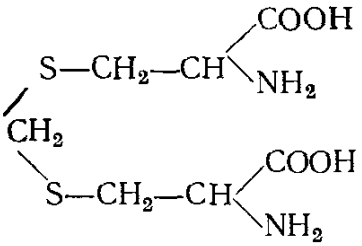


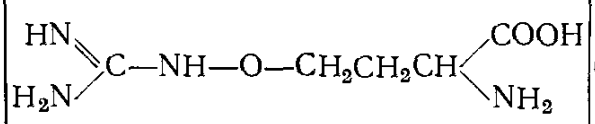


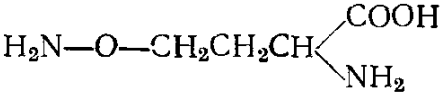
Аминокислота	Формула	Источник получения
α-Фенилсаркозин	$CH_3-C(C_6H_5)(NH-CH_3)-COOH$	Этамицин
β-Диметиллейцин	$(CH_3)_2CHCH(N(CH_3)_2)CH_2COOH$	
Метилвалин	$(CH_3)_2CH-CH(HNCH_3)-COOH$	Антибиотик эхинолицин
β-Фенил-α-аминомасляная кислота	$CH_3-CH(C_6H_5)-CH(NH_2)-COOH$	Антибиотик батромицин
Аллиин	$CH_2=CHCH_2-S(=O)-CH_2CH(COOH)(NH_2)$	Чеснок
Аллицин	$CH_2=CHCH_2-S(=O)-SCH_2CH=CH_2$	Вещество, обусловливающее острый вкус чеснока. Образуется из аллиина
Лантионин	$CH_2-CH(COOH)(NH_2)-S-CH_2-CH(COOH)(NH_2)$	В антибиотиках субтилина (из *Bacillus subtilis* и др). Образуется при обработке шерсти щелочью
β-Метиллантионин	$CH_2-CH(NH_2)-COOH$; $S-CH(CH_3)-CH(NH_2)-COOH$	Субтилин и другие антибиотики
(β-Тиазолил²)-β-аланин	$N(=HC)-C(=CH)-CH(NH_2)CH_2COOH$; $HC-S-CH$	Антибиотик батромицин
Дьенколевая кислота	$S-CH_2-CH(COOH)(NH_2)$; CH_2; $S-CH_2-CH(COOH)(NH_2)$	Впервые обнаружена в дьенколевых орехах. Сравнительно широко распространена (например, в сыворотке крови крупного рогатого скота)
Канаванин	$(HN)(H_2N)C-NH-O-CH_2CH_2CH(COOH)(NH_2)$	Соевые бобы *
Каналин	$H_2N-O-CH_2CH_2CH(COOH)(NH_2)$	Образуется при энзиматическом гидролизе канаванина



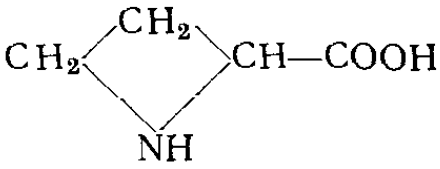
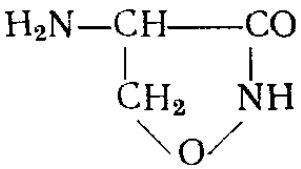
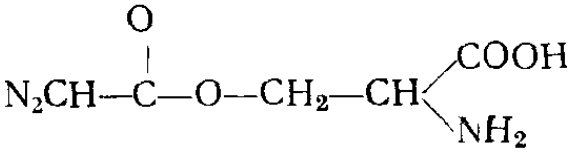
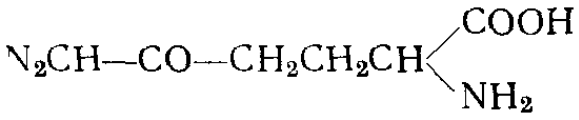
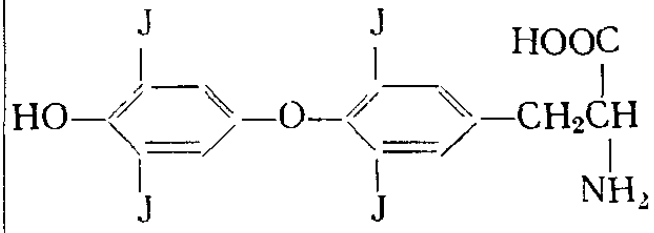
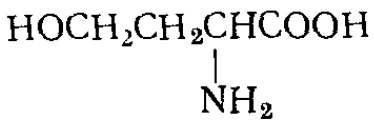
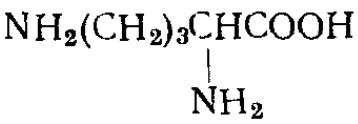
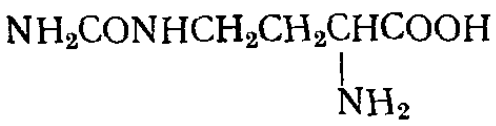








* Канаванин — биологический антагонист аргинина (структурное отличие — замена CH_2 на O).

Аминокислота	Формула	Источник получения
Азетидин-2-карбоновая		Ландыши «соломонова печать»
Циклосерин		Антибиотик из *streptomyces orchidatius* (производное серина)
Азасерин		Антибиотик, продуцируемый одним из штампов *streptomyces*
6-Диазо-5-оксо-**L**-норлейции		Антибиотик из стрептомицетов
Тироксин		Гормон щитовидной железы
D-Пенициллламин		Пенициллин
Гомосерин		Бобовые
Орнитин		Антибиотик грамицидии С
Цитруллин		Корневые клубеньки

веществах, то он, по-видимому, еще значительно изменится. Особенно интересно, что в строении этих аминокислот и их производных не наблюдается каких-либо ограничений. Во всяком случае, открытие азасерина, содержащего диазогруппу, явилось для исследователей большой неожиданностью.

В этой работе мы ограничимся рассмотрением аминокислот, входящих в состав белков.

Глава 1

СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ

Самым простым методом синтеза всех аминокислот, казалось бы, должен являться метод, основанный на реакции между α-галоидными производными кислот и аммиаком.

$$R{-}\underset{\displaystyle Cl}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + NH_3 \quad R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + NH_4Cl$$

Наряду с аминокислотой образуется некоторое количество иминокислоты. Во избежание этой вторичной реакции приходится брать аммиак в большом избытке, или же проводить синтез по измененному методу Чирониса, заключающемуся в том, что в реакции применяют углекислый аммоний. Образующееся карбаминовое производное аминокислоты не вступает в дальнейшую реакцию.

$$R{-}\underset{\displaystyle Cl}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + (NH_4)_2CO_3 \rightarrow R{-}\underset{\displaystyle NHCOOH}{\underset{|}{CH}}{-}COOH$$

Можно также пользоваться методом Габриэля и действовать на α-галоидокислоту фталимидом калия. Последующим гидролизом или обработкой гидразином или фенилгидразином получают аминокислоты.

$$C_6H_4\begin{cases}CO\\CO\end{cases}NK + RCH(Cl){-}COOH \rightarrow C_6H_4\begin{cases}CO\\CO\end{cases}NCH(R)COOH \quad (I)$$

$$I \xrightarrow{H_2O} C_6H_4(COOH)_2 + NH_2CH(R)COOH$$

$$I \xrightarrow{NH_2NH_2} C_6H_4\begin{cases}CO{-}NH\\CO{-}NH\end{cases} + NH_2CH(R)COOH$$

До самого последнего времени легко доступными α-галоидопроизводными были только производные алифатических кислот. Поэтому этот метод широко использовался только для синтеза глицина, аланина, валина, лейцина и их изомеров.

В 1956 г. А. Н. Несмеянов и Р. Х. Фрейдлина разработали новый метод синтеза ω- и α-галоидных кислот на базе реакции теломеризации и тем самым сделали доступными как α-, так и ω-моно- и полигалоид-

ные органические кислоты. Последовательность происходящих радикальноцепных реакций может быть изображена следующей схемой:

$$CCl_4 \xrightarrow{h\nu} Cl + CCl_3\cdot;\ CCl_3\cdot + CH_2{=}CH_2 \rightarrow CCl_3{-}CH_2{-}CH_2\cdot$$

$$CCl_3CH_2{-}CH_2\cdot + CH_2{=}CH_2 \rightarrow CCl_3CH_2CH_2CH_2CH_2\cdot$$

$$CCl_3CH_2CH_2CH_2CH_2\cdot + CCl_4 \rightarrow CCl_3CH_2CH_2CH_2CH_2Cl + CCl_3\cdot \text{ и т. д.}$$

Рост цепи прерывается при взаимодействии с CCl_4. Тетрахлоралкан и трихлоралкан под действием безводного хлорного железа, хлористого алюминия или хлористой сурьмы уже при комнатной температуре отщепляют хлористый водород с образованием дихлорвиниловых производных.

$$ClCH_2CH_2CH_2CH_2CCl_3 \xrightarrow{FeCl_3} ClCH_2CH_2CH_2CH{=}CCl_2$$

$$CH_3CH_2CH_2CH_2CCl_3 \xrightarrow{FeCl_3} CH_3CH_2CH_2CH{=}CCl_2$$

Последние в концентрированной серной кислоте при 0—20° хлорируются до α- ω- дихлор- и α-хлоралифатических кислот.

$$ClCH_2CH_2CH_2CH{=}CCl_2 \xrightarrow[H_2SO_4]{Cl_2} ClCH_2CH_2CH_2{-}\underset{\displaystyle Cl}{\underset{|}{CH}}{-}COOH$$

$$CH_3CH_2CH_2CH{=}CCl_2 \xrightarrow[H_2SO_4]{Cl_2} CH_3CH_2CH_2{-}\underset{\displaystyle Cl}{\underset{|}{CH}}{-}COOH$$

Аминирование галоидных производных кислот получают затем с высокими выходами самые различные алифатические, ароматические и гетероциклические аминокислоты. Можно полагать, что метод аминирования галоидопроизводных кислот вновь займет доминирующее положение среди других методов синтеза.

В настоящее время наибольшее значение имеют методы, основанные на реакциях с малоновым или циануксусным эфирами и в меньшей степени — с ацетоуксусным эфиром.

Применение малонового эфира для синтеза аминокислот было предложено еще в 1904 г. Э. Фишером. Ниже приводится схема синтеза аминокислот по Фишеру.

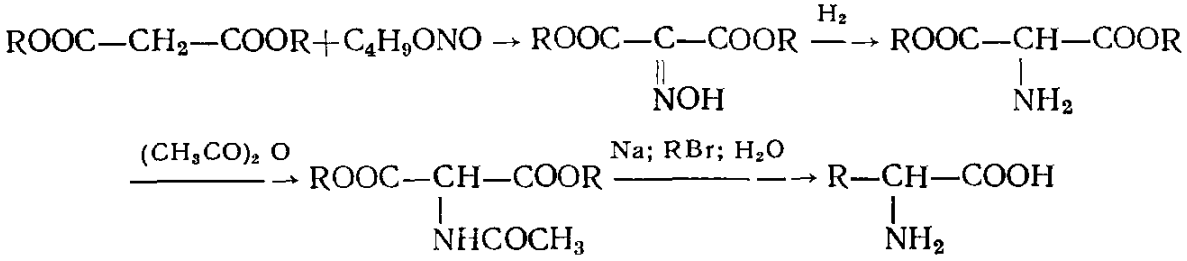
$$\begin{array}{l} \text{COOH (R)} \\ | \\ \text{HCNa} + C_6H_5CH_2Br \rightarrow \\ | \\ \text{COOH (R)} \end{array} \begin{array}{l} \text{COOH (R)} \\ | \\ \text{HC}{-}CH_2C_6H_5 \\ | \\ \text{COOH (R)} \end{array} \xrightarrow{Br_2} \begin{array}{l} \text{COOH (R)} \\ | \\ \text{BrC}{-}CH_2C_6H_5 \\ | \\ \text{COOH (R)} \end{array} \xrightarrow{H_2O} \begin{array}{l} C_6H_5CH_2CH{-}COOH \rightarrow \\ | \\ Br \end{array}$$

$$\xrightarrow{NH_3} C_6H_5CH_2CH\,(NH_2)\,COOH$$

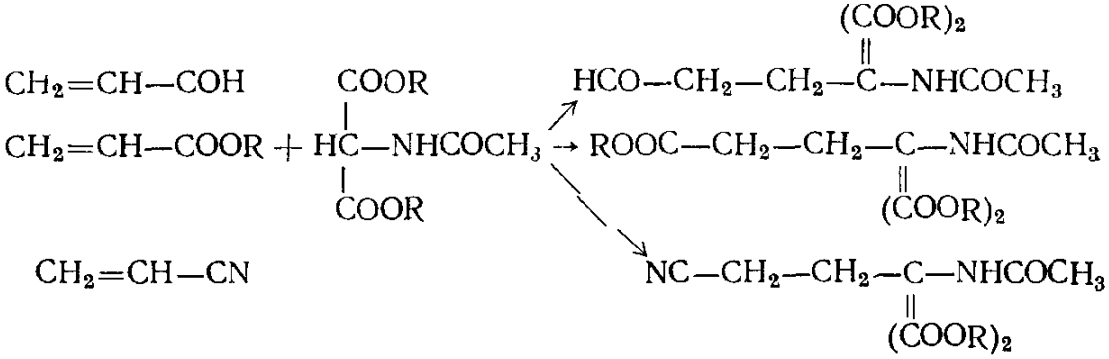
Метод интересен сейчас лишь с исторической точки зрения.

Из значительного числа вариантов этой реакции в настоящее время широкое применение получил так называемый синтез с помощью ацетиламиномалонового эфира. Малоновый эфир подвергают нитрозированию. Нитрозомалоновый эфир восстанавливают каталитически (над Pd, Ni) или цинком в уксуснокислой среде до аминомалонового эфира; последний представляет собою очень нестойкое соединение, поэтому аминогруппу защищают ацильным остатком. Из разнообразных ацильных групп, применявшихся для этой цели (фталильной, бензоильной, ацетильной и формильной), наибольшее значение получила ацетильная. Ацетиламиномалоновый эфир представляет собою устойчивое соединение, которое применяют для синтеза самых разнообразных аминокис-

лот. Действием натрия и галоидалкила с последующим частичным омылением и декарбоксилированием получают аминокислоты

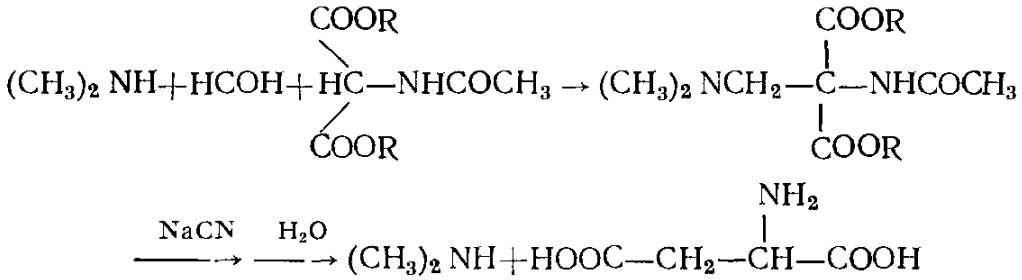


Из приведенных схем синтеза различных аминокислот следует, что этот метод пригоден для синтеза всех известных аминокислот. Наряду с галоидалкилами стали широко использовать акролеин, эфиры акриловой кислоты и акрилонитрил, что позволило одновременно вводить радикалы и новые функциональные группы.

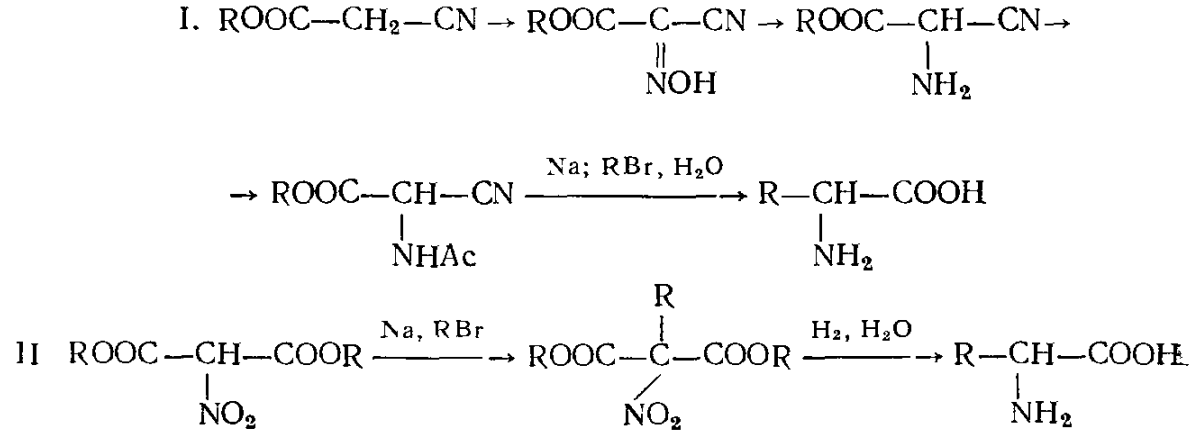


Использование реакции Манниха еще более расширило рамки применения аминомалонового эфира. Вторичные амины и соединения с подвижным водородом у С-атома конденсируют с формальдегидом. Образующиеся третичные амины также легко реагируют с аминомалоновым и цианоуксусным эфирами, как и галоидалкилы (см. например синтез триптофана).

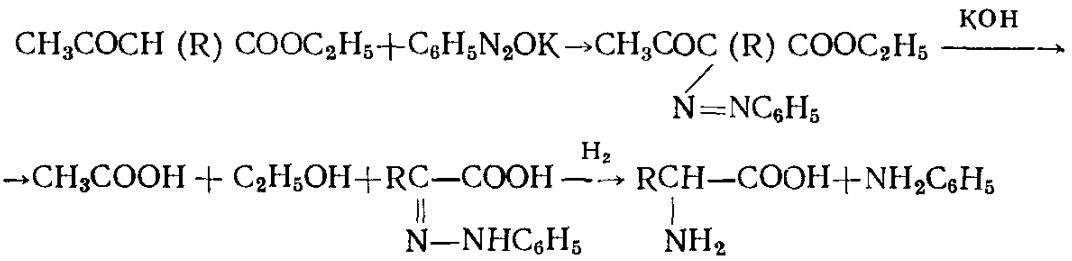
Можно проводить конденсацию между диметиламином, формальдегидом и ацетиламиномалоновым эфиром. В полученном соединении диметиламин легко замещается на другие группы, так, например, при реакции с цианистым натрием с последующим омылением получают аспарагиновую кислоту.



Аналогично используют цианоуксусный и нитромалоновый эфиры, но их применяют менее широко.



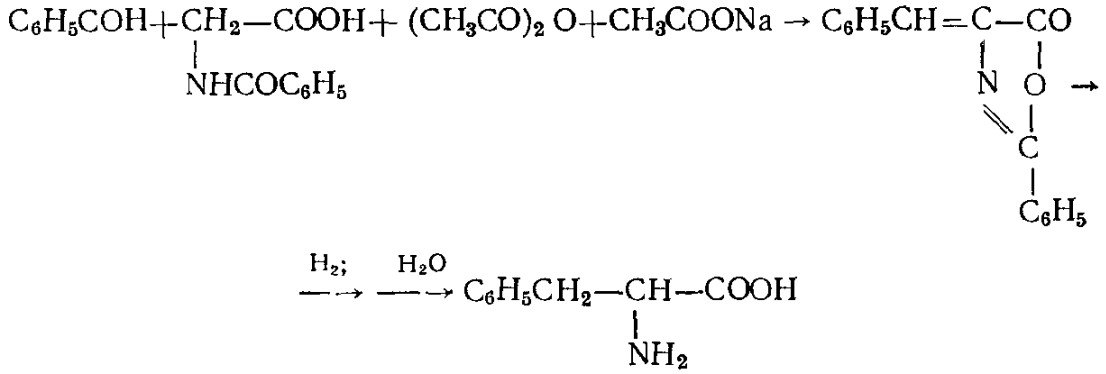
В 1940 г. В. В. Феофилактов предложил оригинальный путь синтеза аминокислот из ацетоуксусного эфира, основанный на его способности реагировать с диазосоединениями. Алкил- или арил-ацетоуксусный эфир обрабатывают арилдиазотатом и тотчас же подвергают кислотному расщеплению. Образующееся азопроизводное изомеризуется в гидразон кетокислоты, который восстанавливают до аминокислоты и анилина.



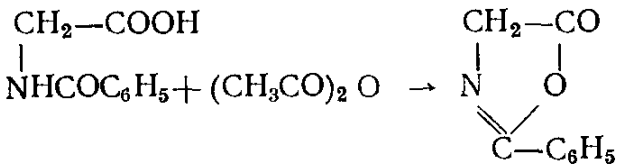
Реакция была проверена на большем числе примеров. Особенно успешно она проходит с соединениями ароматического ряда.

Ароматические аминокислоты можно получать с достаточно хорошими выходами, пользуясь вариантами реакции Перкина — кротоновой конденсацией Самым распространенным из них является так называемый азлактоновый метод, разработанный Эрленмейером.

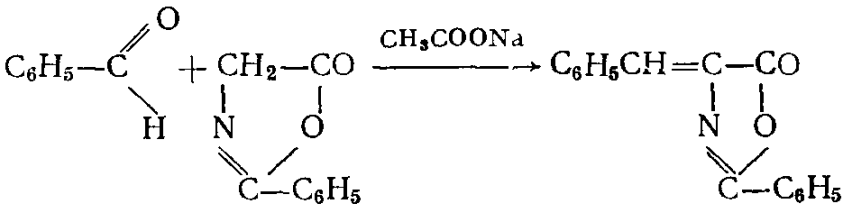
При конденсации ароматических альдегидов с ацилглицином (чаще всего пользуются гиппуровой кислотой) в присутствии уксусного ангидрида и безводного ацетата натрия образуется 2-фенил-4-арилиден-5-оксазолон(азлактон), который при восстановлении и гидролизе превращается в аминокислоту.



Реакция основана на подвижности метиленовой группы. В настоящее время доказано, что на первой стадии реакции происходит циклизация ацилглицина под действием уксусного ангидрида в 2-арилоксазолон,

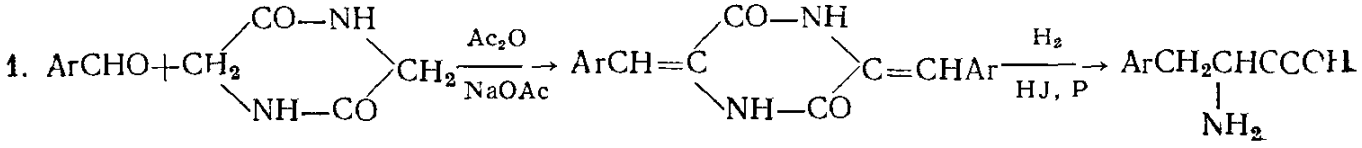


обладающий активной метиленовой группой, которая взаимодействует с альдегидами.

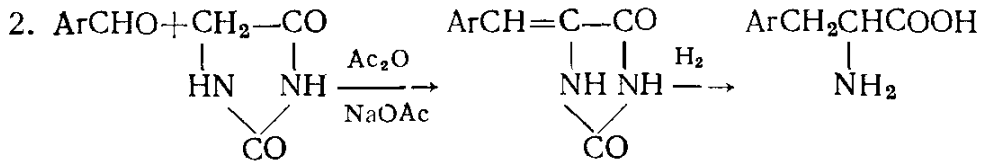


Картером и рядом других авторов было показано, что реакция может идти и с алифатическими альдегидами, но выходы аминокислот в этих случаях незначительны. Тот же принцип использования подвижности метиленовой группы лежит в основе синтеза ароматических аминокис

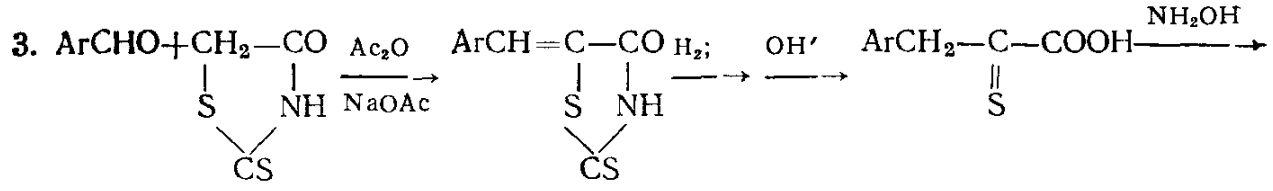
лот путем конденсации альдегидов с дикетопиперазинами, гидантоинами и другими соединениями, имеющими подвижный атом водорода. Ниже представлена схема подобных реакций.

1. 

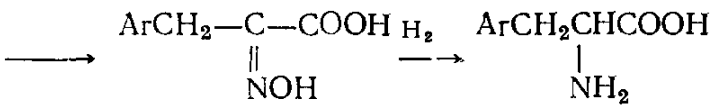
Дикетопиперазии

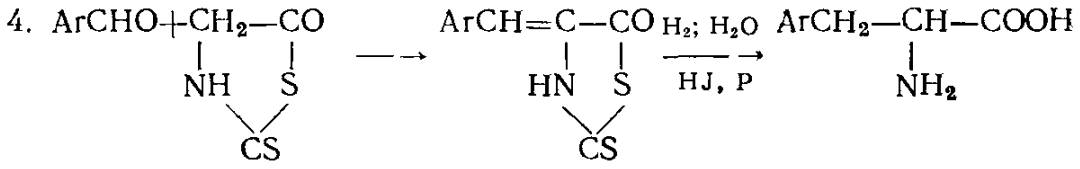
2. 

Гидантоин

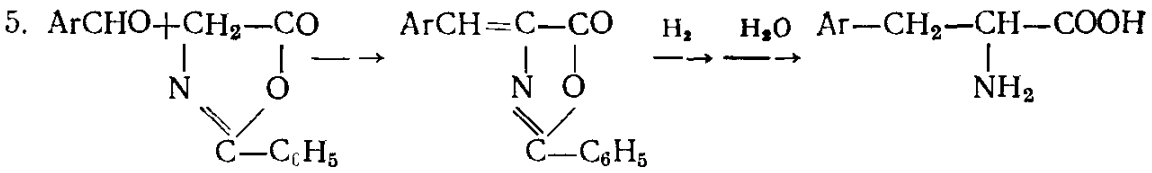
3. 

Роданин



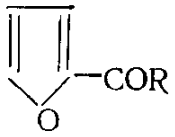
4. 

2-Тиотиазолон-5

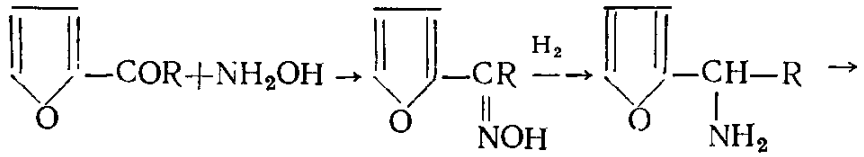
5. 

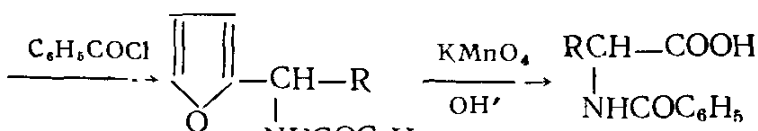
Оксазолон

Недавно А. П. Терентьев и Р. А. Грачева предложили использовать в качестве дешевого сырья для синтеза аминокислот кетоны ряда фурана с общей формулой



Реагируя с гидроксиламином, они образуют оксимы, которые восстанавливают цинком в кислой среде до аминов. Затем аминогруппу защищают ацилированием и соединение окисляют перманганатом в щелочной среде. В результате разрыва фуранового кольца образуется ацилированная аминокислота, которую гидролизуют до аминокислоты.

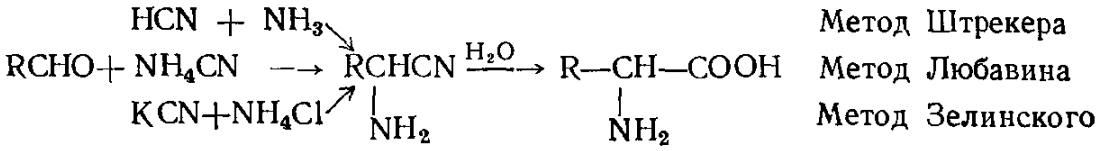




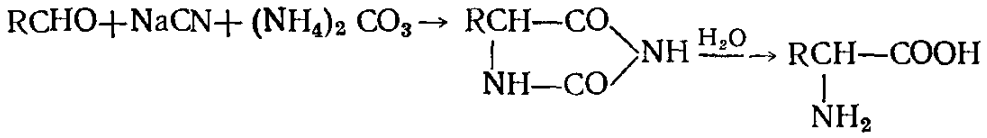
$R=CH_3,\ C_2H_5,\ C_3H_7,\ C_4H_9,\ C_5H_{11}$

Не потерял еще практического значения и самый первый метод синтеза аминокислот — цианогидриновый. В 1851 г. Штрекер конденсировал ацетальдегид с синильной кислотой и аммиаком и после гидролиза образовавшегося аминонитрила получил первую аминокислоту — аланин.

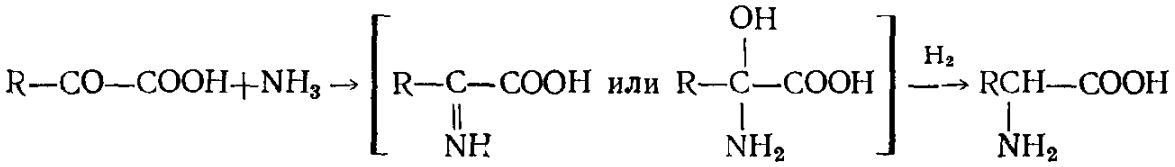
Вместо аммиака и HCN можно применять цианистый аммоний или смесь хлористого аммония и цианистого калия.



Наконец, можно действовать смесью цианистого натрия и углекислого аммония. В этом случае образуется гидантоин, более устойчивый чем аминонитрил, который гидролизуют до аминокислоты.

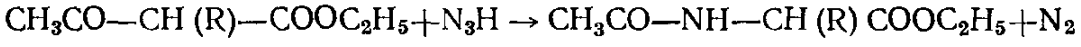


В ряде исследований ставилось целью изменение метода введения азота. Так, Кноп предложил действовать аммиаком не на галоидо-, а на кетокислоту. Образующееся при этом соединение гидрируют на платине или на железе.

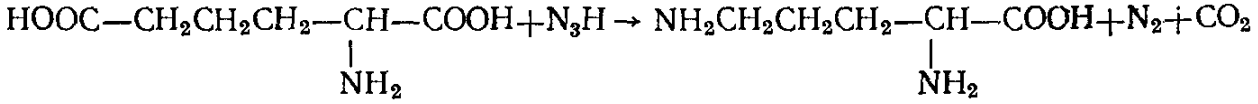


Этот метод широко применяется при синтезе аминокислот с меченым азотом.

Шмидт предложил пользоваться азотистоводородной кислотой. При действии на ацетоуксусный эфир образуется этиловый эфир ацетиламинокислоты.



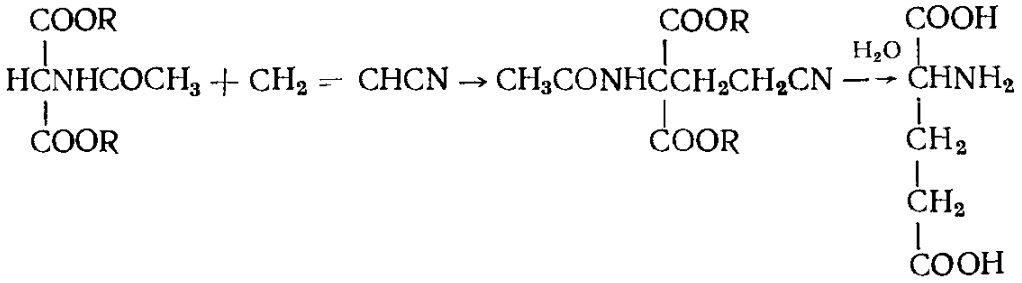
Если действовать азотистоводородной кислотой на дикарбоновые кислоты, то одна карбоксильная группа замещается на аминогруппу. В том случае, если действуют азотистоводородной кислотой на α-аминодикарбоновую кислоту, то реагирует ω-карбоксильная группа и образуется α, ω-диаминокислота.



Рассмотренные методы позволяют синтезировать самые различные α-аминокислоты. Однако разнообразие аминокислот, входящих в состав белков, этим не ограничивается. Значительное место среди них занимают аминокислоты, содержащие наряду с аминной и карбоксильной группами еще и другие функциональные группы (см. табл. 2). Синтез этих соединений имеет определенную специфику и требует внесения изменений в описанные выше методы или же совсем иного подхода. Синтез некоторых из них излагается ниже.

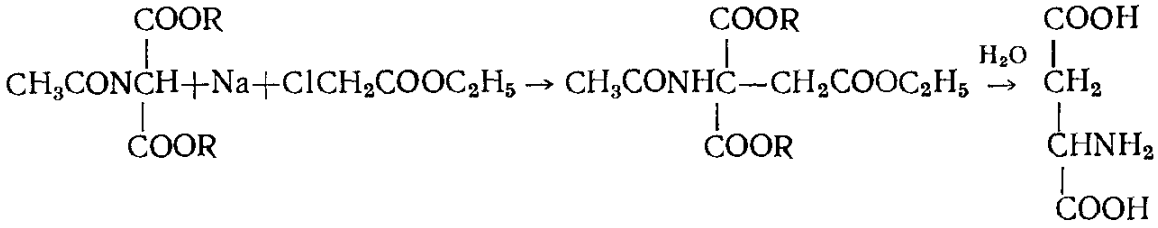
1. Дикарбоновые аминокислоты — аспарагиновая и глутаминовая. Обе аминокислоты получаются с хорошими выходами из ацетиламиномалонового эфира. Так, при конденсации ацетил-

аминомалонового эфира с акрилонитрилом и последующем омылении образуется глутаминовая кислота.

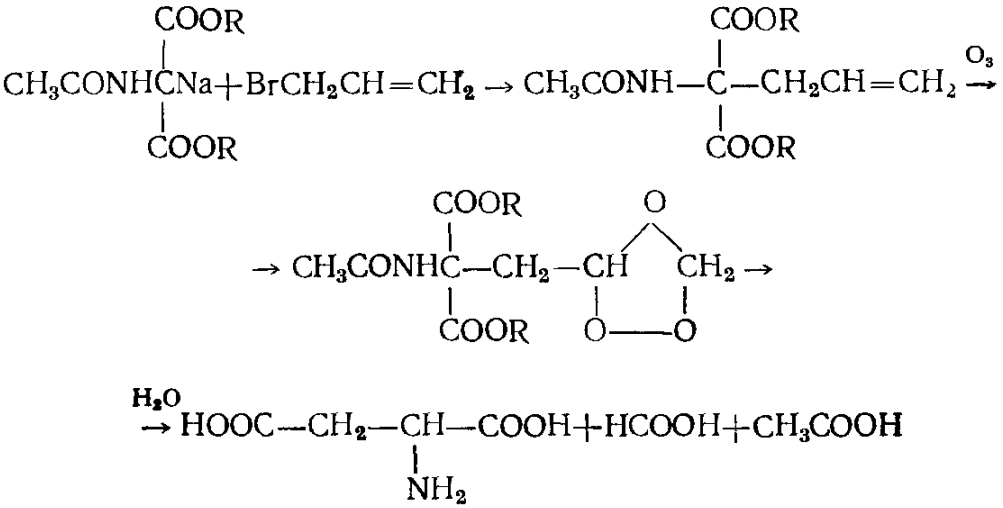


Для синтеза можно также применять акролеин и эфиры акриловой кислоты.

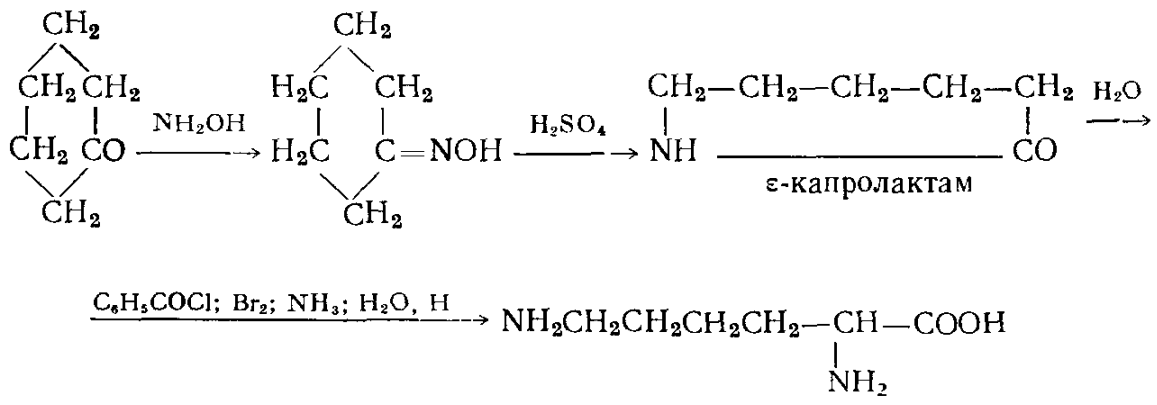
Аспарагиновую кислоту синтезируют из ацетиламиномалонового эфира и эфира хлоруксусной кислоты.



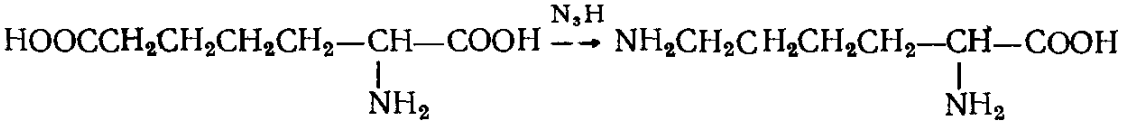
Интересен по своей идее метод получения аспарагиновой кислоты, предложенный Уорнером и Мо. Авторы конденсировали ацетиламиномалоновый эфир с 1-бромпропеном-3, полученное соединение озонировали и разлагали обычным образом.



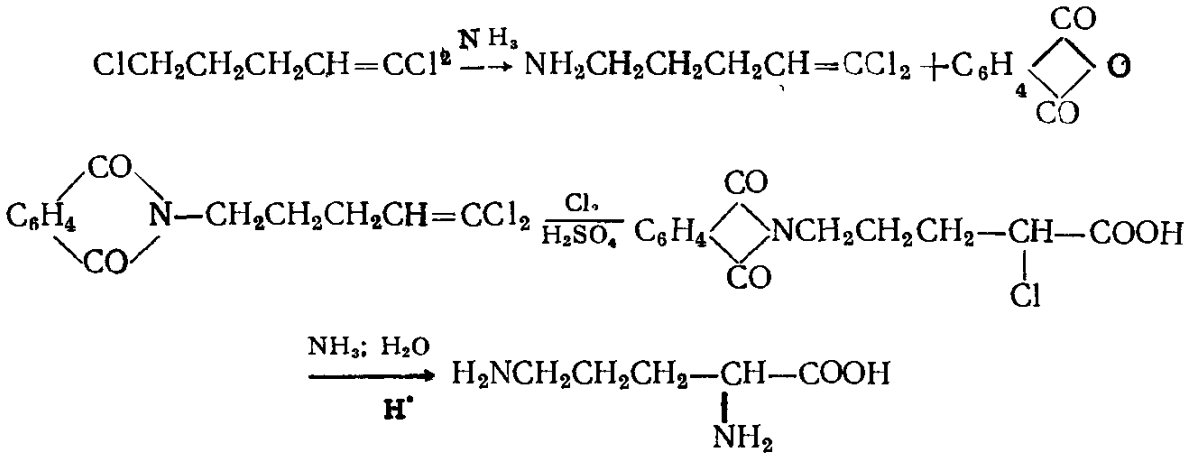
2. Диаминокислоты. Среди этих кислот представляют интерес лизин — незаменимая аминокислота, встречающаяся почти во всех белках, и орнитин, найденный в ряде антибиотиков. Их можно синтезировать несколькими методами. До последнего времени широко пользовались методами, основанными на применении капролактама и пиперидона. Первый применяется для синтеза лизина, второй — для синтеза орнитина. Ниже приведена схема синтеза лизина.



Интересный метод был предложен в 1952 г. Арнштейном. Циклогексанон реагирует с натрийамидом с образованием натрийциклогексанона. При действии углекислоты получают циклогексанонкарбоновую кислоту. Последовательным действием диазометана и азотистоводородной кислоты получают азид, который гидролизуют до α-аминопимелиновой кислоты. При действии на последнюю азотистоводородной кислотой получают лизин. Метод используют для синтеза лизина с меченым C^{14} в карбоксильной группе.

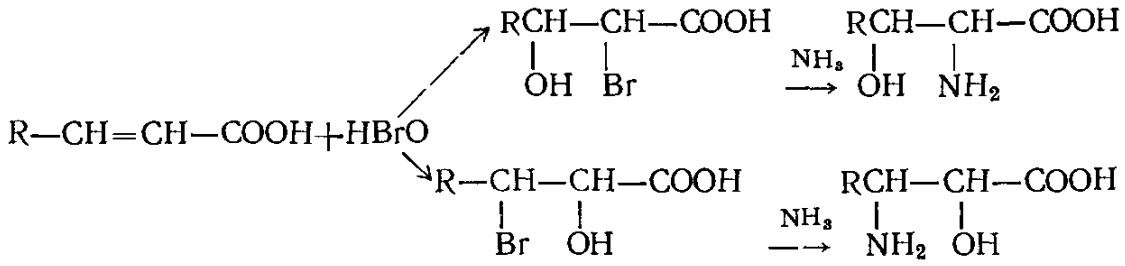


В 1956 г. орнитин получен А. Н. Несмеяновым, Р. Х. Фрейдлиной и В. Г. Петровой из 1,1,5-трихлорпентена-1 по схеме



Широко используются также ацетиламиномалоновый, цианоксусный и нитромалоновые эфиры (см. стр. 446).

3. Оксиаминокислоты — серин и треонин. Общим методом синтеза любых β-окси-α-аминокислот является действие бромноватистой кислоты на непредельные кислоты с последующей обработкой аммиаком. В результате образуется смесь изомерных оксиаминокислот.

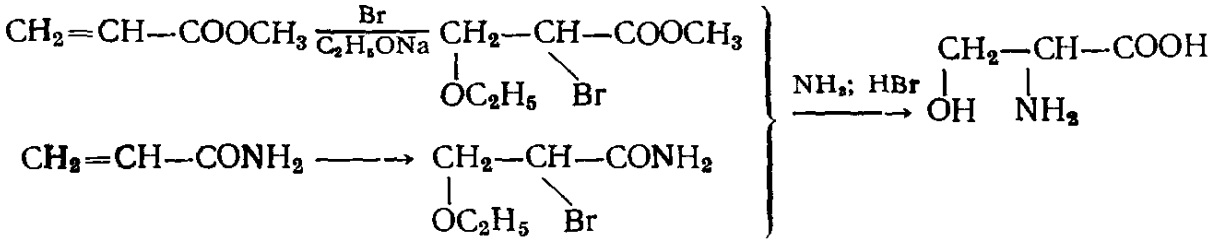


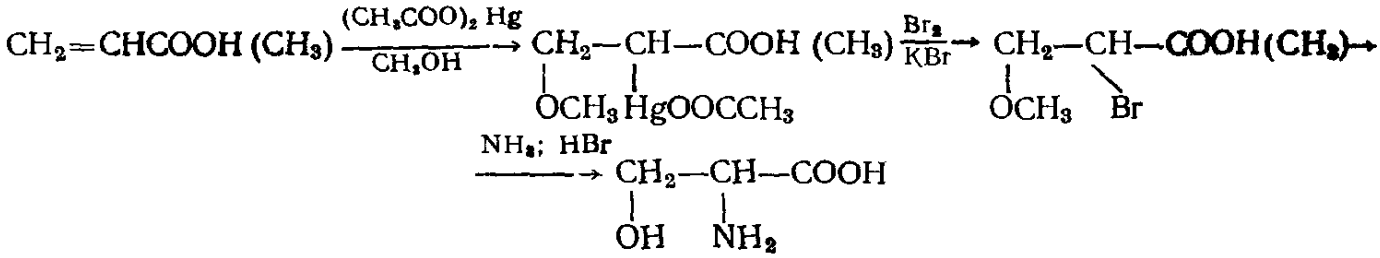
Картер нашел, что реакция между кротоновой кислотой и бромноватистой кислотой, получаемой «в момент выделения», протекает только в одном направлении с образованием β-окси-α-бром-масляной кислоты, которую аминированием превращают в β-окси-α-аминомасляную кислоту.

К сожалению, при этой реакции преобладающим изомером является неприродный изомер аллотреонин. Его можно превратить в треонин, пользуясь вальденовским обращением, но это осложняет синтез (см. стр. 455).

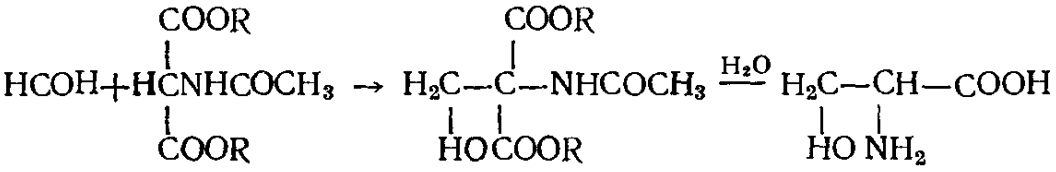
Для синтеза этой и других β-окси-α-аминокислот было предложено несколько вариантов реакции, позволяющих закрепить положение атома Br и OH-группы в молекуле.

Эти варианты реакции представлены следующими уравнениями:

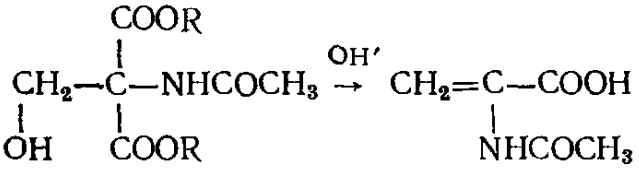




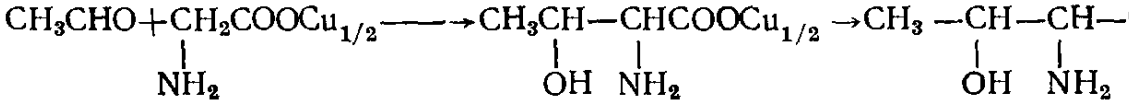
Однако более широко применяемым методом синтеза серина в настоящее время является метод альдольной конденсации формальдегида с ацетиламиномалоновым эфиром, разработанный Кингом. Образующийся при этом оксиметилен-ацетиламиномалоновый эфир при гидролизе дает серин.



Следует отметить сравнительно легко протекающую в щелочной среде дегидратацию оксиметилен-ацетиламиномалонового эфира, в результате которой образуется ацетиламиноакриловая кислота.

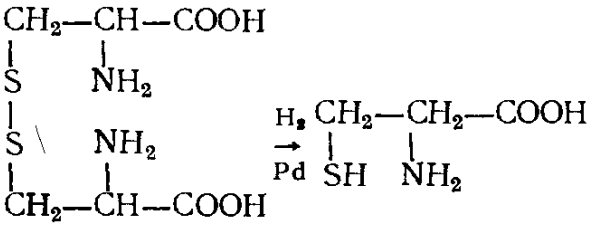


Треонин можно получить нитрозированием ацетоуксусного эфира и последующим восстановлением над платиновым и палладиевым катализатором. Реакция протекает в две стадии. Сначала нитрозогруппа восстанавливается до аминогруппы, затем в более жестких условиях кетонная группа превращается в гидроксильную. Но наиболее удобным методом в настоящее время является метод, предложенный в 1958 г. японским ученым Акабори. Он остроумно использовал реакцию синтеза треонина, происходящую в живом организме, а именно альдольную конденсацию ацетальдегида с глицином. При взаимодействии медного комплекса глицина с ацетальдегидом образуется медная соль треонина, которую разлагают соляной кислотой или сероводородом. Существенно, что главным продуктом реакции является треонин, а не аллотреонин.

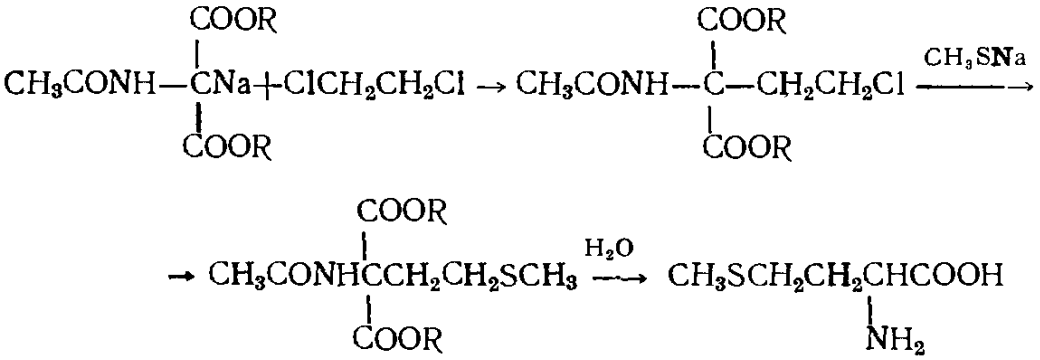


4. Серасодержащие аминокислоты цистин, цистеин и метионин. Цистин настолько легко выделяется из продуктов гидролиза белков, что разработка методов его синтеза представляет только теоретический интерес.

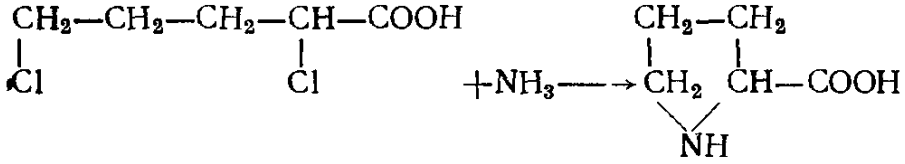
Цистеин проще всего получить из цистина каталитическим гидрированием.



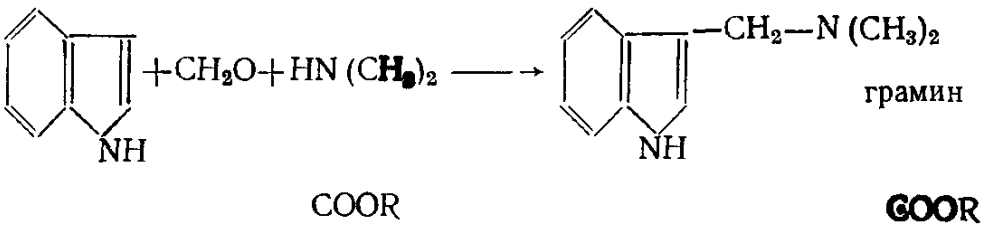
При синтезе метионина исследователи встретились с рядом трудностей. Для его получения было предложено много методов. Одним из наиболее простых с точки зрения доступности исходного сырья и однотипности с синтезом других аминокислот, является синтез метионина из малонового эфира. Ацетиламиномалоновый эфир конденсирует с 1,2-дихлорэтаном, обрабатывают метилмеркаптидом натрия и гидролизуют.



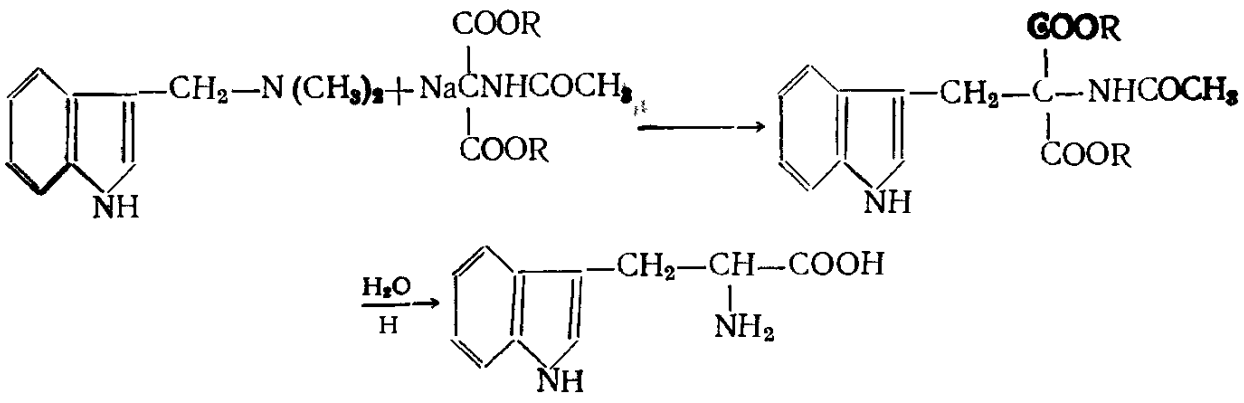
5. Гетероциклические аминокислоты — пролин, оксипролин, гистидин, триптофан. В настоящее время благодаря работам А. Н. Несмеянова и Р. Х. Фрейдлиной наиболее простым методом получения пролина является аминирование α-, ω-дихлорвалериановой кислоты.



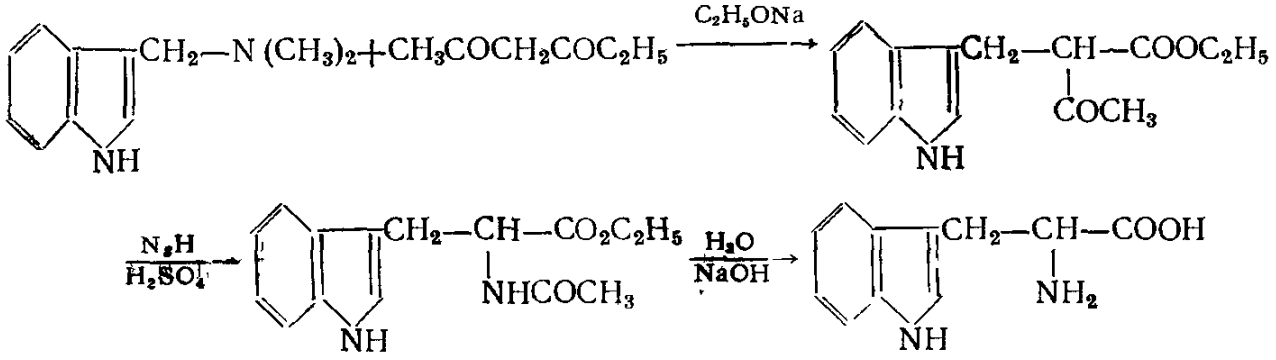
Триптофан стал широко доступен благодаря сочетанию реакции Манниха и малонового синтеза. Пользуясь реакцией Манниха из индола, формальдегида и диметиламина, получают индолилдиметиламинометан — грамин, обладающий реакционной способностью, аналогичной реакционной способности галоидалкила. Его вводят в конденсацию с ацетиламиномалоновым эфиром и продукт реакции гидролизуют.



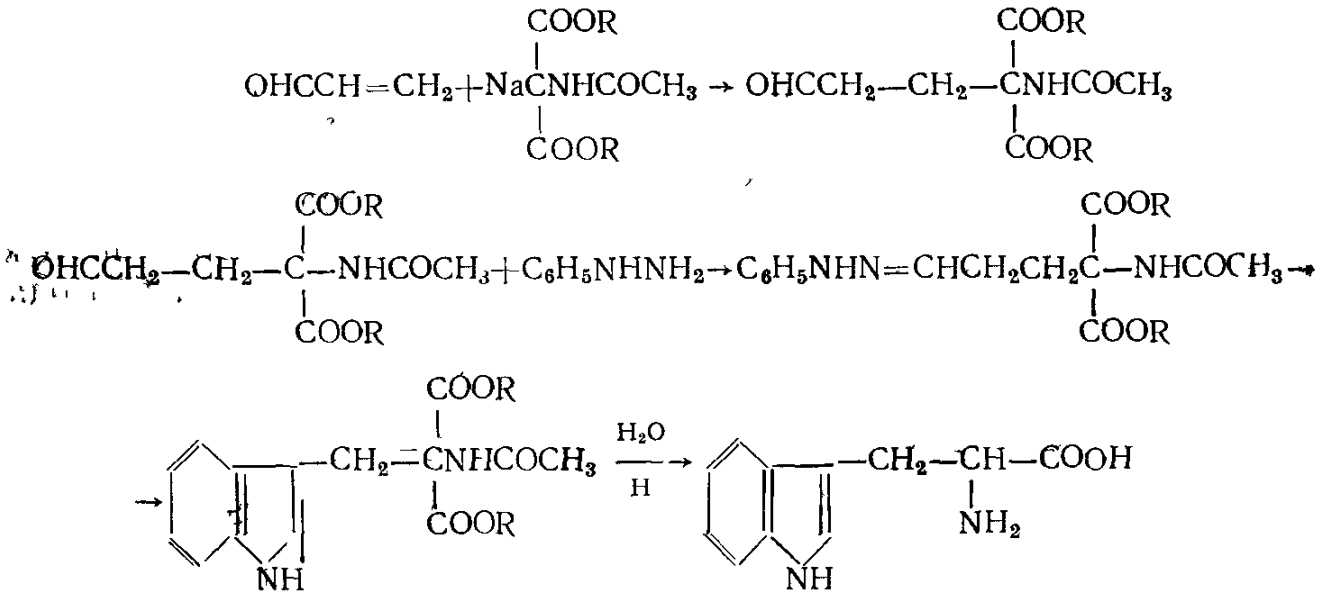
грамин



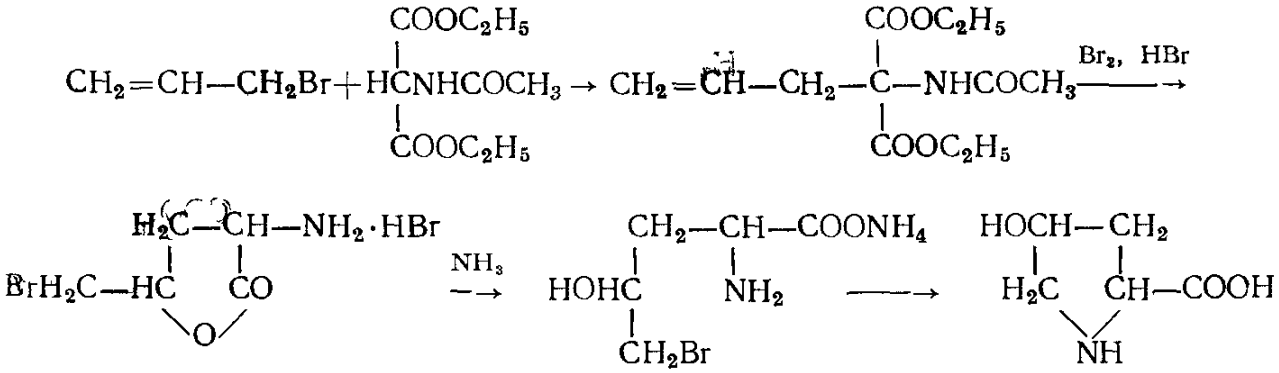
Грамин можно сочетать также с ацетоуксусным эфиром и полученное соединение обработать азотистоводородной кислотой. Образующийся при этом этиловый эфир ацетилтриптофана гидролизуют щелочью и получают триптофан.



Интересен метод получения триптофана, позволяющий синтезировать его без применения индола в качестве исходного вещества. Ацетиламиномалоновый эфир конденсируют с акролеином, затем действуют фенилгидразином и полученный гидразон циклизуют.

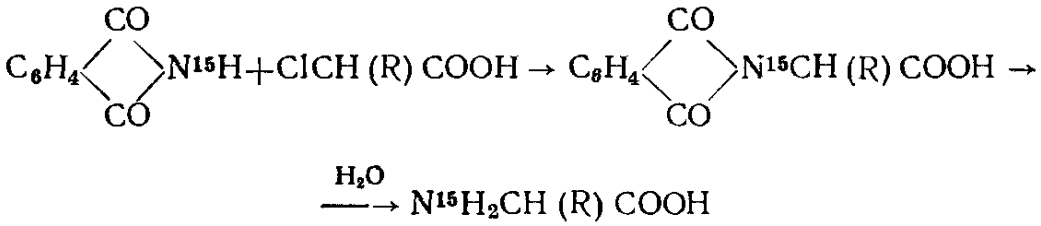


Оксипролин тоже получают из ацетиламиномалонового эфира. Для этого последний конденсируют с бромистым аллилом, затем обрабатывают бромом и действием бромистоводородной кислоты превращают в α-амино-γ-бромметилбутиролактон, который циклизуют в оксипролин.



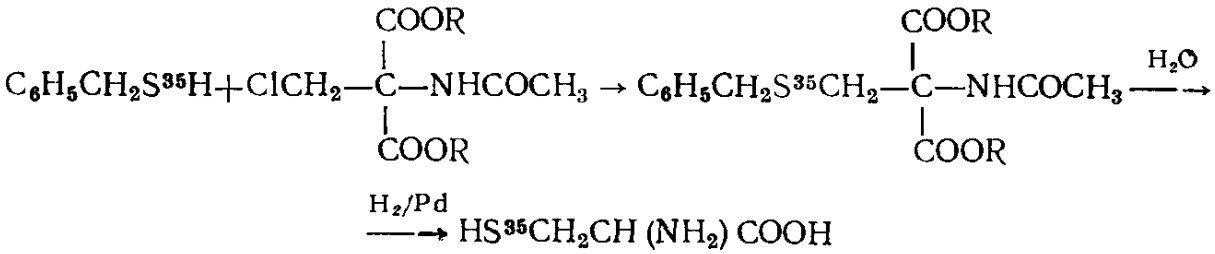
В связи с широким применением для биологических исследований аминокислот с мечеными атомами большое значение приобрел синтез аминокислот, содержащих C^{14}, N^{15}, S^{35} и P^{32}. Большинство применяемых методов не отличается от обычных, чаще всего пользуются теми, кото-

рые позволяют вводить меченый атом в последней стадии синтеза. Так, для получения аминокислот с меченым атомом азота применяют фталимидный синтез.



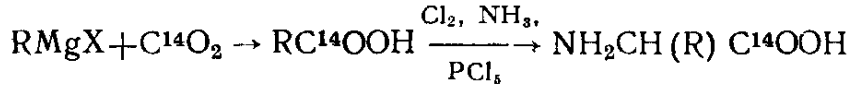
Широко используется также метод Кнопа — взаимодействие кетокислоты с аммиаком, содержащим N^{15} (см. стр. 447).

Аминокислоты с меченой серой получают из ацетиламиномалонового эфира действием бензилмеркаптана, содержащего S^{35}.

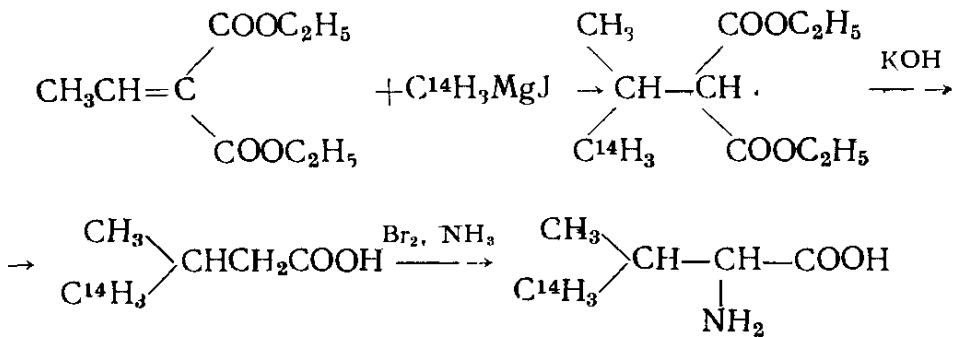


Введение меченого атома углерода проводят различными путями, в зависимости от того, в какое положение вводят метку.

Для получения аминокислоты, содержащей C^{14} в карбоксильной группе, применяют циангидриновый метод, используя $KC^{14}N$, или предварительно получают магнийорганическим методом кислоту, применяя $C_{14}O_2$.



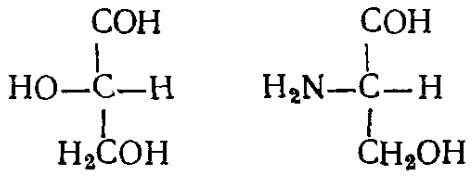
Для введения C^{14} в цепь можно пользоваться одним из описанных методов, например, малоновым, азлактоновым и т д. Галоидалкилы или другие применяемые компоненты должны содержать C^{14}. Например, для синтеза серина, меченного C^{14} в положении 3, можно воспользоваться описанным выше синтезом — конденсацией ацетиламиномалонового эфира с $HC^{14}OH$ (см. стр. 444). Валин с C^{14} в одной из CH_3-групп можно получить следующими последовательными реакциями: малоновый эфир конденсируют с ацетальдегидом и на полученный этилиденмалоновый эфир действуют метилмагнийиодидом, содержащим C^{14}. Из образовавшегося изопропилмалонового эфира получают изовалериановую кислоту, содержащую C^{14} в метильной группе, ее подвергают последовательно действию галоида и аммиака и получают валин.



Разработка новых методов синтеза аминокислот не является сейчас злободневной задачей. Имеющиеся методы в основном удовлетворяют потребности исследователей. Более существенным в настоящее время является вопрос о простых методах разделения рацематов аминокислот на оптические антиподы.

Благодаря фундаментальным исследованиям Фишера, Фрейденберга и Каррера, а также работам Левина стереохимические отношения в ряду аминокислот, входящих в состав белка, в настоящее время достаточно хорошо выяснены. Все эти аминокислоты обладают одинаковой конфигурацией α-углеродного атома и относятся к одному стерическому L-ряду соединений. Такое обозначение не определяет абсолютной конфигурации соединения, а свидетельствует лишь о том, что все аминокислоты относятся к генетическому ряду, происходящему от L-глицеринового альдегида.

Часто, однако, сравнивают конфигурацию аминокислот с конфигурацией L-серина и обозначают генетический ряд как L-ряд.



L-глицериновый альдегид

L-серин

Проводя превращения одних аминокислот в другие, не затрагивая асимметрического центра, можно установить взаимосвязь природных аминокислот.

Такие превращения были осуществлены Э. Фишером.

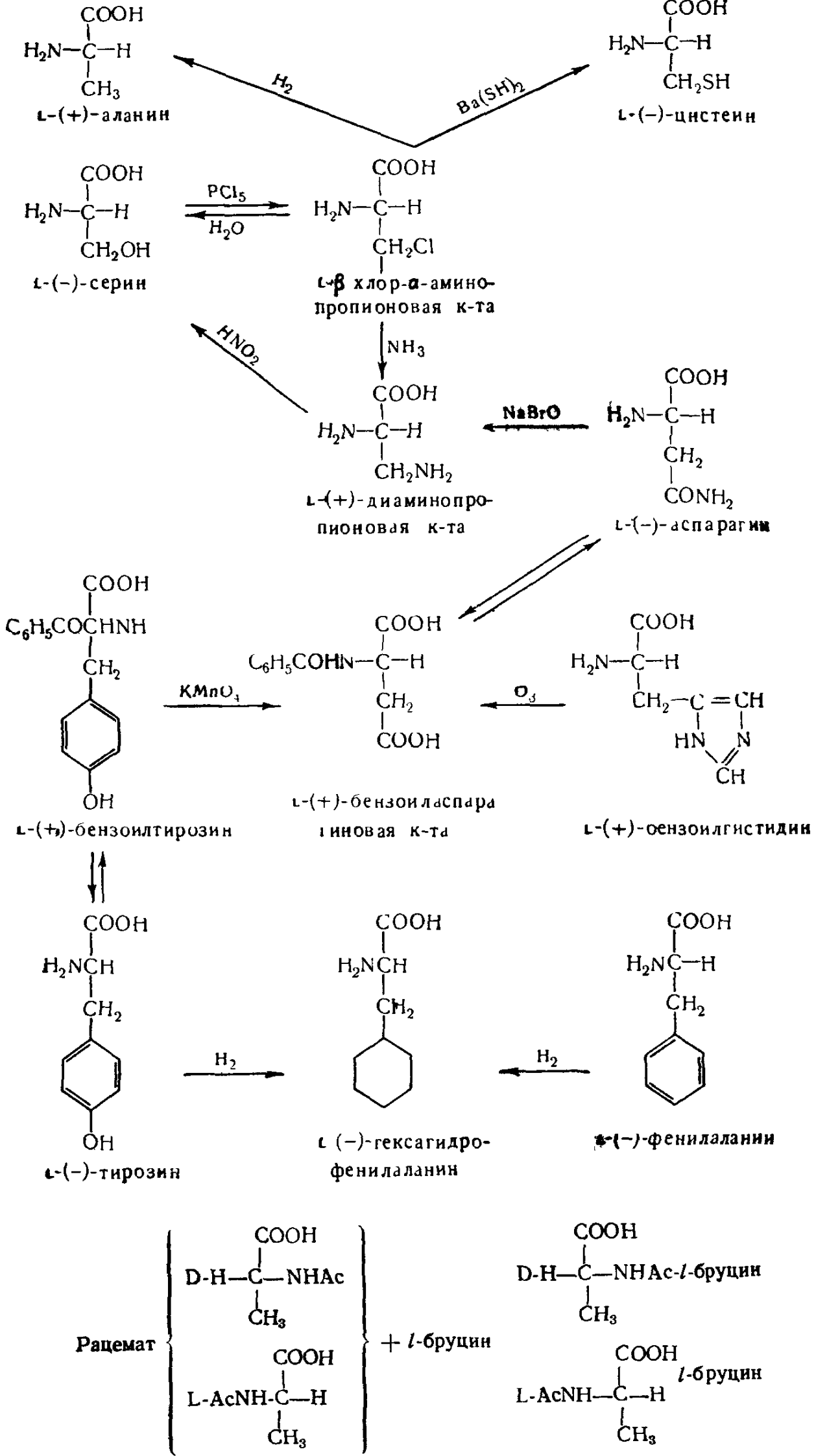
Из L-серина действием PCl_5 была получена L-β-хлор-α-аминопропионовая кислота, которая восстановлением иодистоводородной кислотой превращается в L-аланин, а при обработке сероводородом — в L-цистеин. Если обработать хлораминопропионовую кислоту аммиаком, то образуется L-диаминопропионовая кислота, которая действием азотистой кислоты превращается вновь в исходный серин. Диаминопропионовая кислота той же конфигурации получается при проведении гофмановской перегруппировки с L-аспарагином. Этим доказывается генегическая связь между аспарагином и серином.

Было проведено аналогичное химическое сопоставление конфигураций аспарагина, гистидина, тирозина и фенилаланина. Окисление бензоил-L-тирозина перманганатом и окисленне бензоил-L-гистидина озоном приводит к одному и тому же изомеру бензоиласпарагиновой кислоты, тождественной с препаратом, полученным непосредственным бензоилированием L-аспарагиновой кислоты. Наконец, при гидрнровании L-(—)-бензоилтирозина и L-(—)-фенилаланина образуется один и тот же изомер L-(—)-гексагидрофенилаланина.

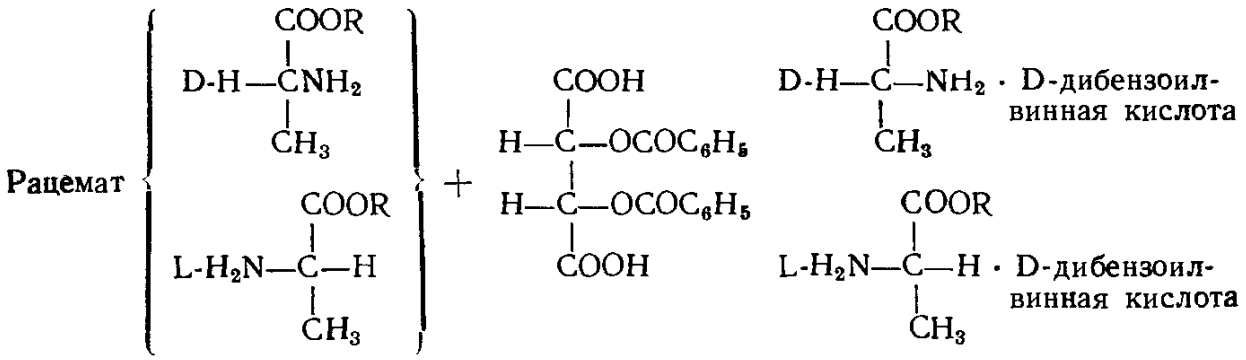
Приведенные превращения протекают у β-углеродного атома, не затрагивая асимметрического α-углеродного атома, поэтому все они проходят без обращения конфигурации. Ниже приводится схема этих превращений (см. стр 455)

Разделение рацемических аминокислот на оптические антиподы можно провести любым из классических методов, пользуясь соответствующими алкалоидами. Описание этих методов имеется во всех учебниках органической химии. Приведем только схему (см. стр. 455).

Разделение полученных диастереомеров осуществляется путем кристаллизации.

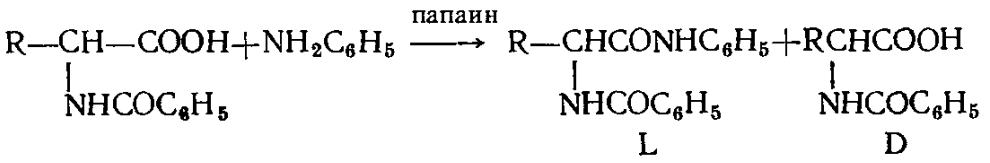

L-(+)-аланин
H2
Ba(SH)2
L-(−)-цистеин
L-(−)-серин
PCl5
H2O
L-β хлор-α-амино-пропионовая к-та
NH3
HNO2
NaBrO
L-(+)-диаминопро-пионовая к-та
L-(−)-аспарагин
KMnO4
O3
L-(+)-бензоилтирозин
L-(+)-бензоиласпара гиновая к-та
L-(+)-бензоилгистидин
H2
H2
L-(−)-тирозин
L (−)-гексагидро-фенилаланин
L-(−)-фенилаланин
Рацемат
+ l-бруцин
D-H—C—NHAc-l-бруцин
L-AcNH—C—H
l-бруцин

Недавно Лоссе предложил применять для разделения на антиподы рацематов аминокислот и пептидов D-дибензоилвинную кислоту



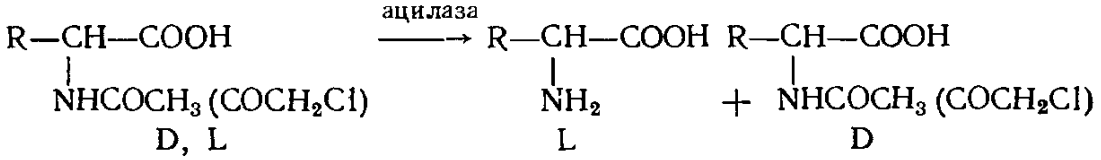
Разделение солей ведется также кристаллизацией.

Все большее значение в последнее время приобретают ферментативные методы разделения рацематов аминокислот. Бергман показал, что ацилированные аминокислоты реагируют с анилином под действием фермента папаина избирательно — образуются анилиды только L-аминокислот.

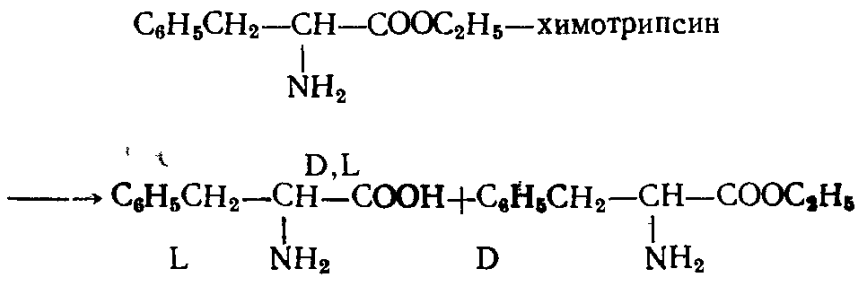


Эти работы, развитые Фрутоном, имеют существенное значение в связи с вопросами о путях образования пептидной связи. Однако для разделения рацематов на антиподы этот путь мало пригоден, так как образующиеся анилиды слишком устойчивы.

Гринштейн нашла, что ацилаза, выделяемая из почек, например, свиньи, расщепляет только L-антиподы ацетиламинокислот и хлорацетиламинокислот.

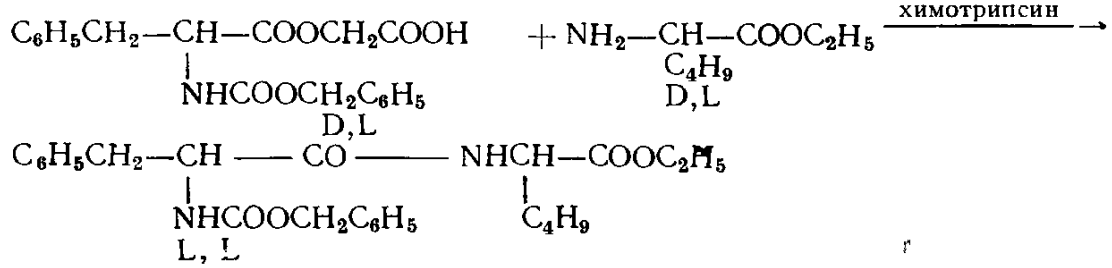


Метод пользуется в настоящее время наибольшей популярностью. Все большее значение приобретает использование эстеразного действия протеолитических ферментов — химотрипсина или смеси ферментов панкреатина. Если такой смесью подействовать на эфиры рацемических аминокислот, то гидролизуется только L-антипод, который легко отделить. Таким путем М. А. Губерниев получил L-фенилаланин. Этот метод широко развит Цаном.



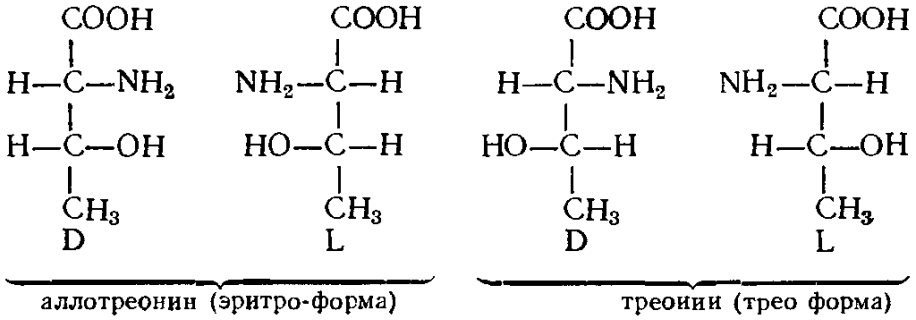
М. М. Ботвиник и В. И. Остославская предложили проводить одновременно с расщеплением рацемических аминокислот на антиподы синтез оптически деятельных пептидов. При действии на гликолевый эфир N-карбобензокси-DL-фенилаланина этиловым эфиром DL-аминокисло-

ты, например, лейцина под действием химотрипсина образуется этиловый эфир карбобензокси-L-фенилаланил-L-лейцина:

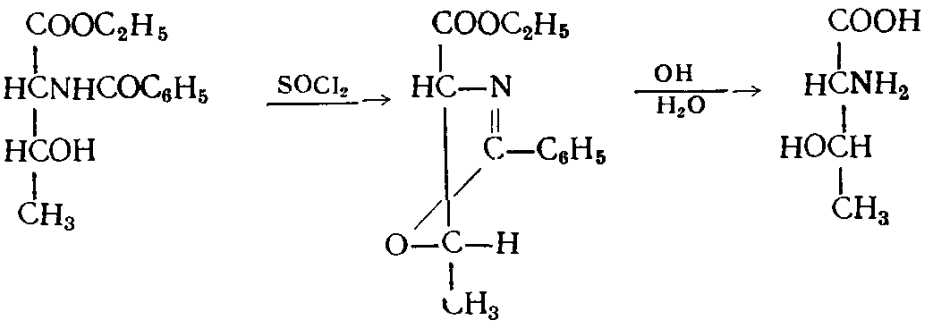


Разделение рацематов на оптические антиподы осложняется в тех случаях, когда аминокислота содержит не один, а два асимметрических атома углерода, например, при получении L-изолейцина, L-треонина или L-оксипролина. У соединений с двумя асимметрическими атомами углерода различают два ряда стереоизомеров, получивших названия эритро- и треорядов.

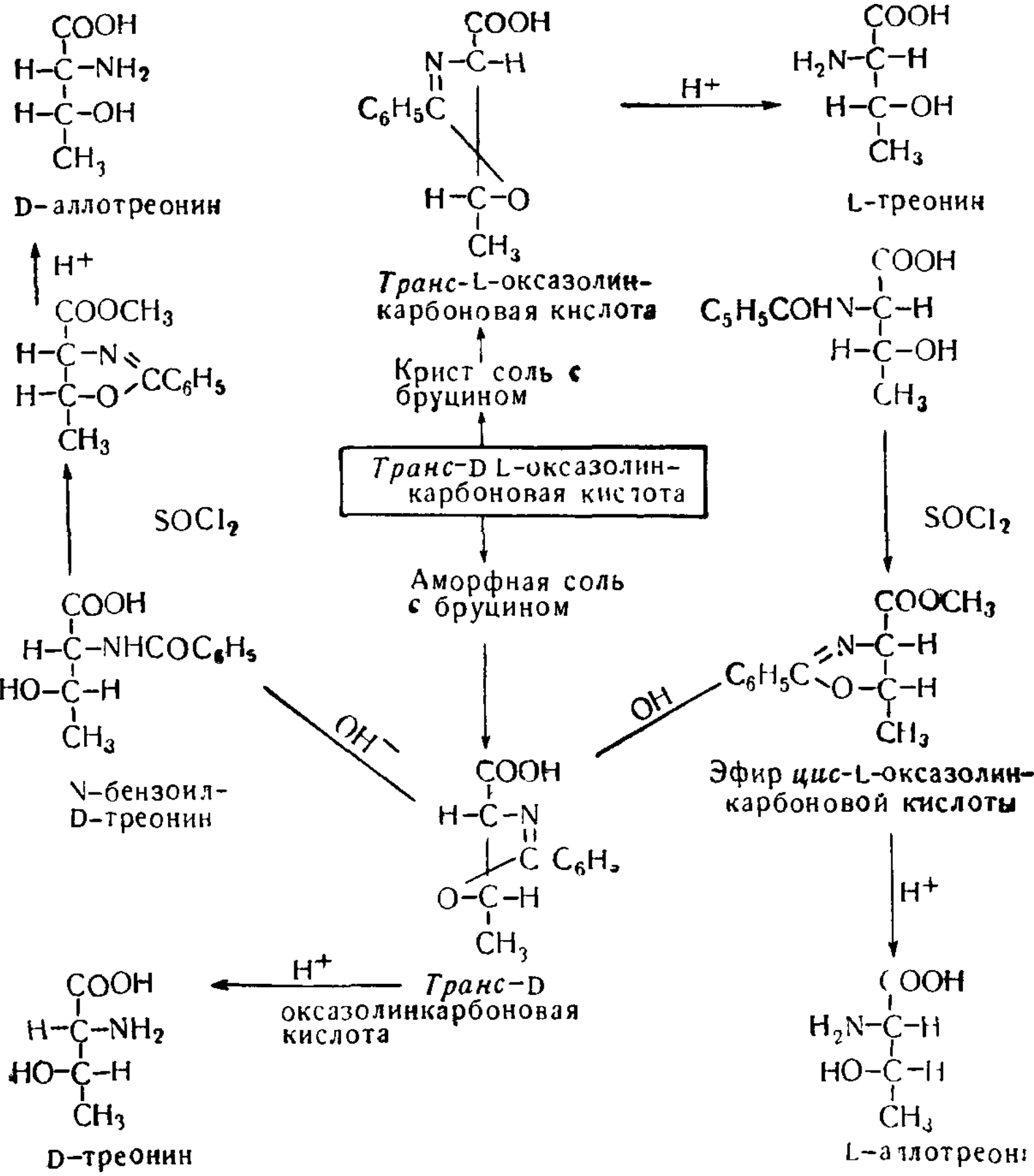
В эритроряду заместители, повторяющиеся у обоих асимметрических атомов углерода, расположены зеркально, в треоряду в одинаковом порядке. Это соответствует пространственному расположению водорода и гидроксила у D-эритрозы и D-треозы, откуда и произошли оба названия. Ниже представлены изомеры треонина.



Из этих соединений в состав белка входит только L-треонин. При синтезе же треонина из кротоновой кислоты преимущественно образуется аллотреонин. Превращение аллотреонина в треонин можно осуществить обращением конфигурации у одного из асимметрических С-атомов α или β. Эллиотт проводит это обращение у α- или β-углеродного атома Так, например, при действии на этиловый эфир N-бензоилаллотреонина тионилхлоридом происходит замыкание оксазолинового цикла с одновременным обращением у β-углеродного атома. В результате вместо цис-изомера этилового эфира оксазолинкарбоновой кислоты образуется транс-изомер, гидролиз которого приводит к треонину.



Превращения всех стереоизомеров аминооксимасляной кислоты представлены на следующей схеме:


D-аллотреонин
H+
SOCl2
N-бензоил-D-треонин
OH−
D-треонин
H+
Транс-D оксазолинкарбоновая кислота
Транс-L-оксазолин-карбоновая кислота
Крист соль с бруцином
Транс-D L-оксазолин-карбоновая кислота
Аморфная соль с бруцином
L-треонин
SOCl2
Эфир цис-L-оксазолин-карбоновой кислоты
OH
H+
L-аллотреонин

Глава 2

СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ

Аминокислоты представляют собой амфотерные соединения общей формулы $N^+H_3—CH(R)COO^-$. Физические исследования показали, что и в кристаллах они находятся в ионной форме Инфракрасный спектр аминокислот не обнаруживает ни линии, характерной для COOH-группы, ни линии NH_2-группы. Аминокислоты обладают поэтому всеми свойствами полярных соединений: легко растворяются в воде и нерастворимы в большинстве органических растворителей. Боковые цепи аминокислот оказывают существенное влияние на их свойства. Увеличение длины углеродной цепи резко понижает растворимость аминокислот в воде и повышает их растворимость в спирте.

Аминокислота	Растворимость в воде *г* на 100 *мл*	Отношение растворимости в воде к растворимости в спирте
Глицин	25	2500
Аланин	16	750
Валин	7	
Лейцин	1	25
ε-Аминокапроновая кислота		1000

Изоэлектрические точки α-амино-α-карбоновых кислот лежат около pH=6, так как константы диссоциации карбоксильной группы несколько выше константы диссоциации аминной группы. Введение в аминокислоту дополнительных функциональных групп — кислых, основных или только полярных смещает изоэлектрическую точку (см. табл. 4). В кислой среде в аминокислотах подавляется диссоциация карбоксильной группы и соединение ведет себя как амин. В щелочной среде подавляется диссоциация аммонийной группы и проявляются кислые свойства вещества.

$$\overset{\oplus}{N}H_3—CHR—COOH \underset{OH^\ominus}{\overset{H^\oplus}{\rightleftarrows}} \overset{\oplus}{N}H_3—CHR—COO^- \underset{H^\oplus}{\overset{OH^\ominus}{\rightleftarrows}} NH_2—CHR—COO^\ominus$$

pH < pI pH=pI pH > pI

Различие изоэлектрических точек аминокислот и особенности их поведения при различных pH используются для разделения аминокислот методом ионофореза. Особенно большое значение приобрел метод ионофореза на бумаге, силикагеле и в сочетании с хроматографией. Титро

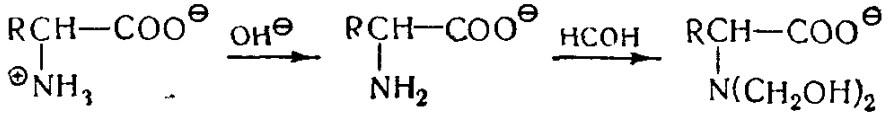
Таблица 4

Изоэлектрические точки и растворимость аминокислот

Аминокислота	Изоэлектрическая точка (*PI*)	Растворимость г/100г воды при 25°	
		оптически активного изомера	рацемата
Глицин	5,97	24,99	
Аланин	6,0	16,51	16,65
Валин	5,96	8,85	7,77
Лейцин	5,98	2,19	1,18
Изолейцин	6,02	4,12	2,18
ε-Аминокапроиовая	7,59		
Лизин	9,74	Очень хорошая	
Гистидин	7,59	4,29	
Аргинин	10,76	Очень хорошая	
Аспарагиновая	2,77	0,5	0,81
Глутаминовая	3,22	0,84	2,64
Аспарагин	5,41	3	—
Глутамин	5,65	3,6	—
Фенилаланин	5,48	2,96	1,3
Тирозин	5,66	0,045	—
Триптофан	5,89	1,13	0,25
Серин	5,68	—	5,22
Треонин	6,16	20,5	—
Цистин	5,03	0,011	—
Цистеин	5,05	—	—
Метионин	5,74	—	3,38
Пролин	6,30	16,2	—
Оксипролин	5,83	3,61	—

вание аминокислот можно проводить после предварительного подавления диссоциации карбоксильной или аминной группы. Этого достигают различными способами.

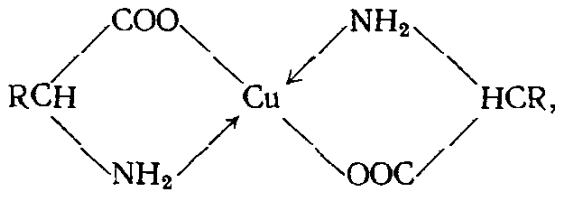
По методу, предложенному Серенсеном, аминокислоту обрабатывают формалином и получают диметилольное производное, которое можно оттитровать кислотой. Так как формальдегид реагирует только с незаряженной аминогруппой, то реакцию проводят в ясно щелочной среде. Основность образующихся метилольных производных настолько невелика, что ею можно пренебречь.



Аминокислоты вступают в те же реакции, что и амины и органические кислоты. Кроме того, для них характерны реакции, обусловленные одновременным присутствием двух диаметрально противоположных функциональных групп, находящихся в смежном положении. Введение в аминокислоту дополнительных функциональных групп, ароматического радикала, гетероциклических остатков и т. д. сильно расширяет диапазон реакций, в которые вступают аминокислоты.

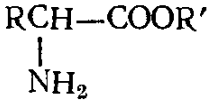
В настоящем изложении не ставится цель дать исчерпывающее перечисление реакций, оно посвящено рассмотрению общего вопроса о подходе к установлению строения молекулы белка.

Со щелочами аминокислоты образуют соли. Из них особый интерес представляют комплексные соли с металлами, например, с медью



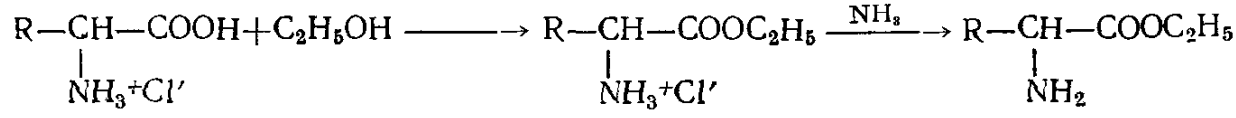
которые легко образуются при обработке аминокислот свежеприготовленной гидроокисью меди. Эти соли характеризуются определенными линиями в ультрафиолетовой области спектра. Медные комплексы используются иногда для защиты α-аминной и α-карбоксильной групп. Например, селективное ацилирование ε-аминогруппы лизина можно легко провести, пользуясь медным комплексом лизина.

Эфиры аминокислот



Эфиры аминокислот представляют собою сильно основные соединения, легко растворяющиеся в органических растворителях. Многие из них перегоняются под уменьшенным давлением. Этиловые эфиры аминокислот широко используются при исследованиях строения белков. В 1901 г. Э. Фишер предложил пользоваться фракционированной разгонкой эфиров для разделения гидролизатов аминокислот. Это был первый метод, позволивший количественно определять всю сумму аминокислот, содержащихся в белках. С помощью этого метода был открыт ряд аминокислот в белках.

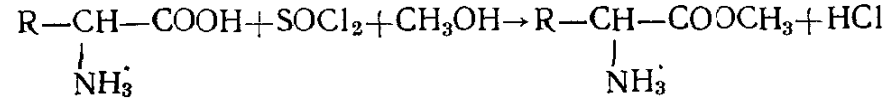
Обычно эфиры получают нагреванием аминокислот со спиртом в присутствии HCl (для уменьшения диссоциации карбоксильной группы) и выделяют в виде хлоргидратов. Для получения свободных эфиров особенно удобно обрабатывать суспензию хлоргидратов эфиров аминокислот в хлороформе газообразным аммиаком или органическим основанием, например, триэтиламином.



Метиловые эфиры ацилированных аминокислот можно получать также действием диазометана.



Бреннер предложил этерифицировать аминокислоты и пептиды действием метанольного раствора тионилхлорида. При этом в качестве промежуточного соединения образуется эфир минеральной кислоты, реагирующей затем с аминокислотой.



В последнее время были получены эфиры с самыми различными спиртовыми остатками. Многие из них широко используются при син-

тезе пептидов. Таковы, например, бензиловые эфиры Они обладают тем преимуществом, что спиртовый остаток можно удалять не только методом гидролиза· бензильная группа легко отщепляется в виде толуола при гидрировании над палладием.

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOCH_2C_6H_5 \xrightarrow{H_2/Pd} R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + C_6H_5CH_3$$

Бензиловые эфиры аминокислот не всегда удается получить нагреванием аминокислоты со спиртом в присутствии HCl, так как при этом образуется хлористый бензил Поэтому их рекомендуют получать нагреванием бензолсульфокислой или пара-толуолсульфокислой соли аминокислоты с бензиловым спиртом с одновременной отгонкой воды и последующим разложением соли.

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_3^{\oplus}\cdot CH_3C_6H_4SO_3^{\ominus}}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + C_6H_5CH_2OH \longrightarrow R{-}\underset{\displaystyle NH_3^{\oplus}\cdot CH_3C_6H_4SO_3^{\ominus}}{\underset{|}{CH}}{-}COOCH_2C_6H_5$$

Большое значение приобрели эфиры аминокислот, в которых спиртовый остаток содержит какую-либо группировку, оттягивающую на себя электроны Например, цианметиловые, п-нитрофениловые и тиофениловые эфиры ацилированных аминокислот

$$R{-}\underset{\displaystyle NHCOR'}{\underset{|}{CH}}{-}COOCH_2CN;\quad R{-}\underset{\displaystyle NHCOR'}{\underset{|}{CH}}{-}COOC_6H_4NO_2;\quad R{-}\underset{\displaystyle NHCOR'}{\underset{|}{CH}}{-}COSC_6H_5$$

Оттягивание электронов способствует появлению на карбонильном углероде некоторого δ^+ заряда, который облегчает реакцию между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминной группой другой (см. синтез пептидов).

Синтез цианметиловых эфиров проводят взаимодействием соли ацилированной аминокислоты с хлорцианметилом.

$$R{-}\underset{\displaystyle NHAc}{\underset{|}{CH}}{-}COO^-\,N^+(C_2H_5)_3 + ClCH_2CN \rightarrow R{-}\underset{\displaystyle NHAc}{\underset{|}{CH}}{-}COOCH_2CN + N(C_2H_5)_3\cdot HCl$$

Для получения нитрофениловых эфиров ацилированных аминокислот удобно применять дициклогексилкарбодиимид (см. ниже).

$$R{-}\underset{\displaystyle NHAc}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + OHC_6H_4NO_2 + C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11} \rightarrow R{-}\underset{\displaystyle NHAc}{\underset{|}{CH}}{-}COOC_6H_4NO_2 +$$

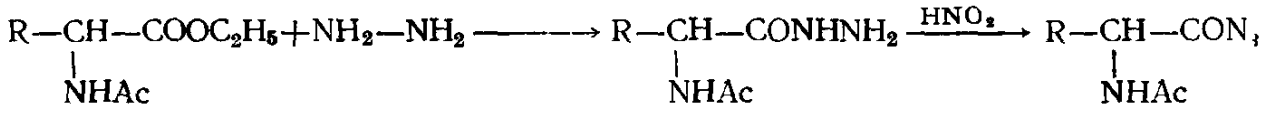
$$+ C_6H_{11}NH{-}CO{-}NHC_6H_{11}$$

Эфирная группа обычно более активна, чем карбоксильная. Она легко реагирует с аммиаком, аминами, гидразинами, гидроксиламином и т. д. Эфиры аминокислот восстанавливаются в мягких условиях $LiAlH_4$, $LiBH_4$, AlH_3 до аминоспиртов.

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOR' \xrightarrow{H_2} R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}CH_2OH$$

Эту реакцию широко применяют для установления числа пептидных цепей в белках и для определения С-концевых аминокислот. Позже было найдено, что и сами аминокислоты можно восстанавливать до амино-

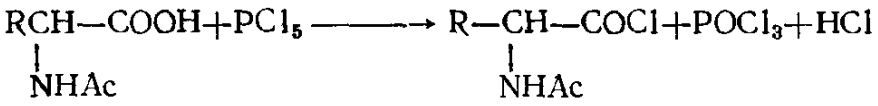
спиртов Эфиры ацилированных аминокислот также реагируют с гидразином, образуя гидразиды кислот; последние дают с азотистой кислотой азиды кислот, которые используют при синтезе пептидов



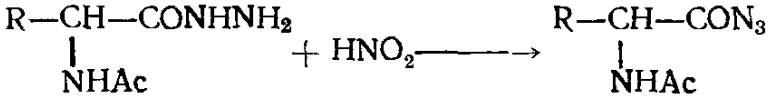
Ангидриды аминокислот

Не меньшее значение, чем эфиры аминокислот, имеют ангидриды аминокислот, особенно смешанные ангидриды ацилированных аминокислот с неорганическими и органическими кислотами. Эта группа соединений представляет краеугольный камень, на котором построено большинство современных методов синтеза пептидов. Ниже приведено несколько примеров синтеза ангидридов ацилированных аминокислот.

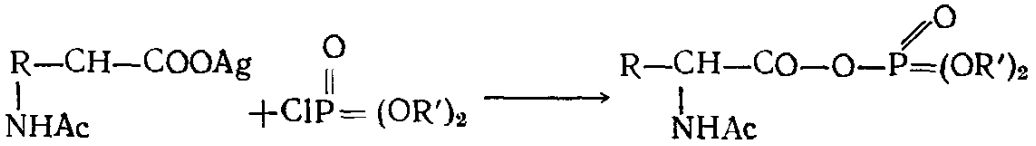
1 Смешанный ангидрид ациламинокислоты и галоидоводородной кислоты.



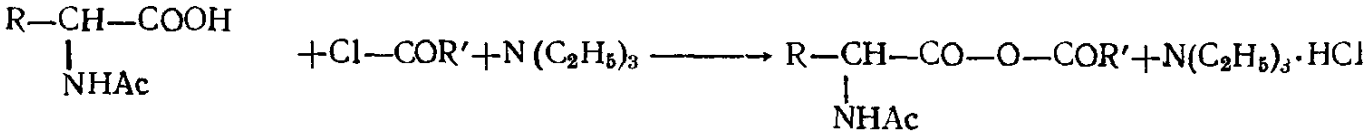
2 Смешанный ангидрид ациламинокислоты и азотистоводородной кислоты.



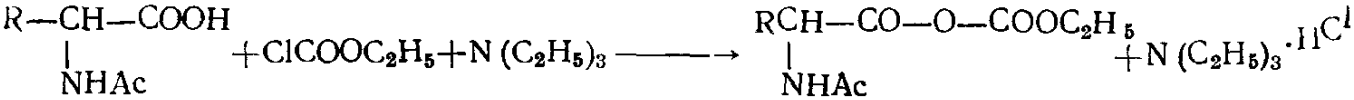
3 Смешанный аигидрид ациламинокислоты и фосфорной или фосфористой кислоты.



4 Смешанный ангидрид ациламинокислоты и органической кислоты

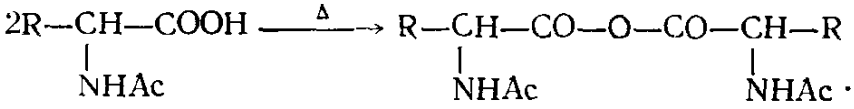


5. Смешанный ангидрид ациламинокислоты и эфира угольной кислоты.



Все эти соединения можно получать и с алкилированными аминокислотами.

6. Ангидриды двух аминокислот (реакц'ия Данилевского).



Дикарбоновые аминокислоты — аспарагиновая и глутаминовая могут реагировать по α-, β- и ν-карбоксильным группам

Аминогруппа в аминокислотах способна к тем же реакциям, что и аминогруппа в первичных аминах. Ниже приводятся некоторые из них

1. При взаимодействии аминокислот с азотистой кислотой количественно выделяется азот.

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + HNO_2 \longrightarrow R{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + N_2$$

Реакция применяется для определения аминного азота в аминокислотах, пептидах и белках (метод ван-Сляйка).

В лизине реагируют обе аминогруппы, но с разной скоростью. α-аминогруппа во всех аминокислотах, пептидах и белках разлагается азотистой кислотой за 5 минут, ω-аминогруппа лизина взаимодействует с азотистой кислотой значительно медленнее. Для количественного определения реакцию проводят в течение 30 минут.

2. Аминокислоты образуют труднорастворимые соли с рядом кислот — пикриновой, пикролоновой, фосфорно-вольфрамовой, флавиановой и т. д. Эти соли используются для идентификации и разделения аминокислот.

3. С хлорангидридами и ангидридами кислот аминокислоты образуют ациламинокислоты (реакция Шоттен — Баумана).

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH_2}}{-}COONa + R'COCl \xrightarrow{NaOH} R{-}\underset{\displaystyle NHCOR'}{\underset{|}{CH_2}}{-}COONa + NaCl$$

Эти соединения являются исходными веществами для синтеза пептидов. Особенно важны следующие ацильные производные.

А. Карбобензоксипроизводные.

$$C_6H_5CH_2OCOCl + NH_2CH(R)COONa \longrightarrow C_6H_5CH_2OCONHCH(R)COONa$$

Б. п-Толуол-сульфопроизводные (тозильные).

$$CH_3C_6H_4SO_2Cl + NH_2CH(R)COONa \longrightarrow CH_3C_6H_4SO_2NHCH(R)COONa$$

В. Трифторацетильные производные.

$$(CF_3CO)_2O + NH_2CH(R)COONa \longrightarrow CF_3CONHCH(R)COONa + CF_3COONa$$

4. Аминогруппа легко реагирует также с алкилгалогенидами, с образованием алкильных производных

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COONa + \xrightarrow{R'J} R{-}\underset{\displaystyle NHR'}{\underset{|}{CH}}{-}COONa \xrightarrow{R'J} R{-}\underset{\displaystyle N(R')_2}{\underset{|}{CH}}{-}COONa \longrightarrow$$

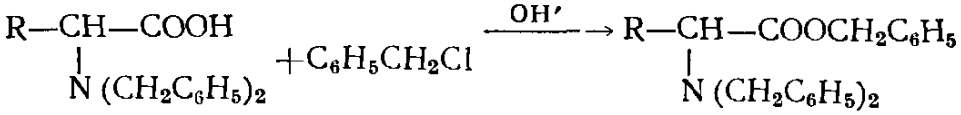
$$\xrightarrow{H'} R{-}\underset{\displaystyle N^+(R')_3}{\underset{|}{CH}}{-}COO^- \text{ (бетаины)}$$

Из алкильных производных особенно интересны следующие.

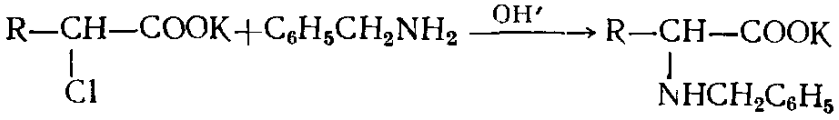
А. Бензильные производные.

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + C_6H_5CH_2Cl + KOH \longrightarrow R{-}\underset{\displaystyle N(CH_2C_6H_5)_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOK + KCl$$

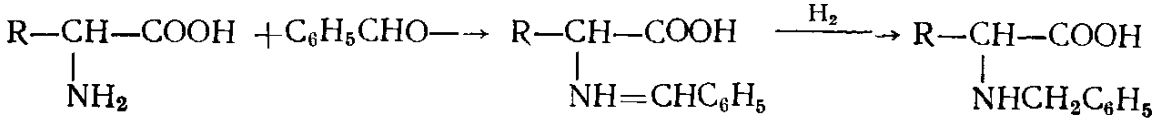
Наряду с бензильными производными получаются и бензиловые эфиры, которые разлагают омылением.



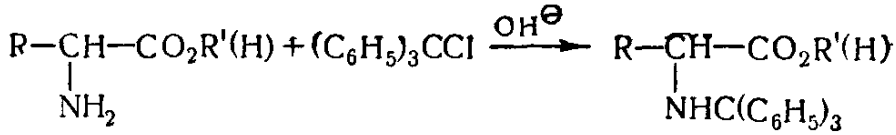
Моиобензильные производные получают взаимодействием галоидокислот с беизиламином



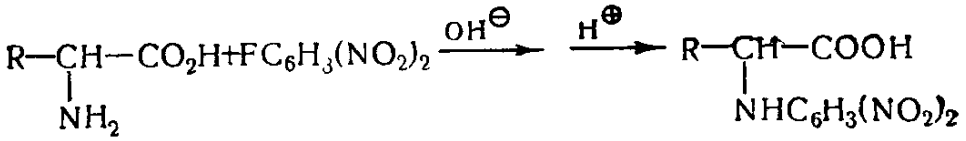
или реакцией аминокислоты с бензальдегидом с последующим восстановлением образовавшегося бензальпроизводного.



Б. Трифенилметильные (тритильные) производные



В. 2,4-динитрофенильные производные



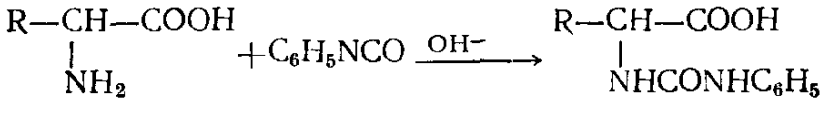
Ацильные производные аминокислот обладают кислыми свойствами и ведут себя как обычные органические кислоты. Значение различных ацильных и алкильных производных аминокислот определяется возможностью их использования при синтезе пептидов (см. стр. 488) и при определении строения молекулы белка (см. строение пептидов, стр. 510 и далее).

Лизин, гистидин и аргинин, окси- и серасодержащие аминокислоты могут образовывать моно-, ди- и триацильные и алкильные производные.

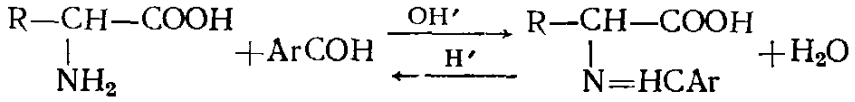
Специфическое поведение различных «защитных» групп предоставляет широкие возможности для создания различных вариантов синтеза пептидов (см. стр. 510 и далее). То же относится и к методам активации карбоксильной группы.

Динитрофенильная группа связывается с аминогруппой аминокислоты очень прочно, поэтому эти производные не применяются при синтезе пептидов, но благодаря своей устойчивости они используются при определении концевых аминных групп в белках (см. стр. 510).

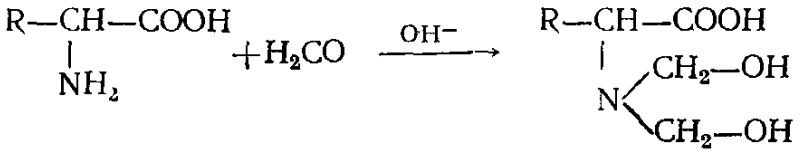
5. С фенилизоцианатом и фенилтиоизоцианатом аминокислоты образуют изоциановые и изотиоциановые производные, которые под действием кислоты циклизуются в гидантоины и тиогидантоины (см. ниже).



6 С альдегидами аминокислоты образуют так называемые шиффовы основания, которые устойчивы только в щелочной среде.



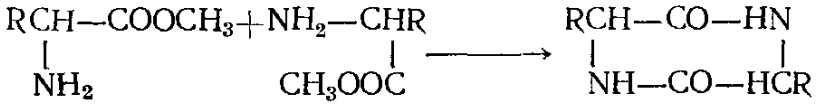
Формальдегид образует с аминокислотами моно- и диметилольные производные.



При восстановлении последних получают диметиламинокислоты, которые также можно использовать для маскировки аминогруппы в пептидах и в белках. Бензилиденовое производное аргинина, труднорастворимое в воде, используется для выделения аргинина из гидролизата белков.

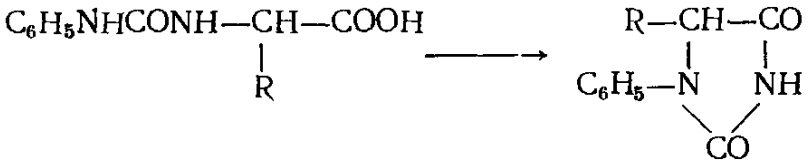
Известно большое число реакций аминокислот и их ацильных производных, в которых участвуют одновременно аминная и карбоксильная группы, в результате чего образуются гетероциклические соединения различных классов.

7. К этим реакциям следует отнести в первую очередь образование дикетопиперазинов, возникающих при нагревании аминокислот в безводном глицерине или гликоле. Еще легче эта реакция протекает с эфирами аминокислот и пептидов, особенно с метиловыми и этиловыми, которые в некоторых случаях циклизуются спонтанно.



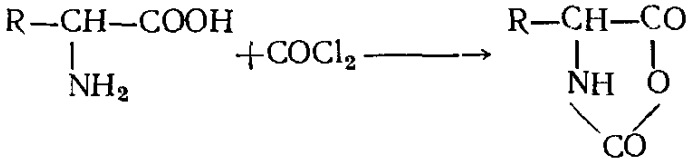
Свойства и реакции дикетопиперазинов подробно изучены Н. И. Гавриловым с сотрудниками.

8. Изоциановые и изотиоциановые производные аминокислот при нагревании с кислотами превращаются в гидантоины и тиогидантоины.

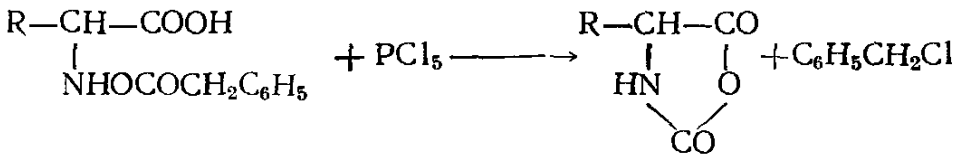


фенилгидантоин

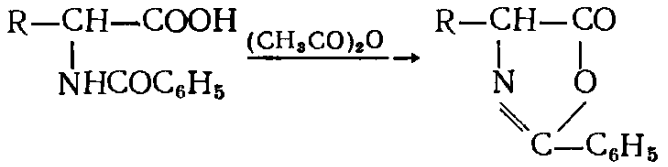
9. С фосгеном аминокислоты и их ацильные производные образуют N-карбоксиангидриды (ангидриды Лёкса).



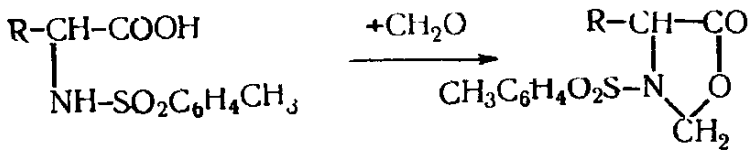
Они получаются также при действии PCl_5 или PBr_3 на карбобензоксиаминокислоты.



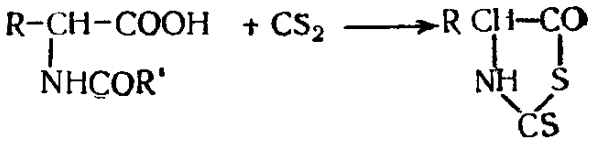
10. Ацильные производные аминокислот при нагревании с уксусным ангидридом образуют оксазолоны.



11. Тозильные производные аминокислот реагируют при нагревании с формальдегидом с образованием оксазолидонов.

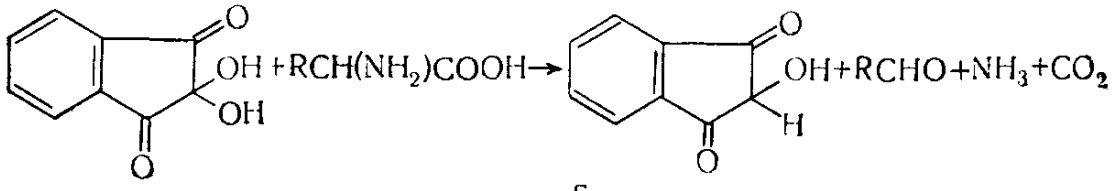


12. С сероуглеродом ациламинокислоты образуют 2-тио-5-оксазолидоны.

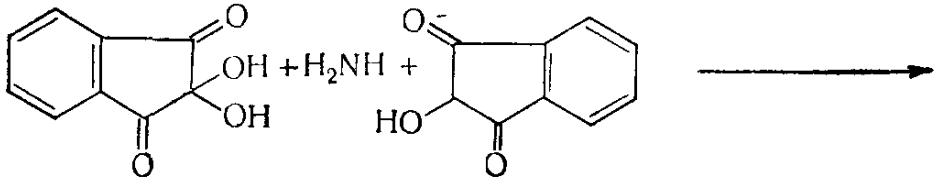


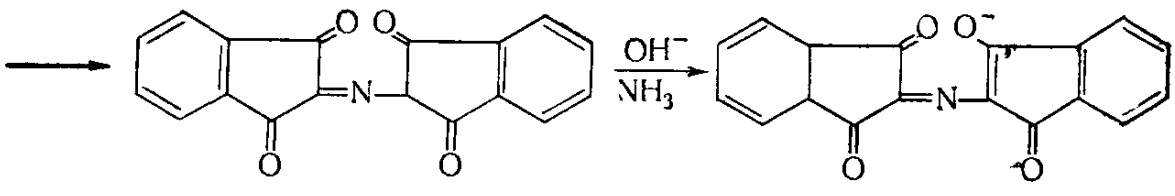
Карбоксиангидриды, оксазолоны и оксазолидоны также используют в синтезе пептидов.

Общей для всех аминокислот является реакция с нингидрином. При нагревании аминокислоты с нингидрином (трикетогидринденгидратом) происходит окислительное дезаминирование аминокислоты с одновременным декарбоксилированием и образованием альдегида, угольной кислоты и аммиака. Молекула нингидрина восстанавливается до гидриндантина. Выделившийся аммиак, нингидрин и гидриндантин образуют соединение, которое при pH=4,5 и выше превращается в енол, окрашенный в фиолетовый цвет (I).



Гидриндантин

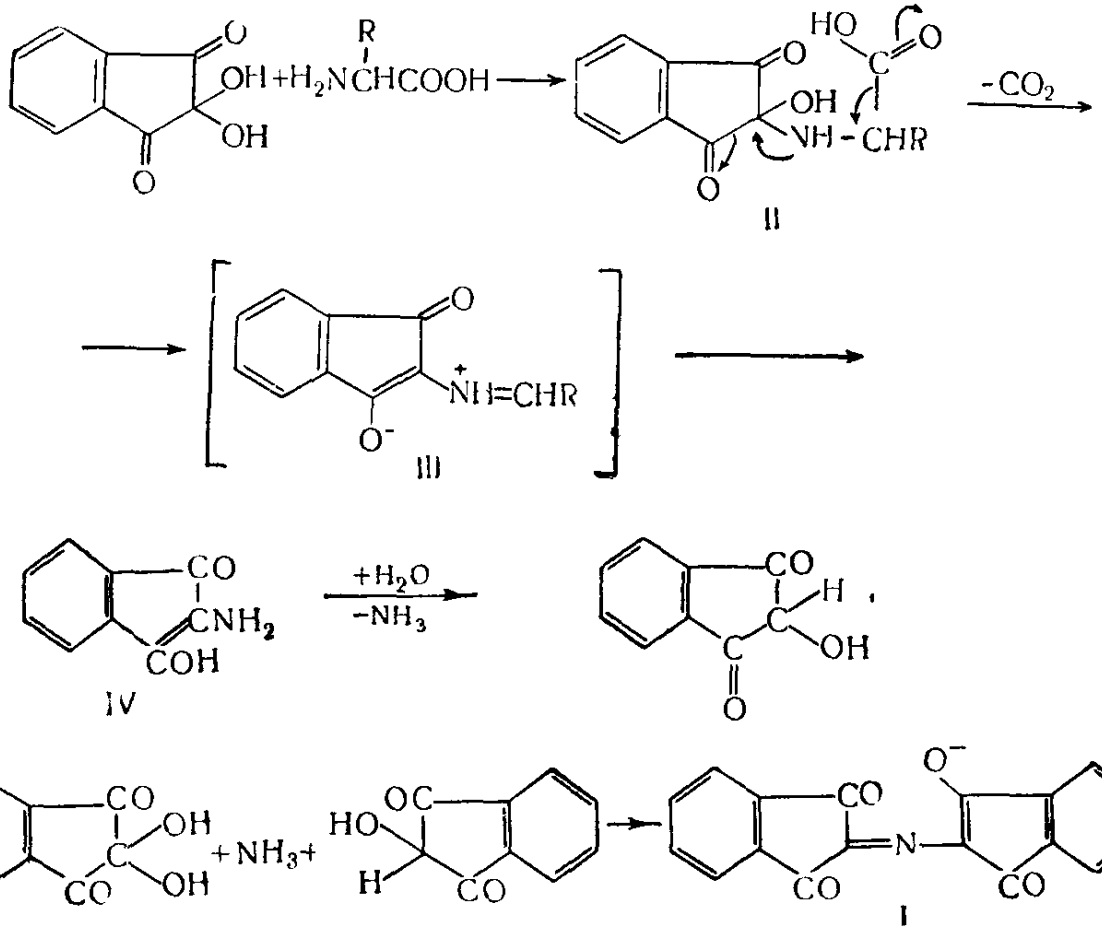




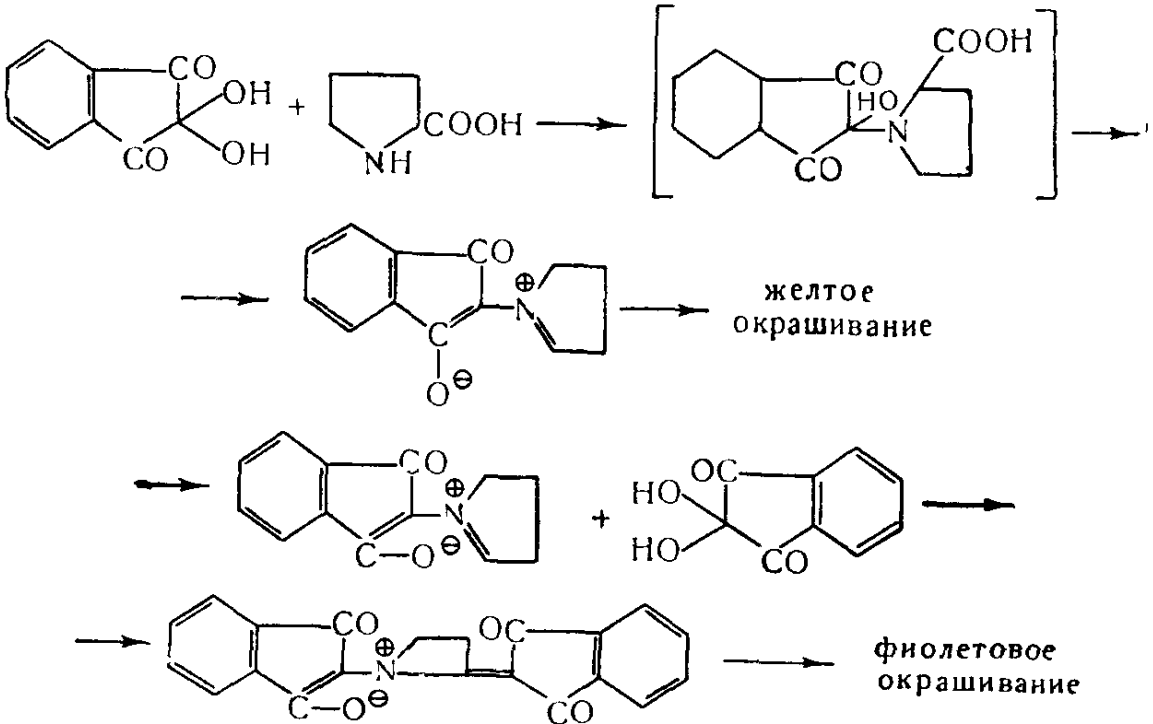
Фиолетовая Руэмана

Представленная схема была предложена в 1910—1911 гг. Руэманом, открывшим эту реакцию. С тех пор механизм реакции подвергался неоднократно пересмотру. Согласно современным представлениям, конечным продуктом реакции между аминокислотой и нингидрином является фио-

летовая Руэмана, но ее образование протекает по-иному. Нингидрин реагирует с аминокислотой по аминогруппе, давая соединение (II). Вследствие смещения электронов соединение (II) подвергается декарбоксилированию и превращается в гипотетический цвиттерион (III), который гидролизуется до амина (IV) и альдегида. Амин (IV), выделенный ранее Руэманом, также мало стоек и под действием воды распадается на аммиак и молекулу восстановленного нингидрина — гидриндантин. Из нингидрина, гидриндантина и аммиака образуется «фиолетовая Руэмана».



Реакцию с нингидрином дают не только α-, но и β- и γ-аминокислоты, и т. д. пептиды, белки, амины и аммиак. Пролин дает с нингидрином желтую окраску, которая при продолжительном нагревании переходит в красно-фиолетовую. Реакцию нингидрина с пролином изображают следующей гипотетической схемой:



Нингидринная реакция широко используется для анализа аминокислот. Реакция протекает количественно. Образующийся альдегид является характерным для каждой аминокислоты Специфическое определение альдегида позволяет установить соответствующую аминокислоту. Колориметрия окрашенного комплекса в сочетании с хроматографией и ионофорезом является сейчас одним из самых распространенных методов аминокислотного анализа белковой молекулы.

Приведенные ниже три реакции — дезаминирование, переаминирование и декарбоксилирование представляют собою процессы, протекающие в живом организме и лежащие в основе метаболизма аминокислот.

Реакция дезаминирования может проходить тремя путями.

А. Окислительное дезаминирование — распад аминокислоты на кетокислоту и аммиак

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH \xrightarrow[-H_2O]{{}^1/_2O_2} R{-}CO{-}COOH + NH_3$$

Б. Гидролитическое дезаминирование — распад аминокислоты на оксикислоту и аммиак

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + H_2O \rightarrow RCH(OH){-}COOH + NH_3$$

В. Восстановительное дезаминирование — распад аминокислоты на органическую кислоту и аммиак.

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + 2H \rightarrow R{-}CH_2{-}COOH + NH_3$$

В организме распад аминокислот идет в основном по первой схеме.

Реакция переаминирования представляет собой основной процесс новообразования аминокислот в природе. Этот процесс был открыт в 1937 г. А. Е. Браунштейном и М. Г. Крицман. При взаимодействии аминокислоты с кетокислотой (обычно с дикарбоновой) образуются новые амино- и кетокислоты.

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + HOOC{-}CO{-}CH_2{-}CH_2COOH \longrightarrow R{-}CO{-}COOH + HOOC{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}CH_2{-}CH_2{-}COOH$$

Так как в процессе этой реакции не наблюдается промежуточного образования аммиака, то, очевидно, она осуществляется путем переноса аминогруппы на кетокислоту, почему и называется реакцией переаминирования. По современным представлениям, в организме она катализируется ферментами — аминоферазами. В этой реакции участвует пиридоксальфосфат, который своей альдегидной группой принимает на себя аминную группу и передает ее кетокислоте.

Реакция декарбоксилирования. Под действием особых ферментов — декарбоксилаз в тканях животных происходит расщепление аминокислот до амина и угольной кислоты.

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH \longrightarrow R{-}CH_2NH_2 + CO_2$$

Аналогичный процесс гнилостного расщепления белка происходит под действием микроорганизмов, в огромном количестве населяющих кишеч-

ник. В результате образуются амины Некоторые из них, например, гистамин, триптамин и тирамин, возникающие из гистидина, триптофана и тирозина, обладают мощным фармакологическим действием на кровеносные сосуды и кровяное давление Другие — путресцин и кадаверин представляют собой продукты декарбоксилирования орнитина и лизина и относятся к трупным ядам.

In vitro декарбоксилирование аминокислот может происходить при нагревании аминокислот

Ниже перечисляются некоторые аминокислоты, входящие в белки, и рассматриваются их специфические свойства.

Алифатические аминокислоты

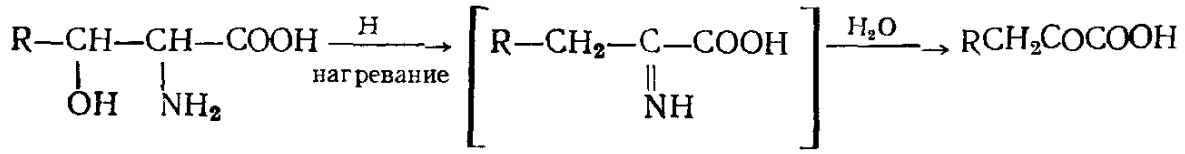
Глицин — первая выделенная из белков аминокислота Содержится в больших количествах в коллагене (~25%) и фиброине шелка (~40%). Благодаря наличию метиленовой группы способна к реакциям конденсации. Специфической реакцией на глицин является взаимодействие с орто-фталевым альдегидом с образованием окрашенного в зеленый цвет соединения N-Метильное производное глицина — саркозин CH_3NH-CH_2-COOH найден в актиномицине и карнозине.

Остальные алифатические аминокислоты, входящие в состав белков,— аланин, валин, лейцин и изолейцин не дают специфических реакций.

Оксиаминокислоты Серин — β-окси-α-аминопропионовая кислота; треонин — β-окси-α-аминомасляная кислота; оксилизин — δ-окси-α-ε-диаминокапроновая кислота.

Серин и треонин входят в состав большинства белков, оксилизин найден только в склеропротеинах, например, в коллагене. Оксигруппа серина и треонина обладает, по-видимому, специфическими свойствами. Так, в фосфопротеидах фосфорная кислота связывается с белком через гидроксильную группу этих аминокислот, а также оксигруппы тирозина и оксипролина Активность ряда ферментов — химотрипсина, трипсина, холинэстеразы связывают с оксигруппой серина

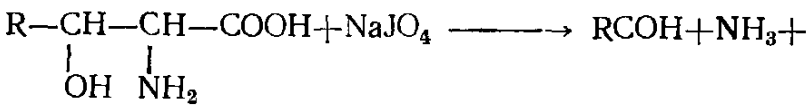
Поскольку серин и треонин являются β-оксиаминокислотами, для них характерна относительно малая устойчивость. При нагревании с кислотами и щелочами элиминируется молекула воды, а образующаяся нестойкая иминокислота распадается до кетокислоты и аммиака.



(см. также гидролиз)

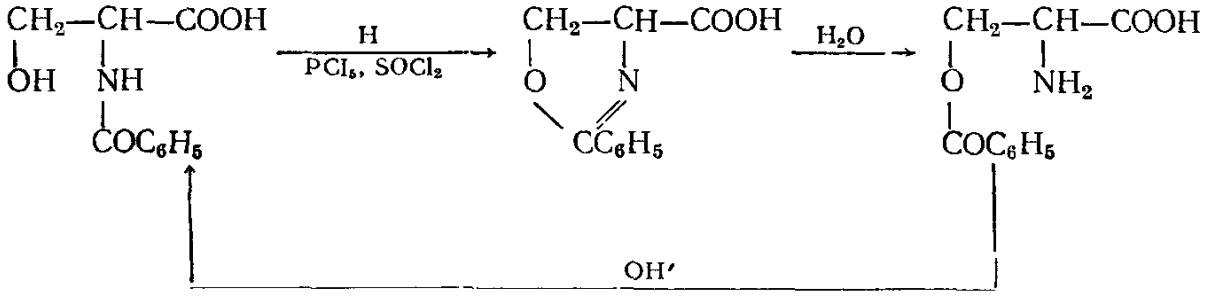
Благодаря смежному положению гидроксильной и аминной групп β-оксиаминокислоты обладают рядом интересных специфических реакций.

А. Все три оксиаминокислоты окисляются иодной кислотой с разрывом углеродного скелета

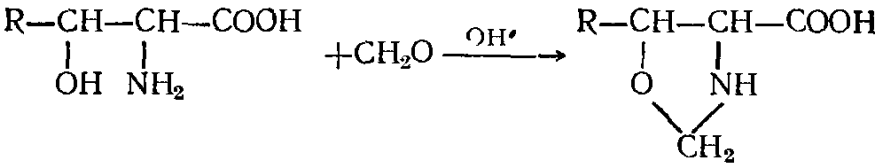


Выделяющиеся альдегид и аммиак можно обнаружить качественно и определить количественно При окислении серина образуется формальдегид, при окислении треонина — ацетальдегид.

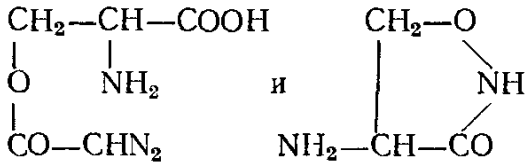
Б Ацильные производные β-оксиаминокислот обладают интересной особенностью. Бергман показал, что N-бензоилсерин при нагревании с PCl_5 или $SOCl_2$ превращается в фенилоксазолидинкарбоновую кислоту, которая в кислой среде гидролизуется до О-бензоилсерина. Последний в щелочной среде спонтанно превращается в N-бензоилсерин.



В. С формальдегидом серин и треонин реагируют окси- и аминогруппами, образуя оксазолинкарбоновые кислоты.



Своеобразные производные серина, а именно азасерин и циклосерин, найдены среди физиологически активных соединений.

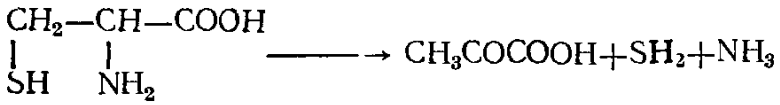


О-диазоцетилсерин (азасерии) 4-амино-3-изоксалидон (циклосерин или оксамицин)

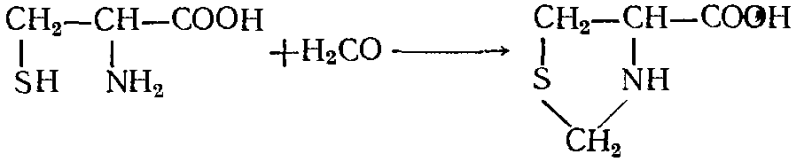
Н. К. Кочетков с сотрудниками разработали метод синтеза циклосерина.

Серасодержащие аминокислоты: цистеин, цистин и метионин. Эти аминокислоты содержатся почти во всех белках. Особенно большое количество цистина содержится в кератинах — волосах, шерсти и т. д.

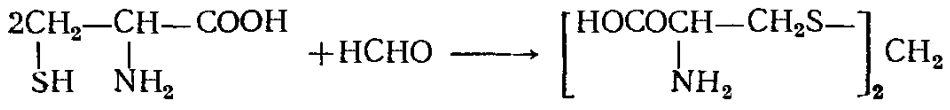
Цистеин — β-тио-α-аминопропионовая кислота (и в еще большей степени цистин) подобно β-оксиаминокислотам неустойчива, особенно по отношению к щелочам, и распадается с элиминированием H_2S и образованием пировиноградной кислоты и аммиака.



С формальдегидом образует тиооксазолидинкарбоновую кислоту.



При избытке цистеина при этом образуется дьенколевая кислота:

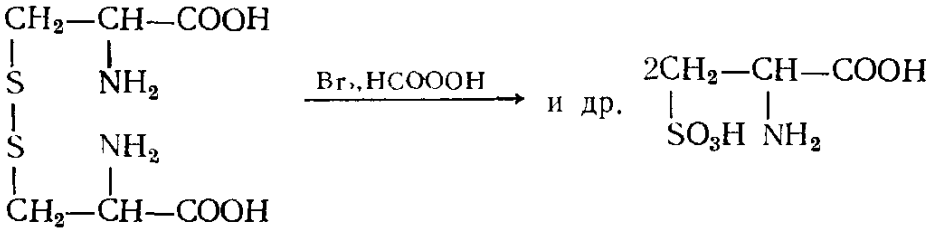


Тиольная группа, подобно оксигруппе в оксиаминокислотах, легко ацилируется и алкилируется. Но образующиеся тиоэфирные (S-ацильные) производные малоустойчивы, особенно по отношению к щелочам. Более прочными являются S-алкильные соединения цистеина. Особенно важны S-бензильные производные, которые широко применяют в качестве защитной группы при синтезе пептидов.

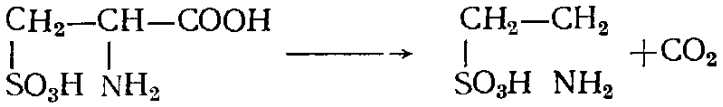
Цистеин легко образует меркаптиды с ионами тяжелых металлов, например, ртути и меди, которые применяют для определения цистеина в белковых гидролизатах.

Цистеин очень легко дегидрируется даже кислородом воздуха и превращается в цистин. Большое число качественных реакций, характерных для цистеина (реакция с порфириндином, нитропруссидом или щелочью и ацетатом свинца) специфичны для тиольной группы.

Цистин. Дисульфидная группа цистина легко восстанавливается до цистеина (особенно каталитически), а также окисляется. Характер окисления зависит от выбранных окислителей. Особое значение имеет действие брома или надмуравьиной кислоты, окисляющее S—S мостик до сульфогруппы с образованием цистеиновой кислоты.

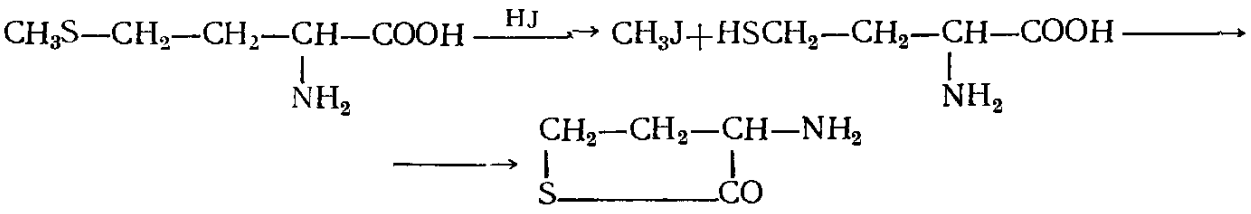


При более сильном окислении цистеиновая кислота декарбоксилируется до таурина.



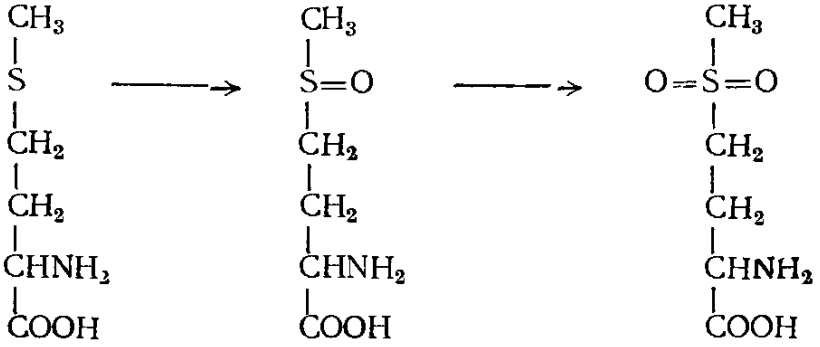
Метионин (γ-метилтио-α-аминомасляная кислота) был найден в белках только в 1922 г. В организме метионин является переносчиком-поставщиком метильной группы.

Характерным для метионина является элиминирование метильной группы под действием иодистоводородной кислоты или натрия в жидком аммиаке с образованием гомоцистеина.

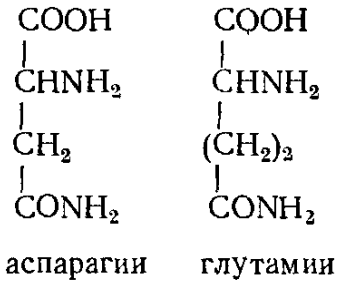


γ-тиолактон гомоцистеина.

Многие окислители, как например перекись водорода, надмуравьиная кислота и другие превращают метионин в сульфоксид, а затем в сульфон.



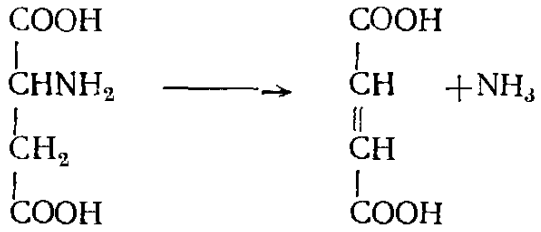
Дикарбоновые аминокислоты. Аспарагиновая и глутаминовая кислоты содержатся не только в белках, но в виде своих амидов — глутамина и аспарагина — широко распространены в природе.



аспарагин глутамин

Роль аспарагина и глутамина в растениях заключается в обезвреживании аммиака, образующегося при дезаминировании аминокислот. Накапливающийся в семенах аспарагин используется затем при прорастании для синтеза белков в молодых тканях ростка. Физиологическая роль обоих амидов была установлена Д. Н. Прянишниковым. Оба амида найдены также в белках. Присутствием этих амидов объясняется образование аммиака во время гидролиза белков.

Аспарагиновая кислота, как β-аминокислота сравнительно легко дезаминируется при нагревании с образованием фумаровой кислоты.

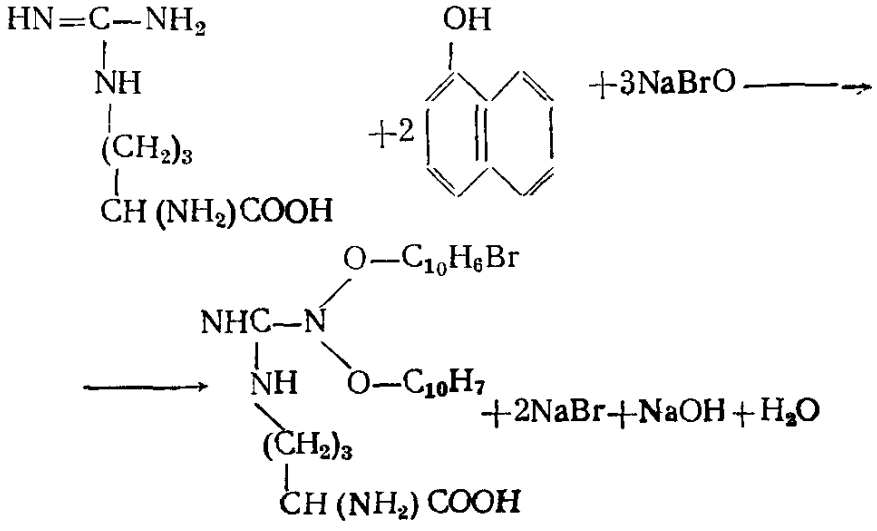


Глутаминовая кислота — γ-аминоглутаровая — при нагревании превращается в пирролидонкарбоновую кислоту.



Основные аминокислоты. В белках встречается только одна диаминокислота — лизин (α, ε-диаминокапроновая кислота). В продуктах щелочного гидролиза белков, а также в ряде антибиотиков (грамицидин) найден еще орнитин — α, δ-диаминовалериановая кислота. В гидролизатах она образуется из аргинина. Обе аминокислоты не обладают специфическими реакциями.

Аргинин — δ-гуанидино-α-амино-валериановая кислота — неустойчив к щелочам и распадается в слабых щелочных растворах до цитруллина, а в концентрированных до орнитина (см. гидролиз). Гуанидинная группа взаимодействует с галоидированным α-нафтолом с образованием окрашенных в малиновый цвет соединений (реакция Сакагучи).



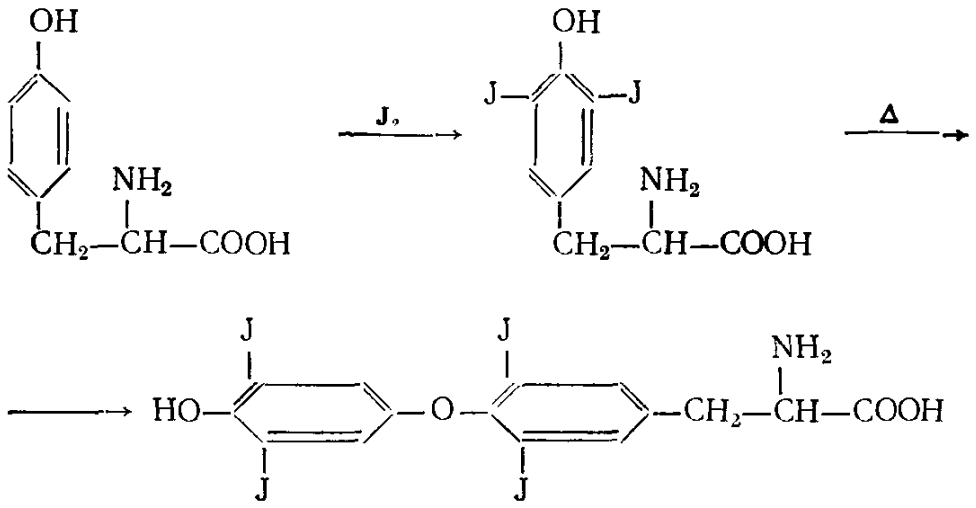
Характерным для аргинина является также образование труднорастворимых солей, например, серебряных, с фосфорновольфрамовой и с флавиановой (2,4-динитро-1-нафтол-7-сульфо-кислота) кислотами. Флавиановую кислоту используют для выделения аргинина из гидролизатов.

Ароматические аминокислоты — фенилаланин и тирозин

Обе аминокислоты легко обнаруживаются действием концентрированной азотной кислоты по появлению ярко-желтой окраски (ксантопротеиновая реакция).

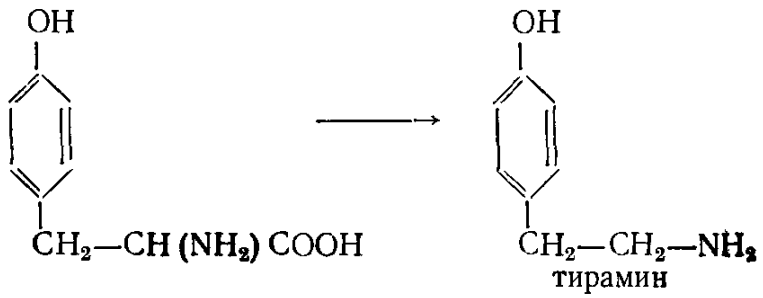
Тирозин, содержащий фенольный остаток, вступает в реакцию азосочетания и диазотируется. Однако самой специфической реакцией на тирозин является малиновое окрашивание при взаимодействии со смесью азотнокислой и азотистокислой ртути (реакция Миллона). Эта реакция используется и для количественного определения тирозина. Тирозин подобно фенолам легко окисляется, иодируется и бромируется.

3,5-дииодтирозин является предшественником гормона щитовидной железы тироксина. Последний образуется в организме из 3,5-дииодтирозина под действием ферментов.



тироксин

При декарбоксилировании тирозин превращается в физиологически активный амин тирамин.



тирамин

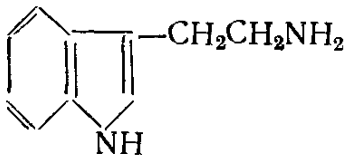
Гетероциклические аминокислоты: триптофан, пролин, оксипролин и гистидин

Триптофан — β-индолил-аланин — относится к числу незаменимых аминокислот. Хотя содержание этого вещества в белках невелико, но отсутствие его в пище приводит к гибели животного.

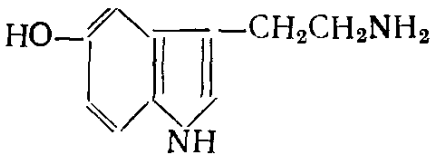
Наличие индольного кольца в молекуле триптофана обусловливает ряд специфических реакций. Триптофан легко окисляется при нагревании с кислотами и очень легко конденсируется с альдегидами в кислой среде, образуя окрашенные продукты (см. гидролиз) Последние исполь-

зуют для качественного и количественного определения триптофана. Чаще всего пользуются диметиламинобензальдегидом.

Триптофан является предшественником ряда физиологически активных веществ. При декарбоксилировании он превращается в триптамин (см. выше), который окисляется до 5-окситриптамина — серотонина.



триптамин



серотонин

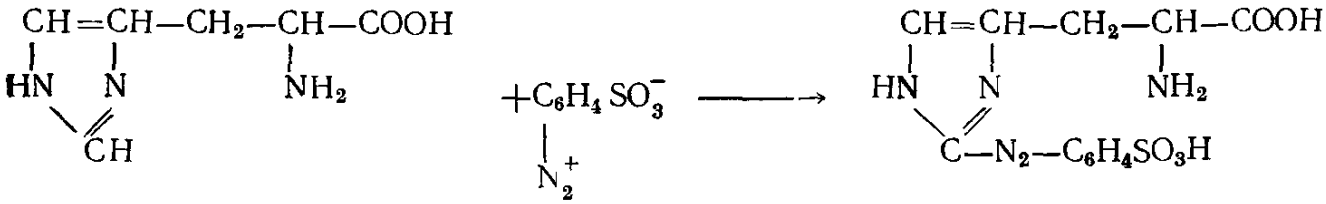
В высших растениях триптофан превращается в индолилуксусную кислоту — гетероауксин,— которая является одним из стимуляторов роста растений.



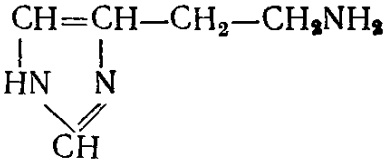
триптофан — индолилуксусная кислота

Гистидин — α-имидазолил-α-аминопропионовая кислота — представляет собой третью наиболее слабую основную аминокислоту, входящую в состав белков. Подобно лизину и аргинину, он дает нерастворимые соли с рядом кислот и металлов, например, с фосфорно-вольфрамовой кислотой и с ионом серебра.

Наличие имидазольного кольца обусловливает ряд специфических реакций гистидина. Так, с диазобензолсульфокислотой гистидин дает продукт азосочетания, окрашенный в кроваво-красный цвет (реакция Паули). Эта реакция используется для качественного и количественного определения гистидина.



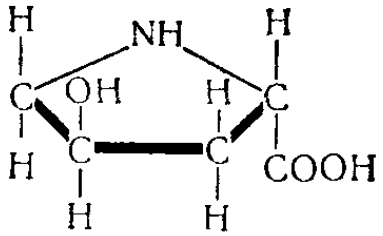
При декарбоксилировании гистидина образуется гистамин.



Все три основные аминокислоты — аргинин, гистидин, и лизин содержатся в значительных количествах в особой группе белков — протаминах, отличающихся от других белков тем, что они являются сильными основаниями.

Пролин и *оксипролин* относятся к аминокислотам пиррольного ряда. Они отличаются от всех других аминокислот тем, что не содержат первичной аминогруппы. С нингидрином они дают не фиолетовое, а желтое окрашивание. Характерной для них цветной реакцией является реакция с изатином — появление синего окрашивания у пролина и зеленого у оксипролина. Пролин — единственная из аминокислот, входящих в бел-

ки, которая легко растворяется в спирте. Оксипролин содержит два асимметрических атома углерода. Недавно было доказано пространственное строение природного оксипролина. Как оказалось, окси- и карбоксильная группы находятся в транс-положении.



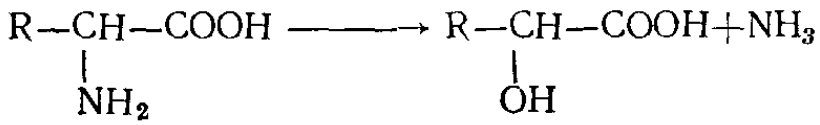
Оксипролин содержится только в склеропротеинах и кератинах. Для его выделения Бергман предложил воспользоваться способностью пролина и оксипролина давать трудно растворимые соли с родаиилатами. Пролин осаждается анилинроданилатом, оксипролин — аммонийроданилатом, который называется солью Рейнеке.

$(NH_2C_6H_5)_2$ $Cr(SCN)_4$	$[(NH_3)_2Cr(SCN)_4]NH_4$
анилиироданилат	аммонийрейнекат

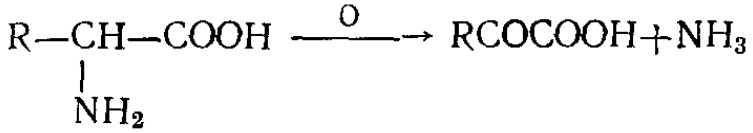
Глава 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ

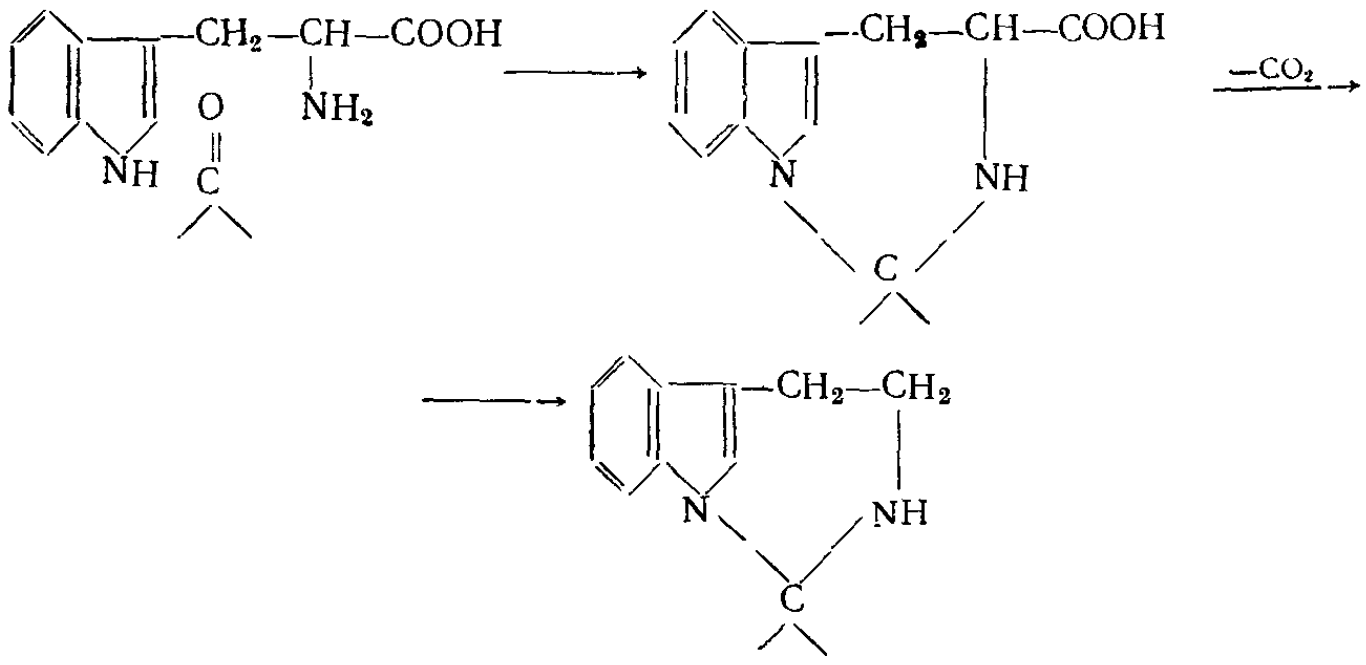
Первой задачей при определении строения природных полипептидов и белков является установление их аминокислотного состава. Основным методом для этого и сейчас служит гидролиз. Его можно проводить тремя способами: обработкой белка или полипептида кислотой, щелочью или ферментами. Из этих трех возможных методов самым распространенным является кислотный гидролиз Выбор последнего обусловлен тем, что кислоты по сравнению со щелочами вызывают меньшее число побочных процессов, а в сравнении с ферментами проводят гидролиз более полно. Чаще всего пользуются 8*N* серной кислотой или 20%-ной соляной кислотой. В процессе кислотного гидролиза ряд аминокислот подвергается вторичным реакциям. Так, некоторые из аминокислот дезаминируются, распадаясь до оксикислоты и аммиака (гидролитическое дезаминирование)



или образуют кетокислоту и аммиак (окислительное дезаминирование).



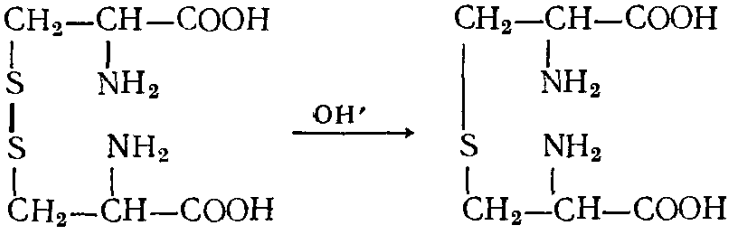
Полностью разрушается триптофан (и частично тирозин), образуя окрашенные в темно-коричневый цвет вещества, получившие общее название гуминов или меланинов. Недавно было показано, что триптофан реагирует при этом аминной группой и азотом индольного кольца с карбонильной группой альдегида или кетокислоты с последующим отщеплением углекислоты и дегидрированием, образуя так называемые граманы.



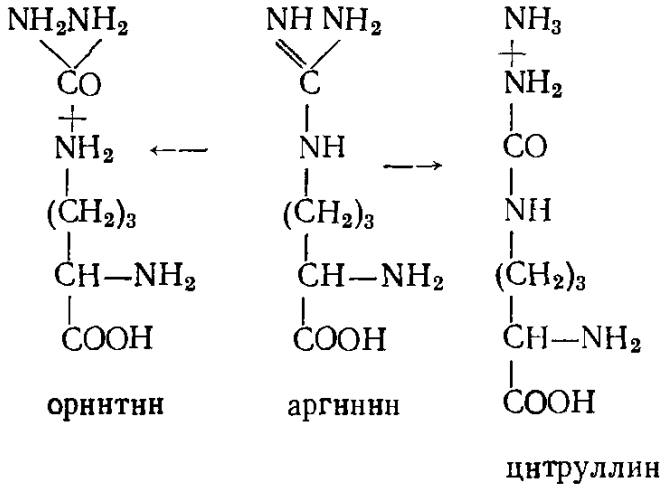
В основном такое разложение обусловливают углеводы, примеси металлов и образующиеся побочно альдегиды. Частично при кислотном гидролизе разрушается и тирозин.

Щелочной гидролиз применяется значительно реже, так как он вызывает рацемизацию аминокислот, а также интенсивное разложение некоторых из них.

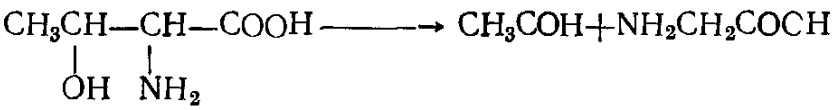
В условиях щелочного гидролиза разрушаются цистин и аргинин и в значительной степени серин и треонин. Цистин в мягких условиях превращается в лантионин.



Аргинин образует в слабых растворах щелочей цитруллин, в концентрированных — орнитин.



Оксиаминокислоты и цистеин расщепляются до аммиака и кетокислоты (см. выше). Наряду с этим наблюдается также реакция альдольного разуплотнения, при которой разрывается С—С связь с образованием альдегида и глицина. Из серина образуются формальдегид и глицин, из треонина — ацетальдегид и глицин.



Все эти процессы еще более свойственны пептидам, чем самим аминокислотам. Такое поведение аминокислот во время гидролиза имеет исключительное значение, поскольку в результате распада наблюдается не только разложение аминокислоты, но и превращение ее в другую. Если при этом образуется аминокислота, обычно не обнаруживаемая в белках (например, орнитин или лантионин), то легко установить, что она является артефактом. Более серьезным недостатком метода является образование аминокислот, входящих в состав белка, например, глицина, так как оно может привести к ошибочным заключениям.

Существенным моментом при проведении полного гидролиза белков является определение его конца. Обычно конец гидролиза устанавливают по прекращению нарастания аминного азота (определяемого методом ван Сляйка) и выражают его в процентах от количества общего азота. Эта величина не достигает 100%, если белок содержит аминокислоты, в которых азот находится не только в виде α-аминного, например, содержит аргинин, гистидин, пролин и т. д.

Гидролиз белков ферментами пищеварительного тракта применяется главным образом для проведения неполного ступенчатого расщепления. Полученный тем или иным способом гидролизат содержит смесь аминокислот и аммиак, образовавшийся в результате расщепления аспарагина и глутамина и частичного дезаминирования пептидов и аминокислот. После предварительного удаления основной массы кислоты или щелочи гидролизат подвергают фракционному разделению на аминокислоты. В течение первых двух десятилетий текущего столетия аминокислоты разделяли в виде их эфиров, которые подвергали перегонке в вакууме (метод Э. Фишера). Позднее этот метод потерял свое значение из-за сложности выполнения и необходимости применения большого количества белка. В настоящее время благодаря появлению метода газовой хроматографии, применение эфиров аминокислот, возможно, вновь окажется интересным.

Разработанные впоследствии колориметрические методы определения аминокислот сильно продвинули наши сведения об аминокислотном составе белков. Но и для осуществления этими методами требовалось много времени и значительное количество вещества.

Только благодаря появившимся в начале 40-х годов новым методам, вопрос об определении аминокислотного состава получил свое полное и окончательное разрешение. В настоящее время основными способами такого определения являются следующие: 1) распределительная хроматография; 2) ионофорез; 3) электрохроматография; 4) ионообменная хроматография и 5) противоточное распределение. Последним методом пользуются главным образом при разделении пептидов. Метод распределительной хроматографии на бумаге, разработанный в 1941 г. Гордоном, Мартином и Синджем, положил начало новой эры в развитии химии белка.

Принцип распределительной хроматографии основан на различии в коэффициентах распределения аминокислот между водой и органическим растворителем. Особенность метода распределительной хроматографии на бумаге по сравнению с обычной экстракцией аминокислот из водного раствора органическим растворителем заключается в том, что одну из фаз, чаще всего водную, помещают на какой-нибудь инертный твердый носитель, а органический растворитель — подвижная фаза,— проходя через первую, извлекает и распределяет аминокислоты на бумаге в соответствии с их коэффициентами распределения. Положение аминокислот на бумаге определяют по отношению скорости движения аминокислоты к скорости движения фронта растворителя и обозначают R_f. Величина R_f зависит в первую очередь от строения аминокислоты, затем от системы растворителей, pH среды и сорта бумаги. Чем полярнее аминокислота, тем меньше она растворяется в органических растворителях и тем меньше ее R_f. Увеличение длины углеродной цепи повышает R_f. Введение в молекулу полярных групп, например, гидроксильной, аминной или карбоксильной понижает R_f. Так, R_f фенилаланина в системе фенол/вода=0,85, а тирозина 0,51. Другие примеры изменения R_f в зависимости от строения аминокислоты представлены на рис. 3 и 4. Подбирая соответствующие смеси растворителей, можно провести достаточно тонкое разделение аминокислот. Наиболее часто пользуются для такого разделения системами: вода — фенол — аммиак; вода — бутанол — уксусная кислота; бутанол — аммиак — коллидин и т. д. Разделение можно проводить на одномерной или двумерной хроматограммах. Можно пользоваться также различными типами распределительной хроматографии на бумаге — нисходящей, восходящей и радиальной. Величины R_f для каждой из систем растворителей оказываются постоянными при соблюдении

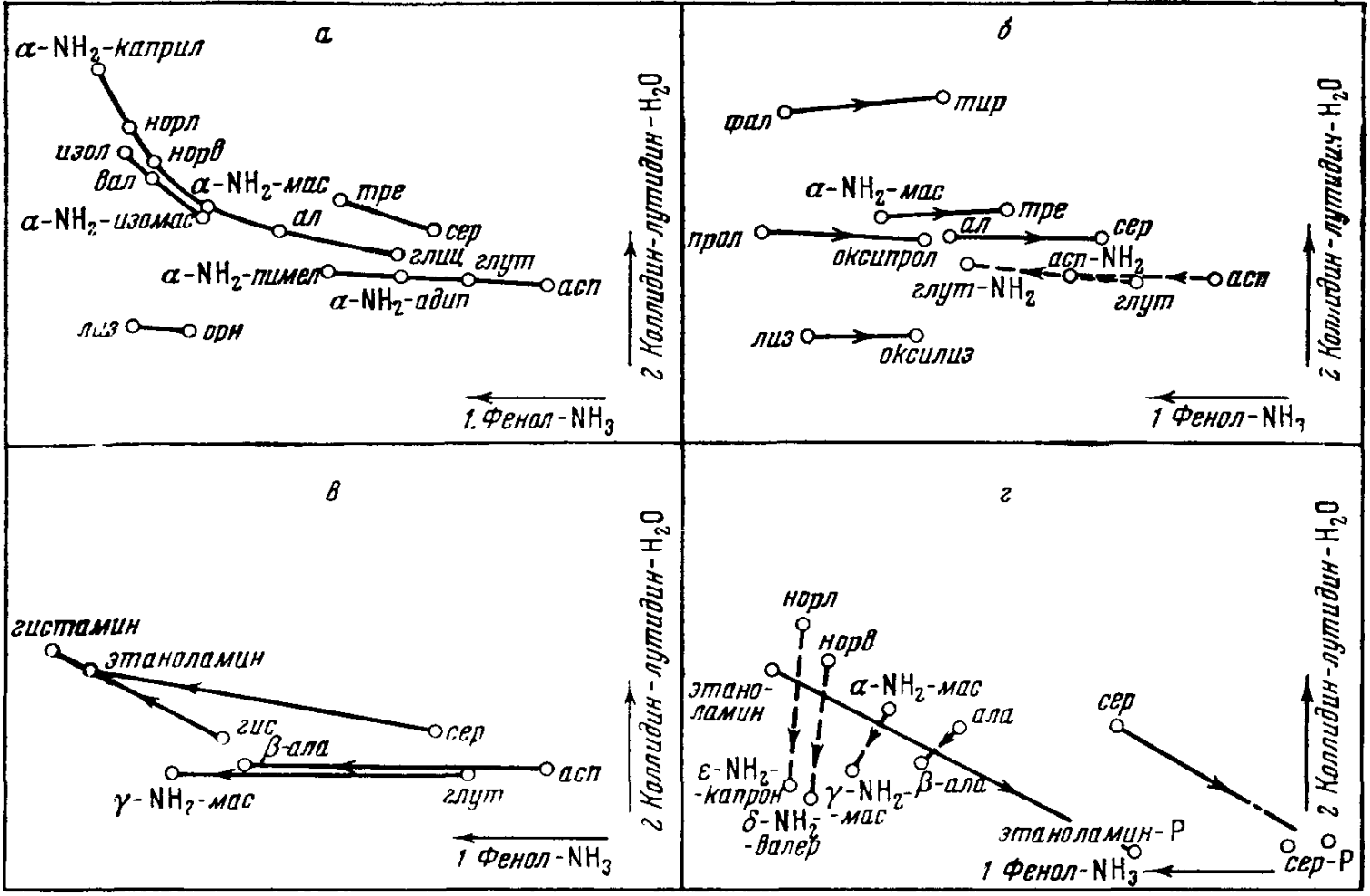


Рис. 3. Зависимость распределения аминокислот на двумерной хроматограмме от их строения.

а — гомологический ряд, *б* — введение ОН-группы; — — — — амидирование, *в* — декарбоксилирование, *г* — фосфорилирование; — -- — — перемещение NH_2.

постоянных условий хроматографирования. На рис. 4 приводится карта распределения аминокислот при двумерной хроматограмме. Проявление аминокислот проводят чаще всего обработкой хроматограммы раствором нингидрина. Большинство аминокислот окрашивается при этом в фиолетовый цвет разного оттенка. Пролин образует пятно желтого цвета. Аминокислоты, содержащие другие группы, кроме аминной и карбоксильной, можно обнаружить пользуясь специфическими красочными реакциями, описанными ранее. Количественное определение аминокислот можно проводить непосредственно на бумаге и определять содержание аминокислоты по интенсивности окраски, или фотометрии пятна. Лучшие результаты получают вымыванием аминокислоты и колориметрированием полученного раствора после обработки его нингидрином. Для этого проводят несколько хроматографических разделений смеси аминокислот, одну из хроматограмм проявляют, определяя таким путем положение аминокислот на хроматограмме. Можно также просматривать некоторые аминокислоты в ультрафиолетовом свете.

Важное изменение в хроматографирование аминокислот внесли Штейн и Мур, которые предложили проводить разделение аминокислот на колонке, заполненной бумажным порошком или крахмалом. Через колонку пропускают сначала раствор аминокислот, а затем разделяют их вымыванием смесью растворителей, собирая раствор с помощью специального автоматического коллектора в серию пробирок. Затем колориметрируют растворы с нингидрином. Этот метод оказался особенно удобным для тонкого разделения аминокислот, а

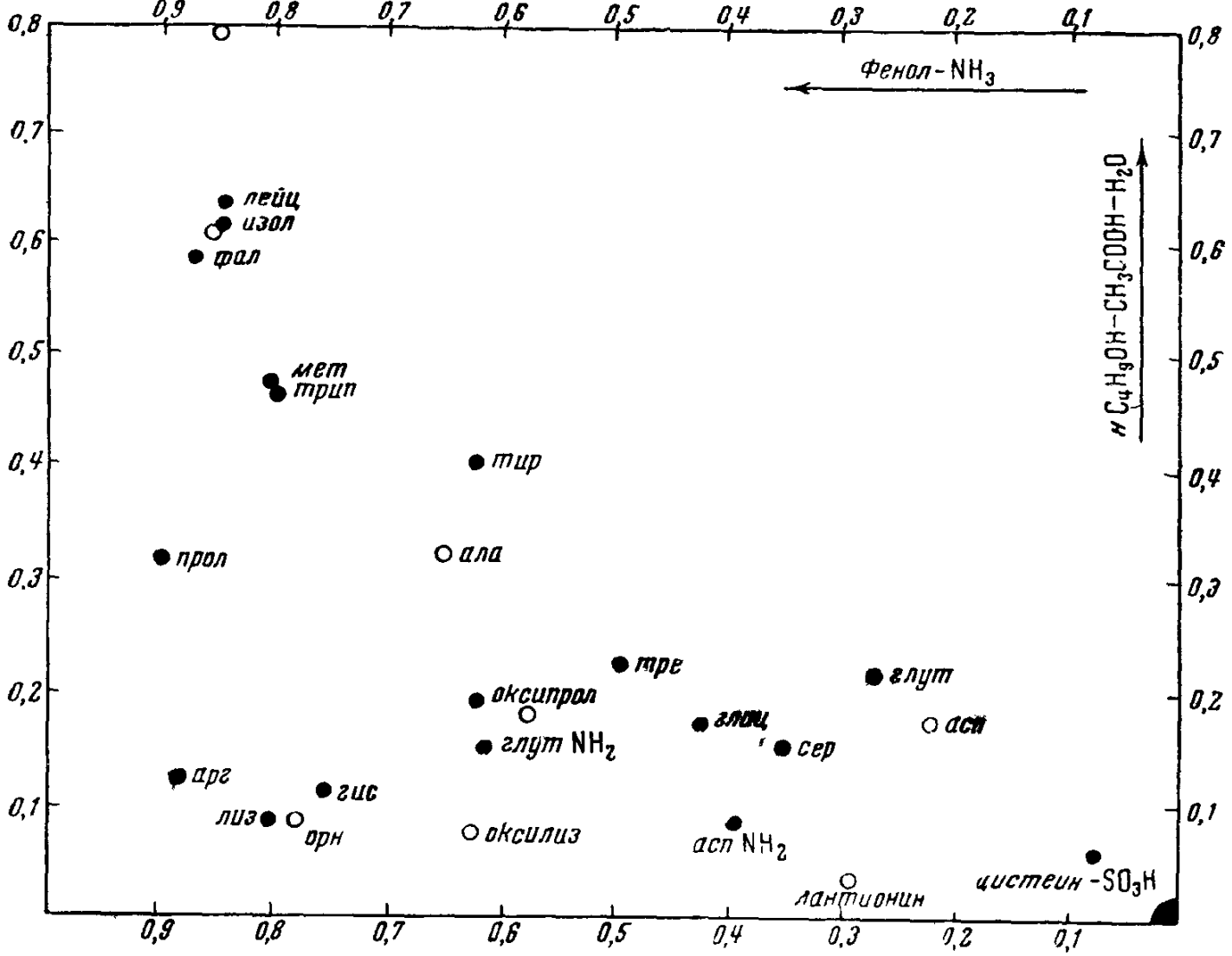


Рис 4. Карта распределения аминокислот на двумерной хроматограмме

также для разделения аминокислот в препаративных целях. Особенно продуктивно проведение такого определения, если воспользоваться для этого ионообменными смолами.

Разделение аминокислот на ионообменниках основано на способности аминокислот образовывать соли с кислотами и щелочами. Подбирая соответствующие катиониты или аниониты, можно быстро и с успехом разделить гидролизат белка, пользуясь для этого 2,5—3,5 *мг* белка. Ионообменную хроматографию хорошо сочетать с элюционным или вытеснительным анализом. Мур и Штейн пользуются для этого катионитной смолой сульфополистирольного типа Дауэкс-50, через колонку которого пропускают аминокислоты; последние вымывают затем соответствующими буферными растворами. Для разделения достаточно 3 *мг* аминокислот.

Ионофоретический метод разделения аминокислот также базируется на их амфотерности. При различных pH раствора аминокислоты движутся к катоду или аноду, в соответствии с их изоэлектрическими точками и электрофоретической подвижностью Так при pH, близком к 6, кислые аминокислоты направляются к аноду, основные к катоду, а нейтральные остаются неподвижными. Ионофорез также можно проводить в растворе или на твердом носителе. Первый метод позволяет разделять аминокислоты только на сравнительно крупные фракции — кислую, основную и нейтральную. Второй метод, так же как и распределительная хроматография на бумаге, дает возможность разделять любые аминокислоты. В качестве твердого носителя применялись силикагель, крахмал и бумага. Из них самым простым оказался ионо-

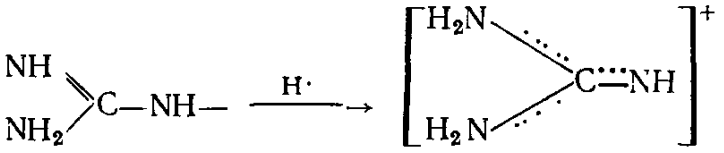
форез на бумаге. Все же при сложных смесях иногда оказывается целесообразным предварительно разделить исходную смесь на ряд фракций. Недостатком метода ионофореза являются процессы диффузии и электроэндосмоса, благодаря которым зоны разделения оказываются менее четкими. Применение высоковольтного ионофореза с напряжением на электродах от 1500 до 3000 *в* ускоряет процесс. Особенно широко используется он при разделении пептидов. В последнее время разделение проводят еще более тонко, сочетая одновременно распределительную хроматографию и ионофорез.

В некоторых случаях полезно бывает перевести аминокислоты в какие-либо производные, которые легче разделяются или легче затем определяются, например в динитрофенильные производные, окрашенные в желтый цвет, или производные, содержащие радиоактивный атом, чаще всего иод или серу.

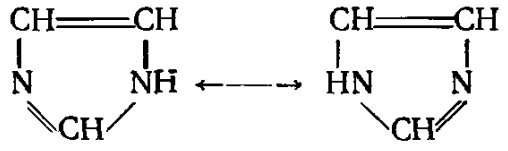
Благодаря этим новым методам, разработанным очень детально, определение аминокислотного состава белка не является уже трудноразрешимой проблемой.

Определение точного аминокислотного состава является первичным обязательным моментом при изучении строения молекулы белка. Без такого определения прежде всего оказалось бы невозможным установление последовательности аминокислотных остатков в пептидной цепи. Помимо этого изучение аминокислотного состава белков позволяет сделать некоторые заключения о реакционной способности белковой молекулы. В табл. 5 представлен аминокислотный состав ряда белков. В графе А указано содержание аминокислот в %, в графе В — в граммолях на 10^5 *г* белка. Такой подсчет позволяет сопоставлять аминокислотный состав различных белков. В зависимости от содержания в белках аминокислот с различными функциональными группами (кроме α-COOH и ε-NH_2), в них могут преобладать кислые или основные, полярные или липотропные группы.

К основным — катионным группам относятся конечные α-аминогруппы, ε-аминогруппа лизина, гуанидинная группа аргинина и имидазольное кольцо гистидина. Наиболее сильным основанием из этих трех аминокислот является аргинин. Константа диссоциации гуанидинной группы pK 12, 18, что вызвано образованием гуанидиний-иона, в котором положительный заряд распределен между всеми тремя атомами азота



Более слабым основанием является лизин, pK′ ε-аминной группы — 10,53. Самое слабое основание представляет собою гистидин, pK′ имидазольного кольца равно 6,00. Имидазольное кольцо может образовывать мезомерные формы.



К кислым анионным группам относятся концевые COOH-группы пептидных цепей и β- и γ-карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот, не связанные в амидах. pK (β-COOH) 3,65. pK (γ-COOH) 4,25.

Таблица 5

Аминокислотный состав некоторых белков

Аминокислота	Сальмин		Гистон тимуса теленка		Миоглобин лошади		Гемоглобин		Казеин		Миозин кролика		Пепсин		Коллаген		Эдестин		Глиадин		Зеин	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	В	А	В	А	В	А	Б	А	В	А	В	А	В	А	В
Аланин	1,12	1	6,94	12	7,95	15	7,40	54	3,20	36	6,5	73,0	—	—	9,5	106,9	4,31	40	2,13	24	10,52	118
Глицин	2,95	3	5,07	9	5,85	13	5,60	48	2,00	26,7	1,9	25,3	6,4	29	27,2	363	—	—	—	—	—	—
Валин	3,14	2	3,22	4	4,09	6	9,10	50	7,20	61,4	2,6	22,1	7,1	21	3,4	29,1	6,5	56	2,66	23	3,98	34
Лейцин	0	0	5,21	6	16,80	22	15,40	75	9,2	116,9	15,6	119,0	10,4	27	5,6	42,8	7,5	58	11,9	91	21,1	164
Изолейцин	1,64	1	20,05	24		—	0	0	6,1				10,8	28			4,7	36			5,0	38
Пролин	5,80	4	4,04	5	3,34	5	3,90	22	10,6	92,2	1,9	16,7	5,0	15	15,1	131,3	4,25	36	13,55	116	10,53	91
Фенилаланин	0		4,08	4	5,09	5	7,70	30	5,0	30,3	4,3	26,2	6,4	13	2,5	15,2	5,45	32	6,44	39	7,3	44
Тирозин	0		3,30	3	2,40	2	3,03	11	6,3	34,8	3,4	18,8	8,5	16	1,0	5,5	4,25	24	3,20	18	5,25	29
Триптофан	0		0		2,34	2	1,70	5	1,2	5,89	0,8	3,9	2,4	4	0	0	1,48	7	6,60	3	—	—
Серин	9,1	7	5,33	7	3,46	6	5,80	35	6,3	60,0	4,38	41,2	12,2	40	3,37	32,1	6,30	60	4,90	47	7,05	67
Треонин	0		6,82	6	4,56	7	4,36	24	4,9	41,1	5,1	42,9	9,6	28	2,28	19,2	3,85	32	9,10	18	3,45	29
Цистин/2	0		0		0	0	0,45	2,5	0,34	2,84	1,40	11,7	1,64	4	0	0	0,93	8	2,58	21	0,83	7
Цистеин	0		0		0	0	0,56	3	0	—	—	—	0,5	2	0	0	0,5	4				
Метионин	0		0		1,71	2	1,0	4,5	2,8	18,8	3,4	22,8	1,7	4	0,8	5,4	2,4	16	1,69	11	2,41	16
Аргинин	85,2	40	17,4	16	2,2	2	3,65	14	4,1	23,6	7,36	42,3	1,0	2	8,59	49,4	16,7	96	2,74	16	1,71	10
Гистидин	0		2,69	2	8,5	9	8,71	36	3,1	20,0	2,41	15,5	0,9	2	0,74	4,8	2,5	16	1,82	12	1,32	9
Лизин	0		10,23	11	15,5	18	8,51	38	8,2	56,1	11,92	81,4	0,9	2	4,47	30,7	2,4	16	0,65	4	—	0
Аспарагиновая кислота	0		5,71	7	8,2	10	10,60	51	7,1	53,4	8,9	66,9	16,0	41	6,3	47,3	120	90	1,34	10	4,61	35
Глутаминовая кислота	0		4,30	5	16,48	19	8,50	38	22,4	152,3	22,1	150,3	11,9	28	11,3	77,0	20,7	141	45,7	311	26,9	183
Оксипролин	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	14,0	107	—	—				
Оксилизин	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,1	6,8	—	—				
Молекулярный вес (химический)	8000		15500		16000																	
Молекулярный вес (физический)			15500		17000						850000		341000									

Примечание А — содержание аминокислот. в %. Б — число аминокислотных остатков в молекуле белка. В — число аминокислотных остатков на 10^5 г белка.

Таблица 6

Распределение функциональных групп в белках

(число групп в 10^5 *г* белка)

Белок	Катионы	Свободные анионы	Сумма ионов	Амидные группы	Гидроксильные группы	Фенольные группы	SH-группы	Индольные группы	Липотропные группы	Глицин	Цистин/2
Зеин	18,4	5,7	24,1	212,0	96,1	29,0	—	0,9	503,2	—	6,9
Глиадин	31,95	0	31,95	321,0	64,4	17,7	—	2,9	303,9	—	21
Эдастин	10,0	27,0	37,0	—	19,25	7,75	—	—	322,8	37,6	5,0
Фиброин шелка	13,3	35,4	48,7	0	167,7	70,7	0	0	407,0	581	0
Химотрипсиноген	76,7	23,0	99,7	109,4	193,9	14,9	10,8	27,3	321,8	84,0	27,5
Пепсин	17,7	107,4	125,1	94,0	196,6	46,9	4,2	11,8	316,2	85,4	13,7
Инсулин	68,4	78,5	146,9	99,5	67,3	69,0	0	0	307,2	57,4	104
Кератин шерсти	85,4	66,9	152,3	83,2	149,3	25,7	—	8,8	281,8	87,0	98,9
Лизоцим	118,8	44,2	163,0	122,2	109,9	20,0	0	52,0	243,7	76,1	56,6
Адренокортикотропный гормон овцы	92,7	70,5	163,2	85,9	84,0	13,3	—	—	221,6[6]	107	60,0
Рибонуклеаза	128,0	49,5	177,5	146,5	189,7	43,8	5,0	0	169,0[6]	17,3	54,4
Казеин (суммарный)	99,7	91,2	190,9	114,3	101,1	34,8	—	5,9	355,6	26,7	2,8
Яичный альбумин	91,9	109,5	200,6	72,5	111,5	20,4	21,5	5,9	372,3	40,6	4,0
Гонадотропный гормон гипофиза быка	117,8	86,3	204,1	70,7	105,5	28,8	—	4,1	253,4[6]	50,6	20,8
Гемоглобин лошади	135,4	72,9	208,3	64,8	92,0	16,8	4,67	8,3	366,1	74,6	3,76
Коллаген	91,7	77,2	168,2	47,0	158,3	5,5	0	0	330,7	363	0
Желатина	92,8	121,4	214,2	5,3	159,6	5,5	0	0	323,4	359,0	0
Эдестин	128,6	104,2	232,8	126,8	92,4	23,5	4,2	7,2	283,4	—	7,2
Гистон печени крысы	190	62	252	62,0	100	27,6	0	0	318	77,5	0
Сывороточный альбумин человека	142,7	120,2	262,9	63,0	70,6	26,0	5,8	0,98	233,3*	65,9	46,7
Сывороточный альбумин быка	147,7	138,5	286,2	55,9	89,4	28,0	2,5	2,8	321,3	24,3	41,8
Миоглобин лошади	173,6	126,5	300,1	451	71,4	13,3	0	11,5	323.9	78,0	0
Миоглобин кита	194,6	125,6	320,2	40,6	61,4	11,7	0	12,7	321,6	53,9	0
Сальмин	490	0	490	0	87	0	0	0	102	39	0

* Без аланина, содержание которого неизвестно.

К полярным относятся все выше перечисленные группы и, кроме того, амидные группы аспарагина и глутамина, гидроксильные β-оксиаминокислот, фенольный и тиольный остатки тирозина и цистеина и индольная группа триптофана. Радикалы алифатических и жирно-ароматических аминокислот относятся к липотропным остаткам. Все эти группы, совместно с пептидной цепью, обусловливают многообразие функций белка (см. табл. 6).

ЛИТЕРАТУРА

Губен И. Методы органической химии, т. 4, кн. II. Аминокислоты, дикетопиперазины и полипептиды. Госхимиздат, 1949, стр. 851.

Денбэль П. Общая химия аминокислот и пептидов. В сб. Белки, под ред. Г. Нейрата и К. Бейли, т. I. М., ИЛ, 1956, стр. 101.

Збарский Б. И., Мардашев С. Р., Иванов И. И. Биологическая химия. Медгиз, 1954.

Зелинский Н. Д., Стадников Г. Д. О новом общем методе синтеза α-аминокислот. Собрание трудов, т. 1. Изд-во АН СССР, 1954, стр. 316.

Нейбергер А. Стереохимия аминокислот. В сб Химия белка, т. 2. М., ИЛ, 1952, стр. 298.

Несмеянов А. Н., Фрейдлина Р. Х., Петрова Р. Г. Получение пролина и D,L-орнитина из 1,1,1,5-тетрахлорпентана. Изв. АН СССР, 1957, № 4, 451.

Олбертн Р. Электрохимические свойства белков и аминокислот. В сб. Белки, под ред. Г. Нейрата и К. Бейли, т 2. М., ИЛ, 1956, стр. 431.

Терентьев А. П., Грачева Р. А. Получение амино- и оксикислот через производные фурана ЖОХ, 1958, 28, 1167; ЖОХ, 1959, **29**, 3474.

Фердман Л. А. Биохимия. Изд-во Высшей шк., 1959.

Фредлина Р. Х., Кост В. Н., Васильева Е. Ф., Несмеянов А. Н. Синтез α-аминокислот из соединений, содержащих CCl_2-CH-группу. Изв. АН СССР, отд. хим. наук, 1959, № 5, 826.

Greenstein J. P. The resolution of racemic α-amionacids. Advances in Protein Chemistry, 1954, **9**, 120.

Hais I. M., Macek K. Handbuch der Papierchromatographie. Jena. 1958.

Wieland Th. Methoden zur Herstellung und Umwandlungen von Aminosäuren und Derivaten. Houben — Weyl, Methoden der Organischen Chemie; vol. XI/2, 1958, S. 279.

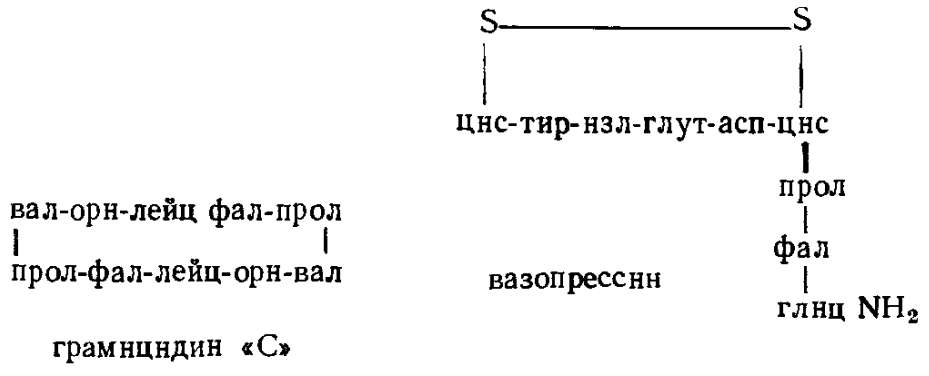
Часть II

ПЕПТИДЫ И ЦИКЛОПЕПТИДЫ

С помощью современных методов анализа аминокислот — хроматографии, ионофореза и метода противоточного распределения к 50-м годам XX века был окончательно установлен аминокислотный состав большого числа белков. Эти исследования еще раз подтвердили, что большинство белков состоит из 22 различных аминокислот и что разнообразие белков вызвано главным образом количественным соотношением аминокислотных остатков, характером связи, последовательностью в пептидной цепи или циклах и конформацией белковой молекулы Эти вопросы и являются самыми кардинальными в настоящее время. Первым из них, требовавшим разрешения, был вопрос о характере связи аминокислотных остатков в белке В конце прошлого столетия Гофмейстером было высказано предположение, что основной формой связи аминокислотных остатков и белков является амидная —CO— NH-. Это положение нашло свое подтверждение в блестящих работах Э. Фишера и его школы. Основными фактами, подтверждавшими это положение, были следующие:

1. Количество карбоксильных и аминных групп в белках невелико (см. табл. 6).
2. Число их увеличивается при гидролизе белка
3. Белки дают биуретовую реакцию, характерную для пептидов.
4. Пептиды расщепляются теми же протеолитическими ферментами, которыми расщепляются белки и продукты их распада.

Все эти положения были высказаны Э. Фишером более 50 лет тому назад. Но за последние 10—15 лет был накоплен огромный фактический материал о продуктах распада белка и было синтезировано огромное число пептидов, среди них ряд природных, что окончательно подтвердило эту точку зрения (см. стр 524—525). Наряду с полипептидами и белками за последнее время среди природных соединений найдено значительное количество циклических пептидов. Некоторые из них обладают гормональным действием, например вазопрессин, регулирующий кровяное давление, другие являются продуктами жизнедеятельности микроорганизмов, например грамицидины. Одни из этих циклопептидов состоят только из аминокислотных остатков (грамицидин), другие содержат в цикле и другие элементы — серу. Швицер предложил называть первые гомодетными и вторые гетеродетными циклопептидами.



Глава 1

СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ И ЦИКЛОПЕПТИДОВ

Изучение пептидов удобно начать с методов их синтеза Самый простой из мыслимых путей синтеза — взаимодействие двух молекул аминокислот — не осуществлен в обычных условиях

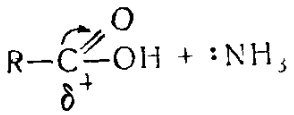
$$NH_2—CH(R)—COOH + NH_2—CH(R')—COOH \text{ ——— не идет}$$

I компонент II компонент

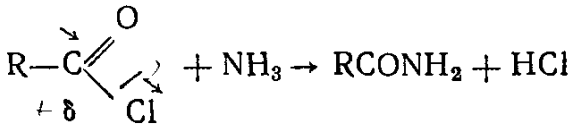
Реакция не идет по следующим причинам. образование пептидной связи представляет собою частный случай амидирования органической кислоты:

$$RCH_2COOH + NH_3 \rightarrow RCH_2CONH_2 + H_2O$$

В этой реакции нуклеофильная группа аммиака атакует электрофильный углерод карбоксильной группы.



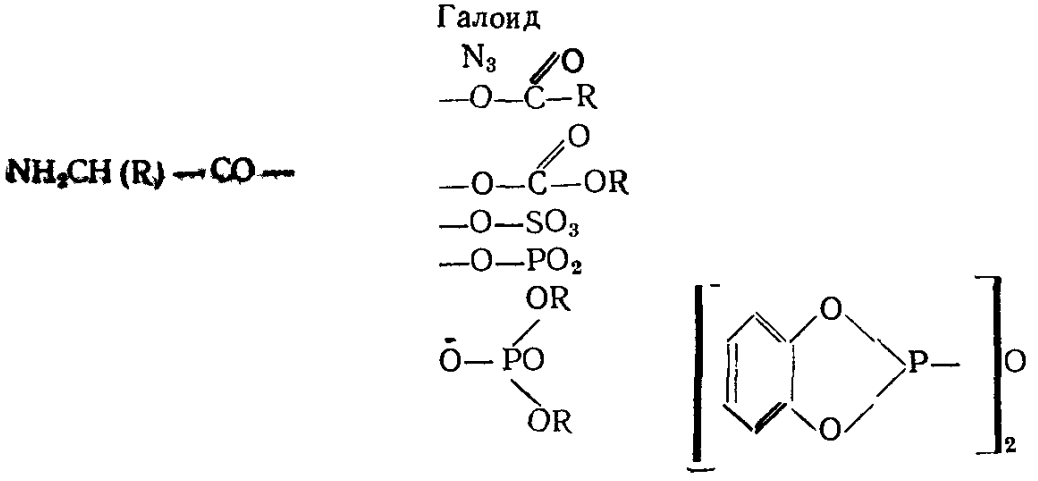
Но заряд этот невелик, и реакция амидирования протекает только при нагревании. Замена водорода в карбоксильной группе на остаток, оттягивающий на себя электроны, способствует реакции амидирования.



Заряд δ^+ на углероде значительно уменьшается у амфотерных аминокислот. Поэтому реакция образования пептидной связи может происходить только при значительной затрате энергии. На образование одного моля пептида затрачивается около 3000—4000 *кал*. Можно провести, однако, реакцию и при обычных условиях, если активизировать молекулу аминокислоты путем увеличения заряда на С-атоме введением в молекулу аминокислоты группировок, оттягивающих на себя электроны.

Для активации превращают аминокислоты в смешанные ангидриды или в эфиры, содержащие в спиртовом остатке электрофильные группировки, или же, наконец, во внутренние циклические ангидриды и эфиры.

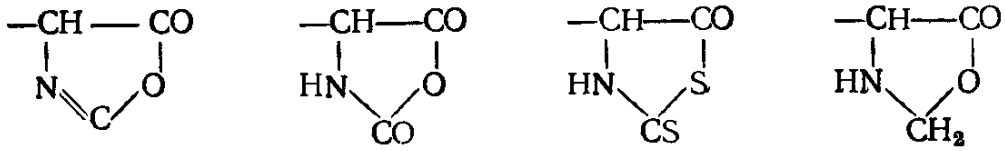
Смешанные ангидриды аминокислот



Активированные эфиры аминокислот

$$NH_2CH(R)-CO-\begin{cases}-OCH_2C\\ -OC_6H_4NNO_2\ n\\ -OC_6H_4CN\\ -OC_6H_3(NO_2)_2\text{-}2,4\\ -SC_6H_5\\ -OC_6H_3NO_2CH_3\end{cases}$$

Внутренние ангидриды или эфиры аминокислот



оксазолон — карбоксиангидрид — меркаптотиазолон — оксазолидон

Наряду с активацией карбоксильной группы в 1-м компоненте важно еще защитить аминную группу первого и карбоксильную группу второго компонента. Это необходимо для предотвращения нежелательных реакций конденсации между карбоксильной и аминной группами первого компонента и для предотвращения взаимодействия его аминной группы с соединениями, используемыми для активации карбоксильной группы. Синтез можно тогда изобразить следующей схемой:

$$\underset{\mathrm{I}}{XNH-CH(R)COY}+\underset{\mathrm{II}}{H_2NCH(R')COOR''}\longrightarrow XNHCH(R)CONHCH(R')COOR'',$$

где X — защитная группа;

Y — активирующая группа.

$R''=C_2H_5$, CH_3, $CH_2C_6H_5$, Na, K

Карбоксильную группу второго компонента защищают путем этерификации или образованием солей. Чаще всего пользуются метиловыми и этиловыми эфирами, в последнее время также бензиловыми эфирами. Метиловые и этиловые эфиры полученных пептидов гидролизуют обычно щелочью на холоду, бензиловые эфиры разрушают гидрированием на палладии.

$$XNHCH(R)-CONH-CH_2COOCH_2C_6H_5\longrightarrow XNH\underset{\underset{R}{|}}{CH}CONHCH_2COOH+C_6H_5CH_3$$

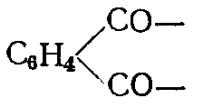
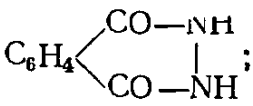
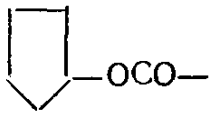
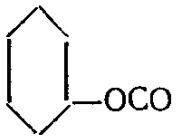
Бензиловые эфиры особенно удобно использовать в тех случаях, когда в качестве защитной группы применяется карбобензокси- или бензильные остатки. «Защита» аминных групп должна удовлетворять основному требованию; удаляться избирательно без одновременного расщепления пептидной связи в пептиде. По этой причине оказались непригодными бензоильные, ацетильные, карбэтокси- и карбометоксипроизводные аминокислот. В качестве защитных групп чаще всего применяют следующие группы (см. табл. 7).

Если аминокислоты содержат еще и другие функциональные группы, например, OH, SH, $NH_2-C=NH$, или карбоксильные группы, то синтез пептидов иногда сопровождается побочными процессами. Поэтому целесообразно по возможности защищать эти группы. Так, аргинин применяют обычно в виде нитроаргинина.

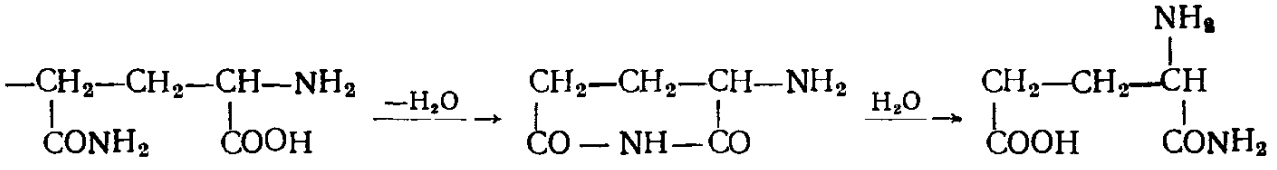
Гидроксильную группу в оксиаминокислотах в последнее время защищают бензильным остатком, который уже давно применяли для защиты сульфгидрильной группы цистеина Существенные затруднения

Таблица 7

Наиболее употребительные защитные группы

Группа	Формула	Условия удаления	Продукт реакции	Кем и когда предложены
Карбобензокси	$C_6H_5CH_2OCO-$	Гидрирование над палладием	$C_6H_5CH_3$; CO_2; пептид	Бергман, Зервас, 1932 г.
		Действие HBr в CH_3COOH	$C_6H_5CH_2Br$, CO_2, пептид	Бен-Ишаи, 1952 г.
		Действие натрия в жидком аммиаке	$C_6H_5CH_3$, CO_2; пептид	
п-Толуолсульфо (тозильная)	$CH_3C_6H_4SO_2-$	То же	$C_6H_5CH_3$, пептид	Шенхеймер, 1926 г.
Трифторацетильная	CF_3CO-	Действие слабых щелочей	CF_3COONa, пептид	Вейганд, 1952 г.
Трифенилметильная (тритил)	$(C_6H_5)_3C-$	Действие 50%-ной уксусной кислоты, разбавленной HCl, CH_3COOH	$(C_6H_5)_3COH$, пептид	Хельферих, 1925 г.; Веллюз, 1955 г.
Дибензильная	$(C_6H_5CH_2)_2-$	Гидрирование над палладием	$C_6H_5CH_3$, пептид	Веллюз, 1954 г.
Формильная	$HCO-$	Гидролиз HCl в спиртовом растворе	HCOOH, пептид	Уоллей, 1953 г.
Фталильная		Действие гидразингидратом	 пептид	Ишхан, 1949 г.
Карбоксициклопентил		Действие HBr в CH_3COCH_3	Пептид, циклопентан, CO_2	Мак-Кей, Олбкутсон, 1957 г.
Карбоксициклогексил		То же	Циклогексан, CO_2, пептид	То же
Бутилоксикарбонил	$(CH_3)_3C-OCO-$	Действие HBr	Пептид, CO_2, спирт	Швицер, 1959 г.
п-фенилазо-бензилоксикарбонил	$C_6H_5-N=N-C_6H_4-CH_2OCO-$	Гидрирование над палладием	Пептид, CO_2, фенилазотолуол	То же

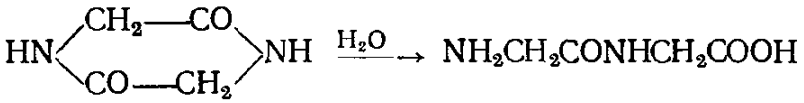
возникают при синтезе пептидов, содержащих глутаминовую и аспарагиновую кислоты. Глутаминовая кислота (или ее производные), ее пептиды и амиды легко циклизуются в пироглутаминовую кислоту, при гидролизе которой могут образоваться как γ-, так и α-амид глутаминовой кислоты или ее пептида.



глутамин — пироглутаминовая кислота — изоглутамин

Замечательно то, что применяемые «защитные» группы характеризуются как различной степенью устойчивости их связи с аминной группой, так и разнообразием методов их отщепления Так, тритильный остаток отщепляют слабой кислотой, а трифторацетильный — щелочью, карбобензокси и дибензильную группы удаляют гидрированием; не подвергаются гидрогенолизу карбоксициклопентильная и карбоксициклогексильная группы и т д. Это дает исследователю возможность подбирать различные комбинации экранирования аминогруппы при синтезе сложных полипептидов из различных аминокислот.

Рассмотрение методов синтеза пептидов начнем с истории Первый пептид был получен случайно в 1882 г Курциусом При взаимодействии серебряной соли гиппуровой кислоты с бензоилхлоридом он получил бензоилглицилглицин. В 1901 г. Фишер получил глицилглицин гидролизом дикетопиперазина.



В том же году Курциус получил нитробензоилглицилглицин взаимодействием азида бензоилглицина с эфиром глицина

$$C_6H_5CONHCH_2CON_3+NH_2CH_2COOR' \longrightarrow C_6H_5CONHCH_2CONHCH_2COOR'$$

Все эти методы страдали существенными недостатками. Синтез Фишера тем, что реакция ограничена получением только дипептида; синтезы Курциуса тем, что бензоильная и нитробензоильная группы отщеплялись труднее, чем гидролизовалась пептидная связь. Началом развития синтеза пептидов следует поэтому считать работы Э. Фишера в 1903 г, в которых он проводил реакцию между хлорангидридами α-галоидорганических кислот и солями аминокислот или их эфирами с последующим аминированием образовавшейся бромациламинокислоты

$$\underset{\text{I}}{BrCH(R)COCl}+H_2NCH_2COONa \xrightarrow{OH'} NaCl+\underset{\text{II}}{BrCH(R)CONHCH_2COOR'} \rightarrow 2NH_3$$

$$NH_2CH(R)CONHCH_2COOH+NH_4Br.$$

Бромациламинокислоту (II) можно обработать PCl_5 и образующийся хлорангидрид бромациламинокислоты вновь сочетать с аминокислотой или пептидом.

$$BrCH(R)CONHCH_2COOH+PCl_5 \rightarrow BrCH(R)CONHCH_2COCl+POCl_3+HCl$$

$$BrCH(R)CONHCH_2COCl + NH_2CH(R')COONa \rightarrow$$

$$\rightarrow BrCH(R)CONHCH_2CONHCH(R')COOH$$

и т. д.

Реакцию можно оборвать аминированием полученного бромацетилпептида

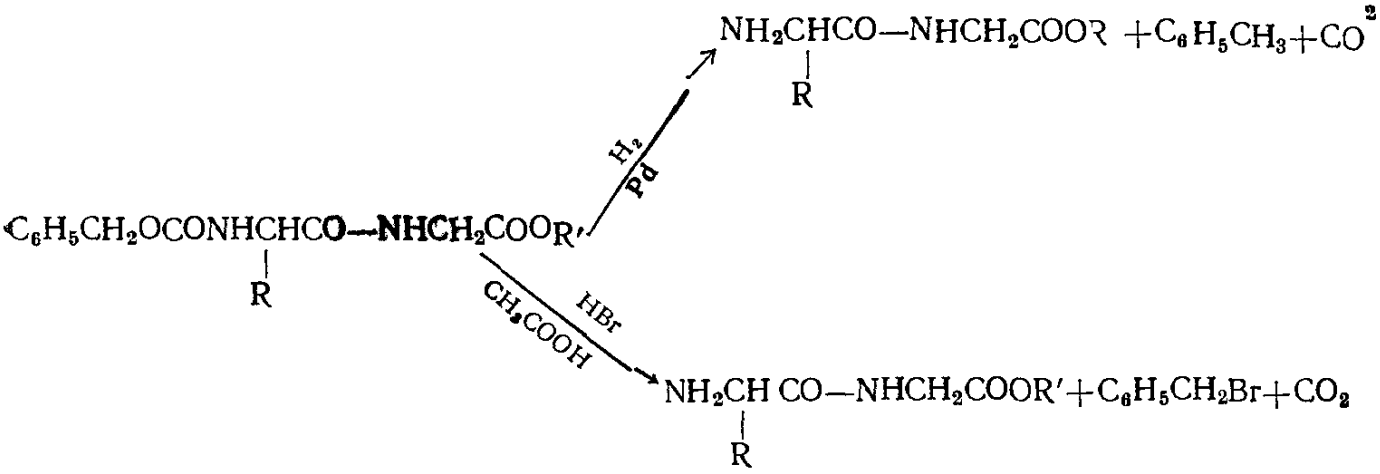
$$BrCH(R)CONHCH_2CONHCH(R')COOH+NH_3 \rightarrow$$

$$\rightarrow NH_2CH(R)CONHCH_2CONH—CH(R')—COOH$$

Таким путем был получен первый 18-членный пептид, в некотором отношении напоминавший белок (например, способностью высаливаться). L- лейц-глиц-(глиц)$_2$ L-лейц-глиц-глиц-глиц-L-лейц-глиц-глиц-глиц- глиц - глиц-глиц-глиц-глиц-лейцин Ограниченность этого метода обусловлена

тем, что с его помощью нельзя синтезировать пептиды с широким спектром аминокислотных остатков, и поэтому нельзя достигнуть основной цели — синтеза пептидов, тождественных природным, или выделяемым из белков

Вторым переломным моментом в синтезе пептидов явился 1932 г., когда Бергман и Зервас предложили применять в качестве защитной группы так называемую карбобензокси-группу (см стр. 464) $C_6H_5CH_2OCO$, которая при гидрировании над катализаторами, при действии жидкого аммиака или иодистого фосфония распадается до толуола и CO_2, а при обработке бромистоводородной кислотой в ледяной уксусной кислоте образует бромистый бензил и CO_2



Введение карбобензоксигруппы позволило расширить ассортимент аминокислот, используемый для синтеза пептидов, и дало возможность получать любые пептиды. Синтез проводился по следующей схеме:

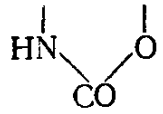
$$C_6H_5CH_2OCONHCH_2COOH+PCl_5 \rightarrow C_6H_5CH_2OCONHCH_2COCl+POCl_3+HCl$$

$$C_6H_5CH_2OCONHCH_2COCl+NH_2CH\,(R)\,COOC_2H_5\rightarrow$$

$$C_6H_5CH_2OCONHCH_2CONHCH\,(R')\,COOC_2H_5 \xrightarrow[H_2O]{OH'} \xrightarrow{H_2/Pd} NH_2CH_2CONHCH(R')COOC_2H_5$$

Недостаток метода заключается, однако, в том, что в ряде случаев при получении хлорангидрида карбобензоксиаминокислоты PCl_5 реагирует с самой карбобензоксигруппой, отщепляя хлористый бензил и образуя карбоксиангидрид.

$$C_6H_5CH_2OCONHCH_2COOH+PCl_5 \rightarrow CH_2-CO+C_6H_5CH_2Cl$$



Особенно легко протекает эта реакция с карбобензоксиглицином и с карбобензоксиглицилпептидами. Поэтому в синтезе пептидов стали широко пользоваться азидами аминокислот.

$$C_6H_5CH_2OCONHCH_2COOH \xrightarrow{NH_2-NH_2} \xrightarrow{HNO_2} C_6H_5CH_2OCONHCH_2CON_3$$

$$C_6H_5CH_2OCONHCH_2CON_3+NH_2CH\,(R)\,COOC_2H_5 \rightarrow$$

$$\rightarrow C_6H_5CH_2OCONHCH_2CONHCH\,(R)-COOC_2H_5$$

Применение азидного метода, предложенного Курциусом, с одновременным использованием «карбобензоксизащиты» оказалось чрезвычайно плодотворным. Метод позволяет получать пептиды, состоящие из любых аминокислот; при работе с оптически деятельными аминокислотами не наблюдается рацемизации.

В 1951 г. почти одновременно Буассона в Швейцарии, Вон в Англии и Виланд в Германии начали разрабатывать новые методы синтеза, в которых также использовались смешанные ангидриды, но образован-

ные ацилированной или алкилированной аминокислотой и органической кислотой.

$$XNHCH(R)—CO—O—CO—CH_2R'$$

Их получают действием триэтиламинной соли ацил- (или алкил) аминокислоты на хлорангидрид органической кислоты. В качестве остатков органической кислоты были испробованы самые разнообразные кислоты. Наиболее удачным оказалось применение смешанных ангидридов, образованных с изовалериановой кислотой и эфирами угольной кислоты.

$$XNHCH(R)COONH(C_2H_5)_3 + ClCOCH_2CH(CH_3)_2 \rightarrow XNHCH(R)CO—O—COCH_2CH(CH_3)_2$$

$$\downarrow + ClCOOC_2H_5 \rightarrow XNHCH(R)CO—O—COOC_2H_5$$

При взаимодействии этих смешанных ангидридов с эфирами аминокислот при низкой температуре почти спонтанно идет реакция образования пептида.

$$XNHCHR—CO—O—CCOC_2H_5 + NH_2CH(R')COOC_2H_5 \rightarrow XNHCHCONHCH(R')COOC_2H_5 + CO_2 + C_2H_5OH$$

Реакцию проводят в хлороформе, хлористом метилене, диоксане или тетрагидрофуране. Особенно рекомендуется последний растворитель, в котором наблюдается наименьшая степень рацемизации.

Возможен второй вариант реакции — взаимодействие остатка органической кислоты из смешанного ангидрида с эфиром аминокислоты.

$$XNHCH(R)CO—O—COCH_2CH(CH_3)_2 + NH_2CH(R')COOC_2H_5 \rightarrow$$

$$\rightarrow (CH_3)_2CHCH_2CO—NHCH(R')COOC_2H_5$$

Но этот вариант почти не имеет места, вероятно вследствие того, что реакционная способность изовалерианового остатка меньше, чем аминокислотного из-за стерических препятствий.

В этот же период и несколько ранее появился ряд других методов, при которых используются смешанные ангидриды аминокислот с серной, фосфорной, пирофосфорной и т. п. кислотами. Однако широкое применение получили только производные фосфора. Таковы реакции с диэтилфосфитом или с тетраэтилпирофосфитом,

$$XNHCH_2COOH + (C_2H_5O)_2P—O—P(OC_2H_5)_2 \rightarrow XNHCH_2C(=O)—O—P(OC_2H_5)_2 +$$

тетраэтилпирофосфит

$$+ NH_2CH(R)COOC_2H_5 \rightarrow XNHCH_2CO—NHCH(R)COOC_2H_5 + HO—P(OC_2H_5)_2$$

с дихлорфосфитом и с монохлорфосфитом; например:

$$XNHCH_2COOH + ClP(OC_2H_5)_2 \rightarrow XNHCH_2—COOP(OC_2H_5)_2 \rightarrow +$$

$$+ NH_2CH(R)COOC_2H_5 \rightarrow XNHCH_2CONHCH(R)COOC_2H_5$$

Интересный вариант синтеза пептидов был предложен Вейгандом. Он обрабатывал аминокислоту ангидридом трифторуксусной кислоты и получал ангидрид трифторацетиламинокислоты и трифторуксусной кислоты, который затем вводился в реакцию с эфиром аминокислоты.

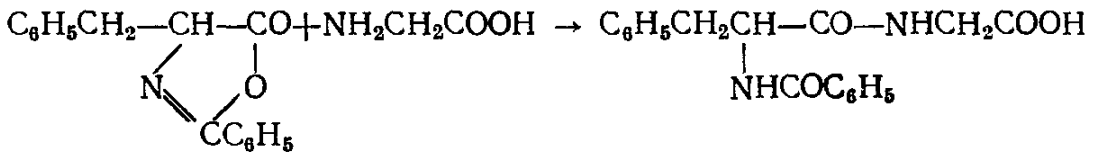
$$NH_2CH(R)COOH + (CF_3CO)_2O \rightarrow CF_3CONHCH(R)CO{-}O{-}COCF_3 \rightarrow$$

$$\rightarrow + NH_2CH(R')COOC_2H_5 \rightarrow CF_3CONHCH(R)CONHCH(R')COOC_2H_5 + CF_3COOH$$

Недостатком этого метода является относительная склонность получаемого смешанного ангидрида к симметризации и к рацемизации.

Для синтеза пептидов применялся еще ряд циклических ангидридов и эфиров, например:

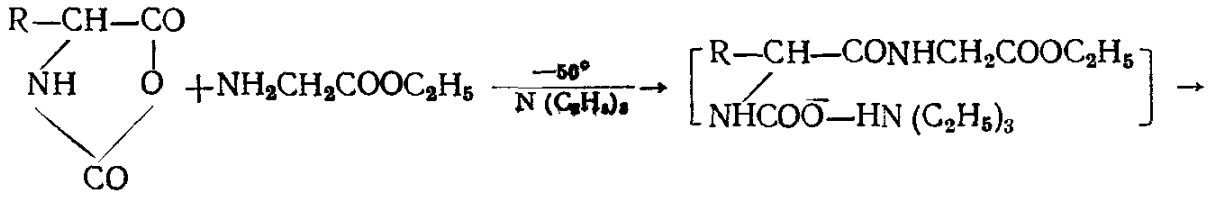
А Оксазолоны



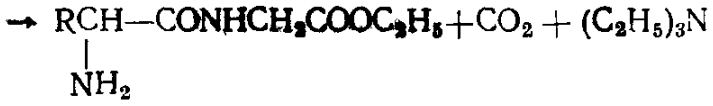
2-фенил-4-бензил-5-оксазолон — бензоилфенилаланилглицин

Метод пригоден только для синтеза ацилированных пептидов.

Б. Карбоксиангидриды

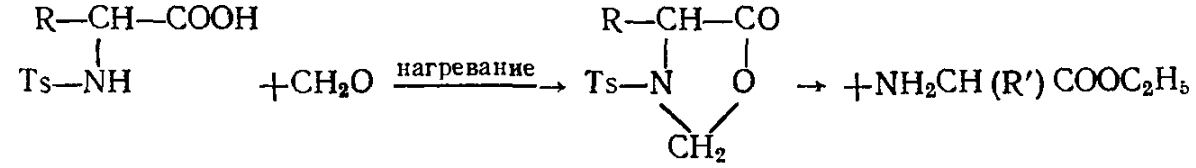


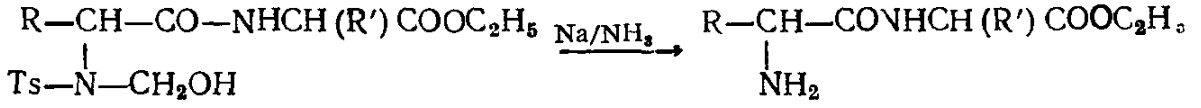
карбоксиангидрид



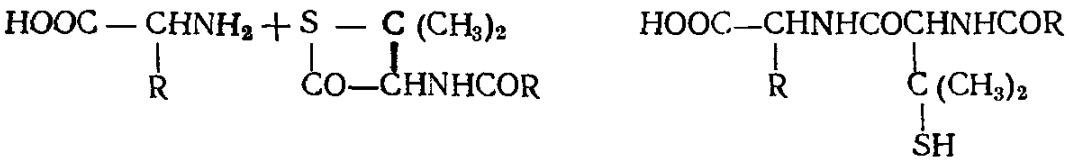
Синтез пептидов с помощью карбоксиангидридов мало пригоден, так как карбоксиангидриды легко полимеризуются и их успешно применяют для получения полимеров (см. ниже).

В. Оксазолидоны. Тозильные производные аминокислот превращают нагреванием с формальдегидом в оксазолидоны, которые реагируют с эфирами аминокислот.





Интересный метод применения циклических производных аминокислот был предложен в 1955 г. И. Л. Кнунянцем с сотрудниками. Они показали, что α-ациламинотиолактоны легко реагируют с аминокислотами и пептидами, образуя пептиды, содержащие меркаптоаминокислоты.



В этой реакции, в отличие от описанных ранее, применяется производное аминокислоты с четырехчленным циклом.

В последнее время большое значение приобрели методы, основанные на применении активированных эфиров аминокислот. Наиболее удачными из испробованных оказались цианметиловый эфир, предложенный в 1955 г. Швицером, и *n*-нитрофениловый эфир. Оба эфира представляют собой кристаллические соединения, получение которых вполне доступно.

Цианметиловые эфиры получают взаимодействием ациламинокислоты с хлорцианметилом (см. стр. 462), *n*-нитрофениловые эфиры — взаимодействием ациламинокислоты с *n*-нитрофенолом в присутствии дициклогексилкарбодиимида:

$$XNHCH(R)COOH + HOC_6H_4NO_2 + C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11} \rightarrow$$
$$\rightarrow XNHCH(R)COOC_6H_4NO_2 + C_6H_{11}NHCONHC_6H_{11}$$

Они реагируют с эфирами аминокислот и пептидов:

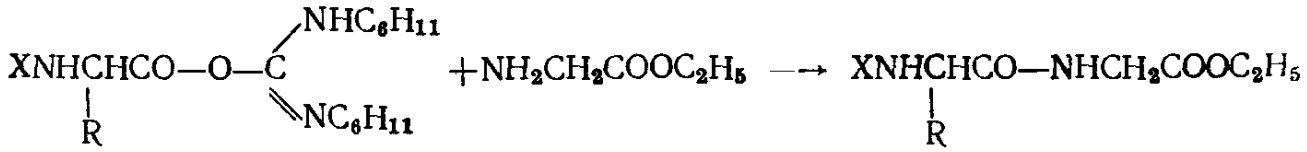
$$\left.\begin{matrix} XNHCH(R)COOCH_2CN \\ XNHCH(R)COOC_6H_4NO_2 \end{matrix}\right\rangle + NH_2CH_2COOC_2H_5 \rightarrow XNHCH(R)CONHCH_2COOC_2H_5$$

Реакция протекает быстро без рацемизации и с высокими выходами пептидов. Оба метода широко используются для синтеза полипептидов как линейных, так и циклических (см. ниже).

Однако эти достижения не удовлетворили исследователей. В 1955 г. были, наконец, найдены реакции, позволявшие получать пептиды без предварительной активации карбоксильной группы, так как активация происходит в процессе реакции. В качестве активирующих средств были предложены дициклогексилкарбодиимид (Шихан, 1955 г.) и этоксиацетилен (Аренс, 1955 г.). При взаимодействии ациламинокислоты с эфиром аминокислоты в присутствии дициклогексилкарбодиимида образуется эфир защищенного пептида и выпадает дициклогексилмочевина.

$$XNHCH(R)COOH + C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11} + NH_2CH_2COOC_2H_5 \rightarrow$$
$$\rightarrow XNHCH(R)CO{-}NHCH_2COOC_2H_5 + C_6H_{11}NHCONHC_6H_{11}$$

По-видимому, промежуточным соединением и в этом случае является активированный «эфир», тотчас же вступающий в реакцию с эфиром аминокислоты.



Реакция идет чрезвычайно легко и при этом не происходит рацемизации пептидов. Существенно, что реакцию можно проводить в водных и спиртовых растворах.

Этоксиацетилен реагирует с аминокислотами по схеме:

$$XNHCH(R){-}COOH + NH_2CH_2COOC_2H_5 + HC{\equiv}COC_2H_5 \rightarrow$$
$$\rightarrow XNHCH(R)CONHCH_2COOC_2H_5 + CH_3COOC_2H_5$$

Реакцию можно проводить и с хлоргидратами эфиров аминокислот. Замечательно то, что побочным продуктом реакции является этилаце-

тат, который не мешает выделению пептидов. Механизм реакции еще окончательно не установлен. Аренс высказывает предположение, что одним из промежуточных соединений также является ангидрид

$$HC\equiv COC_2H_5 + XNHCH(R)COOH \longrightarrow CH_2=C(OC_2H_5)(OCOCH(R)NHX),$$

который затем реагирует с эфиром аминокислоты.

$$CH_2=C(OC_2H_5)(OCOCH(R)NHX) + NH_2CH_2COOC_2H_5 \longrightarrow XNHCH(R)CONHCH_2COOC_2H_5$$

Синтез пептидов можно осуществлять не только активацией карбоксильной, но и аминной группы, удлиняя пептидную цепь со стороны аминной конечной группы. Наиболее удачными является активация эфиров аминокислот производными фосфорной кислоты. При действии на эфиры аминокислоты тетраэтилпирофосфитом образуется фосфоаминосоединение, которое реагирует затем с ацилированными или алкилированными аминокислотами.

$$ROCO-CHNH_2(R) + (C_2H_5O)_2-P-O-P(OC_2H_5)_2 \longrightarrow$$

$$\longrightarrow ROCOCHNH-P(OC_2H_5)_2(R) + (C_2H_5O)_2POH;$$

$$ROCOCHNH-P(OC_2H_5)_2(R) + HOOCCHNHX(R) \rightarrow XNHCHCONH-CHCOOR(R,R') + (C_2H_5O)_2POH$$

При действии на эфиры аминокислот треххлористым фосфором получаются очень активные амиды фосфористой кислоты, называемые также фосфоазосоединениями, которые взаимодействуют с защищенными по аминогруппе аминокислотами:

$$5R'OCO-CH(R)-NH_2 + PCl_3 \longrightarrow R'OCO-CH(R)-N=P-NH-CH(R)-COOR' +$$

$$+ 3R-CH(NH_2)-COOR'\cdot HCl$$

$$R'OCO-CH(R)-N=P-NH-CH(R)COOR' + 2C_6H_5CH_2OCONHCH(R'')COOH \longrightarrow$$

$$\longrightarrow 2C_6H_5CH_2OCONHCH(R'')CO-NHCH(R)-COOR' + HPO_2$$

Скорость образования пептидов зависит от применяемых активных групп. Со смешанными ангидридами, карбодиимидом и этоксиацетиленом реакция протекает быстро и фактически заканчивается в течение 10—30 мин. Активированные эфиры аминокислот реагируют значительно медленнее. Биркофер предложил воспользоваться этим различием для синтеза трипептидов без предварительного выделения промежуточно образующихся дипептидов.

Синтез протекает в две стадии. Сначала проводят реакцию между карбобензоксиаминокислотой и *n*-нитрофениловым эфиром аминокислоты методом смешанных ангидридов или карбодиимидным методом. Затем к образовавшемуся *n*-нитрофениловому эфиру карбобензоксидипептида без его предварительного выделения прибавляют эфир аминокислоты. В результате получают эфир карбобензокситрипептида.

$$C_6H_5CH_2OCONHCH(R)COOH + NH_2CH(R')COOC_6H_4NO_2 + C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11} \longrightarrow$$

$$\longrightarrow C_6H_5CH_2OCONHCH(R)CO{-}NHCH(R')COOC_6H_4NO_2 \xrightarrow{NH_2CH(R'')COOR'''} \longrightarrow$$

$$\longrightarrow C_6H_5CH_2OCONHCH(R)CO{-}NHCH(R')CO{-}NHCH(R'')COOR'''$$

Особое значение в синтезе пептидов имеет выбор таких защитных и активирующих групп и условий реакции, при которых не происходит рацемизации, так как в противном случае не только образуется смесь трудно разделимых стереоизомеров, но синтез не достигает основной цели — получения природных соединений. Лучше всего отвечают этому требованию синтезы с применением дициклогексилкарбодиимида (карбодиимидный метод) или этоксиацетилена и азидный метод. Недавно было обнаружено, что пептиды подвергаются наименьшей рацемизации, если проводить синтез последовательным нанизыванием аминокислотных остатков со стороны карбоксильной группы.

Разнообразие методов синтеза пептидов дало возможность получать пептиды самого различного состава и с любой последовательностью аминокислот. Однако, применение всех этих методов синтеза требует освоения большого числа разных реакций. Неудивительно поэтому, что исследователи стремятся найти такой синтез, который позволил бы получать пептиды одним общим путем, подобно тому, как большинство аминокислот можно получать малоновым синтезом. Недавно было показано, что универсальным, по-видимому, является карбодиимидный метод. Он позволяет нанизывать аминокислотные остатки с карбоксильного конца пептидов или соединять между собою пептиды различной длины и состава без предварительной активации карбоксильной группы.

Однако все описанные методы вряд ли позволят исследователям синтезировать соединения с молекулярным весом в 100 000 и выше, т. е. близких по размерам к молекулам белков. Между тем, создание подобных высокомолекулярных моделей было бы очень полезным для подхода к изучению свойств белков, например, при решении вопросов о пространственном строении молекул, о взаимосвязи между способностью образовывать фибриллярные и глобулярные молекулы и их аминокислотным составом, об оптической деятельности белков и т. п.

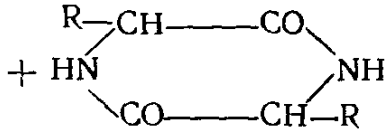
Вследствие этого возникло второе направление, целью которого явился синтез полимеров и сополимеров аминокислот. Образующиеся соединения характеризуются высоким молекулярным весом и представляют собою смесь линейных пептидов, в большинстве своем нерастворимых в воде; в некоторых случаях они обладают свойствами пластмасс.

Полимеры аминокислот можно получать нагреванием аминокислот или их эфиров, нагреванием эфиров пептидов и конденсацией N-карбоксиангидридов аминокислот.

При нагревании эфиров пептидов образуются полиаминокислоты различной длины и дикетопиперазины.

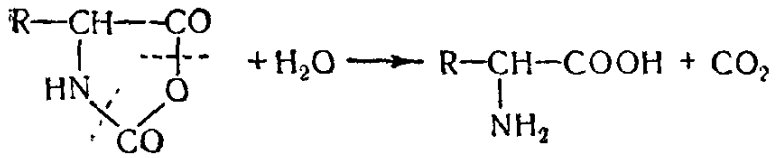
$NH_2CH(R)CONHCH(R)COOC_2H_5 \longrightarrow$

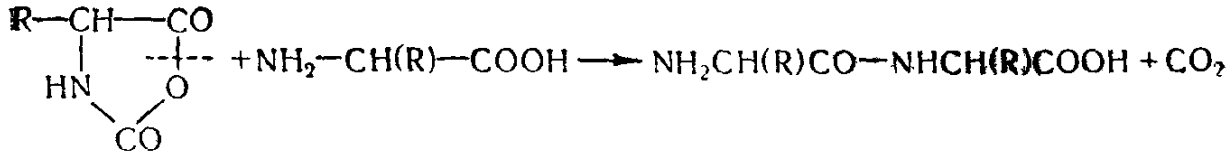
$\longrightarrow NH_2CH(R)CO[NHCH(R)CO]_nNHCH(R)COOC_2H_5 +$

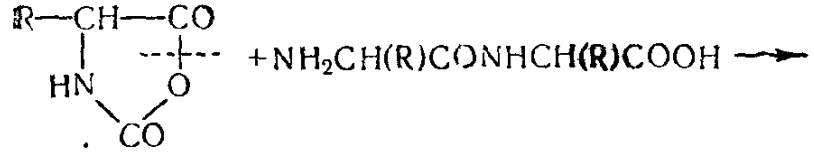


В СССР кинетику этих процессов изучает К. Т. Порошин с сотрудниками. Наибольший интерес и распространение имеет, однако, N-карбоксиангидридный метод. N-Карбоксиангидриды аминокислот получаются с хорошими выходами при взаимодействии карбобензоксиаминокислот с PCl_5 или $COCl_2$ (см. стр. 466).

Карбоксиангидриды полимеризуются при плавлении или при нагревании в органических растворителях. Инициаторами реакции служат следы воды или соединений с активным атомом водорода — амины, спирты. Механизм реакции заключается, по-видимому, в том, что под действием воды N-карбоксиангидрид аминокислоты разлагается до CO_2 и аминокислоты, которая в момент своего образования реагирует со второй молекулой N-карбоксиангидрида, образуя пептид и CO_2. Пептид вновь реагирует с N-карбоксиангидридом и таким образом протекает цепная реакция.

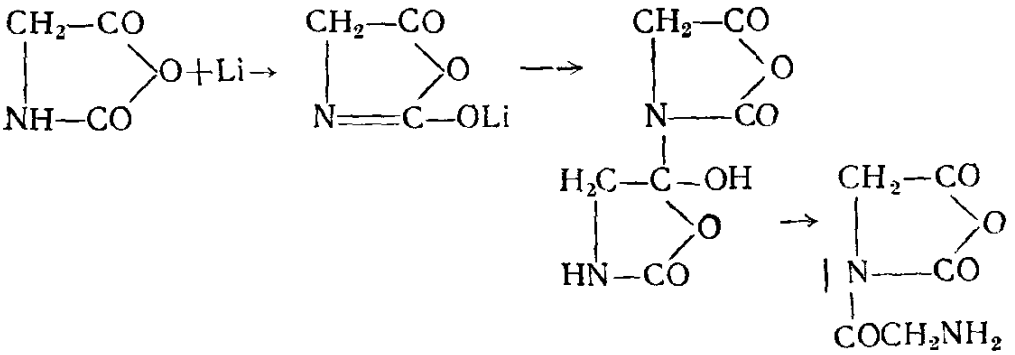


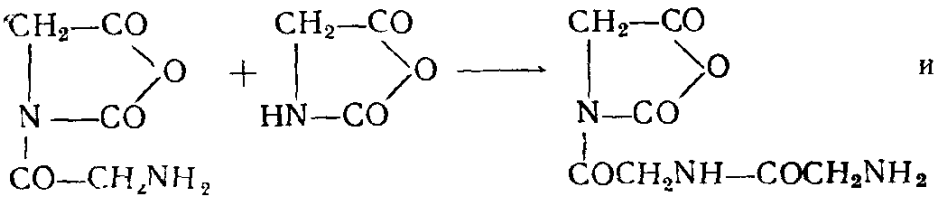






Баллард предложил схему реакции, инициируемой литием:





Этот метод является наиболее важным для синтеза полимеров аминокислот. Таким путем получены поли-L-лизин, поли-L-глутаминовая кислота, поли-L-серин и большое число сополимеров, состоящих из различных аминокислот.

Методы синтеза циклопептидов не отличаются от методов синтеза линейных пептидов. Применяют те же методы активации карбоксильной группы: синтезируют азиды, цианметиловые и нитрофениловые эфиры пептидов и т. д., затем без добавления второго компонента удаляют защитную группу и, чтобы направить реакцию в сторону образования циклических, а не линейных пептидов, проводят ее в сильно разбавленном растворе. Так, Швицер при синтезе грамицидина С применил *п*-нитрофениловый эфир тритилдекапептида. После удаления тритильной группы *п*-нитрофениловый эфир декапептида оставлялся в морфолиновом растворе.

$$(C_6H_5)_3C{-}HN\text{-вал-орн-лейц-фал-прол-вал-орн-лейц-фал-прол-}O{-}C_6H_4NO_2 \rightarrow$$

$$\xrightarrow{H^{\cdot}} H_2N\text{-вал-орн-лейц-фал-прол-вал-орн-лейц-фал-прол-}O{-}C_6H_4NO_2 \rightarrow$$

$$\rightarrow \underset{\displaystyle NH}{\underset{|}{\text{вал}}}\text{-орн-лейц-фал-прол-вал-орн-лейц-фал-}\underset{\displaystyle CO}{\underset{|}{\text{прол}}}$$

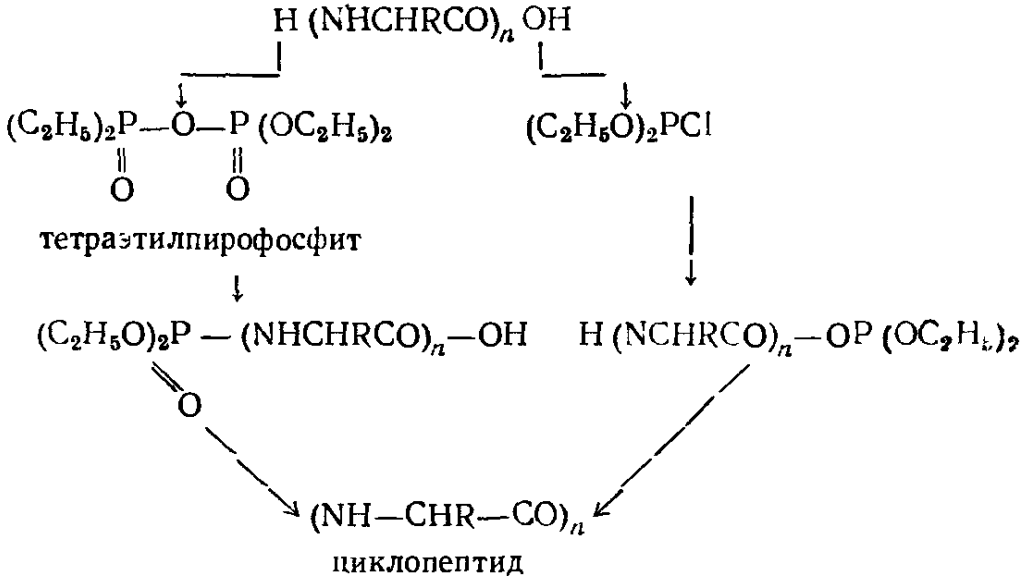
Швицер предложил также применять для этой цели цианметиловые эфиры пептидов. Е. А. Морозова и С. Женодарова, синтезировавшие ряд циклогексапептидов, проводили циклизацию самих пептидов, используя внутримолекулярное отщепление воды с помощью дициклогексилкарбодимида или этоксиацетилена. Последний был применен ими впервые. Таким путем был получен глицил-лейцил-диглицил-лейцил-глицин.

$$\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH_2}}{-}CO{-}NH{-}CH(C_4H_9){-}CO{-}(NHCH_2CO)_2{-}NH{-}CH(C_4H_9)CO{-}\underset{\displaystyle HOOC}{\underset{|}{NHCH_2}} +$$

$$+ CH{\equiv}COC_2H_5 \rightarrow$$

$$\rightarrow \underset{\displaystyle NH}{\underset{|}{CH_2}}{-}CO{-}NH{-}CH(C_4H_9){-}CO{-}(NHCH_2CO)_2{-}NH{-}CH(C_4H_9)CO{-}\underset{\displaystyle CO}{\underset{|}{NHCH_2}}$$

Недавно Роте предложил применять для циклизации пептидов фосфористые соединения — тетраэтилпирофосфит, хлорангидриды эфиров фосфорной кислоты, фосфорный ангидрид, диэтилфосфит и др.



$$H(NHCHRCO)_n OH$$

$$(C_2H_5)_2\underset{\displaystyle O}{\underset{\|}{P}}{-}O{-}\underset{\displaystyle O}{\underset{\|}{P}}(OC_2H_5)_2 \qquad (C_2H_5O)_2PCl$$

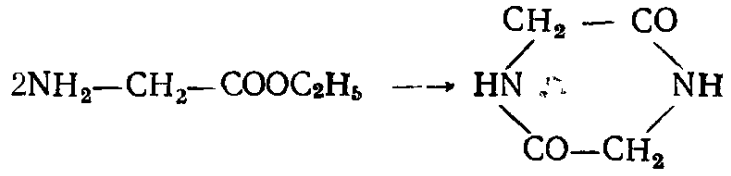
тетраэтилпирофосфит

$$(C_2H_5O)_2\underset{\displaystyle O}{\underset{\|}{P}}{-}(NHCHRCO)_n{-}OH \qquad H(NCHRCO)_n{-}OP(OC_2H_5)_2$$

$$(NH{-}CHR{-}CO)_n$$

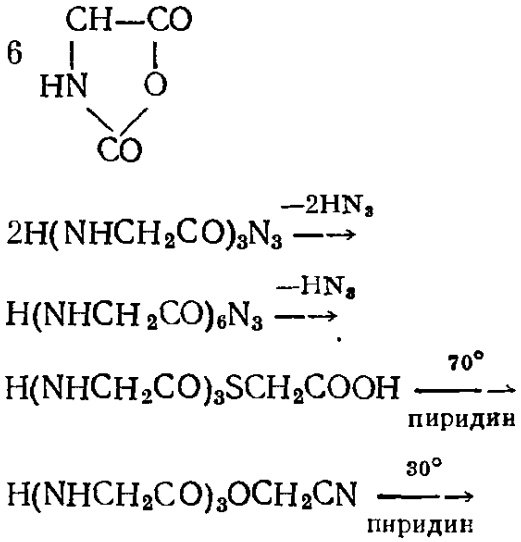
циклопептид

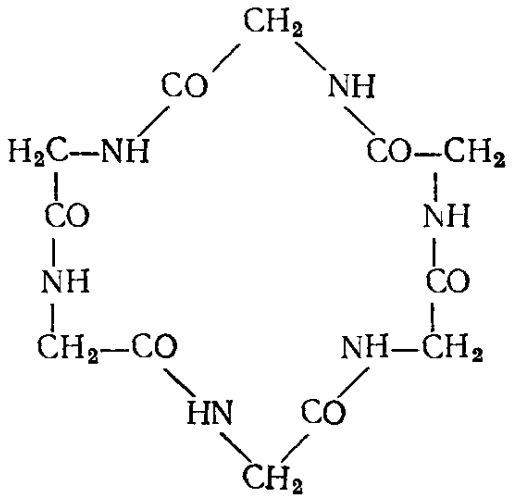
Существенное значение при замыкании циклов имеет пространственное расположение отдельных участков молекулы — так называемая конформация молекулы. Она выражается, например, в том, что пептиды различной длины циклизуются с разной легкостью. Особенно легко циклизуются дипептиды, образуя дикетопиперазины.



Реакция протекает настолько легко, что не возникает необходимости специально активировать карбоксильную группу и проводить реакцию в разбавленных растворах.

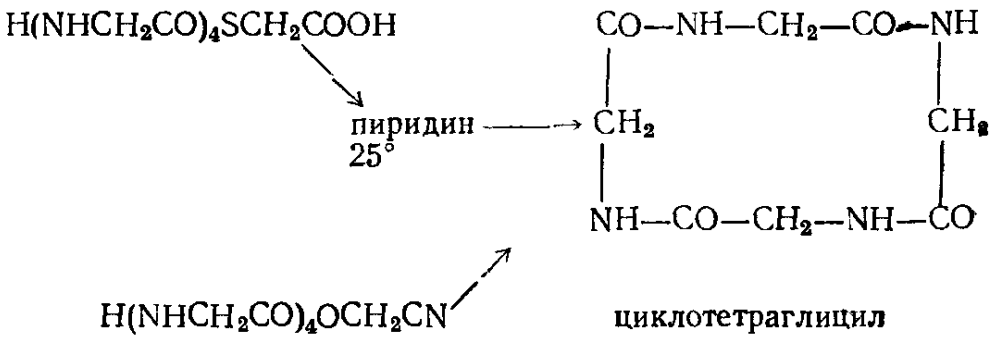
Напротив, трипептиды не образуют циклотрипептидов, а димеризуются с образованием циклогексапептидов, что было показано на большом числе примеров. Так, например, циклогексаглицил образуется при циклизации карбоксиангидрида глицина, азида диглицилглицина, азида пентаглицилглицина, тиогликолевого эфира диглицилглицина и цианметилового эфира диглицилглицина.





циклогексаглицил

Аналогично ведут себя *n*-нитрофениловый эфир глициллейциллейцина и глицилфенилаланилглицин. В то же время тиогликолевый эфир и цианметиловый эфир триглицилглицина образуют в тех же условиях циклотетраглицил



циклотетраглицил

Разное поведение трипептидов и тетрапептидов объясняется различием пространственной структуры молекул. Неустойчивость циклотриглицила обусловлена, вероятно, наличием трех цис-амидных связей. Для циклотетраглицила легко построить пространственную модель с четырьмя транс-амидными связями. Такая система должна быть более устойчивой (см. рис. 5). Самым крупным из синтезированных цикло-

пептидов является грамицидин С, представляющий собою циклодекапептид (см. рис. 6).

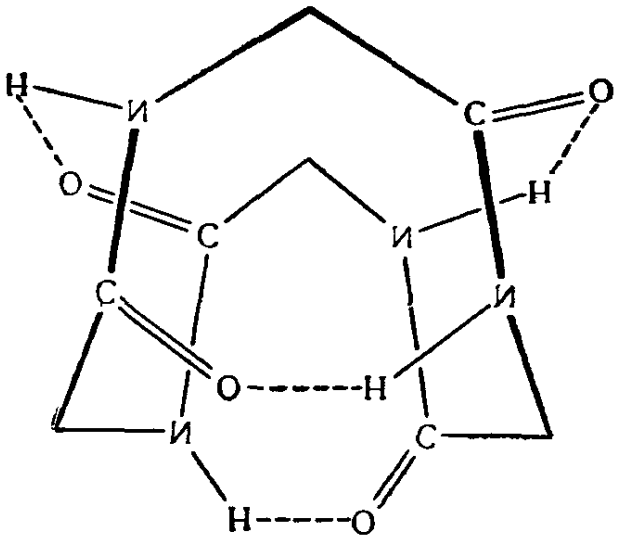


Рис 5 Модель циклотетрапептида

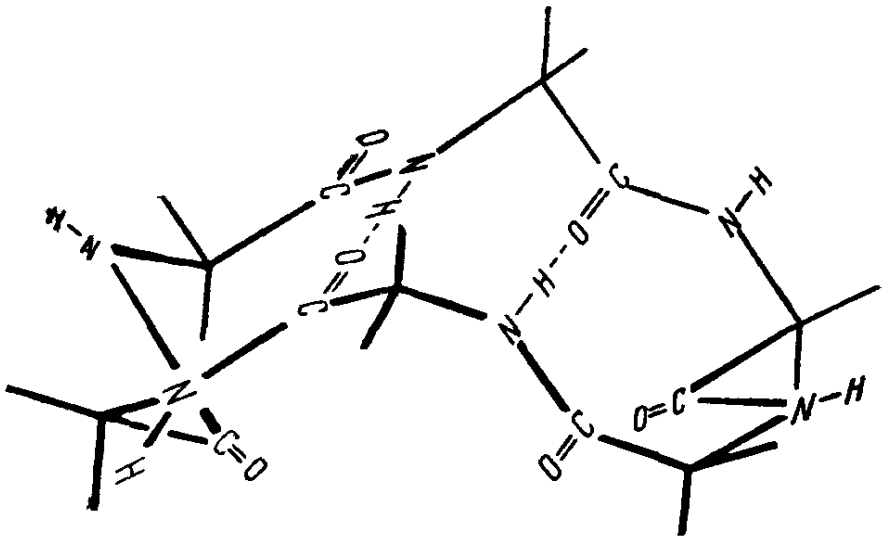


Рис 6 Модель грамицидина С

Его синтез — блестящий пример использования современных методов получения пептидов:

$$\text{Кбз*-лейц-OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2 \xrightarrow{\text{H-фал-OC}_2\text{H}_5} \text{Кбз-лейц-фал-OC}_2\text{H}_5\ [\text{L, D}] \xrightarrow{\text{NaOH}}$$

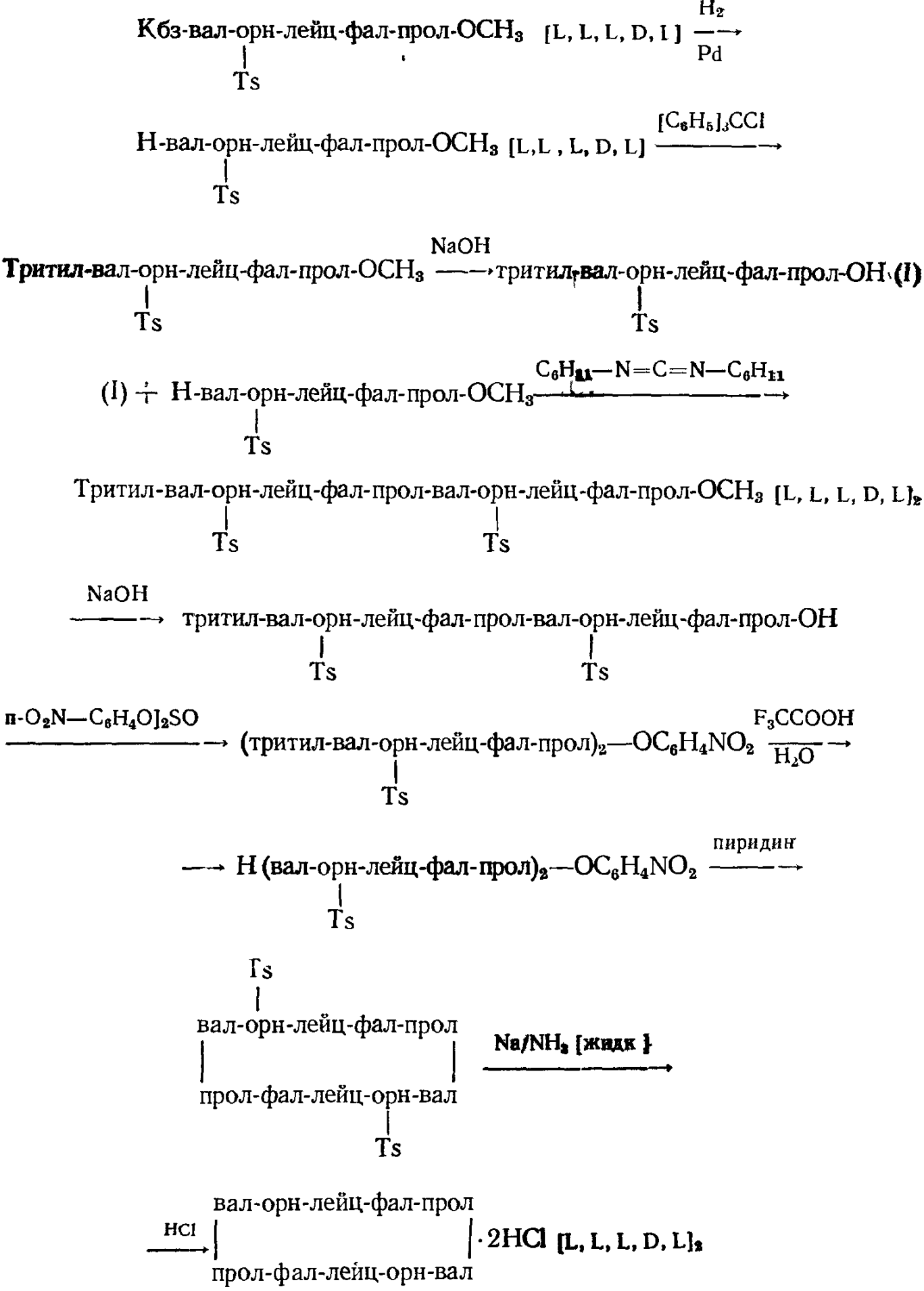
$$\text{Кбз-лейц-фал-OH} \xrightarrow[(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}]{\text{ClCH}_2\text{CN}} \text{Кбз-лейц-фал-OCH}_2\text{CN} \xrightarrow{\text{H-прол-OCH}_3} \longrightarrow$$

$$\text{Кбз-лейц-фал-прол-OCH}_3 \xrightarrow[\text{Pd}]{\text{H}_2} \text{H-лейц-фал-прол-OCH}_3\ [\text{L, D, L}]$$

$$\text{Кбз-вал-OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2 \quad \underset{\text{Ts}}{\text{H-орн-OCH}_3} \quad \underset{\text{Ts}}{\text{Кбз-вал-орн-OCH}_3} \xrightarrow{\text{NH}_2\text{—NH}_2}$$

$$\underset{\text{Ts}}{\text{Кбз-вал-орн-NH}_2\text{—NH}_2} \xrightarrow[\text{HCl}]{\text{NaNO}_2} \underset{\text{Ts}}{\text{Кбз-вал-орн-N}_3} \xrightarrow{\text{H-лейц-фал-прол-OCH}_3} \longrightarrow$$

* Кбз — карбобензокси



Грамицидин С синтезирован Швицером и Зибером в 1956 г.

Примером синтеза гетеродетного циклопептида может служить синтез окситоцина. Ниже приведен синтез, проведенный дю Виньо и Боданским. Окситоцин получен последовательным нанизыванием аминокислотных остатков со стороны карбоксильного конца молекулы с использованием *п*-нитрофениловых эфиров.

1) Кбз-лейц-$OC_6H_4NO_2$ + H-глиц-OC_2H_5 → Кбз-лейц-глиц-OC_2H_5 $\xrightarrow{HBr/CH_3COOH}$ →
лейц.-глиц.-OC_2H_5

2) кбз-прол-$OC_6H_4NO_2$ + H-лейц-глиц-OC_2H_5 →

кбз-прол-лейц-глиц-OC_2H_5 $\xrightarrow[CH_3COOH]{NH_3}$ кбз-прол-лейц-глиц-NH_2 $\xrightarrow{HBr/CH_3COOH}$ →

→ $\boxed{\text{прол-лейц-глиц-}NH_2}$

3) кбз-[S-бензил]цис-$OC_6H_4NO_2$ + прол-лейц-глиц-NH_2 →

кбз-[S-бензил]цис-прол-лейц-глиц-NH_2 $\xrightarrow{HBr/CH_3COOH}$ →

→ $\boxed{NH_2[S\text{-бензил}]\text{цис-прол-лейц-глиц-}NH_2}$

4) кбз-асп[NH_2]-$OC_6H_4NO_2$ + NH_2[S-бензил]-цис-прол-лейц-глиц-NH_2 →

кбз-асп[NH_2]-цис[S-бензил]-прол-лейц-глиц-NH_2 → $\xrightarrow{HBr/CH_3COOH}$ →

→ $\boxed{NH_2\text{асп}[NH_2]\text{-цис[S-бензил]-прол-лейц-глиц-}NH_2}$

5) кбз-глут[NH_2]-$OC_6H_4NO_2$ + NH_2асп[NH_2]-цис[S-бензил]прол-лейц-глиц-NH_2 →

кбз-глут[NH_2]-асп[NH_2]-цис[S-бензил]-прол-лейц-глиц-NH_2 $\xrightarrow{HBr/CH_3COOH}$ →

$\boxed{NH_2\text{-глут}[NH_2]\text{-асп}[NH_2]\text{-цис[S-бензил]-прол-лейц-глиц-}NH_2}$

6) кбз-изл-$OC_6H_4NO_2$ +

+ NH_2-глут[NH_2]-асп[NH_2]-цис[S-бензил]-прол-лейц-глиц-NH_2 →

кбз-изл-глут[NH_2]-асп[NH_2]-цис[S-бензил]-прол-лейц-глиц-NH_2 $\xrightarrow{HBr/CH_3COOH}$ →

$\boxed{NH_2\text{-изл-глут}[NH_2]\text{-асп}[NH_2]\text{-цис[S-бензил]-прол-лейц-глиц-}NH_2}$

7) кбз-тир[O-бензил]$OC_6H_4NO_2$ +

+ NH_2-изл-глут[NH_2]-асп[NH_2]-цис[S-бензил]-прол-лейц-глиц-NH_2 →

кбз-тир[O-бензил]-изл-глут[NH_2]-асп[NH_2]-цис[S-бензил]-прол-лейц-глиц-NH_2

$\xrightarrow{HBr/CH_3COOH}$

$\boxed{NH_2\text{-тир[O-бензил]-изл-глут}[NH_2]\text{-асп}[NH_2]\text{-цис[S-бензил]-прол-лейц-глиц-}NH_2}$

8) кбз-цис-[S-бензил]-$OC_6H_4NO_2$ + NH_2-тир- [O-бензил] -изл-глут[NH_2]-

-асп[NH_2] -цис[S-бензил]-прол-лейц-глиц-NH_2 →

→Кбз- цис[S-бензил-] - тир[O- бензил]- изл- глут[NH_2]- асп[NH_2]- цис[S- бензил]

прол-лейц-глиц-NH_2 $\xrightarrow{Na/NH_3}$

[NH_2-цис[SH]-тир-изл-глут[NH_2]-асп[NH_2]-цис[SH]-прол-лейц-глиц-NH_2]

$\xrightarrow{O_2}$

цис-тир-изл-глут[NH_2]-асп[NH_2]-цис-прол-лейц-глиц-NH_2

S ——————————— S

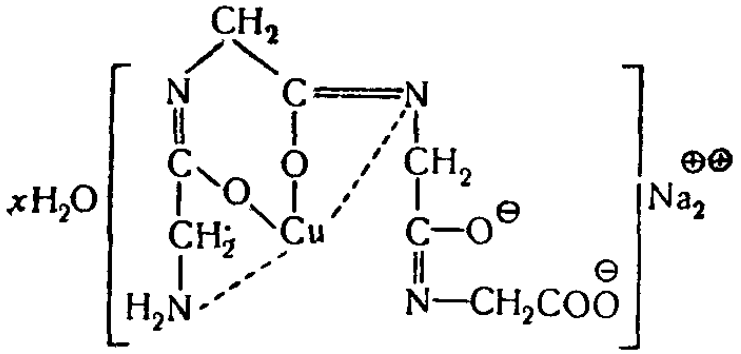
окситоцин [L, L, L, L, L, L, L, L, L]

Глава 2

РЕАКЦИИ ПЕПТИДОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ СТРОЕНИЯ

Реакции пептидов

Пептиды дают все реакции, которые характерны для аминокислот, с теми, однако, коррективами, которые вносят увеличение молекулярного веса, увеличение расстояния между аминной и карбоксильной группами и главное — появление новой функциональной группы — амидной. Специфической для пептидов является биуретовая реакция: с солями меди в щелочной среде пептиды дают окрашенные комплексы, например,

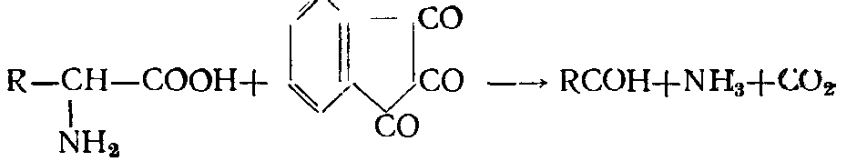


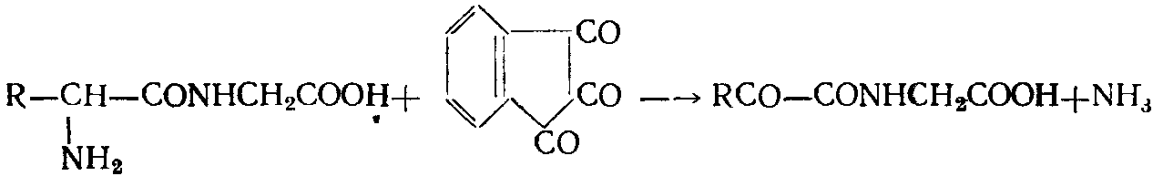
Дипептиды образуют комплексы синего цвета с максимумом поглощения ~610 mμ в ультрафиолете, трипептиды — комплексы фиолетового цвета, с максимумом поглощения ~580 mμ и тетрапептиды и пептиды с более длинной цепочкой — розовые, максимум поглощения ~505 mμ.

Окраска комплекса зависит также и от тех аминокислотных остатков, которые входят в состав пептида. Так, оксиаминокислоты смещают спектр поглощения в сторону более коротких волн. Пептиды, образованные по γ-карбоксильной группе глутаминовой кислоты, не дают биуретовой реакции.

Биуретовая реакция является не только качественной, но и количественной. Она позволяет следить за ходом гидролиза белков и устанавливать содержание пептидов в смесях с различной длиной цепи. Значительный вклад в изучение биуретовой реакции и способов ее использования для определения строения белков внесли Н. И. Гаврилов, М. И. Плехан и К. Т. Порошин.

Пептиды дают нингидринную реакцию, но в отличие от аминокислот, при этом не выделяется CO_2.



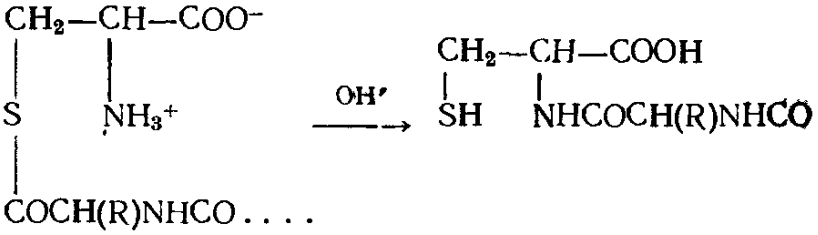


По количеству выделившейся CO_2 можно определить содержание аминокислот в смеси, а по разности между общим азотом смеси и азотом аминокислот — содержание пептидов.

Пептидная NH—CO-группа не реагирует с нингидрином, но ее можно обнаружить так называемой бензидинной реакцией. При действии на соединения, содержащие NH_2 и NH-группы, газообразным хлором образуются N-хлорзамещенные производные, которые вытесняют иод из иодистого калия и при последующей обработке бензидином или толидином окрашиваются в темно-синий цвет. Реакция мало специфична.

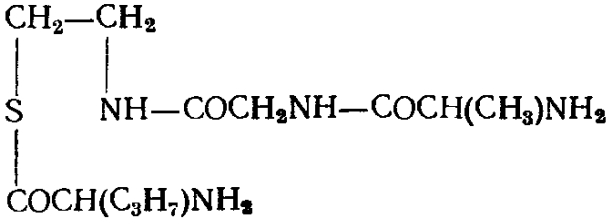
До недавнего времени считалось, что пептидная NH-CO-группа относительно инертна. Вследствие оттягивания электронов на кислород атом азота становится малоспособным к нуклеофильным реакциям, а водород — малоподвижным. Исследование пептидов и аминоацильных производных аминокислот, содержащих дополнительные функциональные группы, особенно таких, у которых они расположены в смежном положении, открыли новую страницу в области возможных превращений пептидов. Это относится в первую очередь к пептидам, содержащим цистеин и оксиаминокислоты, а также к пептидам дикарбоновых аминокислот.

И. Л. Кнунянц с сотрудниками нашли, что пептиды цистеина, у которых аминокислотный остаток расположен у серы, так называемые S-пептиды, способны в слабощелочной среде изомеризоваться в N-пептиды.

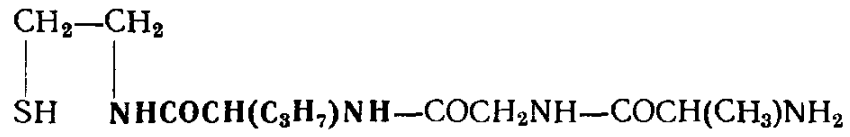


Реакция протекает настолько легко, что авторы предложили использовать ее в качестве одного из методов синтеза цистеиновых пептидов.

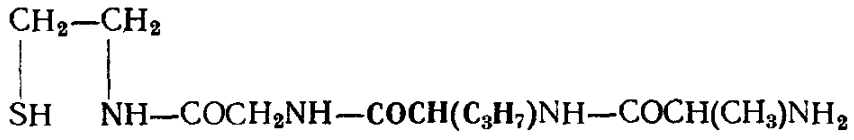
Виланд изучал эту реакцию на более сложных моделях и пришел к заключению, что перегруппировка аминоацильного остатка с серы на азот может проходить не только на соседнюю аминную группу, но и на более отдаленную. В качестве примера для изучения им был выбран S-валил-N-аланилглицилцистеамид.



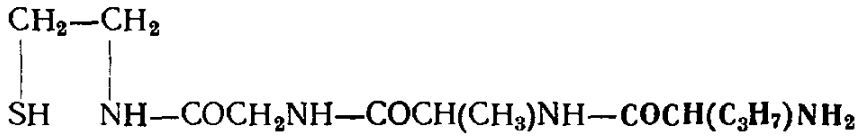
Под действием щелочи он превращается в следующие тетрапептиды



аланил-глицил-**валил**-цистеамид (I)



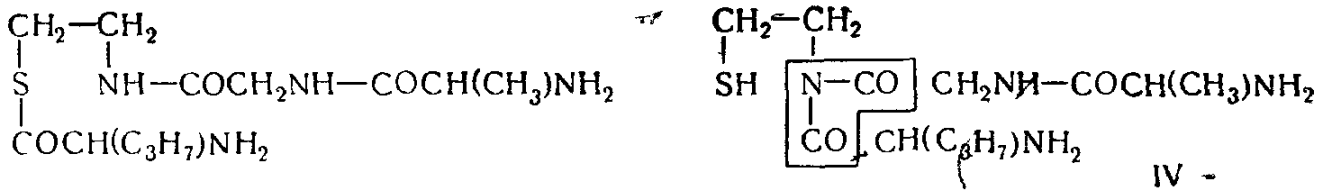
аланил-валил-глицил-цистеамид (II)



валил-аланил-глицил-цистеамид (III)

Таким образом, валиновый остаток может перемещаться в три разных положения по отношению к цистеамиду.

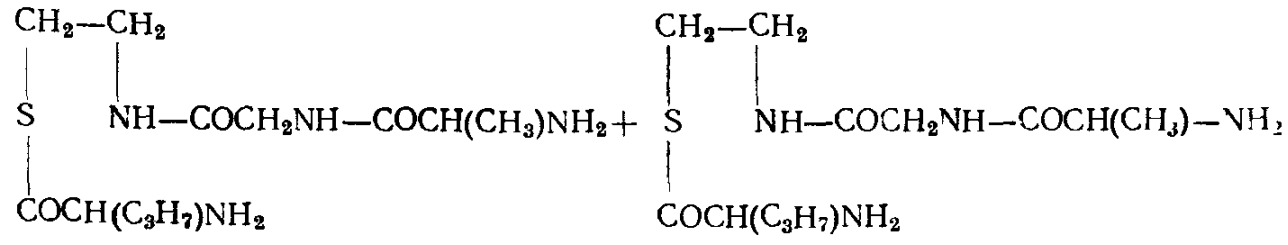
Виланд вскрыл и механизм этой реакции. Как оказалось, сначала образуется нестойкое промежуточное диаминоацильное производное (IV) (по амидной группе цистеамида; S-валиновый остаток перемещается на амидную группу цистеамида),



IV

которое может претерпевать следующие превращения (см. схему стр. 507): а) остаток аланилглицина может мигрировать на аминную группу валила с образованием аланилглицилвалилцистеамида (I); б) валильный остаток может мигрировать на следующую пептидную связь с образованием нового диаминоацильного производного цистеамида аланил (N-валил)-глицилцистеамид (V). Последний в свою очередь с равной степенью вероятности может образовывать аланил-валил-глицил-цистеамид (II) и валил-аланил-глицилцистеамид (III).

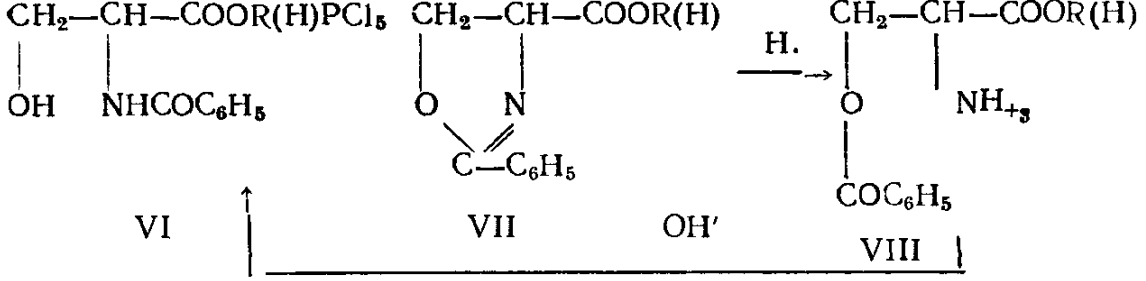
Виланд показал также, что S-производное пептида цистеамида может реагировать с аминной группой другой молекулы (межмолекулярно) с образованием валил-валина.



валил-валин

Не менее интересны межмолекулярные перегруппировки пептидов β-оксиаминокислот.

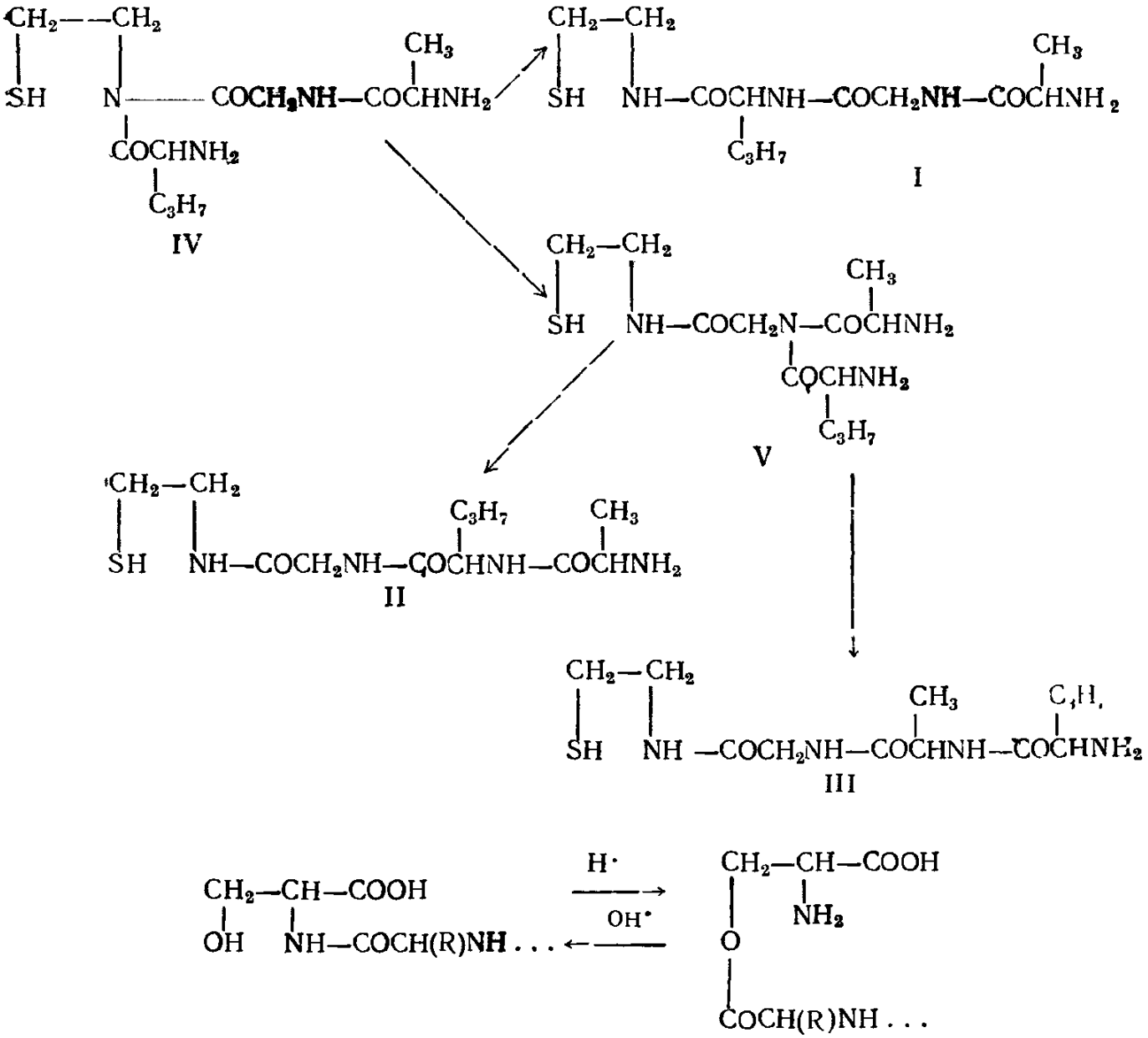
Еще в 1923 г. Бергман показал, что бензоилэтаноламин и эфир бензоилсерина (VI) под действием PCl_5 или $SOCl_2$ циклизуются с образованием эфира оксазолинкарбоновой кислоты (VII), который при обработке слабыми кислотами превращается в О-бензоилпроизводное серина (VIII) или этаноламина.



Последнее соединение (VIII) представляет собой эфир бензойной кислоты, у которой спиртовым остатком является оксиаминокислота. О-бензоильные производные аминоспиртов и оксиаминокислот устойчивы только в кислой среде. При подщелачивании они спонтанно превращаются в исходные N-бензоильные производные.

Дальнейшие исследования показали, что аналогичные процессы проходят и с пептидами β-оксиаминокислот с образованием О-пептидов (М. М. Ботвиник, С. М. Аваева, Э. А. Мистрюков). Бергман предполагал, что такие перегруппировки могут иметь место и в природе.

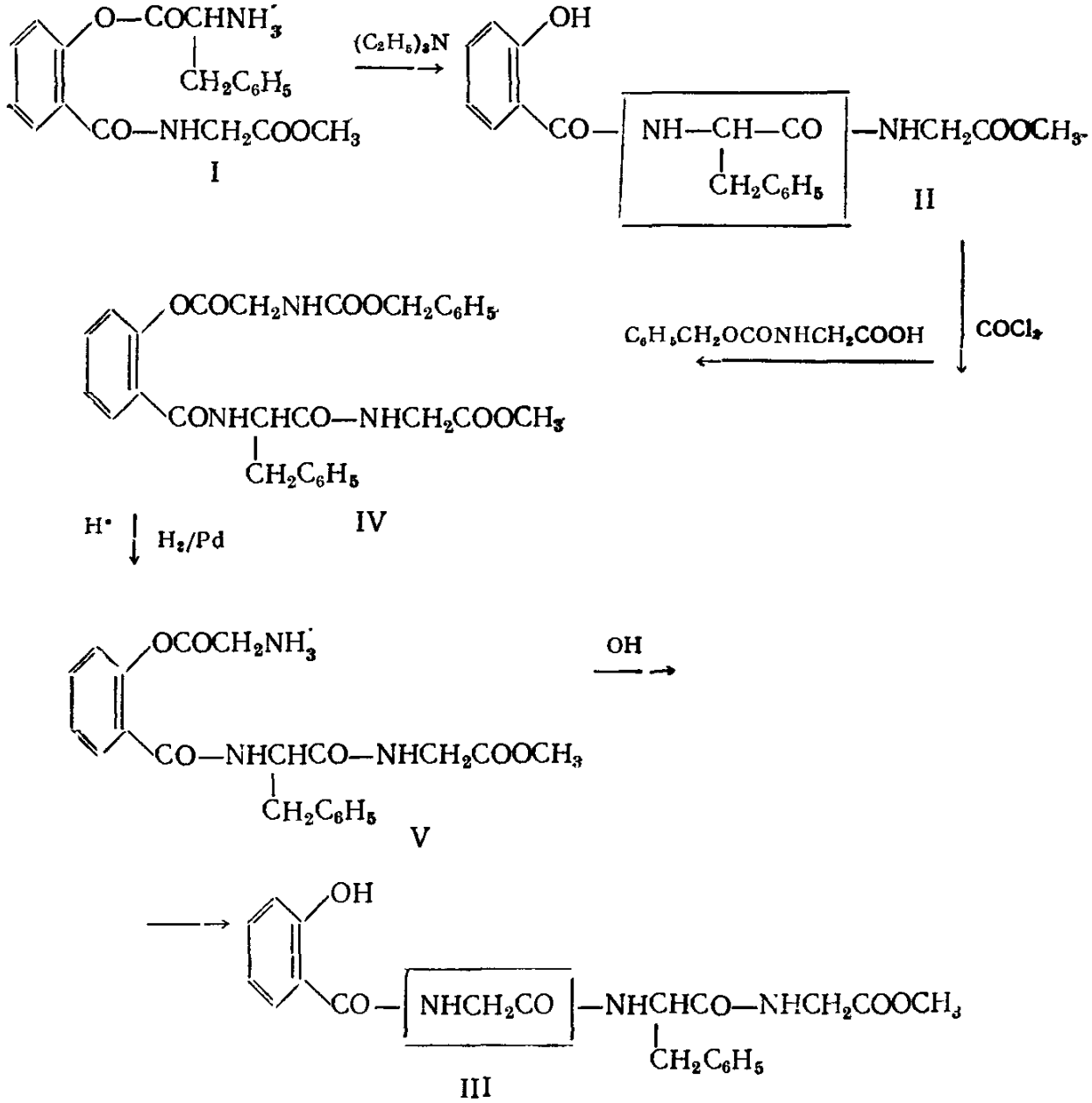
Схема
перегруппировки S-пептида



Эти реакции могут происходить и в более мягких условиях, например, в условиях гидролиза белковой молекулы (Денюэль). Они были обнаружены и на белках Эллиотом.

Новую внутримолекулярную перегруппировку пептидов β-оксиаминокислот недавно открыл Бреннер.

Если обработать метиловый эфир (О-фенилаланил)-салицилоилглицина (I) триэтиламином, то фенилаланиновый остаток, связанный с фенольным гидроксилом, внедряется в пептидную связь, образуя новый пептид — метиловый эфир салицилоилфенилаланилглицина (II). Его можно снова превратить в О-аминоацильное производное, например, в метиловый эфир (О-глицил)-салицилоилфенилаланилглицина (III). Для этого метиловый эфир салицилоилфенилаланилглицина последовательно обрабатывают фосгеном и карбобензоксиглицином. Образующийся метиловый эфир (О-карбобензоксиглицил)-салицилоилфенилаланилглицина (IV) подвергают гидрогенолизу над палладиевой чернью в кислой среде и получают соль метилового эфира (О-глицил)-салицилоилфенилаланилглицина (V). В щелочной среде остаток глицина внедряется в пептидную связь, образованную салициловой кислотой и фенилаланиновым остатком. Возникает салицилоильное производное трипептида, а именно метиловый эфир салицилоилглицилфенилаланилглицина (III).



У производных серина и треонина подобная реакция протекает в более жестких условиях — под действием третичного бутилата натрия в третичном бутаноле.

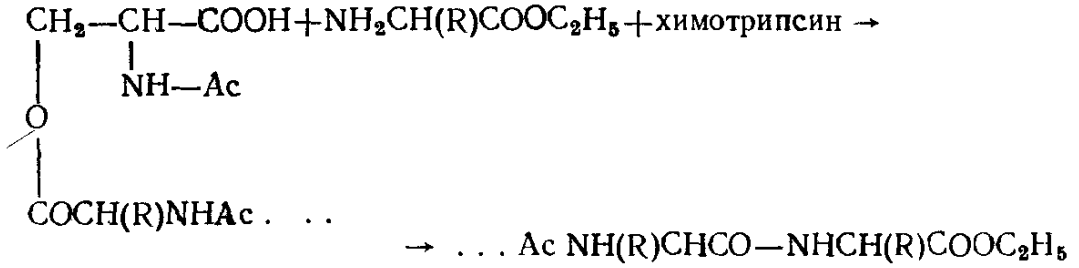
Таким путем были превращены в N-пептиды следующие О-пептиды серина и треонина:

Амид О-глицил-N-бензоилсериила → Амид N-бензоилсерилглицина
Амид О-глицил-N-бензоилглицилсерина → Амид N-бензоилглицилсерилглицина
Амид О-глицил-N-бензоилтреониила → Амид N-бензоилтреонилглицина

Бреннер назвал открытую им реакцию реакцией внедрения. В отличие от обычного пути образования пептидной цепи путем нанизывания аминокислотных остатков последовательно к аминной или карбоксильной группе пептида в описанной выше реакции происходит внедрение аминокислотного остатка в пептидную группу CO—NH.

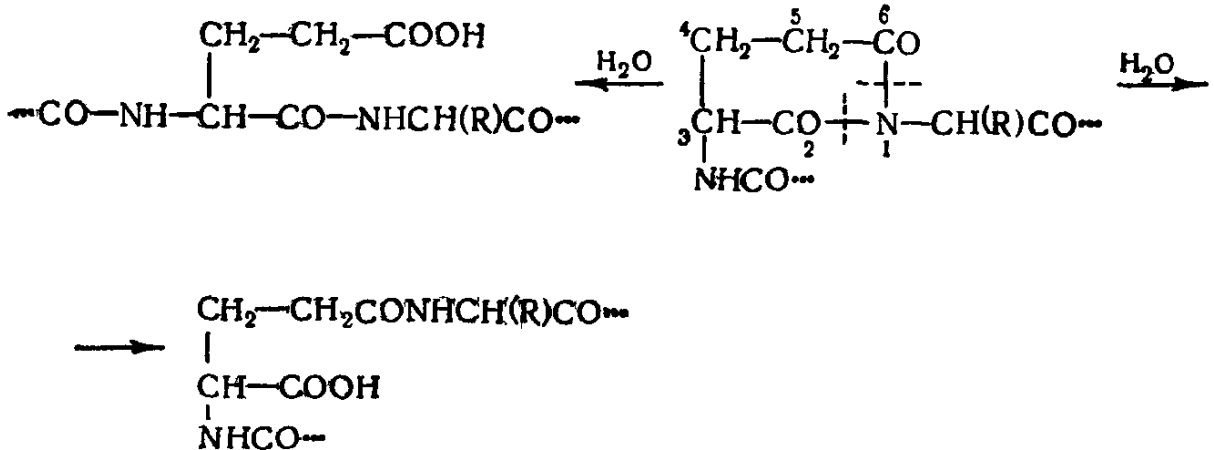
Реакция внедрения по данным Бреннера не ограничивается пептидами β-оксиаминокислот. Им было найдено, что амид глицилфенилаланина способен в жестких щелочных условиях изомеризоваться в амид фенилаланилглицина. Этот последний в свою очередь также способен превращаться в амид глицилфенилаланина.

О-пептиды β-оксиаминокислот, подобно S-пептидам цистеина, реагируют под действием ферментов с аминокислотами и межмолекулярно.



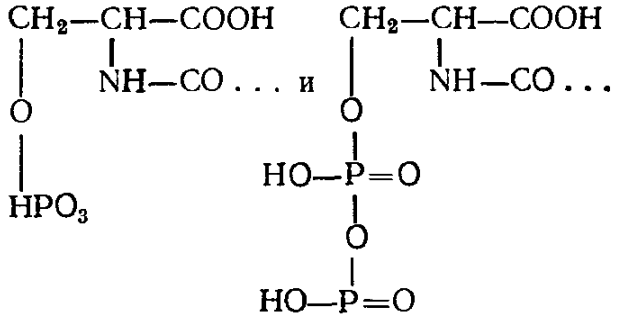
Таким образом, для S-пептидов характерны реакции миграции S→N внутримолекулярные и межмолекулярные, для пептидов β-оксиаминокислот N→O, O→N внутримолекулярные и O→N межмолекулярные. Кроме того, для пептидов β-оксиаминокислот характерна реакция внедрения. Все изложенное позволяет заключить, что S-пептиды цистеина и О-пептиды β-оксиаминокислот представляют собой богатые энергией вещества, способные служить промежуточными соединениями в синтезе пептидных связей, подобно описанным ранее ангидридам аминокислот. К таким же богатым энергией веществам следует отнести N-ацильные производные дикетопиперазинов и N-имидазольные производные гистидина. Весьма возможно, что все они принимают какое-то участие в синтезе пептидов в живой клетке, являясь переносчиками аминоацильных остатков.

Третий тип превращений обнаружен у пептидов глутаминовой кислоты: α-пептиды глутаминовой кислоты при нагревании легко отщепляют воду с образованием пиперидиндиона 2,6. В водной среде последние могут раскрываться по связи 1,6 с образованием исходного пептида или по связи 1,2 с образованием нового γ-пептида глутаминовой кислоты.



Эта реакция особенно интересна тем, что в природе из капсюльной оболочки бактерий [*Bacillus subtilis* и *Bacillus anthracis*] выделен γ-полипептид D-глутаминовой кислоты.

Наконец, за последнее время возрос интерес еще и к производным пептидов β-оксиаминокислот, образованных с фосфорной кислотой.



О-фосфосериновые N-пептиды О-пирофосфосериновые N-пептиды XIV

Такие соединения выделены из белков, в частности, из казеина, белка яичного желтка — вителлина и т. д. Предполагают, что они принимают участие в обмене.

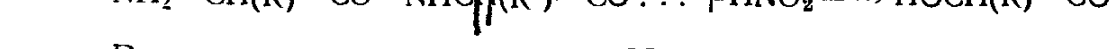
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ ПЕПТИДОВ

Более существенными являются реакции, позволяющие определить строение пептидов, установление которого предсгавляет собою важную ступень в выяснении строения белков.

Изучение строения пептида обычно начинают с определения его аминокислотного состава и длины пептидной цепи. Первое проводят полным гидролизом пептида и количественным определением аминокислот, второе — определением отношения аминного азота к общему $\frac{NH_2}{N}$, которое у дипептидов равно 50%, у трипептидов — 33,33%, у тетрапептидов 25% и т. д. Если пептиды содержат основные аминокислоты или триптофан, то вносят соответствующие поправки на азот, не принимающий участия в образовании пептидной цепи, например, ε-аминный азот лизина, имидазольный — гистидина и т. д.

Следующей задачей является установление последовательности аминокислотных остатков в пептидной цепи. Определение начинают с идентификации концевых аминокислотных остатков.

Определение концевых N-аминных групп разработано достаточно детально. Самым простым, хотя и не совершенным, является метод дезаминирования пептида азотистой кислотой, хлористым нитрозилом, или же окисления бромноватистой кислотой или нингидрином. В результате аминогруппа заменяется гидроксильной или карбонильной и после гидролиза пептида и разделения аминокислот на хроматограмме одна аминокислота исчезает.

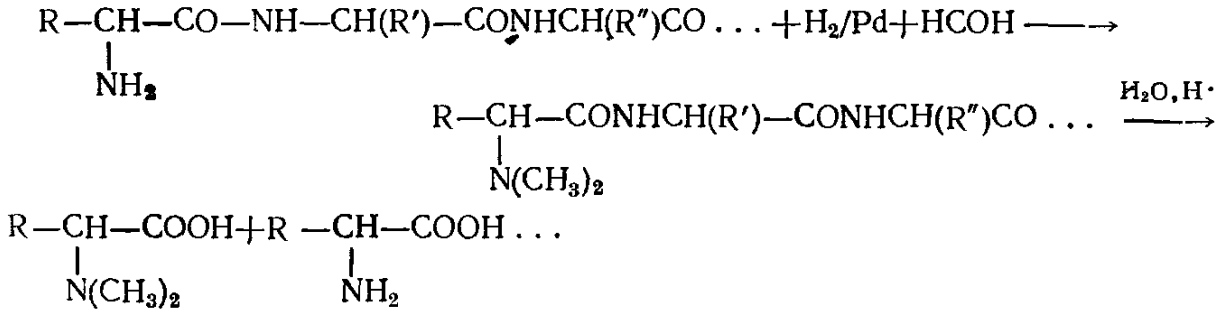


Ряд методов определения N-концевых аминокислот основан на алкилировании или ацилировании пептида и последующем гидролизе. В гидролизате концевая аминокислота обнаруживается в виде алкильного или ацильного производного. Наиболее важным и детально разработанным методом является метод динитрофенилирования белка, предложенный в 1945 г. Зангером и использованный им при установлении строения инсулина.

Пептид (или белок) обрабатывают 2,4-динитрофторбензолом в слабо щелочной среде (pH 9) при 20—25°. Образующиеся 2,4-динитрофенильные производные не распадаются во время кислотного гидролиза

пептидов и белков (исключение составляют динитрофенильные производные глицина, цистина, пролина и триптофана). Динитрофенильные производные аминокислот представляют собою кристаллические соединения, окрашенные в желтый цвет. Вследствие оттягивания электронов динитрофенилированным бензольным кольцом они обладают ясно выраженными кислыми свойствами, легко разделяются электрофорезом и хроматографией и определяются спектрофотометрически.

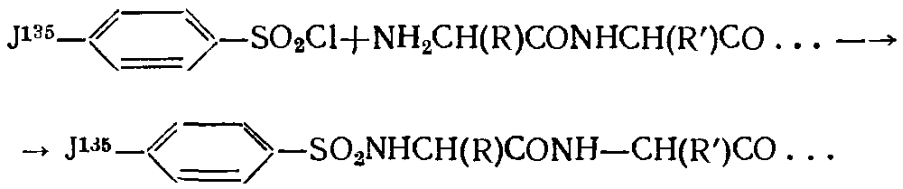
Инграм предложил использовать для определения концевых аминных групп реакцию восстановительного метилирования по Бауману. При действии на пептиды формальдегидом и одновременном восстановлении над палладием образуются N-диметильные производные пептидов, гидролизующиеся до диметиламинокислоты и аминокислот.



Диметиламинокислоты не реагируют с нингидрином и их проявляют орцином, тимоловым синим и т. д.

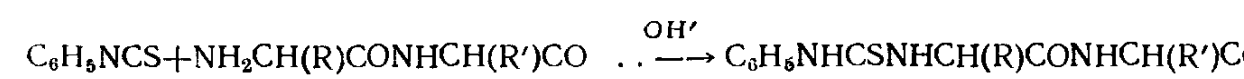
Вследствие тенденции метильных групп к подаче электронов заряд на азоте диметиламинокислот несколько повышен, амфотерные свойства их выражены столь же ярко, как и у самих аминокислот. Разделение их методами электрофореза и хроматографией менее четко, чем разделение динитрофенильных производных аминокислот. Диметильные производные аминокислот не имеют широкого применения при исследованиях строения пептидов.

Метод ацилирования белков, широко применявшийся в начале столетия, сейчас потерял свое значение, так как большинство ацильных производных гидролизуются аналогично пептидной связи. Исключение составляет остаток *n*-иодбензолсульфокислоты (пипсил), который связывается с аминогруппой прочнее, чем динитрофенильный остаток. Обычно применяют пипсилхлорид, содержащий иод ^{135}.

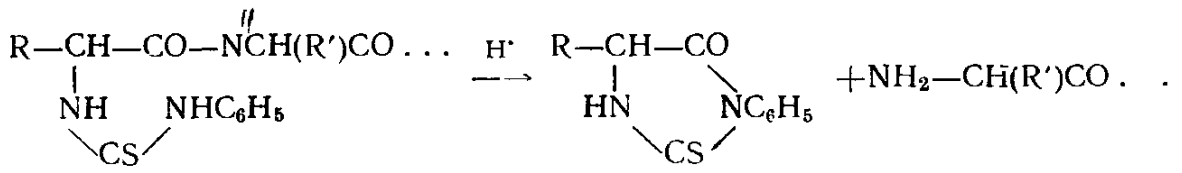


Пипсиламинокислоты можно отделить хроматографически, противоточным распределением или определить, пользуясь радиохроматограммой. Пипсильную защиту полезно применять в тех случаях, когда N-концевым остатком являются глицин, цистин, пролин или триптофан.

Ряд методов основан на получении таких производных пептидов, которые в кислой среде распадаются с образованием циклических соединений, отщепляющихся от пептида. К ним относятся изоцианатные, тиоизоцианатные, карбаминовые и аналогичные производные. Наиболее важным из этих реактивов является фенилизоцианат и фенилизотиоцианат, использовать который предложил Эдман. При действии на пептид, например, фенилизотиоцианата в щелочной среде образуется фенилизотиоциановое производное.



При осторожном нагревании с HCl в нитрометане оно циклизуется с распадом на фенилтиогидантоин и пептид.

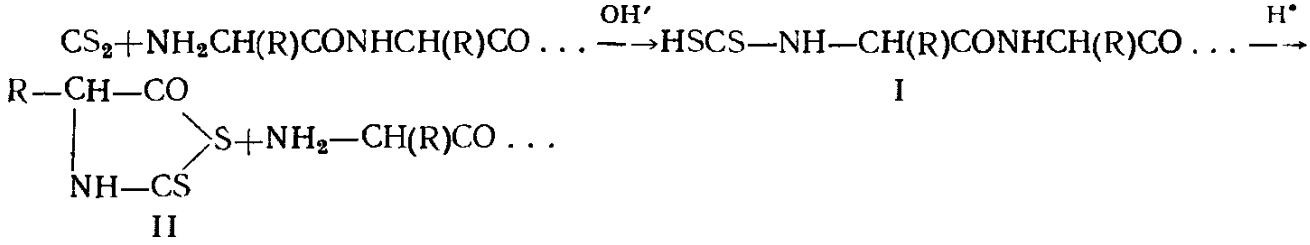


который извлекают в органический растворитель и определяют как таковой или гидролизуют до аминокислоты.

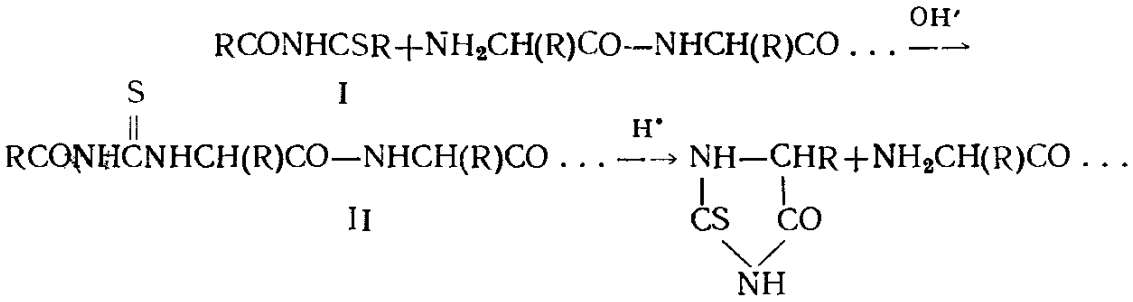
Оставшийся пептид можно подвергнуть вторичной обработке фенилизотиоцианатом и отщепить следующий аминокислотный остаток. Таким образом, этот метод пригоден также и для установления последовательности аминокислотных остатков в пептидах. Френкель-Конрат видоизменил метод для микроопределения аминокислотных остатков в виде фенилтиогидантоинов на бумаге и определил с его помощью первые 8 аминокислот в кортикотропине.

Остальные приведенные ниже методы, основанные на образовании циклических производных, имеют ограниченное значение.

а. Пептид обрабатывают сероуглеродом и получают дитиокарбаминовое производное (I), которое в кислой среде при комнатной температуре расщепляется на 2-тио-5-тиазолидон и пептид. Тиазолидон (II) можно извлечь органическим растворителем.



б. При реакции пептида с эфиром ацилтиокарбаминовой кислоты (I) получают N-ацилтиокарбаминовое производное пептида (II); оно распадается в кислой среде на тиогидантоин и пептид, содержащий, также как и в описанных выше случаях, на один аминокислотный остаток меньше, чем исходный пептид.



Большое значение приобрели в последнее время ферментативные методы, которые позволяют не только устанавливать N- и C-концевые аминокислотные остатки, но и чередование их в пептиде и белке.

Для определения N-концевой аминокислоты пользуются лейцинаминопептидазой, выделяемой из слизистой оболочки кишечника. Лейцинаминопептидаза расщепляет экзопептидную связь, образованную аминокислотным остатком, содержащим свободную аминогруппу. При этом происходит ступенчатая деградация пептида.



Методы определения С-концевых аминокислот пептидов и белков менее разработаны. Следует остановиться на трех способах.

1. Селективное восстановление карбоксильной группы. При обработке пептида или его эфира мягкими восстановителями $LiAlH_4$, $LiBH_4$, AlH_3 карбоксильная группа восстанавливается до спиртовой. Восстановленный пептид подвергают гидролизу и в гидролизате наряду с аминокислотами обнаруживают аминоспирт, соответствующий концевой С-аминокислоте. Его можно извлечь в органический растворитель и определить хроматографически или превратить в пикрат или динитрофенильное производное:

$$\ldots NHCH(R)CO{-}NHCH(R)CO{-}NHCH(R)COOH + LiAlH_4 \rightarrow$$

$$\ldots NHCH(R)CO{-}NHCH(R)CO{-}NHCH(R)CH_2OH \xrightarrow{H^+}$$

$$\ldots NH_2CH(R)COOH + NH_2CH(R)COOH + NH_2CH(R)CH_2OH$$

Детальное изучение реакции показало, что $LiAlH_4$ может при длительном воздействии и более жестких условиях восстанавливать и пептидную связь.

2. Гидразинолиз — метод Акабори.

Амиды кислот реагируют с гидразином, образуя гидразиды кислот и аммиак.

$$RCH_2{-}CONH_2 + NH_2{-}NH_2 \rightarrow RCH_2{-}CONHNH_2 + NH_3$$

Пептиды реагируют также пептидной группой с образованием гидразидов аминокислот. Не вступает в реакцию только С-концевая аминокислота, поскольку карбоксильная группа не реагирует с гидразином.

$$NH_2{-}\underset{\displaystyle R}{CH}{-}CONH{-}\underset{\displaystyle R'}{CH}{-}CONH{-}\underset{\displaystyle R''}{CH}{-}CONH{-}\underset{\displaystyle R'''}{CH}{-}COOH + NH_2{-}NH_2 \rightarrow$$

$$NH_2{-}\underset{\displaystyle R}{CH}{-}CONH_2 + NH_2{-}NH{-}\underset{\displaystyle R'}{CH}{-}CONHNH_2 + NH_2{-}\underset{\displaystyle R''}{CH}{-}CONHNH_2 + NH_2{-}\underset{\displaystyle R'''}{CH}{-}COOH$$

Для отделения аминокислоты от гидразидов аминокислот смесь обрабатывают альдегидом, который образует с гидразидами труднорастворимые гидразоны. С-концевую аминокислоту определяют хроматографически. Этим методом не всегда удается получить хорошие результаты. Реакция проводится в сравнительно жестких условиях, при которых частично распадаются цистин, аспарагин, глутамин и аргинин. Все же этот метод является одним из широко применяемых.

3. Ферментативное расщепление пептида с С-конца.

Для этого пользуются карбоксипептидазой, выделяемой из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Карбоксипептидаза расщепляет экзо-пептидную связь, образованную аминокислотным остатком со свободной карбоксильной группой.

$$\ldots NHCH(R)CONHCH(R)CO{-}NHCH(R)CO{-}NHCH(R)COOH \xrightarrow{\text{карбоксипептидаза}}$$

$$\ldots NHCH(R)CO{-}NHCH(R)CONHCH(R)COOH + NH_2CH(R)COOH$$

Из всех методов определения С-концевых аминокислот этот метод самый специфичный. Пользуясь карбоксипептидазой также, как при действии аминопептидазой, можно определять не только С-концевую аминокислоту, но и последовательно отщеплять аминокислотные остатки с С-конца пептида. Реакция обрывается, когда в пептидной цепи встречается пролин, так как карбоксипептидаза не гидролизует связь CO—N.

Таким образом ферментативные методы дают возможность не только определять N и С-концевые аминокислоты, но и устанавливать порядок чередования аминокислотных остатков на N- и С-концах пептидов.

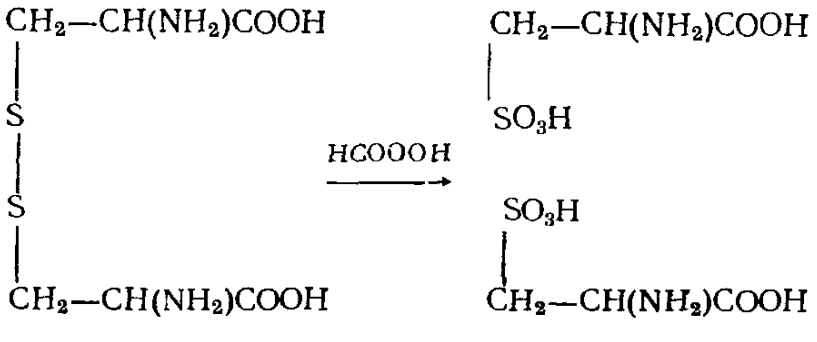
Следующей задачей при определении строения пептидов является установление характера связи и последовательности аминокислотных остатков в молекуле пептида или белка. Эта задача, трудно выполнимая в настоящее время для белков с большим молекулярным весом, облегчается тем, что в природе встречается значительное число относительно низкомолекулярных соединений, представляющих собою пептиды. Виланд предлагает различать три группы природных пептидов: олигопептиды, состоящие из 2—10 аминокислот, полипептиды, состоящие из 10—100 аминокислот, и макропептиды, к которым относятся собственно белки. Изучение природных пептидов представляет собой важный этап в подходе к изучению строения белка. Исследование обычно начинают с определения числа цепей, входящих в состав объекта изучения. Для этого пользуются одним из ранее приведенных методов, например динитрофенилированием, действием азотистой кислоты или аминопептидазы для определения N-концевой аминокислоты и восстановлением, гидразинолизом или действием карбоксипептидазы для определения С-концевого остатка (см. стр. 510 и далее).

Самый совершенный метод установления последовательности аминокислот в пептиде заключался бы в постепенном отщеплении их от полипептидной цепи, подобно тому, как синтез пептида проводят последовательным нанизыванием аминокислотных остатков.

Для этой цели в настоящее время можно было бы воспользоваться методом Эдмана — последовательным отщеплением аминокислот в виде фенилтиогидантоинов (см. стр. 511). Широко применяют также карбоксипептидазу и аминопептидазу.

Однако эти методы применяют в основном для определения строения сравнительно коротких пептидов, получаемых в результате частичного гидролиза. Недавно было произведено последовательное отщепление аминокислотных остатков у папаина с помощью лейцинаминопептидазы. Однако основным путем и до настоящего времени является частичное расщепление пептида или белка на отдельные пептиды и определение их строения. Из сопоставления полученных данных делается заключение о строении соединения. При этом исследователь напоминает археолога, который воссоздает здание по найденным обломкам. Преимущество исследователя в сравнении с археологом заключается в том, что с помощью синтеза он может проверить справедливость своих заключений.

Частичный гидролиз белка проводят кислотами или ферментами. Часто оказывается целесообразным начинать гидролиз с разрушения дисульфидных мостиков цистина. Зангер предложил обрабатывать белки надмуравьиной кислотой, в результате чего дисульфидная группа окисляется количественно до сульфогруппы и в гидролизате вместо цистина обнаруживается цистеиновая кислота.



Если белок состоял из нескольких цепей, связанных дисульфидными мостиками, то такая обработка позволяет разделить белки на отдельные цепи, а затем исследовать каждую из цепей самостоятельно. Этим методом можно также определить, расположены ли дисульфидные мостики внутри одной цепи или между несколькими цепями. При окислении в первом случае молекулярный вес соединения остается неизменным. Метод был впервые применен Зангером для исследования инсулина.

Наряду с цистеином надмуравьиная кислота окисляет триптофан и метионин. Метионин окисляется до сульфона, продукты окисления триптофана не установлены (см. стр. 474).

В качестве окислителей можно применять также бромную воду и надуксусную кислоту. Требования, предъявляемые к гидролизующим агентам, при частичном гидролизе белков более строгие, чем при их полном расщеплении до аминокислот. Так же, как при полном гидролизе, эти агенты должны вызывать возможно меньшее число побочных реакций. Гидролиз должен быть по возможности специфичным, т. е. расщеплять пептидные связи избирательно. Гидролизующий агент не должен вызывать вторичных процессов, например, синтеза пептидов или образования циклических соединений. Кислотный гидролиз обычно проводят при 20—37° 11—12*N* HCl или 10*N* H_2SO_4, часто с добавлением CH_3COOH в соотношении 3 : 1. Скорость расщепления пептидных связей в значительной степени зависит от аминокислотных остатков. Легче всего разрываются сериловые и глициловые связи, а также пептидные связи, образованные аспарагиновой и глутаминовой кислотами. Дипептиды гидролизуются труднее, чем полипептиды с более длинной цепью, и они обычно накапливаются в гидролизате.

Ниже приводятся данные о скорости гидролиза некоторых пептидов в смеси 10*N* HCl и ледяной уксусной кислоты. За единицу принята скорость расщепления глицил-глицина.

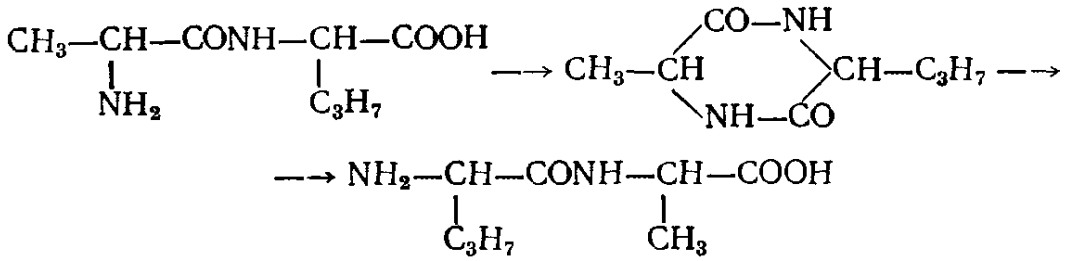
Глицил-глицин	1
Глицил-L-аланин	0,62
L-Аланилглицин	0,62
Глицил-L-лейцин	0,40
Глицил-L-триптофан	0,35
L-Лейцилглицин	0,31
L-Лейциллейцин	0,048
L-Лейцил-L-триптофан	0,041
L-Валилглицин	0,015
Глицил-глицил-глицин	8

Из таблицы следует, что наиболее устойчивыми пептидами являются пептиды валина и лейцина. Устойчивость их пытаются объяснить пространственными затруднениями, вызываемыми радикалом.

Относительная легкость отщепления серина вызвана, по-видимому, миграцией пептидного остатка от азота к кислороду; образующаяся в результате эфирная связь гидролизуется гораздо легче амидной (см. стр. 506). Устойчивость дипептидов обусловлена, вероятно, близостью двух полярных групп — аминной и карбоксильной, затрудняющих подход иона водорода к CO-группе.

В разбавленных кислотах, например, в 0,1 *N*HCl или щавелевой и уксусной кислотах гидролиз протекает несколько по иному, легче всего отщепляется аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Иногда наблюдается вторичная циклизация пептидов. Образовавшийся дикетопиперазин может распасться по другой амидной группе, что приводит к не-

правильным представлениям о последовательности аминокислотных остатков в цепи. Такое наблюдение было сделано при гидролизе аланилвалина 0,1*N* HCl



Интересное сообщение было сделано Паульсоном и Дейдчем. Они предложили гидролизовать белки в присутствии катионита Дауэкс-50 при 100° и 2,5 pH. Расщепление пептидных цепей протекало по другим связям.

Н. Д. Зелинским и В. С. Садиковым было предложено гидролизовать белки слабыми растворами кислот при 180° и 10 *атм*.

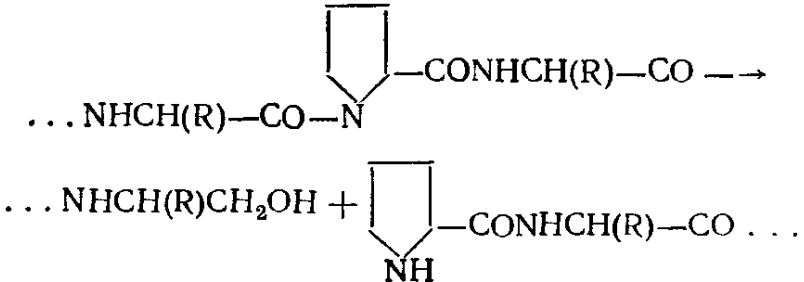
Были проведены также многочисленные работы, ставившие целью найти такие условия расщепления белка, при которых пептидные связи распадались бы избирательно. В этом отношении самым многообещающим является ферментативный гидролиз. В распоряжении исследователей имеется большой набор протеолитических ферментов, гидролизующих пептидные связи избирательно.

Ферментативный гидролиз проходит в мягких условиях и не сопровождается вторичным распадом аминокислот. К числу недостатков этого метода можно отнести возможный вторичный синтез пептидов.

Наиболее специфичным из ферментов является трипсин. Он расщепляет только пептидные связи, образованные карбоксилом аргинина и лизина. Его действие можно еще более ограничить, если динитрофенилировать ε-аминную группу лизина. Химотрипсин расщепляет связи, образованные ароматическими аминокислотами. Недавно было обнаружено, что он гидролизует и лейциновые пептиды. Менее специфичны папаин, пепсин и субтилизин. Последний позволяет, однако, получать смесь низкомолекулярных пептидов, что часто оказывается удобным при исследованиях.

Частичный гидролиз белка является самым несовершенным звеном в определении строения молекулы белка. Как уже отмечалось выше, кислотный гидролиз может привести к образованию вторичных продуктов распада, а ферментативный — вызвать вторичный синтез пептидов. Более совершенными были бы методы, позволяющие устанавливать строение белка без предварительного гидролиза. К таким методам относятся упомянутое выше последовательное отщепление аминокислотных остатков.

Н. И. Гаврилов предложил проводить электровосстановление белка. Им и Т. И. Орловой было показано на моделях, что пептидная связь восстанавливается только в том случае, если она образована пролином. Связанная с пролином аминокислота превращается в аминоспирт, который можно выделить после гидролиза остальной пептидной цепи.

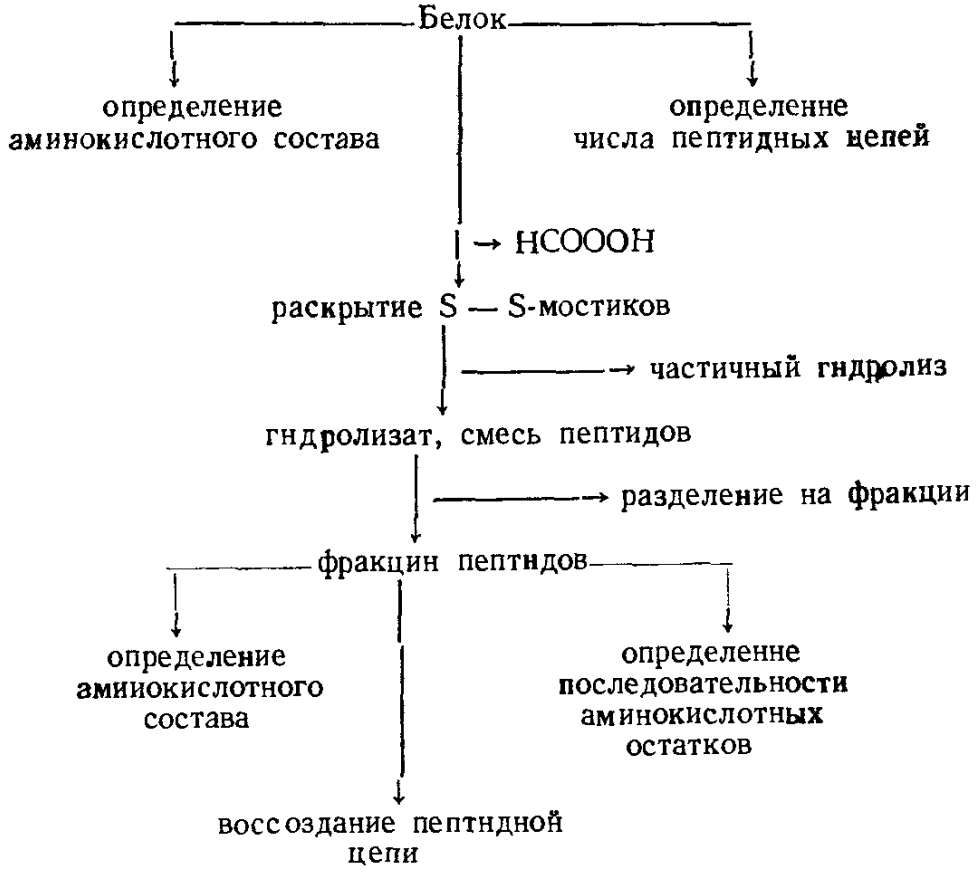


В результате частичного гидролиза белка образуется сложная смесь пептидов. Она значительно сложнее, чем гидролизат, состоящий из одних аминокислот, как по количеству возможного числа обломков,

Схема
фракционированного разделения смеси пептидов, полученных из химотрипсиногена



Схема
определении строения молекулы белка



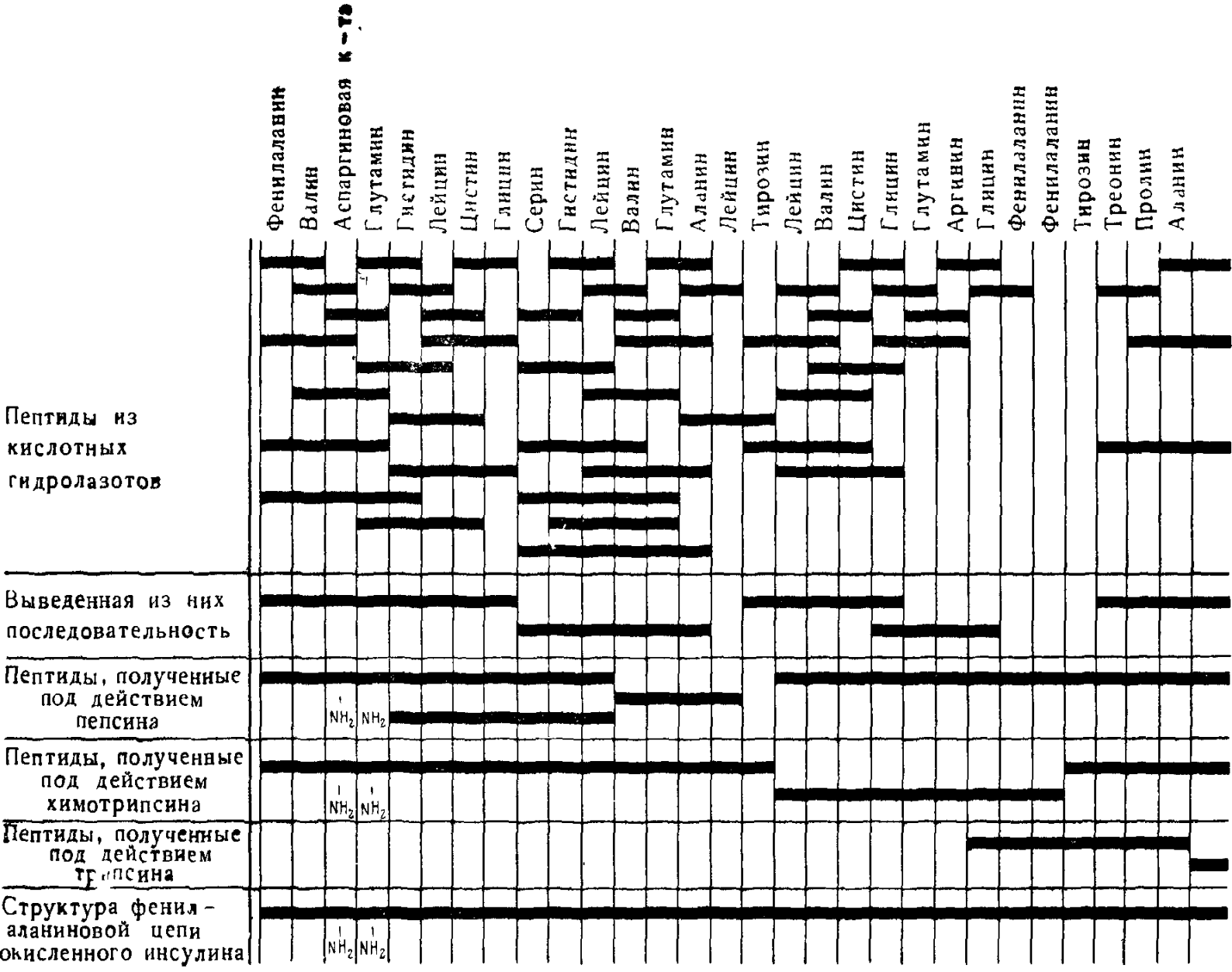


Рис.7. Определение строения фенилаланиновой цепи инсулина

так и по их составу. Неудивительно поэтому, что до создания новых методов исследования — до 1942 г. число выделенных и идентифицированных пептидов было очень мало.

Для предварительного разделения пептидов на фракции часто применяют так называемый четырех- или пятикамерный электрофорез. Он позволяет отделить основные, кислые и нейтральные пептиды друг от друга. Каждую из фракций можно подвергнуть затем разделению при помощи ионообменной хроматографии, микропрепаративным электрофорезом на бумаге или противоточным распределением, ограничиваясь при этом несколькими миллиграммами вещества. В качестве примера представлена схема разделения химотрипсиногена, проведенная Шормом с сотрудниками (см. схему на стр. 517). Прекрасные результаты дает метод Хирса, Мура и Штейна — автоматическое разделение пептидов на смоле Дауэкс-50. Строение пептидов, полученных в результате разделения, устанавливают описанными выше методами.

На схеме (стр. 517) представлен современный метод установления строения белка.

Сопоставляя затем найденные пептиды, исследователь воссоздает рисунок строения изучаемого белка. Пример такой реконструкции представлен на рис. 7 для фенилаланиновой цепи инсулина.

ЛИТЕРАТУРА

Кнунянц И. Л., Первова Е. Я. Синтез пептидов. Усп хим., 1955, **24**, 641.

Фрутон И. Синтез пептидов. В сб. Химия белка, т. 2. ИЛ, 1952, стр. 186

Bamford C., Elliott A., Hanby W. Synthetic Polypeptides. London, 1956

Bergmann M., Mickeley A Umlagerung peptidähnlicher Stoffe. Z. Physiol Chem, 1924, **140**, 128.

Brenner M., Hartmann A *Peptide der Hydroxyaminosäuren; spezielle Probleme.* Proceedings of the Symposium of Methods of Peptide Synthesis. Coll. of Czechoslov. Chem. Comm., 1958, **24**, 126.

Goodman M., Kenner G.W. The Synthesis of peptides. Advances in Protein Chemistry, 1957, **12**, 465.

Proceedings of the Symposium on Methods of Peptide Synthesis. Coll. Czechoslov. Chem Comm., **24**, 1959, 1—160.

Schwyzer R. Aminoacids and Peptides with antimetabolic and cytotoxic properties. Symposium Ciba, 1958.

Schwyzer R. Synthesen von Polypeptid — Wirkstoffen Chemie, 1958, **12**, 53.

Wieland Th. Peptidsynthesen. Angewandte Chemie, 1957, **71**, 471.

Wieland Th, Urbach H. Über Peptidsynthesen Lieb. Ann, 1952, **583**, 129.

Часть III

УСТАНОВЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ

Глава 1

СТРОЕНИЕ БЕЛКА

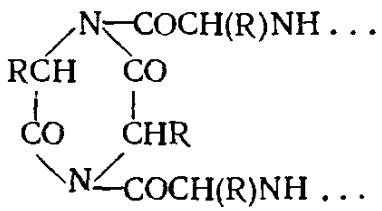
Развитие наших представлений о строении молекулы белка прошло через ряд этапов. Первое высказывание о доминирующем значении NH—CO группы принадлежит А. Я. Данилевскому (1888 г.), который предположил, что аминокислоты соединены в белках с биуретовым остатком.

... NH—CO—NH—CO—CH(R)—NH...

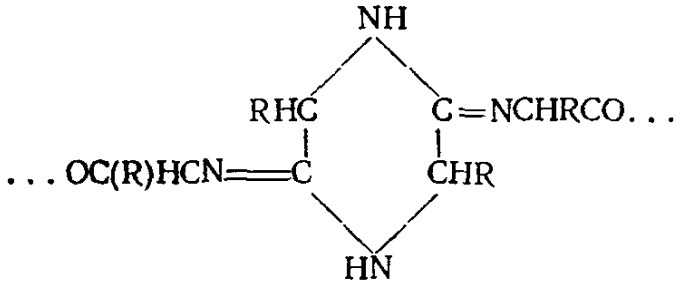
Вслед за этим в 1902 г. Гофмейстер выдвинул гипотезу об амидообразной связи аминокислотных остатков в белке, которая и легла в основу полипептидной гипотезы. Она же послужила основанием Э. Фишеру и Т. Курциусу для разработки методов синтеза пептидов. Одновременно с синтезом многочисленных пептидов, завершившихся синтезом нонадекапептида, проводились исследования по выделению пептидов из белков. Был выделен ряд пептидов, тождественных с синтетическими. Они давали биуретовую реакцию и расщеплялись протеолитическими ферментами; высшие пептиды обладали коллоидными свойствами. Все эти факты в тот период были достаточным подтверждением выдвинутой полипептидной теории. Однако методы органической химии, применявшиеся для выделения пептидов из гидролизатов белков, а именно фракционированная кристаллизация, извлечение органическими растворителями, получение производных и т. д. оказались для этой цели мало пригодными. Число выделенных пептидов было настолько незначительным, что возникли сомнения в справедливости выдвинутой теории.

Остро чувствовалась потребность в новых идеях, новых методах исследования. Н. Д. Зелинский предложил проводить расщепление белка слабыми кислотами под давлением и при повышенной температуре. В результате проведения гидролиза в таких условиях было выделено значительное количество циклопептидов — дикетопиперазинов и циклопептидов более сложного строения. Авторами было высказано предположение, что подобные циклы являются доминирующими структурными единицами в белковой молекуле, и была выдвинута новая гипотеза о строении белка — дикетопиперазиновая. Начался бурный период поисков и разработки новых методов изучения промежуточных продуктов гидролиза белка. Особенно большой вклад в изучение предполагаемых новых структурных единиц внесли Н. И. Гаврилов в СССР и Э. Абдергальден в Германии. Были разработаны методы их количественного определения и детально изучены их свойства Нерешенным, казалось, оставался только вопрос о характере связи дикетопиперазинов и пепти-

дов в белке. В дальнейшем Н. И. Гавриловым была выдвинута гипотеза о том, что дикетопиперазины соединены с пептидами через аминоацильную и амидинную связи.



аминоциальная связь



амидинная связь

Предполагалось, что дикетопиперазины вкраплены в пептидную цепь и разделяют ее на небольшие отрезки. Переломным и решающим явился 1941 г., когда Гордон, Мартин и Синдж предложили применять для разделения продуктов гидролиза белков метод хроматографии на бумаге. Появившиеся вслед затем методы электрофореза, противоточного распределения и метод ионообменных смол позволили исследователям получить необходимый для обоснования теории строения белка экспериментальный материал.

Полученные результаты подтвердили предположение, что скелет белковой молекулы строится многократным повторением NH—CO—CH... остатков, с образованием полипептидных цепей. Никаких других промежуточных продуктов распада белка, кроме пептидов, обнаружено не было. Длина полипептидных цепей может быть различной. Ниже приводятся данные о длине пептидной цепи различных белков.

	Число остатков в пептидной цепи	Молекулярный вес
Рибонуклеаза	124	13 500
Лизоцим	128	14 000
Химотрипсин	—	22 500
Трипсии	—	24 000
Вирус табачиой мозаики (субъединица)	154	18 000
Миозии	2340	300 000
Яичный альбумии	387	46 000

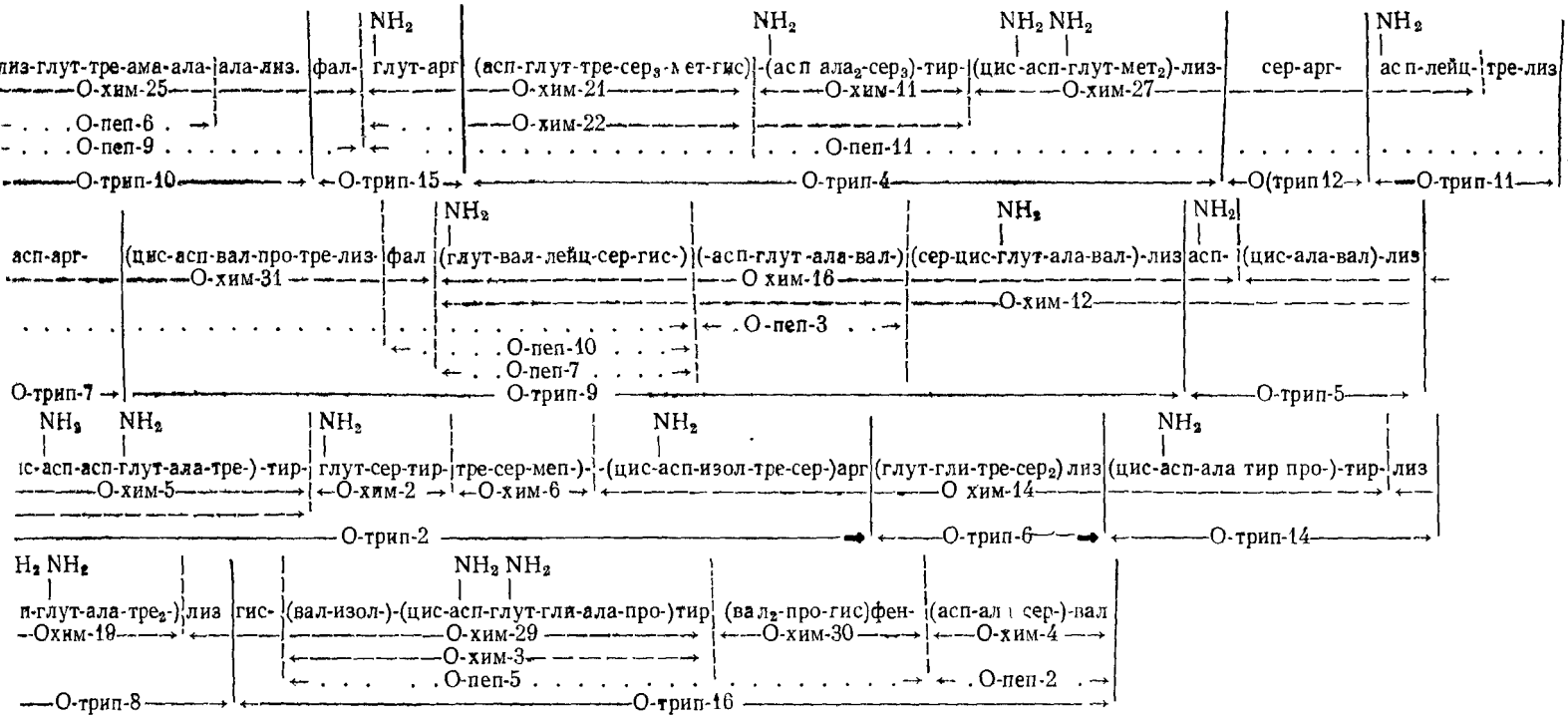
Блестящим примером определения структуры белка может служить усгановление строения рибонуклеазы, проведенное двумя группами исследователей — Муром, Штейном, Хирсом и группой Анфинсена.

Рибонуклеаза состоит из 124 аминокислотных остатков, соединенных в одну пептидную цепь, скреплеиную четырьмя дисульфидными мостиками. N-концевая аминокислота в рибонуклеазе — лизин и С-концевая — валин.

Мур, Штейн и Хирс подвергли рибонуклеазу окислению надмуравьиной кислотой и затем гидролизу химотрипсином, трипсином и пепсином. Образовавшуюся смесь пептидов они разделили на препаративной автоматической колонке на смоле дауэкс=50х2. Аминокислотный состав пептидов был определен на смоле дауэкс=50х4. Всего было получено 32 пептида (см. стр. 521).

Гидролизаты	Число выделенных пептидов
трипсина	13
химотрипсииа	11
пепсииа	8

Определение последовательности аминокислотных остатков в окисленной рибонуклеазе



Примечание пеп — пепсин, хим — химотрипсин, трип — трипсин; О — окисленная

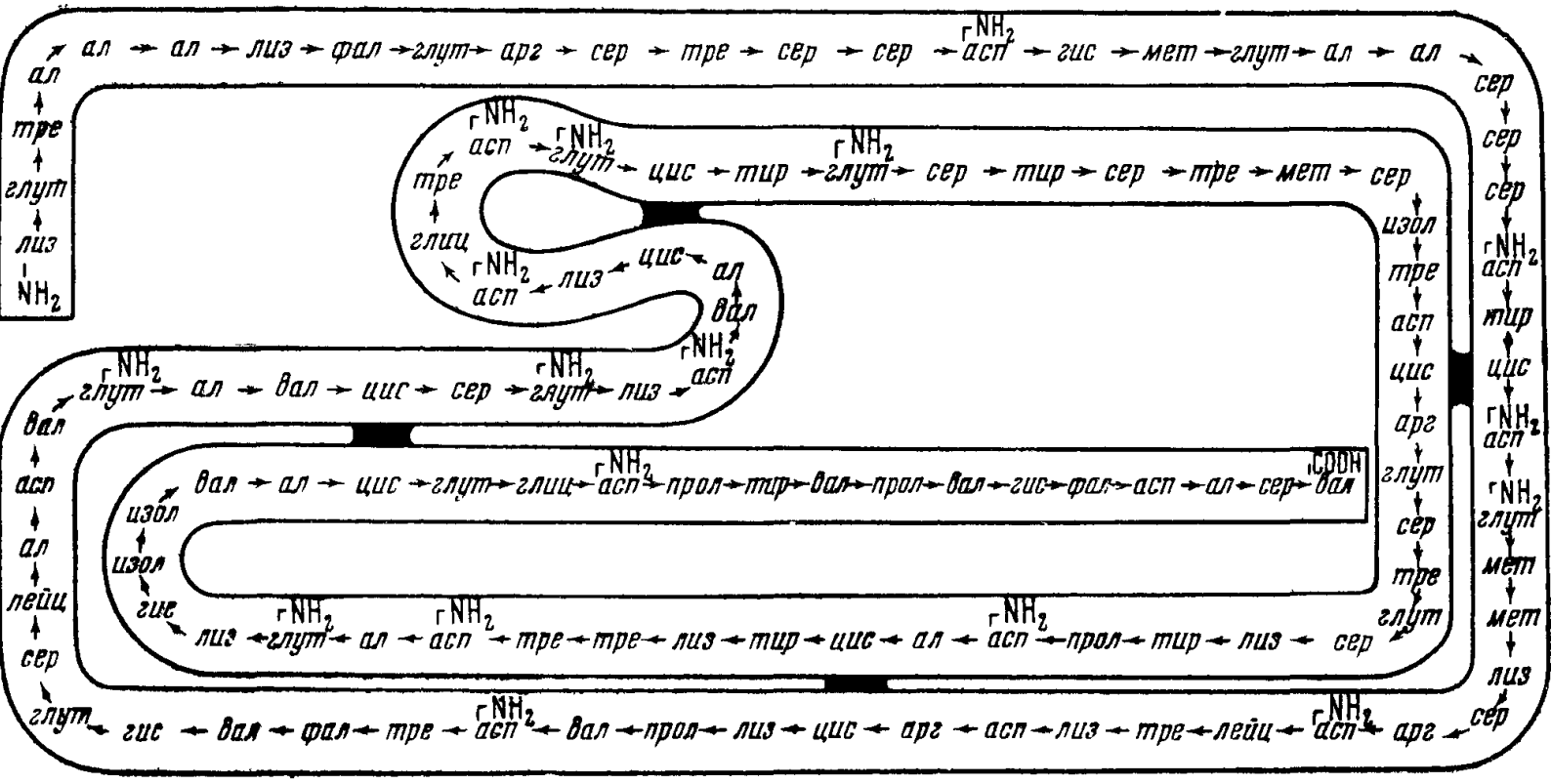


Рис 8 Строение рибонуклеазы

Принимая в качестве постулата, что пептидная цепь не разветвлена и аминокислотные остатки соединены друг с другом только аминными и карбоксильными группами, авторы составили предварительную гипотетическую схему (рис. 8) последовательности аминокислотных остатков в рибонуклеазе.

При этом они основывались на специфическом действии ферментов. В пептидах, образовавшихся в результате трипсинного гидролиза, С-концевыми аминокислотами являются аргинин и лизин. Пептиды, выделенные из гидролизата рибонуклеазы химотрипсином, содержат в основном в качестве концевых С-аминокислот остатки тирозина и фенилаланина.

Определение строения каждого из пептидов при помощи метода динитрофенилирования и метода Эдмана, обработкой лейцинаминопептидазой и карбоксипептидазой, а также гидролизом на более низкомолекулярные пептиды позволило постепенно расшифровать всю структуру рибонуклеазы, представленную на рис. 8. Существенно, что к аналогичному заключению о отроении рибонуклеазы пришла другая группа исследователей, возглавляемая Аффинсеном. Эти авторы предварительно динитрофенилировали рибонуклеазу. При этом наряду с α-аминной группой блокируются и ε-аминогруппы лизина, что еще более увеличивает специфичность трипсина. Так как рибонуклеаза содержит только 4 остатка аргинина, то в результате гидролиза было выделено 5 пептидов, строение которых устанавливалось частичным гидролизом и при помощи описанных ранее методов.

Параллельно с определением последовательности аминокислотных остатков в рибонуклеазе проводилось и определение положения дисульфидных мостиков. Спакман, Мур и Штейн нашли, что рибонуклеазу можно гидролизовать трипсином и химотрипсином без предварительного окисления дисульфидной связи, если проводить гидролиз в 2-молярном растворе хлоргидрата гуанидина. Ими было получено 6 пептидов, которые затем подвергались окислению надмуравьиной кислотой и исследовались. Таким образом было установлено, что S—S мостики расположены в положениях 1—6, 2—7, 3—8 и 4—5.

Руль и Анфинсен в своей работе по определению положения дисульфидных связей использовали способность рибонуклеазы расщепляться субтилизином. Они установили следующие положения S — S мостиков: 1—6, 3—7, 8—2 и 4—5. Рибонуклеаза является вторым (после инсулина) белком, строение которого расшифровано.

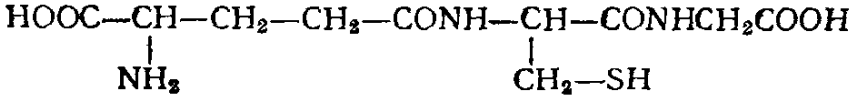
Из изложенного фактического материала следует, что в настоящее время исследователи могут определить совершенно точно аминокислотный состав белков и установить с достаточной степенью достоверности:

а) N-концевые и С-концевые аминокислотные остатки в цепи;
б) число пептидных цепей, входящих в состав белка;
в) последовательность аминокислотных остатков в цепи.

При помощи описанных методов было установлено строение большого числа природных пептидов и нескольких белков.

Ниже приводятся данные о некоторых из них.

Пептиды. 1. Глутатион выделен в 1921 г. Гопкинсом, синтезирован в 1934 г. Харрингтоном и Милом. Широко распространен в природе, принимает, по-видимому, участие в окислительно-восстановительных процессах в клетке.



γ-глутамил-глицилцистеин

Адренокортикотропные гормоны

MSH

асп-сер глиц-пр>л тир лиз мет-глут-гис-фал арг-трипт-глиц-сер-пролпроя-лиз-асп
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

II MSH*

CH_3CO-сер-тир-сер-мет-глут-гис-фал-арг-трипт глиц-лиз-прол-вал-NH_2
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

крупный рогатый скот

АКТГ

сер-тир-сер-мет-глут-гис-фал-арг-трипт-глиц-лиз-прол-вал-глиц-лиз-лиз-арг-арг-прол-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

вал-лиз-вал-тир-прол-асп-глиц-ала-глут-асп-глут-лейц-ал-глут-ал-фал-прол-лейц-глут-фал
20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

Примечание. Все три гормона имеют участки пептидной цепи с одинаковой последовательностью аминокислотных остатков.

2. Интермедины — α- и β-меланотропные гормоны (I, II MSH), из средней доли гипофиза. Управляют деятельностью пигментных клеток кожных покровов амфибий. Строение установлено Ли и Гаррисом. Адренокортикотропный гормон (АКТГ), выделенный из передней доли гипофиза, стимулирует выделение стероидных гормонов корой надпочечников. Строение установлено Беллом, Ли и Уайтом в 1954 г. (см. схему).

3. Гипертензины содержатся в плазме крови, вызывают повышение кровяного давления. Строение установлено в 1956 г. Скеггсом и Пиртом.

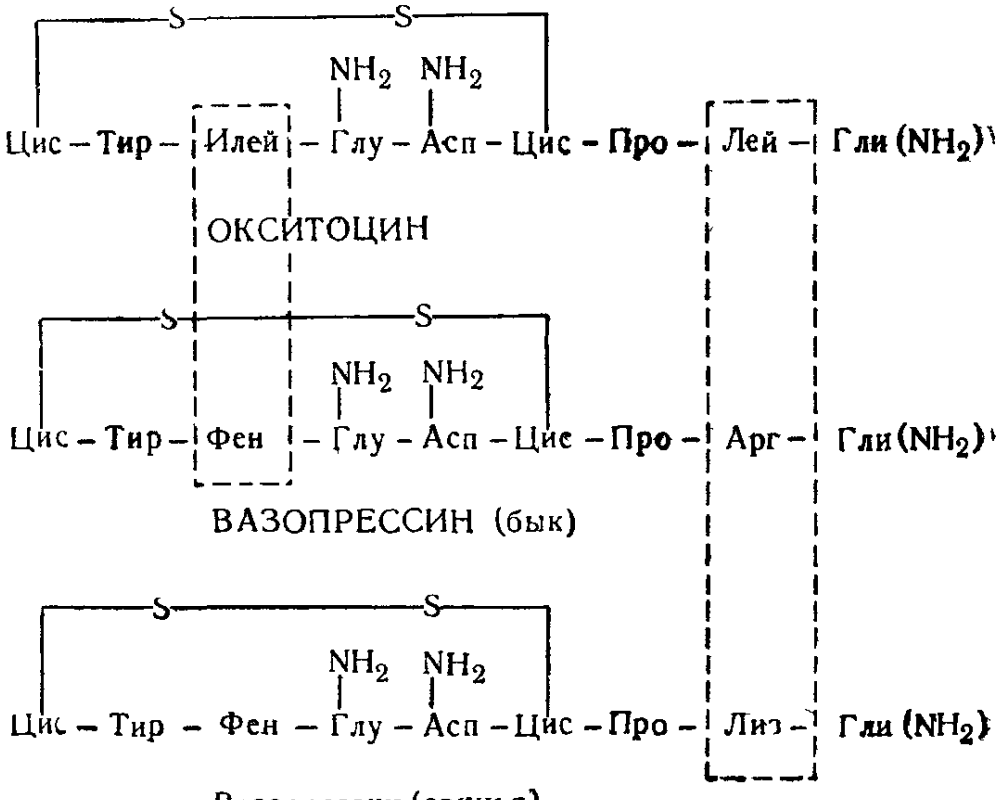
Гипертензин I
асп-арг-вал-тир-изол гис-прол-фал-гис лейц
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Гипертензин II
асп-арг-вал-тир-изол-гис-прол-фал
1 2 3 4 5 6 7 8
} лошадь

Гипертензин I
асп-арг-вал тир вал-гис про-фал-гис-**лейц**
1 2 4 5 6 7 8 **9** **10**
Гипертензин II
асп-арг-вал-тир вал-гис-прол-фал
1 2 3 4 5 6 7 8
} крупный рогатый скот

4. Глюкагон выделен из поджелудочной железы. Обусловливает повышение содержания сахара в крови, является гликогенолитическим фактором. Выделен в 1953 г. Штаубом, Зинном и Беренсом. Эти же авторы в 1956 г. установили строение глюкагона. Он состоит из 29 аминокислотных остатков.

Циклопептиды. 1. Грамицидин С — антибиотик. Представляет собой циклодекапептид. Выделен Г. Ф. Гаузе и М. Г. Бражниковой в 1942 г. из *Bacillus brevis*. Строение установлено А. Н. Белозерским и Т. С. Пасхиной, а также Синджем. Синтезирован в 1956 г. Швицером и Зибером.

вал-орн-лейц-фал-прол (L, L, L, D, L)
|
прол фал-лейц-орн-вал (L, D, L, L, L)



2. Грамицидин J.

3. Тироцидины А и В входят в состав смеси антибиотиков, называемой тиротоксином. Строение их установлено Крейгом; они являются циклопептидами.



4. Окситоцин и вазопрессин — гормоны задней доли гипофиза. Строение установлено дю Виньо в 1950 и 1951 гг. Отличаются один от другого третьим и восьмым аминокислотнымн остатками

Строение окситоцина, вазопрессина, грамицидина С и грамицидина J подтверждено синтезом

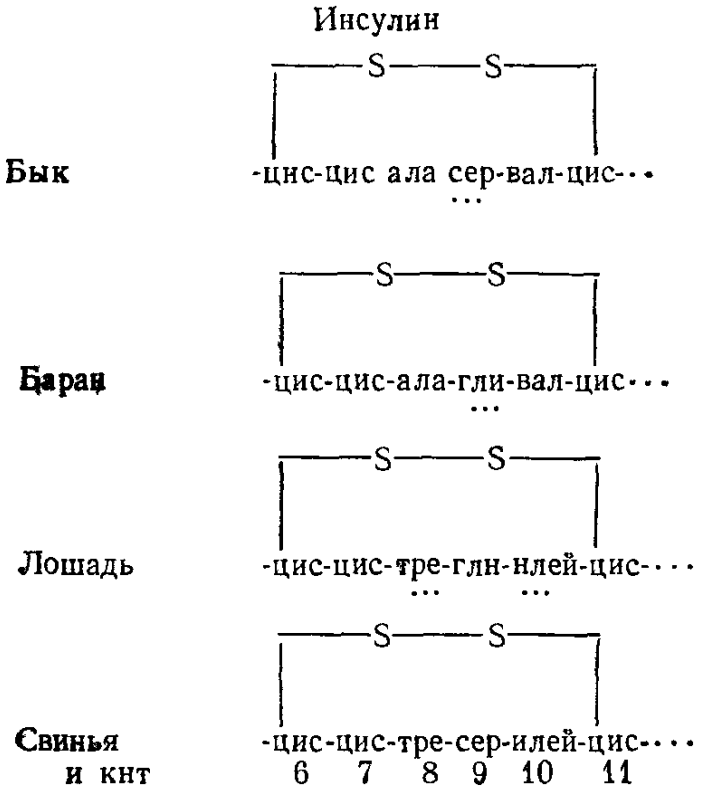
Белки. 1. Инсулин. Молекулярный вес 6000. Строение установлено в 1952 г. Зангером и Таппи. Состоит из двух цепей А и В, соединенных двумя дисульфидными мостиками. Цепь А состоит из 21 аминокислотного остатка, с N-концевой и С-концевой аминокислотами — глицином и аспарагином. Цепь В содержит 30 аминокислотных остатков с фенилаланином на N-конце и аланином на С-конце цепи. Это первый белок, строение которого расшифровано полностью. В процессе этого исследования Зангером был разработан комплекс методов, который послужил основой для всех последующих исследований строения белков.



2. Рибонуклеаза — фермент, выделенный из поджелудочной железы, печени, селезенки и т. д. Вызывает деполимеризацию рибонуклеиновой кислоты. Молекулярный вес 13 500. Содержит 124 аминокислотных остатка. Строение изучалось в основном двумя группами исследователей — Муром с сотрудниками и Аффинсеном с сотрудниками. Представляет одну полипептидную цепь. Восемь цистеиновых остатков образуют 4 дисульфидных мостика (см. рис. 8, стр. 523).

Приведенными примерами не ограничиваются исследования природных пептидов и белков. Для многих белков установлено строение отдельных фрагментов. Хотя мы еще далеки от полной расшифровки строения белков, полученные результаты позволили обнаружить некоторые закономерности, послужившие основой для более глубокого детального рассмотрения ряда биохимических процессов (исследования в этом направлении проводятся Шормом с сотрудниками).

Обнаружены, например, видовые отличия инсулинов у разных животных. В цепи А инсулинов быка, барана, лошади, свиньи и кита имеется различие в аминокислотных остатках на участке 6—10 (см. ниже). С другой стороны, меланотропный гормон и адренокортикотропный гормон (АКТГ), выполняющие совершенно разные функции, имеют участки с одинаковой последовательностью аминокислотных остатков (см. схему на стр. 525).

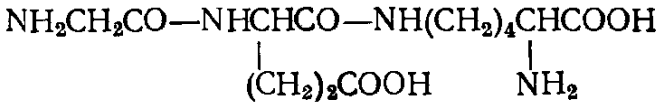


Установление строения рибонуклеазы позволило показать, что ее активность сосредоточена вблизи карбоксильного конца цепи. Пользуясь субтилизином и аминопептидазой, можно отщепить до 20 аминокислотных остатков со стороны аминной группы, и при этом активность фермента не изменится. Еще ярче это выражено у фермента, выделенного из дынного дерева — папаина. В нем можно удалить до 120 остатков из 180, не нарушая его действия.

Молекула белка может быть построена и из нескольких пептидных цепей. Примером этому является инсулин, состоящий из двух цепей (см. схему стр. 527), соединенных между собою S—S-дисульфидными мостиками.

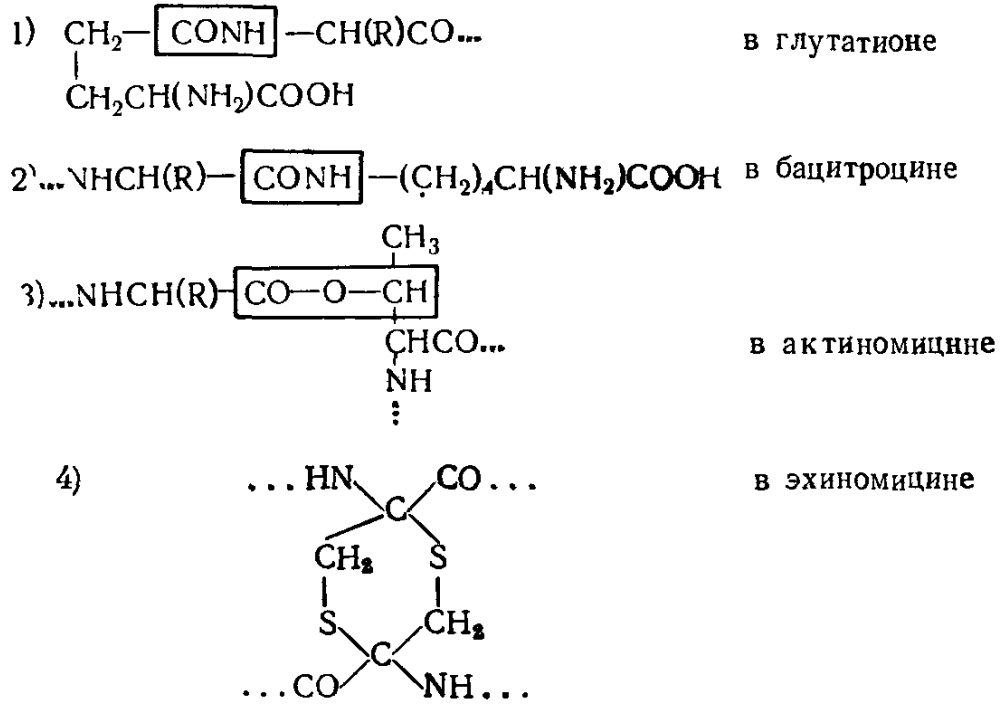
Таким образом, наряду с главным доминирующим типом связи в белке NH—CO имеется еще вторая S—S-дисульфидная связь. Мостики S—S могут образовываться между различными цепями (например, в инсулине) или связывать отдельные звенья одной и той же цепи (например, в рибонуклеазе), или же вызывать образование циклов (см. стр. 527), например, в окситоцине и вазопрессине.

Ограничиваются ли ковалентные связи в белках этими двумя видами? Этот вопрос, интересовавший исследователей еще в начале XX столетия, нельзя считать разрешенным и сейчас A priori можно было бы допустить, что в образовании связей между аминокислотными остатками может участвовать любая функциональная группа, содержащаяся в белке. Можно предположить, например, что ε-аминная группа лизина или β- и γ-карбоксильные группы дикарбоновых аминокислот образуют разветвленные пептиды, что карбоксильные группы в белке и гидроксильные остатки оксиаминокислот образуют эфирные мостики. Однако реальных доказательств для всех этих предположений пока еще нет. Только в самое последнее время появились первые сообщения о том, что из желатины выделен трипептид — глицилглутамил-ε-лизин.



В коллагене с помощью гидроксамовой реакции обнаружены эфирные связи. Но эти сообщения нуждаются в дополнительном подтверждении.

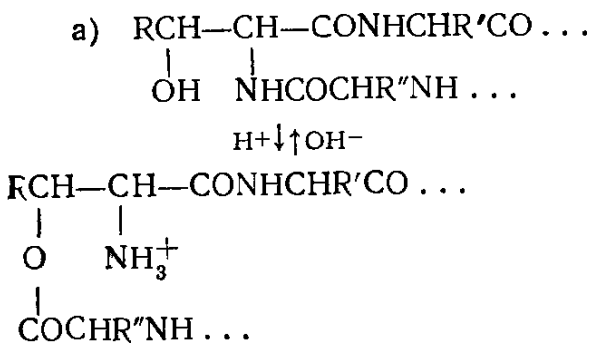
Интересно отметить, что физиологически активные полипептиды обладают более широким спектром связей, чем белки. Ниже представлены некоторые из них.

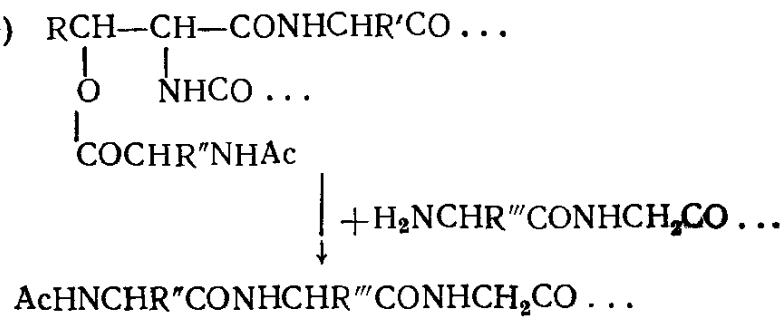


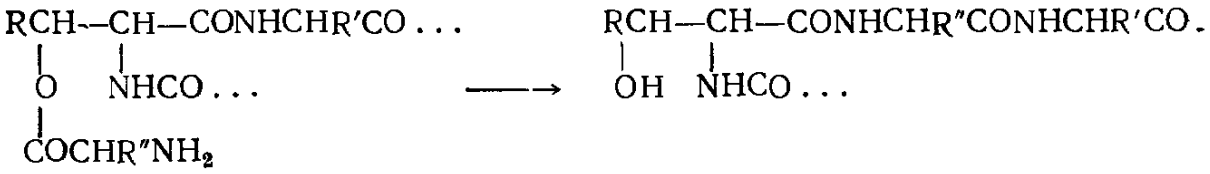
Будут ли обнаружены в белке подобные или другие, более лабильные связи, разрушающиеся под воздействием применяемых реактивов, в частности, во время гидролиза, остается открытым.

Несомненно, однако, одно. Пептидная связь не столь инертна, как это предполагали ранее. Соседние функциональные группы оказывают на нее существенное влияние. Оно выражается не только в повышении лабильности NH—CO связи по отношению к гидролизу, но и в возможных перегруппировках внутри одной пептидной цепи или между пептидными цепями. Такие перегруппировки были описаны выше (см. стр. 505 и далее). Здесь приводятся только их общие схемы.

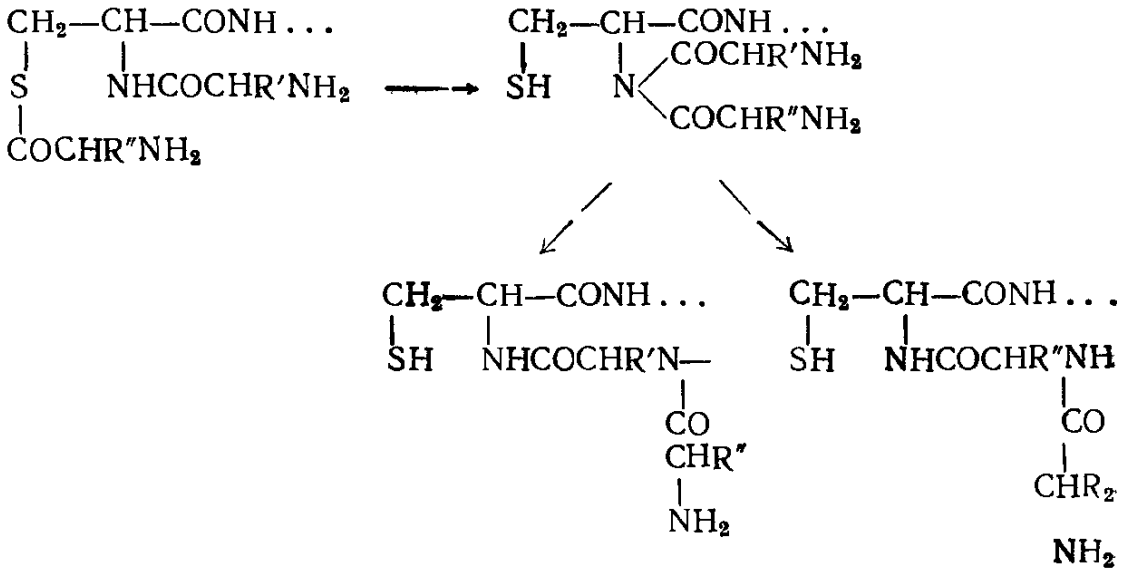
1. Пептиды β-оксиаминокислот

а) 

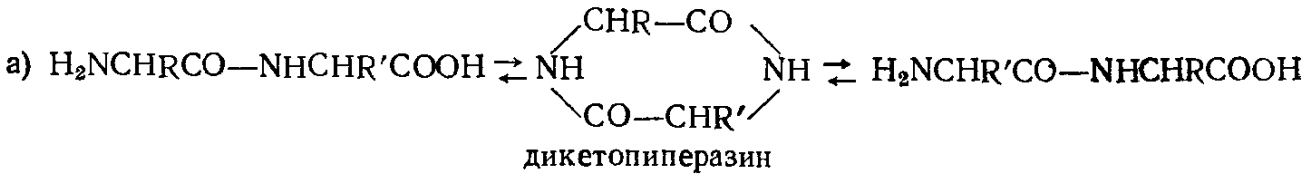
б) 

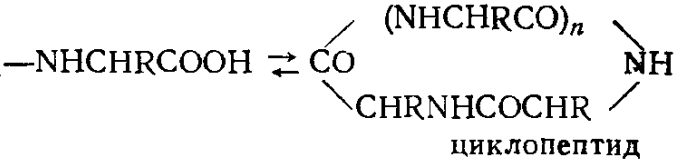
в) 

2. Пептиды цистеина

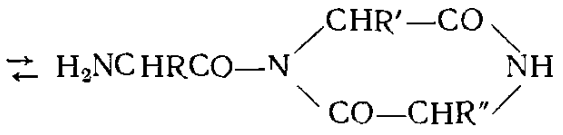


3. Пептиды и циклопептиды

а) 

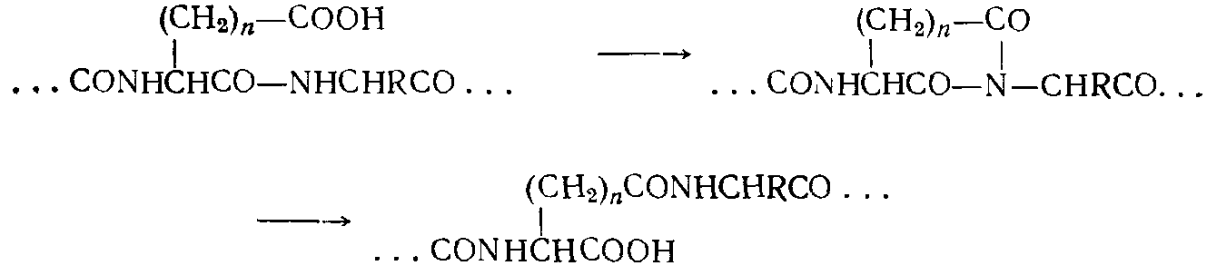
б) 

в) $H_2NCHRCO—NHCHR'CO—NHCHR''COOH \rightleftarrows$



аминоацилцикл**ло**пептид

4. α- и β-Пептиды аспарагиновой и α- и γ-пептиды глутаминовой кислот



1) миграция аминоацильного остатка в отрезках пептидной цепи, содержащей серин и треонин;

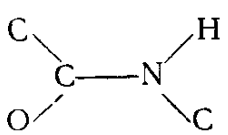
2) изомеризация S-пептидов в N-пептиды в отрезках цепи, содержащей цистеин;

3) взаимные превращения пептидов и дикетопиперазинов;

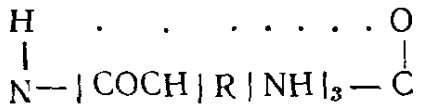
4) превращения α-пептидов аспарагиновой и глутаминовой кислот в β- и γ-пептиды соответственно.

Приведенные выше структуры рибонуклеазы и инсулина представляют собою плоскостные структуры, воссозданные только на основании химического исследования и с учетом одних ковалентных связей. Но ковалентными связями, обеспечивающими образование скелета молекулы, не ограничивается взаимодействие между ее отдельными звеньями. В табл. 6 перечислены функциональные группы, входящие в аминокислотные остатки и не принимающие непосредственного участия в образовании пептидного скелета. Между этими группами и пептидной цепью возникают иные более лабильные связи. Ионизированные COO^- и N^+H_3 группы образуют соли. При взаимодействии различных полярных групп могут появляться водородные связи, а между радикалами действуют ван-дер-ваальсовы силы. Эти три типа связи ковалентные, водородные и ван-дер-ваальсовы ответственны за строение белковой молекулы в целом. В зависимости от порядка чередования аминокислотных остатков функциональные группы сосредотачиваются на различных участках пептидной цепи, создавая благоприятные условия появления тех или иных лабильных связей. Это они обусловливают определенное пространственное расположение пептидных цепей, образование спиралевидной структуры, вытягивание молекулы в виде фибриллы или скручивание ее в глобулу, словом то, что сейчас понимают под конформацией молекулы.

Использование рентгеноструктурного анализа позволяет конструировать пространственные модели молекулы белка. Было найдено, что атомы амидной группы CCONHC, образующие скелет молекулы, лежат почти в одной плоскости и имеют транс-конфигурацию



Каждая амидная группа соединена водородной связью с карбонильным кислородом третьей пептидной группы, в результате чего полипептидная цепь свертывается, образуя так называемую α-спираль.



Такая спираль представляет собою наиболее стабильную конфигурацию остова пептидной цепи (см. рис. 9).

Рентгеноструктурные исследования привели даже к созданию полной пространственной модели белка миоглобина с молекулярным весом 17 000. Они же позволили сделать ряд существенных выводов о строении белков, вытянутых в виде волокон (фибриллярные белки, например, фиброин шелка, коллаген) или свернутых в глобулы (например, белки сыворотки крови), а также сделать вывод о возможных превращениях глобулы в фибриллу (см следующую главу).

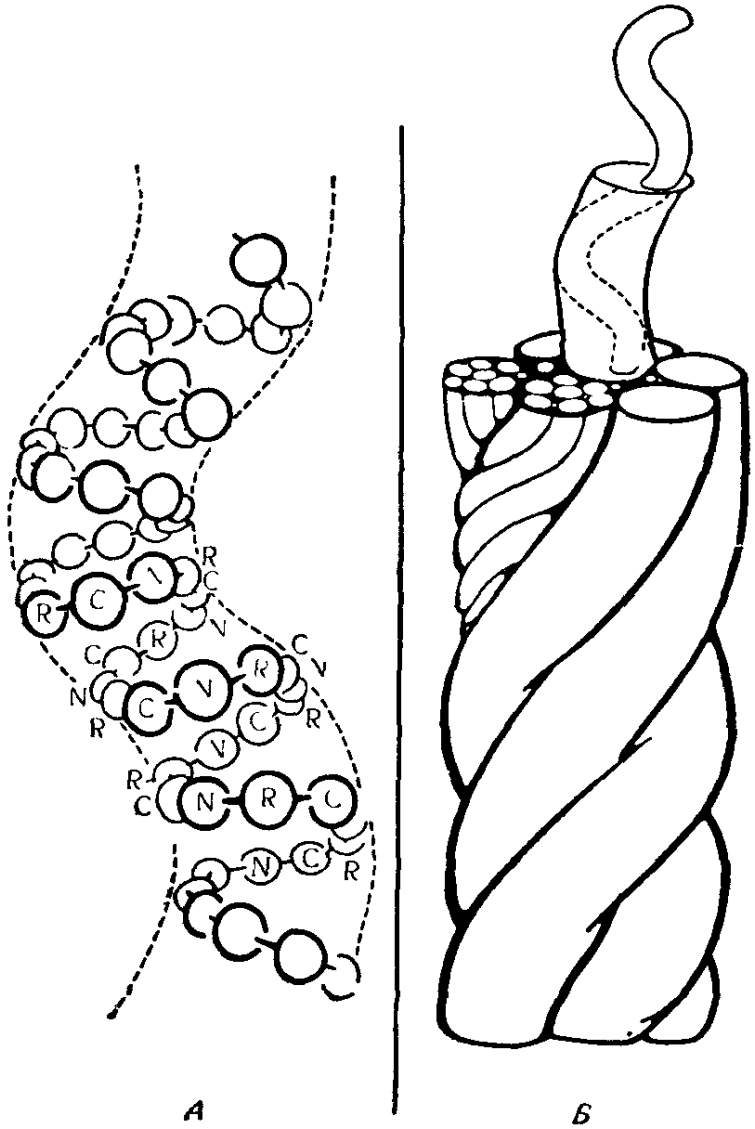


Рис 9 Строение белка

А — полипептидная цепь из амидных групп образует сложную спираль; *Б* — предполагаемое строение бактериального жгутика — образования, видимого под электроним микроскопом (семижильный кабель, состоящий из семижильных шнуров которые в свою очередь состоят из сложных спиралей полипептидных цепей).

По мере того, как в круг исследований втягиваются все более сложные белки — гемоглобин (мол вес. 66 000) химотрипсин (мол вес 22 000), пепсин (мол. вес 35 000) яичный альбумин и, наконец, вирусы, молекулярный вес которых достигает 10^{16} степени, возникает вопрос, ограничивается ли строение этих белков только образованием громадных пептидных цепей, не образуются ли эти гигантские молекулы за счет каких-либо других связей, не являются ли они ассоциатами более простых образований, возникающих за счет многочисленных полярных групп, содержащихся в молекуле белка.

К этому следует еще добавить, что при обсуждении вопроса о строении молекулы белка мы ограничивались так называемыми простыми белками, построенными из одних аминокислотных остатков. По мере накопления наших знаний круг простых белков становится все более ограниченным, первостепенное значение приобретают так называемые сложные белки. Они характеризуются тем, что собственно белковая молекула соединена с какими-либо другими органическими и неорганическими молекулами, которые обычно называют простетическими группами (о классификации белков см. Р. Гауровитц Химия и биология белков М., ИЛ, 1953).

Эти простетические группы также, как и их способы соединения с белками, могут быть очень различными. Так, в фосфопротеидах собственно белок соединен с фосфорной или пирофосфорной кислотами эфирообразно через гидроксильные группы оксиаминокислот. В хромопротеидах простетической группой является красящее вещество гем, представляющее собою соединение порфиринового ряда, содержащее металл. В гемоглобине (красящем веществе крови), который является переносчиком кислорода у позвоночных, гем содержит железо; в гемоцианине, содержащемся в крови и гемолимфе некоторых беспозвоночных животных, гем содержит медь. Железо содержат и ряд других представителей этой обширной и важной группы белков, например, цитохром С — катализатор клеточного дыхания, каталаза и пероксидаза — окислительные ферменты и т. д. Различен также и характер связи простетической группы с белком в хромопротеидах. Согласно современным представлениям, белок (глобин) в гемоглобине связан с гемом водородными связями, возникающими между атомом железа гема и имидазольным кольцом гистидиновых остатков в белке. В цитохроме связующим звеном, по-видимому, является тиоэфирная группа (см. рис. 10).

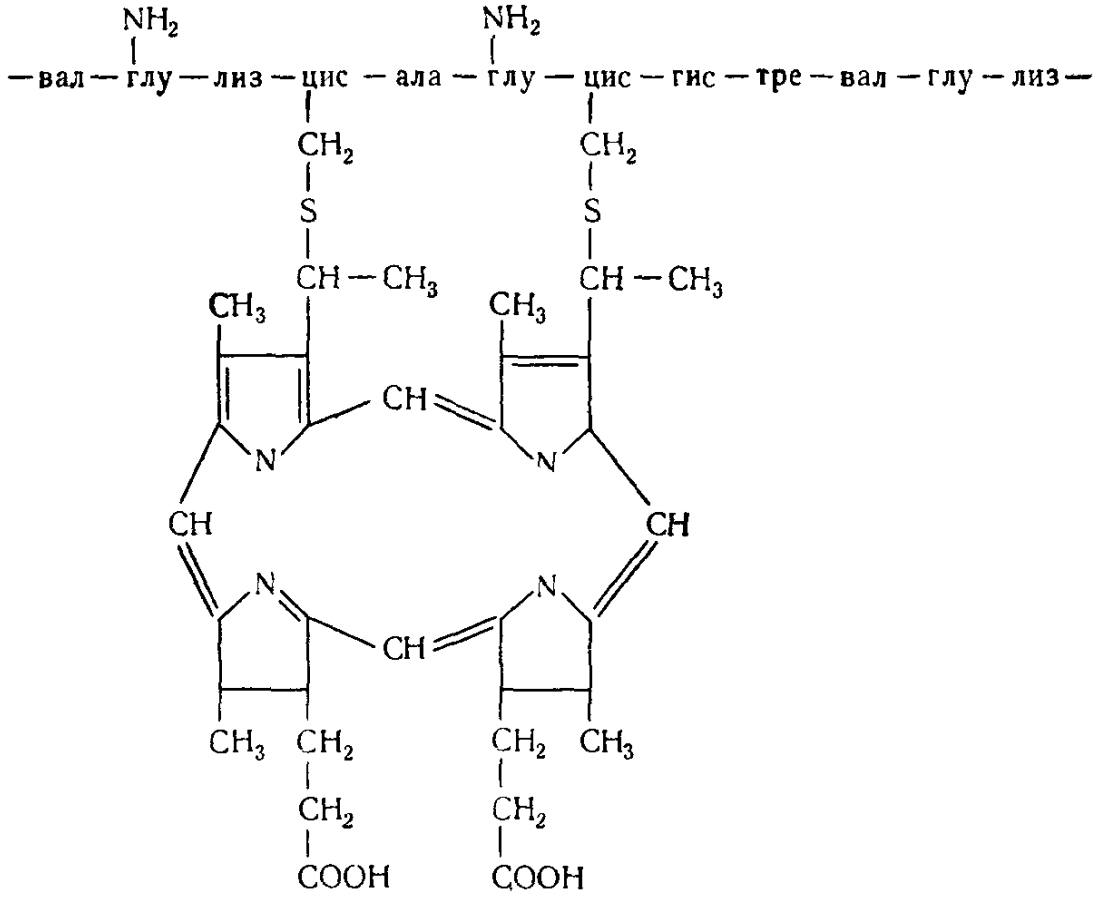


Рис 10 Гемопептид цитохрома

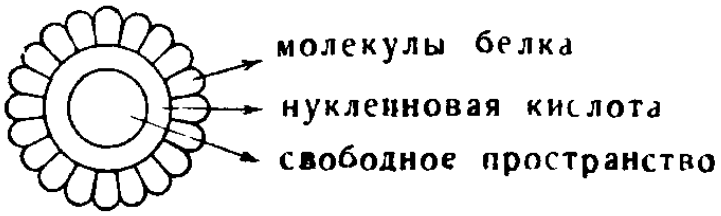
Ряд белков содержит в качестве простетической группы производные углеводов (глюкопротеиды), липоидов (липопротеиды) и т. д.

Наиболее интересной и важной группой из числа сложных белков являются нуклеопротеиды, в них белок соединен с нуклеиновой кислотой. В отличие от других сложных белков нуклеопротеиды состоят из сравнительно простого и низкомолекулярного белка основного характера — протамина или гистона, и высокомолекулярной простетической группы — нуклеиновой кислоты. Нуклеопротеиды входят в состав всех клеток живого организма, являются важной частью хромозом и т. д. К этому классу соединений относятся и молекулы гиганты — вирусы, инициаторы многих инфекционных заболеваний, например, полиомиелита.

Примером строения нуклеопротеидов может служить вирус табачной мозаики (ВТМ), продуцирующий на листьях табака образование белых пятен. Молекулярный вес его около 50 000 000.

Частица ВТМ состоит на 94% из белка и на 6% из рибонуклеиновой кислоты. Согласно современным представлениям (Френкель-Конрат, Шрамм) белковая часть ВТМ слагается из ~2900 субъединиц — полипептидов с молекулярным весом около 18 000 (рассчитано на основании аминокислотного состава). Они соединены между собою вторичными связями. Белок при растворении в кислой среде (pH 3,5—6,5) распадается на субъединицы, которые вновь объединяются при стоянии раствора, при котором происходит образование белка с молекулярным весом около 100 000. Как превращается этот белок в полимер с молекулярным весом около 50 000 000, пока еще остается неизвестным. Есть предположение, что существенное значение при этом играют SH-группы. Эта гигантская молекула, представляющая собой полый цилиндр, связывается затем с рибонуклеиновой кислотой, молекулы которой располагаются внутри цилиндра. Так представляют в настоящее время образование ВТМ. Характер связи РНК с белком различен: до 70% белка отделяется при мягкой обработке щелочью, остальные 30% не гидролизуются и в более жестких условиях.

Ниже представлен разрез молекулы ВТМ, видимой под электронным микроскопом.



Методы, применяемые для установления пространственного строения аминокислот, пептидов и белков, описаны в следующей главе.

Глава 2

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ КОНФИГУРАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ В БЕЛКАХ*

К изучению структуры белка можно подходить с различных точек зрения. Можно исследовать последовательность чередования аминокислотных остатков в полипептидной цепи, изучать характер функциональных групп белка, особенности связей между боковыми группами остатков, пытаться установить наличие или отсутствие определенных групп в белке. Такого рода исследования, связанные с изучением особенностей химического строения различных белков, были приведены выше. Не менее важную роль в изучении структуры белков играют исследования пространственной конфигурации белковых молекул. Определенная пространственная конфигурация белковой молекулы обеспечивает возможность проявления ею определенных свойств, которые и составляют основу биологической специфичности белков. Нарушения конфигурации, происходящие, например, при денатурации, вызывают потерю активности белка, т. е. потерю этих свойств.

Линдерштрем-Ланг подразделил изучение структуры белка на 3 раздела: изучение первичной, вторичной и третичной структур.

Под изучением первичной структуры подразумевается исследование чередования аминокислотных остатков вдоль полипептидных цепей белка. Изучение вторичной структуры — это изучение особенностей пространственного расположения чередующихся друг с другом аминокислотных остатков, которое определяет конфигурацию сравнительно небольших фрагментов полипептидных цепей. Вторичная структура по Линдерштрем-Лангу — это небольшие складки и изгибы пептидной цепи. Они могут, например, привести к тому, что некоторая часть пептидной цепи примет форму спирали. Однако шаг такой спирали, ее толщина будут заметно меньше размеров самой молекулы. Вторичная структура в белках стабилизируется водородными связями между CO- и NH-группами пептидных остатков. Поэтому, исследуя вторичную структуру в химическом аспекте, мы изучаем особенности водородных связей между CO- и NH-группами пептидных остатков.

Изучение третичной структуры по Линдерштрем-Лангу включает исследование конфигурации пептидных цепей как целого. Здесь речь идет уже о больших изгибах и складках, о взаимной укладке отдельных больших фрагментов одной цепи или нескольких цепей в зависимости от того, одна или несколько цепей содержатся в молекуле. Третичная структура

---

* Эта глава написана кандидатом физико-математических наук Н. С. Андреевой.

белковой молекулы стабилизируется главным образом связями между боковыми группами аминокислотных остатков (связи S—S цистина, водородные связи, предполагаемые эфирные связи и силы вандерваальсова притяжения). Поэтому химические исследования третичной структуры предусматривают изучение всех этих типов связей.

Исследуя вторичную и третичную структуры белка в чисто геометрическом плане, мы так или иначе сталкиваемся с необходимостью учета всех химических связей, так как они определяют характерный для данной белковой молекулы набор межатомных расстояний и валентных углов и, в конечном итоге, ее сложную конфигурацию. Третичная структура определяет форму и размеры белковых молекул.

Предметом настоящей главы будет рассмотрение вторичной и третичной структуры белков.

Для изучения вторичной и третичной структуры белка применяются самые разнообразные методы. Наиболее полные данные были получены при изучении дифракции рентгеновских лучей на различных белковых соединениях. Ряд данных, имеющих принципиальное значение для понимания вторичной структуры белка, был получен при помощи таких методов, как инфракрасная спектроскопия и спектрополяриметрия. Пожалуй, следует отметить, что большинство из применяемых в этих исследованиях методов дают некоторую среднюю характеристику конфигурации полипептидных цепей и их упаковки в белке и оказываются нечувствительными к структуре отдельных небольших участков молекулы, если их конфигурация не соответствует конфигурации основной массы цепей.

В развитии структурных исследований белка большую роль сыграло изучение структуры аминокислот, пептидов и полипептидов, которое позволило установить основные стереохимические законы для остова полипептидной цепи. Мы рассмотрим вначале именно эти исследования, так как современные представления о вторичной структуре белка в большой мере опираются на их результаты.

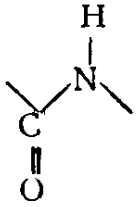
ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ

К настоящему времени методами рентгеноструктурного анализа определена полностью кристаллическая структура многих α-аминокислот и низших пептидов.

Что понимают под определением кристаллической структуры того или иного соединения? Определить кристаллическую структуру вещества — это значит найти пространственное положение каждого атома, входящего в состав соединения. Обычно для каждого атома указывают три координаты по отношению к координатной системе, оси которой совпадают с направлением ребер элементарной ячейки кристалла. Определением координат атомов и заканчивается рентгенографическое определение структуры кристалла. Эта задача довольно сложная и, к сожалению, нет универсальных рецептов для ее решения.

Координаты атомов простых кристаллических соединений, таких, как аминокислоты и низшие пептиды, удается обычно определить с точностью до сотых, а иногда и тысячных долей ангстрема. Эта степень точности, во всяком случае, дает возможность проанализировать особенности пространственной конфигурации молекул и их частей и изучить особенности упаковки молекул в кристаллах. Исследования кристаллической структуры L-аминокислот, ди- и три-пептидов, а также простых соединений, содержащих пептидные группы, таких, например, как N-ацетилглицин, привели к следующим результатам.

Было обнаружено, что во всех исследованных соединениях атомы, принадлежащие к пептидной группе,



располагаются в одной плоскости. Отклонения от плоскостного расположения атомов, наблюдаемые в пептидных группах, не превышают 0,06 Å. Плоскостная конфигурация пептидной группы возможна только в том случае, если пептидный азот является «плоским», т. е. все три связи азота располагаются в одной плоскости под углами около 120°, а не «пирамидальным», как это имеет место во многих соединениях.

По результатам рентгеноструктурных исследований были установлены межатомные расстояния и валентные углы, характерные для пептидных групп. На основании этих данных были постулированы стандартные параметры межатомных расстояний и валентных углов пептидных группировок. Для различных соединений возможны отклонения от этих стандартных значений в пределах нескольких сотых долей ангстрема в длинах связей и в пределах 3—4° в валентных углах. Эти отклонения объясняются напряжениями, возникающими на отдельных участках структуры при образовании плотной упаковки молекул в кристаллах. Стандартные параметры для пептидных групп представлены на рис. 11

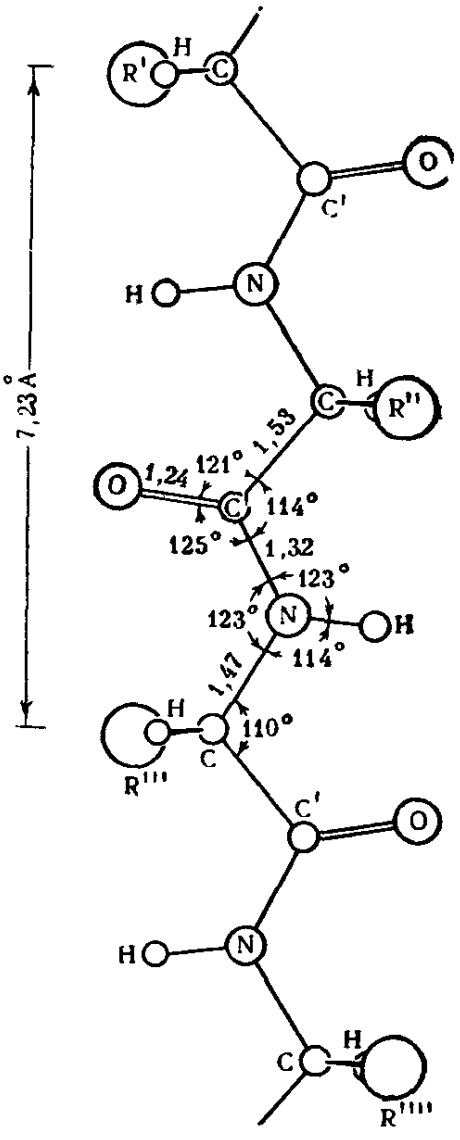


Рис 11. Стандартные параметры пептидных цепей

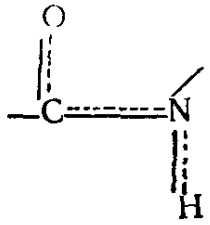
Как показали исследования многих соединений, длина пептидной связи —C—N— колеблется в пределах 0,02—0,03 Å около среднего значения 1,35 Å. Это расстояние не соответствует длине чисто одинарной связи $-\overset{|}{\underset{|}{C}}-N-$ (по многочисленным данным, полученным для различных органических соединений, она близка к 1,47 Å), пептидная связь короче чистой одинарной связи. Вместе с тем она длиннее чистой двойной связи $-\overset{|}{C}=N-$ 1,25 Å.

Расстояние $>C=O$, равное 1,28—1,29 Å, оказывается также длиннее расстояния, характерного для двойной связи $>C=O$ (1,24 Å) и короче расстояния, характерного для одинарной связи.

Полинг считает, что пептидная связь $=\overset{|}{C}-N<$ является на 40% двойной, а связь $>C=O$ на 40% — одинарной.

Особый характер межатомных связей в пептидных группах связан, по-видимому, с перераспределением зарядности атомов кислорода и азота. Кислород должен иметь избыточный отрицательный заряд, так как обе его валентности оказываются не полностью насыщенными, а азот соответственно избыточный положительный заряд.

Измеренные значения межатомных расстояний в пептидной группе указывают на наличие сопряжений в системе связей.



Плоскостная конфигурация групп, содержащих сопряженные связи — факт, хорошо известный в кристаллохимии органических соединений.

Для межатомных расстояний и валентных углов α-углеродного атома и атомов боковых групп получены обычные значения, характерные для многих других органических соединений.

α-углеродный атом имеет тетраэдрическую конфигурацию, т. е. его четыре связи составляют друг с другом углы около 109°. Длина связи $\equiv N-\underset{\alpha}{C}-$ составляет 1,47 Å, $-C-C-$ 1,51—1,54 Å.

Тетраэдрическую конфигурацию имеют углеродные атомы алифатических боковых цепей, а также углеродные атомы пятичленных колец иминокислотных остатков. Это приводит к тому, что пятичленные кольца оказываются не плоскими. Один из углеродных атомов выходит из плоскости, в которой лежат связи остальных четырех атомов, на 0,4—0,5 Å.

Бензольные кольца фенилаланина и тирозина плоские.

Хотя методами рентгеноструктурного анализа не удается непосредственно определить положение атомов водорода, так как они очень слабо рассеивают рентгеновские лучи, тем не менее расположение атомов соседних молекул вблизи азота концевой аминогруппы свидетельствует о наличии цвиттерионной структуры у аминокислот и пептидов в кристаллах, т. е. о наличии концевой заряженной группы NH_3^+ и соответственно COO^-. Как было показано, азот концевой аминогруппы имеет тетраэдрическую конфигурацию.

Наличие избыточного отрицательного заряда на кислороде пептидной группы и положительного на азоте приводит к тому, что пептидные группировки очень легко образуют водородные связи. Водородные связи образуют также концевые амино- и карбоксильные группы и аналогичные группы боковых цепей.

Как уже указывалось, рентгеноструктурным анализом не удается найти положение атомов водорода, однако наличие водородной связи $C{=}O....H-N$ легко обнаруживается рентгенографически по укороченному расстоянию C—N, равному 2,7—3 Å. Линия N—H...O в водородной межмолекулярной связи должна быть прямой. Если азот относится к пептидной группе, положение связи N—H можно рассчитать, так как направление других связей азота в пептидной группе определяется непосредственно. Следовательно, можно проверить, является ли линия N—H...O прямой, т. е. действительно ли группы N—H и C=O образуют водородную связь.

Было обнаружено, что в кристаллической структуре аминокислот и пептидов все пептидные и концевые CO, NH, NH_3^+, NH_2^+, COO^--группы, а также аналогичные группировки боковых цепей образуют водородные связи.

Максимальное насыщение водородных связей в кристаллической структуре аминокислот и пептидов — один из экспериментально установленных законов.

Весьма ценные данные были получены при изучении конфигурации цепей синтетических полипептидов. Эти данные явились основой, на которой в дальнейшем разрабатывались законы стереохимии пептидных цепей.

Синтетические полипептиды, так же как и большинство полимерных веществ, не могут быть получены в виде правильных кристаллов. Наиболее упорядоченная структура таких полимеров возникает в высокоориентированных пленках и нитях. В таких нитях и пленках образуются пачки параллельно расположенных цепей. Азимутальная ориентация пачек цепей или даже отдельных цепочек относительно оси, совпадающей с направлением длины цепи, не фиксирована. Поэтому пространственное положение отдельных звеньев цепочек не соответствует одной правильной трехмерной решетке. В этом смысле структура полимерной нити или пленки менее упорядоченна, чем в правильном кристалле. Для таких структур методом рентгеноструктурного анализа невозможно определить координаты атомов, однако оказывается возможным установить общие особенности конфигурации цепей в пачках. Большую помощь при этом оказывают косвенные данные о конфигурации молекул, полученные другими методами.

Основные результаты изучения структуры синтетических полипептидов сводятся к следующему.

Было обнаружено, что различные синтетические полипептиды, такие как поли-γ-метил-L-глутамат, поли-L-лизин, поли-L-аланин и поли-γ-бензил-L-глутамат при определенных условиях имеют практически одну и ту же конфигурацию цепей в пачках. Используя термин Линдерштрем-Ланга, можно сказать, что они имеют одинаковую вторичную структуру. Это обстоятельство свидетельствует о том, что полипептидные цепи могут иметь конфигурации, не чувствительные к боковым цепям аминокислотных остатков. Следовательно, эти конфигурации должны стабилизироваться связями, принадлежащими только остову пептидной цепи. Этими связями могут являться водородные связи между CO- и NH-группами пептидных остатков. Особенности рентгеновской дифракционной картины перечисленных полипептидов указывают на спиральную конфигурацию отдельных фрагментов их пептидных цепей. Было рассчитано, что полипептидные спирали имеют около 18 идентичных групп в пяти оборотах (или 18 пептидных остатков), т. е. 3,6 остатка в одном обороте. Шаг спирали 5,4 Å. Следовательно, каждый остаток, длина которого, вычисленная из известных значений валентных углов и межатомных расстояний, составляет около 3,6 Å, должен быть наклонен так, что проекция этой длины на ось спирали равна приблизительно 1,56°. Такую спираль можно сравнить с винтовой лестницей, имеющей 18 ступенек в 5 оборотах. Каждая такая ступенька соответствует одному наклоненному пептидному остатку. Такие спирали были названы α-спиралями.

Теоретический расчет α-спиральной конфигурации оказался возможным только благодаря точному знанию валентных углов и межатомных расстояний в пептидной цепи. Полинг проанализировал все возможные конфигурации хребта полипептидной цепи, удовлетворяющие структурным требованиям, сформулированным на основании изучения структуры аминокислот и пептидов. Он показал, что сохраняя стандартные валентные углы и межатомные расстояния, выполняя требование плоскостного расположения пептидных групп, т. е. изгибая цепь только в точках расположения α-углеродных атомов и добиваясь при этом полного насыщения водородных связей в структуре, можно построить только две спи-

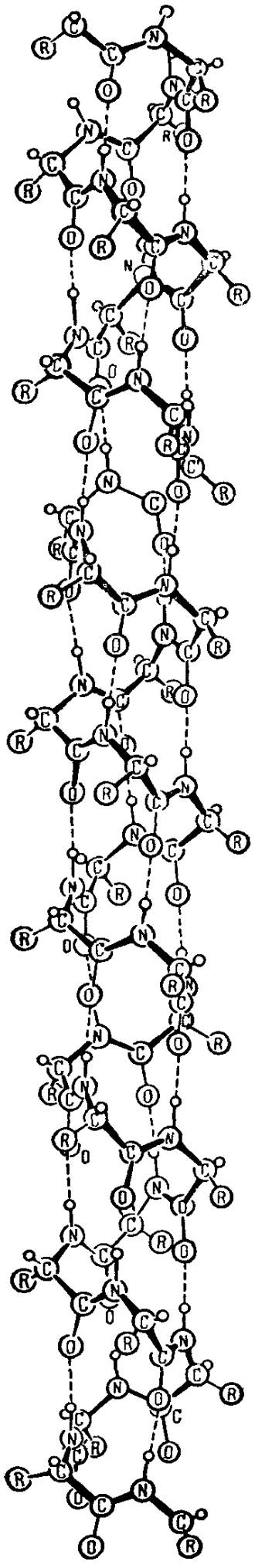


Рис. 12. Модель α-спирали

ральные конфигурации: α-спираль и γ-спираль, γ-спираль очень скоро была отвергнута, так как она мало компактна — вблизи оси γ-спирали находится сравнительно большая пустая полость. α-спираль оказалась очень компактной структурой. На рис. 12, изображающем модель α-спирали, видно, как атомы хребта пептидной цепи плотно прилегают друг к другу.

Как показали исследования инфракрасных спектров поглощения, водородные связи в α-спиралях направлены вдоль оси волокна. Как видно из рис. 12, они связывают отдельные ветки α-спирали.

Изучение зависимости вращения плоскости поляризации света от длины его волны для растворов синтетических полипептидов показало, что все α-спирали полипептидов являются правыми. Это значит, что если за направление последовательности в цепи берется последовательность —CHR—NH—CO—CHR—, спираль образует правый винт. Широкое распространение α-спиральных структур среди синтетических полипептидов дает основание полагать, что такие спирали являются наиболее характерными и устойчивыми конфигурациями полипептидных цепей. Впоследствии это подтвердилось многочисленными физико-химическими исследованиями, в которых изучалась стабильность α-спиральной конфигурации полипептидов в самых различных условиях. Было обнаружено, что α-спираль стабильна в сравнительно широком диапазоне условий (pH, температура), а также в условиях, при которых многие белки остаются нативными.

В синтетических полипептидах были также найдены другие конфигурации цепей, однако, как было показано, эти конфигурации стабильны лишь при весьма специальных условиях, и поэтому им не следует придавать такого широкого значения, как α-структурам.

При условии сильного растяжения спираль может растянуться и цепь принять полностью вытянутую конфигурацию.

Такие конфигурации названы β-конфигурациями. β-структуры мало стабильны и легко превращаются обратно в α-спираль.

В β-структурах все пептидные группы лежат почти в одной плоскости. Плоскости двух соседних пептидных групп образуют очень небольшой угол. Водородные связи в β-структурах образуются между цепями. Поляризованные инфракрасные спектры поглощения показали, что водородные связи в β-структурах, в отличие от α-структур направлены перпендикулярно оси волокна, что находится в полном соответствии с разработанными схемами. Пептидные группы цепей, связанных с водородными связями, образуют волнистый слой. Перпендикулярно этому слою торчат боковые группы амино-

кислотных остатков. Малая стабильность β-структур объясняется сильным отталкиванием боковых атомов, которые слишком близко располагаются друг от друга (см. рис. 13).

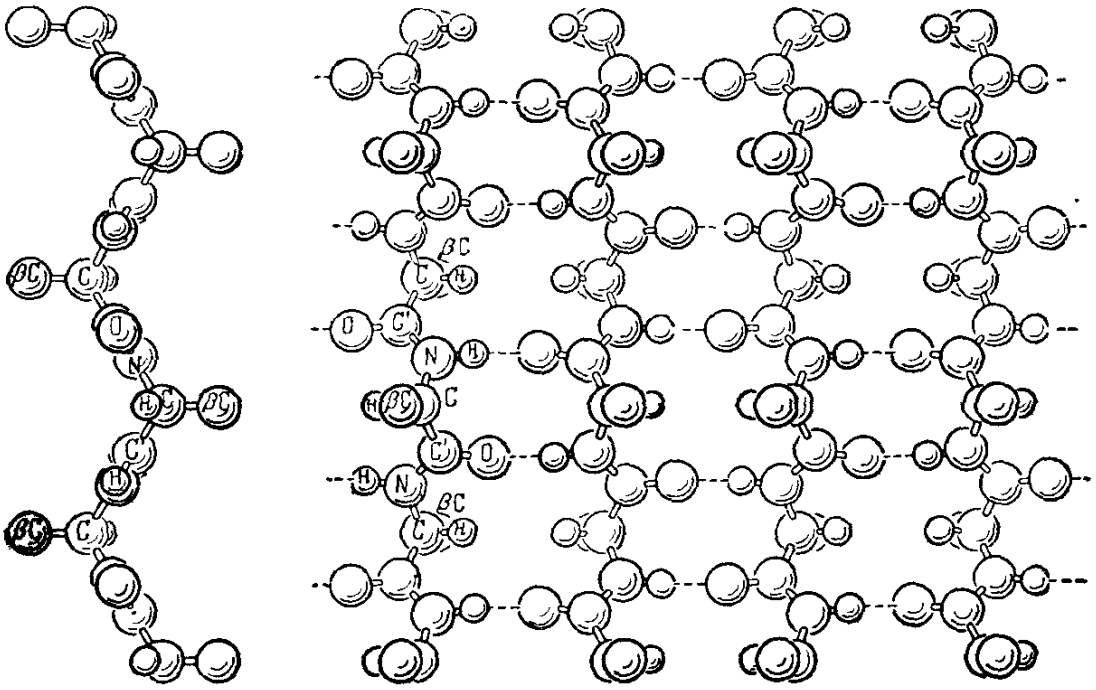


Рис. 13 Конфигурация и упаковка цепей в β-структурах

В полипептидах аминокислот, например, в полипролине была также обнаружена особая конфигурация цепей. Она является следствием специфической стереохимии пирролидиновых колец. Цепь поли-L-пролина — левая спираль с тремя остатками в обороте.

ФИБРИЛЛЯРНЫЕ БЕЛКИ

Большой экспериментальный материал о синтетических полипептидах позволил найти рациональные пути подхода к интерпретации многочисленных экспериментальных данных о белках.

Переходя к анализу этих данных, а также современных теорий пространственной структуры белков, необходимо в первую очередь провести разграничение между фибриллярными и глобулярными белками.

Белки принято делить на два больших класса — белки фибриллярные и белки глобулярные. Основой для такой классификации служат в первую очередь структурные различия белков, принадлежащих к этим двум группам. Фибриллярные белки являются основой различных тканей.

Есть основания полагать, что в волокнах фибриллярных белков полипептидные цепи молекул располагаются приблизительно параллельно оси волокна. В то же время полипептидные цепи глобулярных белков, изгибаясь и закручиваясь, могут принимать самую причудливую форму.

Поэтому молекулы глобулярных белков по форме могут быть близки к сферическим частицам. Таким образом, разница в конфигурации фибриллярных и глобулярных белков определяется в первую очередь их третичной структурой.

Важнейшими фибриллярными белками являются белки мышечных тканей — миозин и *F*-актин, соединительнотканный белок коллаген (он же образует основу кожных покровов млекопитающих, белковую часть костной ткани, а также является важной частью кожных покровов и

различных органов рыб, рептилий и многих беспозвоночных животных); кератин, являющийся основой роговых образований, волос, шерсти; фаброин шелка — белок, секретируемый железами шелковичного червя.

Многие фибриллярные белки в отличие от глобулярных плохо поддаются растворению, что также рассматривалось в качестве одной из основ для разделения белков на два класса. Растворимые фибриллярные белки, такие как миозин, проколлаген (растворимая часть коллагена), характеризуются чрезвычайно высокой асимметрией молекул. Молекула миозина ведет себя в растворе как жесткая палочка длиной около 2000 Å и толщиной всего лишь 24 Å. Молекула проколлагена имеет длину около 2500—3000 Å, а толщину 12 Å. Такая форма молекул несовместима с хаотическим закручиванием цепей. Ясно, что цепи в таких молекулах имеют приблизительно вытянутую форму и в поперечнике молекулы умещается либо несколько цепей, либо несколько их фрагментов.

В настоящее время наиболее полно изучена вторичная структура фибриллярных белков. Ее изучение было чрезвычайно облегчено тем, что во многих фибриллярных белках были обнаружены конфигурации цепей, нечувствительные к характеру и последовательности боковых групп остатков. Это позволило весьма эффективно использовать данные, накопленные при изучении синтетических полипептидов.

Еще в 30-х годах главным образом в работах Астбери была дана рентгенографическая характеристика многих фибриллярных белков. Важнейший результат работ Астбери сводится к следующему. Многие совершенно различные в химическом отношении белки, такие например, как кератин волос, шерсти и рога, миозин мышц, эпидермис кожных покровов, фибриноген — фибриллярный белок, образующийся при свертывании крови, а также многие другие дают практически одинаковые рентгенограммы. Это возможно только лишь в том случае, если конфигурации цепей этих белков и их упаковка или, иначе, их вторичная и третичная структуры в своих общих чертах не зависят от специфического чередования аминокислотных остатков. Здесь речь идет именно об общих чертах вторичной и третичной структур, так как на отдельных участках возможны существенные отклонения от общего плана строения за счет специфического взаимодействия боковых групп остатков, к чему, как указывалось выше, рентгенографический метод исследования оказывается нечувствительным (речь идет об изучении фибриллярных структур).

Каким образом упаковка цепей может быть нечувствительной к особенностям чередования боковых групп остатков? Если цепь в среднем может быть аппроксимирована цилиндром определенного радиуса, то и расстояние между осями таких цилиндров является в среднем некоторой определенной величиной. На рентгенограммах и обнаружится это среднее расстояние между цепями.

Вторичная структура цепи может не зависеть от чередования аминокислотных остатков в том случае, если она обусловлена свойствами хребта пептидной цепи.

Замечательным явилось сходство рентгенограмм перечисленных фибриллярных белков и той структурной формы синтетических полипептидов, которая оказалась нечувствительной к их химической структуре. Речь идет об α-спирали. Получены убедительные признаки существования α-спиральной конфигурации в полипептидных цепях фибриллярных белков. Измеренный по рентгенограммам шаг спирали (около 5 Å) и величина проекции одного остатка на ось волокна (около 1,5 Å) согласуются с расчетными данными для α-спиральных структур. Дихроизм поляризованных инфракрасных спектров поглощения перечисленных фибриллярных белков указывает на то, что водородные связи в этих белках

между пептидными CO- и NH-группами являются внутримолекулярными и направлены вдоль оси волокна, т. е. что они соединяют отдельные витки спиралей, стабилизируя тем самым спиральную конфигурацию цепей.

Все это находится в полном соответствии с данными, полученными для синтетических полипептидов.

Дальнейшие теоретические исследования α-спиральной структуры показали, что она является наиболее энергетически выгодной и стабильной формой хребта пептидной цепи.

Открытие α-спирали в синтетических полипептидах и фибриллярных белках явилось выдающимся достижением структурной химии нашего времени.

Также как синтетические полипептиды, α-белки могут быть переведены в β-форму. Это достигается растяжением, иногда в специальных условиях. Рентгенограммы β-белков показывают, что их молекулярные цепи принимают при растяжении вытянутую конфигурацию. Водородные связи в β-белках также, как и в синтетических полипептидах, направлены перпендикулярно оси волокна. β-Форма белков нестабильна и после удаления растягивающего усилия, как правило, вновь восстанавливается α-спиральная конфигурация цепей. Только один белок,— фиброин шелка в естественном состоянии существует в виде β-формы. Образование β-конфигурации цепей в фиброине шелка происходит в тот момент, когда шелковичный червь прядет шелковую нить. Образующиеся при этом большие силы давления развертывают молекулярные цепи белка. Стабильность образовавшейся β-конфигурации в нити фиброина шелка объясняется тем, что на отдельных фрагментах молекул этого белка скапливаются остатки с короткими боковыми цепями — глицин, аланин, серин. Отталкивание боковых групп этих остатков во много раз меньше отталкивания больших боковых цепей других аминокислот. Поэтому β-структуры, возникающие на отдельных фрагментах цепей фиброина шелка (в местах скоплений остатков с короткими боковыми цепями), оказываются относительно стабильными. Это подтверждается изучением β-структур синтетических полипептидов с короткими боковыми цепями, таких, как поли-(глицил- аланин).

Белки коллагеновой группы характеризуются относительно высоким содержанием остатков пролина и оксипролина. Как показали последние исследования, эти остатки вместе с остатками глицина скапливаются на отдельных участках молекулярных цепей. На этих участках возникают конфигурации, имеющие много общего с конфигурацией цепи поли-L-пролина.

Детали этой конфигурации еще неясны, хотя имеется ряд довольно убедительных гипотез.

Характеризуя в целом особенности вторичной структуры фибриллярных белков, следует подчеркнуть, что для большинства этих белков характерна α-конфигурация полипептидных цепей. Отступление от этой структуры наблюдается у тех белков, у которых обнаруживаются резкие отклонения от закона статистичности в расположении аминокислотных остатков — скопление некоторых видов остатков на отдельных фрагментах молекулярных цепей. В фиброине шелка — скопления остатков глицина, аланина и серина, в коллагене — скопления остатков пролина, оксипролина и глицина.

Пожалуй, следует подчеркнуть, что структурные формы, наблюдаемые в фибриллярных белках, выражены не столь четко, как в синтетических полипептидах. Это объясняется тем, что локальные нарушения, вызываемые структурными различиями боковых групп, «портят» структуру.

Тем не менее признаки, по которым устанавливается наличие того или иного типа структуры, не оставляют в настоящее время возможностей для двузначного толкования экспериментальных данных и можно с уверенностью говорить о том или ином типе вторичной структуры изучаемого фибриллярного белка.

ГЛОБУЛЯРНЫЕ БЕЛКИ

Как известно, многие глобулярные белки могут быть выделены в виде очень мелких кристаллов. Оказалось, что кристаллы некоторых глобулярных белков могут быть выращены до сравнительно больших

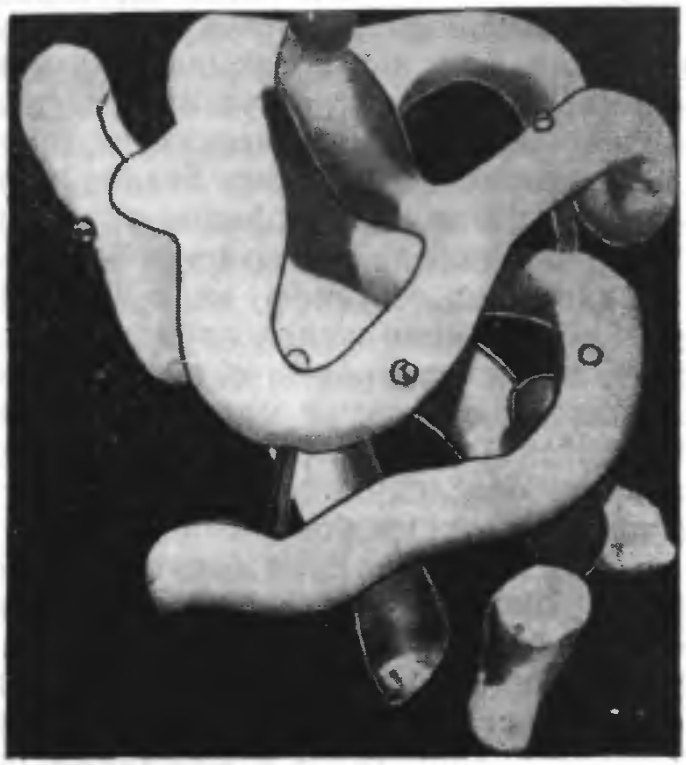


Рис. 14. Третичная структура миоглобина

размеров порядка 1 *мм*. Такие крупные монокристаллы можно исследовать рентгенографически и также, как для всяких других монокристаллов, можно пытаться поставить задачу полного определения их структуры. Попытка определить пространственное расположение атомов в молекуле белка является чрезвычайно заманчивой и в течение многих лет ряд крупных школ зарубежных кристаллографов бьется над ее разрешением. Некоторые методы рентгеноструктурного анализа позволяют найти пространственное расположение атомов в молекуле без исчерпывающих данных об ее химической структуре. Это так называемые прямые методы. Эти методы и пытаются использовать для нахождения структуры белка.

Наибольший успех был достигнут в изучении структуры гемоглобина и миоглобина сердца лошади.

Успех в определении кристаллической структуры обусловлен возможностью нахождения распределения электронной плотности в элементарной ячейке кристалла. Распределение электронной плотности отражает расположение атомов в структуре, так как каждому атому соответствует сгусток электронной плотности, который тем больше, чем больше его атомный номер.

Чтобы найти распределение электронной плотности в элементарной ячейке кристалла, необходимо найти фазы рентгеновских волн, отраженных кристаллом в различных направлениях. Для определения фаз рентгеновских отражений применяются специальные методы. Если удается определить фазы всех рентгеновских отражений, можно достаточно точно определить картину распределения электронной плотности в кристалле. Если удается найти фазы лишь некоторой части рентгеновских отражений, то картина распределения электронной плотности будет довольно размытой и нечеткой. Мы будем иметь нечто подобное изображению предмета, рассматриваемого в микроскоп при плохой фокусировке.

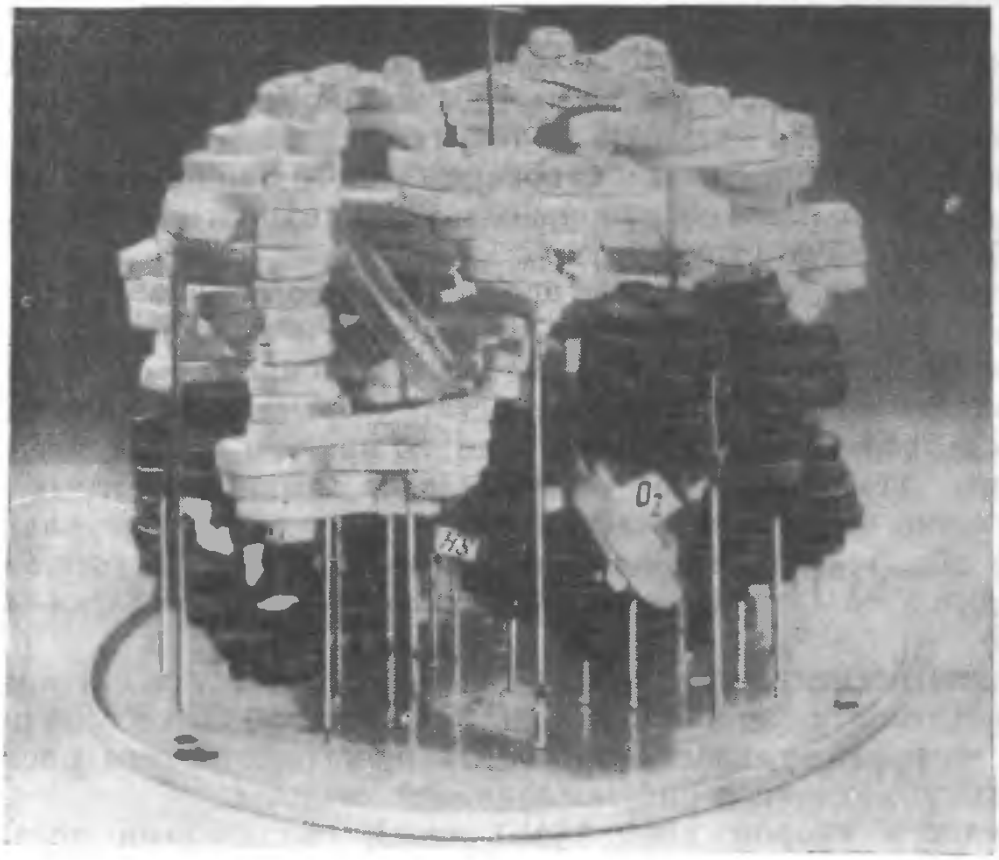


Рис. 15. Третичная структура гемоглобина

Видны отдельные участки цепей со спиральной конфигурацией, плоские гемогруппы и сульфгидрильные группировки. Черные и белые пластники соответствуют разным глобиновым частицам.

Для миоглобина удалось найти фазы некоторой части рентгеновских отражений и, соответственно, найти распределение электронной плотности в молекуле. Полученные картинки оказались, как и следовало ожидать, не очень четкими, на них не были видны отдельные атомы. Однако третичная структура проявилась на них весьма рельефно, так как общие контуры цепей были видны отчетливо.

Это позволило установить третичную структуру миоглобина (см. рис. 14), что явилось большим достижением в области изучения структуры белка.

Для гемоглобина удалось также определить фазы многих рентгеновских отражений, а также определить его третичную структуру (рис. 15).

На рис. 14 изображена третичная структура миоглобина. На рисунке видны изогнутые жгуты, которые соответствуют сгусткам электронной плотности. Это хребты пептидных цепей. Жгуты нигде не соприкасаются друг с другом, в промежутках между ними располагаются атомы боковых групп, упаковка которых менее компактна и, соответственно.

среднее значение электронной плотности на этих участках ниже, чем значение электронной плотности хребта пептидной цепи. Черные отметки — это точки, где находятся тяжелые атомы, введенные в молекулу. Полученное распределение электронной плотности соответствует разрешающей способности метода, которая составляет около 6 Å.

Рентгенографическими методами изучались и многие другие кристаллические белки: рибонуклеаза, инсулин, β-лактоглобулин, сывороточный альбумин и др.

Однако существенно удалось продвинуться в изучении структуры миоглобина и гемоглобина, химическое строение которых сравнительно мало изучено.

Разрешающая способность в 6 Å не является пределом используемых методов исследования. Ее можно повысить до 1,5—2 Å, в соответствии с числом экспериментально наблюдаемых рентгеновских отражений. Следовательно, можно определить положение всех атомов, образующих в своей совокупности сложную молекулу.

Это позволяет определить строение белковой молекулы, не прибегая к ее предварительному разрушению, и устанавливать ее первичную, вторичную и третичную структуру.

Действительно, в последнее время для миоглобина удалось определить фазы 12 000 рентгеновских отражений и получить распределение электронной плотности в молекуле с разрешением в 2 Å. Полученная разрешающая способность еще недостаточна, чтобы можно было наблюдать каждый атом в отдельности. Однако на этом распределении можно проследить конфигурацию чередующихся аминокислотных остатков. На нем четко выявились участки с α-спиральной конфигурацией цепей.

Было обнаружено, что плоский гем расположен на торце α-спирали и находится в непосредственной близости от остатка гистидина (рис. 15).

Успешно исследуется структура значительно более сложного соединения, чем гемоглобин и миоглобин. Речь идет о вирусе табачной мозаики, для которого, удалось определить пространственное расположение белковых субъединиц и рибонуклеиновой кислоты.

Очевидно, в скором времени мы станем свидетелями того, как первичная, вторичная и третичная структура сложнейших соединений — белков и нуклеопротеидов будет установлена непосредственно по атомным координатам, определенным на основании рентгенографических экспериментальных данных.

ЛИТЕРАТУРА

Белицер В. А. О структуре белков. Успехи современной биологии, 1960, **50**, 3.

Дю Виньо В. Выделение и установление структуры вазопрессинов и синтез октапептидаминов с прессорно-антидиуретической активностью. Современные проблемы биохимии ИЛ, 1957, стр. 105.

Волькенштейн М. В. Конфигурационная статистика полимерных цепей. Изд-во АН СССР, 1959.

Зелинский Н. Д., Гаврилов Н. И. Современное состояние вопроса о циклической природе связей аминокислот в молекуле белка. Вест. МГУ, 1947, № 7, стр. 57.

Каверзнева Е. Д. Нерешенные вопросы строения белка. Вест. АН СССР, 1956, № 8, 15.

Кендрью Дж. Структурные белки. Гл. III. В сб. Белки, т. 3, ч. II, ИЛ, 1959

Локшина Л. А., Троицкая О. В. Исследование химического строения белковых веществ. Успехи биологической химии, т. 3. Изд-во АН СССР, 1958, стр. 3.

Лоу Б. Строение и конфигурация аминокислот, пептидов и белков, гл. I В сб Белки, т. 2. ИЛ, 1956.

Мидзусима. Строение молекул и внутреннее вращение. ИЛ, 1957.

Паулинг Л., Кори Р. Конфигурация полипептидных цепей в белках. Современные проблемы биохимии, ИЛ, 1957

Тристрам П. Аминокислотный состав белков. В сб. Белки под ред. Г. Нейрата. К. Бейли, т. 1. М., ИЛ, 1956.
Энгельгардт В. А. Некоторые вопросы современной биохимии. ИЛ, 1959.
Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. The sequence of the aminoacid residues in performic acid-oxidized Ribonuclease. J. Biol. Chem., 1960, 235, 633.
Neuberger C. Symposium on Protein Structure, 1958.
Sanger A. The arrangement of Aminoacids in Protein. Advances in Protein Chemistry. 1952, 7, 1.
Sorm F. Comparative studies in the field of Protein microstructure. Symposium on Protein Structure, 1958.
Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. The disulfide bonds of ribonuclease. J. Biol. Chem. 1960, 235, 648.
Серия статей по исследованию структуры белков. Review of Modern Physics, 1959, 31, N 1—2.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агликоны
морского лука 274
сердечные 273
Аденин
9 D β-глюкопиранозил 196, **200, 201**
дезаминирование 178
синтез 182—184
строение 178
Аденозин
2-дезокси 213
дифосфат 228, 233
5¹-монофосфат 218, 220, 222, 228, **231**
пентафосфат 234
синтез 192, 201
строение 191, 196
тетрафосфат 234
трифосфат 227, 228, 265
гидролиз 231
синтез 233
строение 231
Азасерин 441
Азетидин 2-карбоновая кислота **441**
Акролеин, в синтезе аминокислот **444, 448,** 452
Активность
анаболическая 322
андрогенная 316
зависимость от строения 320, 322
гестагенная 325, 331
кортикоидная 390, 393, 440
зависимость от строения 353, 383
тесты, 343, 344
эстрогенная 303, 313
Актиномицин 434, 470
Аланин 437, 459, 460
содержание в белках 436, 483
β-Аланин 439
L-Аланин, установление конфигурации **454**
Алкалоиды (стероидные) 274
Аллиин 440
Аллицин 440
Аллооксипролин 452
D-Аллооксипролин 439
Аллотреонин 451, 457
Альбумин
длина пептидной цепи 528
молекулярный вес 532
распределение функциональных групп 484
сывороточный, распределение функциональных групп 484
яичный 532
Альгиновая кислота 161
Альдоза, восстановление 100
окисление 101
определение 9
Альдоновые кислоты 102
Альдостерон 343
полный синтез
Джонсона 418—421
Рейхштейна и Ветштейна **418**
Альтроза 76
Амигдалин 97
Амилоза 157
Амилопектин 157
α-Аминоизомасляная кислота 439
ε-Аминокапроновая кислота 459, **460**
Аминокислоты
аминная группа
активация 495
защита 443, 461, 464—466 488 489 510, 511, 514
ангидриды 463, 487, 488, 493
смешанные 492, 496
ацильные и алкильные производные 464, 465
гидразиды 513
дезаминирование 467, 469, 473, 477, 479 479
декарбоксилирование 469, 470, 472, 474, 475
динитрофенилпроизводные 465, 510
диссоциация 459, 460
изоэлектрические точки 459, 460
карбобензоксипроизводные 491, 496
карбоксиангидриды 466
карбоксильная группа,
активация 462, 487, 494
защита 488
классификация 438
кристаллическая структура 536—538
медные комплексы 461
меченные, синтез 452, 453
переаминирование 469
полимеры, 496—498, 541
рацематы, разделение 454—458
реакции качественные 473, 474
с альдегидами 466
с нингидрином 467—469
с фенилтиоизо и с фенилизоцианатом 465, 466
с формальдегидом 460, 466, 467, 471
свойства 459—476
синтезы 442—458
содержание в белках 433, 436
эфиры 461—463, 488
α-Аминомасляная кислота 439
γ-Аминомасляная кислота 439
Аминосахара 10, 127
Ангидросахара 74, 93
Андростан 278
Андростендион 308, 320

Андростерон 272
активность 317
выделение 316
синтез из дегидроэпиандростерона 317
установление строения и пространственной конфигурации 316
Аномеры 40, 42 53 65
ацетатов моносахаридов 65
моносахаридов 40
конфигурация 42
конформация 53
Антоцианы 96, 98
Арбутин 95, 98
Аргинин 437, 460, 473, 474, 478, **482**
содержание в белках 436, 483
Асимметрический синтез 423—424
Аскорбиновая кислота 106
Аспарагин 460, 478
содержание в белках 473
L-Аспарагин 454
установление конфигурации 455
Аспарагиновая кислота 437, 460, 473, **482**
превращение пептидов 509, 531
синтез 444, 447
содержание в белках 436, 483
Атролактиновая кислота 424
Ацилазы
разделение рацематов аминокислот 456
Ацилгликозилгалогениды 69

Батромицин 440
Белки
аминокислотный состав 482—483
биуретовая реакция 486
гидролиз
кислотный 477
ферментативный 479, 516, 518, 523
частичный 514—516
шелочной 478
глобулярные 434, 496
структура 541, 544—546
динитрофенилирование 510, 511, 514, 518
длина пептидных цепей 526
зависимость активности от строения 525, 527
молекулярный вес 483
определение
С-концевых аминокислот 513
N концевых аминокислот 510—512
простетические группы 532, 533
простые (протеины) 434, 435, 532
сложные (протеиды) 434, 435, 532
строение 519—546
структура
первичная 535, 536
вторичная 535, 536, 539—543
третичная 539—544
типы 531
фибриллярные 434, 435, 496, 532, 541—544
фракционирование гидролизата 479
функциональные группы 482—484
электровосстановление 516
Бензоэстрол 313, 314
Бисдегидродойзинолевая кислота 311
Биуретовая реакция
с белками 486
с пептидами 504
Вазопрессин 486, 527
Валин 439, 459, 460
содержание в белках 437, 483
Валин 4 C^{14}, синтез 455
Вещество S Рейхштейна (17,21-диоксипрогестерон)
синтез из дегидроэпиандростерона 360
из дезоксикортикостерона 363
Виомицин 439
Вирусы
табачной мозаики, состав, строение 533—534
Витамин D 271, 299
Вителлин 510

Галактаны 160
Галактоза 52, 65
Галактозамин 128
Гекогенин 369
превращение в кортизон 369—370
Гексозаны 10
Гексэстрол 311
синтез 312—314
Гемоглобин
аминокислотный состав 483
распределение функциональных групп 484
структура 532, 533, 544 546
Гемоцианин 533
Генциобиоза 144
Гепарин 76, 166
Гетероауксин 475
Гетерополисахариды, определение 10
строение 163
Гиалуровая кислота 166
Гидантоин 446, 447, 465, 466
Гидрокортизон (кортизол) 342
превращение
в адреностерон 347
в 6β метил 9α фторкортизон 389
Гиодезоксихолевая кислота 272
превращение в прогестерон 330
Гипертензины 526
Гипоксантин 178, 183
Гиппуровая кислота 445
Гистамин 470, 475
Гистидин 438, 460, 470, 475, 482 509
содержание в белках 436, 483
L-Гистидин, установление конфигурации 454, 455
Гистоны
тимуса теленка, аминокислотный состав 483
печени крысы, распределение функциональных групп 484
Глиадин 436
аминокислотный состав 483
распределение функциональных групп 484
Гликоген, строение 159
Гликозидазы 45, 88
Гликозиды
антрахиноновые 95
гидролиз 91
конфигурация 44
кумариновые 96
сердечные 97
синтез 71, 84
стереохимия 40
строение 88

фенолов 93, 95
флавоновые 96
N-Гликозиды, получение 130
Гликоколь см Глицин
Гликопептиды 97, 163
D-Глицериновый альдегид
абсолютная конфигурация 14, 15
L-Глицериновый альдегид
абсолютная конфигурацня 14, 15
установление конфигурации аминокислот 454
Глицин 437, 450, 459, 460, 470
содержание в белках 436, 470, 483
Глутамин 460
превращения при гидролизе 479
содержание в белках 473
Глутаминовая кислота 437, 460, 473
пептиды 509—510, 530—531
синтез 447
содержание в белках 436, 483
Глутатион 524
Глюкагон 526
Глюкоза, ацетилирование 65
восстановление 100
диацетоновое производное 82
конформация 52
метилирование 33
строение 11, 33
1-фосфат 80
6-фосфат 80
Глюкозамин 125
Глюкопротеиды 533
Глюкуроновая кислота 105
D-Гомодегидроэпиандростерон 332
D-Гомодезоксикортикостерон, синтез из *D*-гомопрогестерона 354
D-гомокортизон 384
Гомополисахариды 10, 154
D-Гомопрогестерон 334
синтез из дегидроэпиандростерона 332
Гомосерин 441
D-Гомостероиды 321, 332, 334, 354
D-Гомотестостерон
синтез из дегидроэпиандростерона 321
Гомоцистеин 472
Гормоны
адренортикотропные
длина пептидной цепи 528
молекулярный вес 528
распределение функциональных групп 484
строение 525
андрогенные 272, 316—324
активность сравнительная 320
гестагенные 272, 325—340
применение 339
гонадотропный
распределение функциональных групп 486
кортикоидные 272, 273
выделение 344
классификация 342
установление строения 349
α- и β меланотропные (интермедины), строение 522, 523
эстрогенные 272, 303, 309
применение 314
разделение 305
связь с гормонами гипофиза 304
Грамин 451
Грамицидин С, синтез 500, 501
строение 525
Грамицидин
содержание орнитина 473, 486
Грамицидин J 527
Гуанин
синтез 182
строение 178
Гуаиозин
синтез 192
строение 192, 193
Гуанозиндифосфатманноза 238, 239
Гуанозиндифосфатфукоза 238
Гуанозинтрифосфат 265
L-Гулоза 105
Гумми-арабик 167

Дегидропрегненолон, превращение
в 6α-метил-17α оксипрогестерон 338
в 17-метилпрогестерон 332
в 16-β-метил-9α-фторпреднизолон 388
в прогестерон 328
в 21-фторпрогестерон 336
Дегидроэпиандростерон, превращение
в андростерон 317
в вещество S Рейхштейна 360
в *D*-гомотестостерон 321
в тестостерон 317—318
Дезаминирование
аденина 176
аминокислот 467, 469, 473, 477, 479
пептидов 479, 510, 514
2-Дезоксиаллоза 118
2-Дезоксиглюкоза 118, 120
6-Дезоксиглюкоза 75
Дезоксикортикостерон 272, 342
превращение в вещество S Рейхштейна 362—363
синтез из дегидроэпиандростерона 349—350
из литохолевой кислоты 351
из периплогенина 352
из прогестерона 346, 349, 353
D-2-Дезоксирибоза 185—189
Дезоксирибонуклеиновые кислоты 174
классификация 260
макромолекулирная структура 258
последовательнаи деструкция 254
строение 246
Дезоксирибонуклеозиды 210
Дезоксисахара, определение 10
синтез 60, 74, 117
2-Дезоксисахара 210—211
Дезоксихолевая кислота 271, 280
превращечие в кортизон 365—367
синтез Δ^{12}-дезоксикортикостерона 353
6-Диазо 5-оксо L-норлейцин 441
α,β-Диаминомасляная кислота 439
α,γ-Диаминомасляная кислота 439
α,ε-Диаминопимелиновая кислота 439
Дибензилхлорфосфат 219
Дигиталоза 117
Дигитоксоза 117
Дикетопиперазины, в синтезе аминокислот 446
образование 466, 496—497, 499, 515—516
строение белка
связь с пептидами 529—531

β-Диметиллейцин 440
Динуклеотиды
синтез 255
Диосгенин 273
превращение в дегидроэпиандростерон 319
Дисахариды 11, 137
определение 11
строение 137
Дисмутация 114
Дифенилхлорфосфат 220
Дифосфопиридиннуклеотид 235
Биохимическая функция 236
синтез 243
Дульцит 101
Дьенколевая кислота 440

Желатина, гидролиз 436
распределение функциональных групп 484
Желчные кислоты 271—272
установление строения 284—285

Защита
аминной группы аминокислот 489
ацетильная 443
динитрофенильная 465, 510, 511
карбобензокси- 464, 466
тозильная 464
тритильная 465
трифторацетильная 464
формильная 443
фталильная 443
карбоксильной группы аминокислот 461, 489
ОН-группы 488
SH-группы 472, 488
Зеин, аминокислотный состав 483
распределение функциональных групп 484

Изолейцин 437, 460
разделение рацемата 457
содержание в белках 436, 483
Изопримвероза 143
Изоэлектрические точки аминокислот 459, 460
Инвертаза 148
Индикан 97
Инозин 191—193
Инсулин 434, 435
распределение функциональных групп 484
строение 515, 518, 520, 525, 527, 529
Интермедины 526

Кадаверин 470
Казеин 436
аминокислотный состав 483
пептиды β-оксиаминокислот 510
распределение функциональных групп 484
Канаванин 440
Каналин 440
Карбоксипептидаза
определение С-концевых групп в белках 513, 514, 518
Каталаза 533
Кверцитин 96
Кератин 433, 476
распределение функциональных групп 484
содержание цистина 471
структура 542
Кетогептозы 25
Кетозы
определение 10
синтез 58
Кетои Робинсона 398
Кетуроновые кислоты 105
Козимаза — см. коэнзим I
Коллаген 433, 532
аминокислотный состав 483
распределение функциональных групп 484
содержание оксилизина 470
структура 543
Кониферин 95
Конфигурация пространственная, пептидных цепей 535—546
Конформация
молекулы белка 434, 531
моносахаридов 50—54
образование циклопептидов 499
Копростан 277
Копростанол 277
Кортизон 272, 342, 364
полный синтез по Джонсону 416—421
по Саррету 410—413
синтез из вещества S Рейхштейна 376
из гекогенина 369, 370
из дегидроэргостерина 373
из дезоксихолевой кислоты 365—367
установление строения 346—349,
Кортизон
2 метил-387
6β-метил-9α фтор-
синтез из гидрокортизона 389
16α метил- 386
гидро-6α-фтор- 389
19-нор- 386
12α-фтор- 389
9α-фтор-16α-окси-, 390, 392
Кортизон-11 эпи-, синтез из вещества S Рейхштейна 376
Кортикостерон 272, 342
установление строения 346
11-дегидро- 342
Δ^1- 354
Δ^{11}- 353
19-нор- 355
Кофермеиты нуклеотидные
классификация 229
несимметричные 229
нуклеозиддифосфатные 229
нуклеозидполифосфатные 229
определение 174—175, 229
Коэнзим А 240
синтез 245
Коэнзим I 235
Крахмал, строение 156
Ксантин 178
синтез 178, 183
Ксантозин 191
1,3 диметил 191
9 N-глюкозид 203
синтез 191—192
Ксилоза 35

Лактоза 142
Лактулоза 142
Ланолин 274
Ланостадиенол 274
Ланостерин (ланостенол) 274
Лантионин 440
Левоглюкозан 93
Лейцин 437, 459
изоэлектрическая точка 460
содержание в белках, 436, 483
Лейцинаминопептидаза
определение N концевых групп в белках 512, 514, 520
Лизин 437, 460, 461, 464, 470, 482
синтез 448
с C^{14} 449
содержание в белках 436, 473, 483
Лизоцим
распределение функциональных групп 484
Ликсоза 52
Липопротеиды 533
Малоновый эфир и его производные, в синтезе аминокислот 443, 444, 447, 448, 450—453, 496
α-Мальтаза 45, 142, 157
Мальтоза, строение 140
Маннаны 160
Маннит 100
Манноза, конформация 54
восстановление 100
Маррианолевая кислота 310—311
Мевалоновая кислота 430
Мелибиоза 148
Метилвалин 440
γ-Метилглутаминовая кислота 439
γ-Метиленглутаминовая кислота 439
β-Метиллантионин 440
Метилхолантрен 280
Метионин 437, 460, 472
синтез 451
содержание в белках 436, 483
Метод
азлактоновый синтеза аминокислот 445, 453
Акабори определение С-концевой аминокислоты 513, 514
Бекера синтеза дезоксирибозидов 211
Ван-Сляйка определения аминного азота 464, 478
Вольфрома 23
Габриэля синтеза аминокислот 442
карбодиимидный синтеза пептидов 494—496, 498
полифосфатов 233, 234
Кнопа синтеза аминокислот N^{15} 453
Курциуса (азидный) синтеза пептидов 491, 496
Серенсена титрования аминокислот 460
смешанных ангидридов синтеза пептидов 463, 496
Спринга синтеза нуклеозидов 201
Тодда синтеза пуриновых оснований 184, 212
Ваубе синтеза пуриновых оснований 183
установления конфигурации аминокислот 454
фенилтиогидантоиновый (Эдмана) определения N-концевых аминокислот 511, 512, 514, 518
Фишера снитеза пуриновых оснований 182—183
Фишера синтеза аминокислот 443
Фокса синтеза нуклеотидов 204
Хильберта — Джонсона синтеза нуклеозидов 207, 209
циангидриновый синтеза аминокислот 446, 447, 453
Шоу синтеза пиримидиновых оснований 181, 209—210, 212
Штейна — Мура хроматографирования аминокислот 481
Микробиологическое гидроксилирование стероидов
в положение 11α прогестерона и вещества S Рейхштейна 376
в положение 11,16,17α-окиси дегидропрогестерона 377
в положение 11-β прогестерона 380
в положение 17, 381
в положение 17 дезоксикортикостерона 380
в положение 7 прогестерона и дезоксикортикостерона 381
в положение 15, 381
в положение 12 прогестерона 381
Микробиологическое дегидрирование стероидов
в положение Δ^1 кортизона и гидрокортизона 383
19-нортестостерона 384
Миоглобин 432, 544—545
аминокислотный состав 483
распределение функциональных групп 484
Миозин 433, 528, 542
аминокислотный состав 483
длина пептидной цепи 528
Мононуклеотиды 175, 185, 215
выделение 175, 176, 215, 216
гидролиз 175, 187
производные 222
синтез 218
строение 216
циклические 225
Моносахариды 9
абсолютная конфигурация 37
ацетали 60
ацетаты 65
ацилирование 65
изомеры конформационные 50
изопропилиденовые производные 81
карбонаты 68
мезилаты 73
меркаптали 59
нитраты 76
номенклатура 24, 38, 40
озазоны 56
озотриазолы 58
оксимы 58
стереохимия 13
таутомерия 46
тиоацетали 59
тозилаты 73, 117
эпимеризация 109, 111
эфиры простые 61
Мочевая кислота 183
Мутаротация 30, 40, 46, 129, 134

Нингидрин, реакции
с аминокислотами 467—469, 475
с пептидами 504—505
19-Нордезоксикортикостерон 355
19-Норкортизон 385, 386
19-Норпрегнин 355, 440
19-Норпрогестерон
синтез из эстрона 333—334
Норстероиды 321—322, 333—334, 355, **384**, 385, 386, 440
19-Нортестостерон
превращение в эстрадиол 384
синтез из эстрона 321, 322
Нуклеиновые кислоты 246, 533
классификация 174
тонкая структура 251
Нуклеозиды
выделение из НК 190
гидролиз 191
монобензилфосфаты 221
разделение 190
синтез 199—213
стереохимия 195—199, 207
строение 191—199
Нуклеопротеиды 533
5'-Нуклеотидаза 218
Нуклеотиды 173
пиримидиновые основания 177
двойственное реагнрование **182**
синтез 179—181
пуриновые основания 177
синтез 182—184

Озоны 58
Окисление, периодатом 28, 35, 44, **89, 134**
тетраацетатом свинца 53, 89
γ-Оксиглутаминовая кислота 439
β-Оксилейцин 439
Оксилизин 439, 470
содержание в белках 436, 483
N^2-Оксилизин 439
γ-Окси-γ-метилглутаминовая кислота **439**
Оксиметилфурфурол 111
17α-Оксипрогестерон
получение
из прегненолона 356—357
из стигмастерина 357—358
превращение в 6-хлор-6-дегидро-17α-оксипрогестерона 339, 356
Оксипролин 438, 460, 475, 476
изоэлектрическая точка 460
разделение рацемата 457
связь в фосфопротеидах 470
содержание в белках 436, 483
Окситоцин 527
синтез 501—503
Олигосахариды 11, 136
Орнитин 441, 470, 478
синтез 448, 449
Оротовая кислота 178
синтез 180
Ортоэфиры 66, 72

Панкреатин 456
Пантотеновая кислота 439
Папаин
гидролиз белка 516
зависимость активности от строения 527
разделение рацематов аминокислот 456
Пектиновая кислота 161
D-Пеницилламин 441
Пенициллин 441
Пентозаны 10, 160
Пентозы 17
Пепсин, аминокислотный состав 483
гидролиз белка 516, 532
распределение функциональных групп 484
Пептидная цепь, структура 531—532, 539—545
Пептиды
алкилирование 510—511
ацилирование 511
биуретовая реакция 504
восстановление карбоксильной группы 513
гидролиз кислотный 477 скорость 515
ферментативный 479, 486
гидролизат химотрипсиногена 517, 518
дезаминирование 510
динитрофенилпроизводные 510, 511, 514
кристаллическая структура 536—538
метилирование 511
β-оксиаминокислот, свойства 506—509
определение
С-концевых аминокислот 513
N-концевых аминокислот 510—512
перегруппировки 505—508
синтез 487—503
синтетические, конфигурация 539—541
циклические 486, 525
цистеина 505, 506
Перегликозидация 87
Перегруппировка Гофмана при установлении конфуграции аминокислот 454, 455
сахариновая 114
Перефосфорилирование 239
Периплогенин 273, 351—352
Пероксидаза 433
Пиримидин, 4,6-диамино- 184
4,6-диокси-4-амино- 183
2,6-диокси-4,6-диамино-183
2,6-диэтокси- 208
2-метилтио-4-глюкозил-4,5,6 - триамино- 184
Полиаденилова кислота 251
Полнаминокислоты 496—498, 541
Полидезоксирибонуклеотиды 255—257
Полимиксин 441
Полипептидная теория строения белка 519
Полирибонуклеотиды 251
Полисахариды 10, 136, 151
Полиуроиды 161
Правило
Ауверса — Скита 291
Хассела — Оттара 51
Хэдсона 49
Чаргаффа 259, 260
Прегненолон, превращение в 17α-оксипрогестерон 356—357
в вещество S Рейхштейна 362—363
17-окси 362
Прегнин, см. 17-Этинилтестостерон
Преднизолон, превращение в 9-фторкортизон 387

9α-фтор-16β-, синтез из дегидропрегненолона 388
6α, 9α-дифтор-16α-метил- 389, 390
16β-метил-9α-фтор, синтез из дегидропрегненолона 388
6α-хлор-9α-фтор-16α-окси- 390
Преднизон (1,2-дегидрокортизон) 383
Примвероза 145
Принцип оптической суперпозиции 48
Прогестерон 272, 376
выделение, строение 325
превращение в дезоксикортикостерон 346, 349, 353
синтез
из 3β-ацетокси-Δ⁵-холеновой кислоты 329—330
из гиодезоксихолевой кислоты 330
из дегидропрегненолона 328
из дегидроэпиандростерона 328
из стигмастерина 327
из эргостерина 326
полный Вудворда 402—405
17,21-диокси-, см. Вещество S Рейхштейна
6α-метил-17α-окси-, синтез из дегидропрегненолона 338
6-хлор-6-дегидро-17α-окси-, синтез из 17α-оксипрогестерона 339
11β-окси- 380
11α-окси- 376
21-фтор- 336
17-окси, см. 17α-Оксипрогестерон
Прогестерон Эренштейна 335
Проколлаген 542
Пролин 438, 460, 475, 513, 516
изоэлектрическая точка 460
полипролин 541
синтез 451
содержание в белках 436, 483
Протамины 475
Пурин
6-амино-2,8-дихлор- 182
6-метилтио-6-N -глюкопиранозиламино- 200
6-окси-2,8-дихлор- 182
2,6,6-трихлор- 182
Путресцин 470

Рамноза 117
Раффиноза 148
Рацематы аминокислот, разделение 454—458
Реактивы Жирара 305
Реакция
Амадори 135
Безекена 42
Веермана 27
Воля 26
Кенигса — Кнорра 86
Кнлиани 21
Миллона 474
Михаэлиса 86
Паули 475
Пурди 34, 61
Руффа 25
Сакагучи 473
Саудена — Фишера 22, 118
Серини 355
Стейси 62
Фишера 27, 85
Хеуорза 33, 88
Хэдсона — Джексона 35, 44
Редуктоны 106
Рентгеноструктурный анализ, молекулы белка 531, 532, 536—538
D-Рибоза 185, 187
1,5-дифосфат 79
5-фосфат 79
5-Рибозилурацил 191
Рибонуклеаза 435
длина пептидной цепи 521
молекулярный вес 521
панкреатическая 248
распределение функциональных групп 484
строение 521—524, 528
Рибонуклеиновые кислоты 174
гидролиз
кислый 216
ферментативный 216, 248
щелочной 215, 248
деструкция избирательная 252
последовательная 252
макромолекулярная структура 262
молекулярный вес 248, 263
растворимые 264
строение 248
участие в биосинтезе белка 263—275
Рибофлавин 237
Рубэритриновая кислота 96
Рутин 96

Сальмин, аминокислотный состав 483
распределение функциональных групп 484
Сапогенины 273
Сапонины 97
Сарментогенин 273, 364—366
Саркозин 470
Сарсасапонин 97
Сахариновые кислоты 114
Сахарные кислоты 102
Сахароза, строение 139
Связь
водородная в белках 531, 538—540, 543
дисульфидная в белках 434, 514, 515, 523—530, 536
пептидная 433, 486, 487, 505, 509—526, 530, 537, 538
Серин 437, 460, 470—471, 478
изоэлектрическая точка 460
синтез 449
содержание в белках 436, 483
Серин-3-C¹⁴, синтез 453
L-Серин, установление конфигурации аминокислот 454
Серотонин 475
Синигрин 97
Сквален 428
Склеропротеины 476
Соланидин 274
Соласодин 274
превращение в дегидроэпиандростерон 319
Сорбит 100
Стереоизомерия, аминокислот 454—458
нуклеозидов 195—199, 207
сахаров 13—19
стероидов 423—437
Стерины, классификация 270

Стероиды, номенклатура 275—276
Стигмастерин 270
превращение
в 17-оксипрогестерон 358
в прогестерон 327
Стильбэстрол 311
синтез 312, 314—315
Строфантидин 273
превращение в прогестерон Эренштейна 335
Строфантин 97
Стурин 436
Субтилизин 516, 523, 527
Субтилин 440

Таннины, строение 67
Таурин 472
Теомицин 439
Тестостерон 272
активность 317
выделение 317
синтез из дегидроэпиандрестерона 317—318
полный по Джонсону 415—416
17-этил- 322
17-этинил- получение из дегидроэпиандрестерона 331
Тимидин 209
Тимин, синтез 178
строение 175
3-N-β-ксилофуранозид 208
3-N-β-ликсофуранозид 208
Тиминрибозид 194
синтез 206, 209
3'-ацетил- 223
3'-фосфат 223
5'-фосфат 223, 224
Тиогидантоины 465, 466
Тирамин 470, 474
Тирозин 437, 460, 470, 474
изоэлектрическая точка 460
связь в фосфопротеидах 470
содержание в белках 436, 483
L-Тирозин, установление конфигурации, 454, 455
Тироксин 441, 474
Тироцидины A и B 526
Трегалоза 138
D-Треоза
установление конфигурации аминокислот 457
Треонин 437, 460, 470, 478
разделение рацемата 457
синтез 449
содержание в белках 436, 483
Трипсин, гидролиз белков 516, 521, 523
длина пептидной связи 520
роль серина в молекуле 470
Триптамин 470, 475
Триптофан 436, 460, 470, 475, 477
изоэлектрическая точка 460
синтез 451
содержание в белках 436, 483
Трифосфопиридиннуклеотид 235, 236

Углеводород Дильса 279, 281
Углеводы
пирофосфаты 77, 80
сульфаты 76
фосфаты 77, 79, 80
Урацил 177
3-N-β-арабинозид 210
1-метил- 193
синтез 179
тиолирование 181
Уридил-5'-3'-уридин 258
Уридин 193
синтез 193, 208
2'-декозси-222
2',3'-дибензил- 222, 223
изопропилиден- 221
5'-монофосфат 221
Уридиндифосфатарабиноза 238
Уридиндифосфат-N-ацетилгалактозамин 238
Уридиндифосфатгалактоза 238
Уридиндифосфатглюкоза
синтез 242, 245
строение 237, 239
Уридиндифосфатглюкуроновая кислота 238 239
Уроновые кислоты 103

Фенилаланин 436, 460
изоэлектрическая точка 460
разделение рацемата 457
содержание в белках 436, 483
L-Фенилаланин, установление конфигурации 454, 455
β-Фенил-α-аминомасляная кислота 440
α-Фенилсаркозин 440
Ферменты
в гидролизе
белков 516, 522, 524
гликозидов 45
в определении концевых аминокислот 512—514
в разделении рацематов аминокислот 456
в синтезе гликозидов 88
Фибрин крови 436
Фибриноген, структура 542
Фиброин шелка 436, 532
распределение функциональных групп 484
структура 543
Флавинадениндинуклеотид 237
синтез 242, 245
Формулы Колли 31
Толленса 31
Фишера 12
Фосфопротеиды 433
связь оксиаминокислот 470
Фосфорилирование 218, 219, 220, 234, 243, 244, 245, 256
Фруктоза 13, 60, 100
1,6-дифосфат 80
Фруктозаны 160
Фукоза 117

Химотрипсин 532
гидролиз белка 516, 522, 524
длина пептидной цепи 520
разделение рацематов аминокислот 456, 457
роль серина 470
Химотрипсиноген
распределение функциональных групп 484

фракционирование гидролизата 517—518
Хитин 161
Холановая кислота 277, 278
Холатриеновая кислота 277
Холевая кислота 301, 302
Δ^5-Холеновая кислота 3β-ацетокси-, превращение в прогестерон 329—330
Холестан 277, 285
Холестанол 270, 277, 423
установление пространственной конфигурации 285
Холестанон 297
Холестерин 270, 325
биогенез 428—429
восстановление 294
выделение из природных объектов 293
полный синтез
Вудворда 406
Робинсона 407
распространение 293
установление строения 277—284
пространственной конфигурации 286—292
характерные реакции 293, 294
i-Холестерин 296
Холинэстераза 470
Хондроитинсерная кислота 166
Хроматография
аминокислот 459
ионообменная 481
на бумаге 479—481
на носителях 481
фракционированная пептидов 517, 518
Хромопротеиды 533

Целлюлоза 76, 154
Цереброзиды 98
Цианин 96
Цианоуксусный эфир, в синтезе аминокислот 443, 444
Циклонуклеозиды 198, 199
Циклопептиды
гетеродетные 486, 501
гомодетные 486
синтез 498—503
Циклосерин 441
производные 471
Цимароза 117, 119
Цистеин 471, 472, 505, 506, 514, 515
изоэлектрическая точка 460
окисление в цистин 472
получение 451
превращения 530, 531
содержание в белках 483
Цистеин-S^{35}, синтез 453
L-Цистеин, установление конфигурации 454, 455
Цистеиновая кислота 472, 514
Цистин 437, 460
восстановление в цистеин 472
изоэлектрическая точка 460
окисление S—S-связи 472
превращения при гидролизе 477
содержание в белках 436, 450, 471, 483
Цитидин 193
синтез 206, 208
Цитидиндифосфатглицерин 240—241
Цитидиндифосфатрибит 240—241
Цитидиндифосфатхолин 240—241
Цитидиндифосфатэтаноламин 240—241
Цитозин 177
синтез 180—181
Цитохром С 533
Цитруллин 441
образование 478

Эдестин, аминокислотный состав 483
распределение функциональных групп 484
Эквиленин 272, 309, 311
полный синтез Бахмаиа 394—396
полный синтез Джонсона 396—397
Эквилин, полный синтез 422
Эластин 484
Электрофорез, аминокислот и пептидов 459, 481, 482
белков 528
фракционирование пептидов 517, 518
Эмодин 96
Эмульсин 45, 88, 142, 154
Эпиандростерон 308, 408
полный синтез по Джонсону 414—415
Эргостерин 270, 297—300, 371, 373
превращение в прогестерон 326
в кортизон 371—375
установление строения 298
D-Эритроза, установление конфигурации аминокислот 457
Эстрадиол 272, 305
активность 308
восстановление 310
выделение 314
установление строения 305—307
α-Эстрадиол 310
Эстриол, активность 308
выделение 305
Эстрон 274, 309, 314
активность 309
выделение 304
облучение 310
окисление 310
получение из 19-нортестостерона 384
превращение
в 19-норпрегнин (норлутин) 334
в 19-норпрогестерон 333—334
в 19-нортестостерон 321
синтез полный
Джонсона — Христиансена 400
Мишера 398—399
установление строения 305—307
Этамицин 439, 440
Эхиномицин 440

Яды жаб 274

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие

Раздел первый

УГЛЕВОДЫ

Введение 7
Классификация и номенклатура углеводов 8

Часть I. *Моносахариды*

Глава 1. Строение и стереохимия моносахаридов 11
Строение моносахаридов 11
Стереохимия моносахаридов 13
Глава 2. Синтетические методы в химии моносахаридов 20
Методы перехода от низших моносахаридов к высшим 21
О номенклатуре высших моносахаридов 24
Переход от высших моносахаридов к низшим 25
Глава 3. Моносахариды как циклические полуацетали 30
Таутомерия моносахаридов 30
Конформация моносахаридов 50
Глава 4. Производные моносахаридов 55
Производные по карбонильной группе 55
Простые эфиры моносахаридов 61
Сложные эфиры моносахаридов 64
Продукты конденсации моносахаридов с альдегидами и кетонами (ацетальные производные моносахаридов) 81
Гликозиды 84
Глава 5. Важнейшие превращения моносахаридов . . 100
Восстановление 100
Окисление 101
Взаимодействие моносахаридов с кислотами 109
Взаимодействие моносахаридов со щелочами 111
Глава 6. Дезоксисахара 116
Методы синтеза дезоксисахаров 117
Строение и свойства дезоксисахаров 121
Глава 7. Моносахариды, содержащие азот, и их производные 124
Аминосахара 124
N-гликозиды (гликозиламины) 130

Часть II. *Олигосахариды*

Глава 1. Дисахариды 136
Глава 2. Высшие олигосахариды 148

Часть III. *Полисахариды*

Введение 151
Глава 1. Гомополисахариды 154
Глава 2. Гетерополисахариды 163

Раздел второй

НУКЛЕОТИДЫ

Введение 173
Глава 1. Компоненты нуклеотидов 177
Гетероциклические основания 177
Моносахариды 185
Глава 2. Нуклеозиды 190
Строение нуклеозидов 190
Синтез нуклеозидов 199
Глава 3. Мононуклеотиды 215
Строение нуклеотидов 216
Синтез нуклеотидов 219
Глава 4. Нуклеотидные коферменты 229
Полифосфаты нуклеозидов 229
Несимметричные пирофосфаты 234
Глава 5. Нуклеиновые кислоты 246
Строение полимерной цепи нуклеиновых кислот 246
О тонкой структуре нуклеиновых кислот 251
Макромолекулярное строение нуклеиновых кислот и их биологическая функция 258

Раздел третий

СТЕРОИДЫ

Глава 1. Понятие о стероидах. Классификация. Номенклатура 269
Глава 2. Установление строения основных стероидных соединений . . . 277
Глава 3. Стерины и желчные кислоты 293
Глава 4. Эстрогенные гормоны. Некоторые производные эстрогенов. Синтетические эстрогены 303
Глава 5. Андрогенные гормоны 316
Глава 6. Гестагенные гормоны 325
Глава 7. Кортикоидные гормоны. Кортикостерон, дезоксикортикостерон и его аналоги 341
Глава 8. Кортикоидные гормоны. Вещество S Рейхштейна 360
Глава 9. Кортизон и гидрокортизон 364
Глава 10. Производные и аналоги кортизона 383
Глава 11. Полный синтез стероидов. Синтезы эквиленина, эстрона, прогестерона, холестерина. Синтез эпиандростерона по Робинсону . . . 394
Глава 12. Полный синтез стероидов. Синтез кортизонацетата, синтез эпиандростерона по Джонсону. Синтезы тестостерона, альдостерона, эквилина 410
Глава 13. Определение абсолютной конфигурации стероидов 423

Раздел четвертый

СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ БЕЛКА

Введение 433

Часть I. *Аминокислоты* 436

Глава 1. Синтез аминокислот 442
Глава 2. Свойства аминокислот 459
Глава 3. Определение аминокислотного состава белков 477

Часть II. *Пептиды и циклопептиды* 486

Глава 1. Синтез пептидов и циклопептидов 487
Глава 2. Реакции пептидов и определение их строения 504

Часть III. *Установление строения белковой молекулы* 520

Глава 1. Строение белка 520
Глава 2. Пространственная конфигурация полипептидных цепей в белках . 535
Особенности структуры аминокислот и пептидов 536
Синтетические полипептиды 539
Фибриллярные белки 541
Глобулярные белки 544

Предметный указатель 548

Николай Константинович Кочетков
Игорь Владимирович Торгов
Мария Моисеевна Ботвиник

*

Химия природных соединений

*

Утверждено к печати
Институтом химии природных соединений
Академии наук СССР

Редактор издательства *В. В. Шпанов*
Технический редактор *В. Г. Лаут*

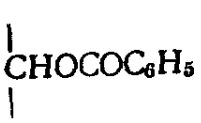
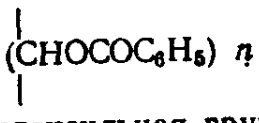
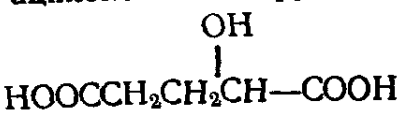
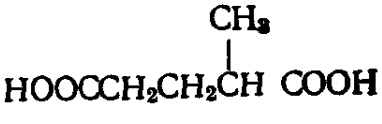
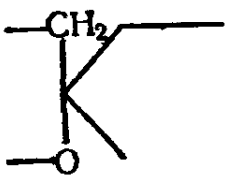
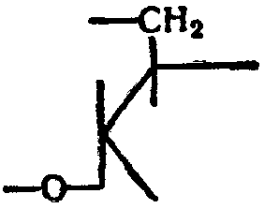
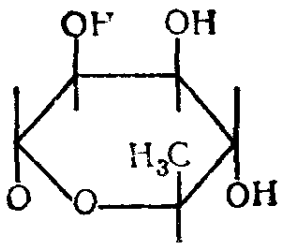
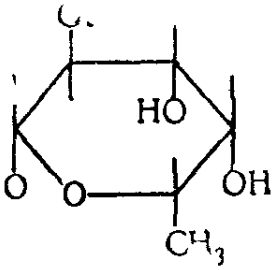
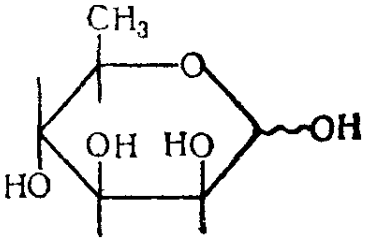
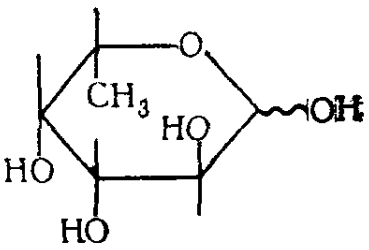
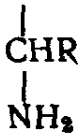
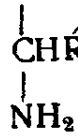
*

РИСО АН СССР № 14—62В. Сдано в набор 10/XI 1960 г.
Подписано к печати 24/IV 1961 г. Формат 70×108¹/₁₆
печ. л. 35,0. усл. печ. л. 47,95, уч.-издат. л. 46,4
Тираж 4500 экз. Т-05607. Изд. № 4825. Тип. зак. № 3575

Цена 3 руб. 45 коп.

Издательство Академии наук СССР. Москва, Б-62, Подсосенский пер., 2
2-я типография Издательства. Москва, Г-99, Шубинский пер., 10

ИСПРАВЛЕНИЯ И ОПЕЧАТКИ

Стр.	Строка	Напечатано	Должно быть
67	нижняя схема		
71	13 и 14 сн.	ацилоксильной группы	ацилоксильная группа
114	нижняя схема		
120	формула X		
195	17 сн.	ферментов	коферментов
234	2 сн.	диола	еиола
240	верхняя схема		
			
349	3 сн.	XXVIII	XXV
350	2 св.	XXVIII	XXV
377	верхняя схема	XXVIII	LXXVIII
		XXIX	LXXIX
404	2 сн.	LXXIV	LXXIVa
530	3 ряд сн.		
542	13 св.	фабриои	фиброин
552	19 св	1, 116, 17a	11,16,17a

Все опечатки из этой таблицы, кроме опечатки на стр. 530, исправлены в тексте

Отсканировал Семенюченко Владимир
chem_vova@mail.univ.kiev.ua; vova2002@mail.ru