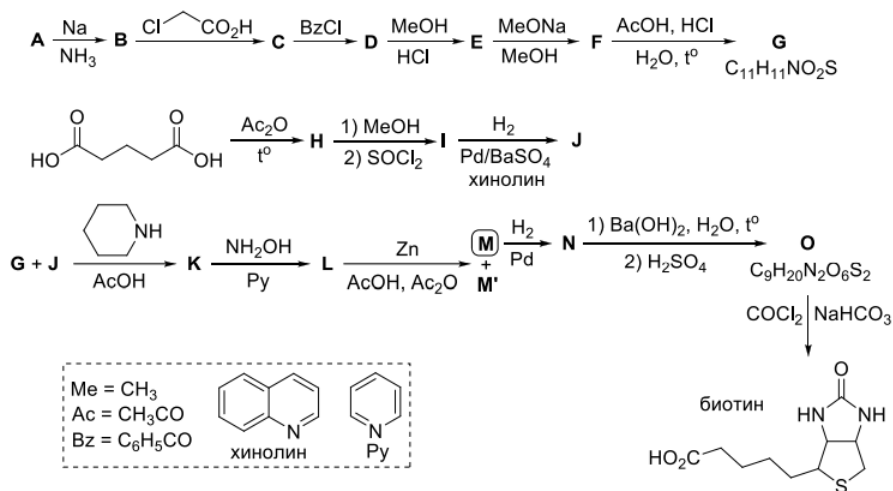


Задача 11-4

Витамин B₇, известный также как биотин, в организме млекопитающих участвует во многих процессах метаболизма, выполняя функцию кофермента ряда карбоксилаз. Первый нестереоселективный синтез биотина был проведён в 1944 году группой американских органиков из компании Merck под руководством Карла Фолкерса. В качестве одного из исходных соединений было взято вещество **A**, в рамановском спектре которого присутствует очень интенсивная полоса в области 500 см⁻¹. При восстановлении **A** натрием в жидком аммиаке образуется единственное органическое вещество **B**, которое содержит 26.47 масс. % серы и является протеиногенной аминокислотой. Полная схема синтеза биотина, проведённого группой Фолкерса, представлена ниже.



1. Напишите структурные формулы веществ **A** – **L**, **M**, **M'**, **N** и **O** (без учёта стереохимии). Соединения **M** и **M'** являются изомерами, отличающимися положением кратной связи. В спектрах ¹³C ЯМР обоих этих веществ присутствуют 17 сигналов, включая 3 сигнала от четвертичных атомов углерода в области 160–180 м.д., а также 6 сигналов в области 100–140 м.д. При этом в случае **M** из этих 6 сигналов 3 принадлежат четвертичным атомам углерода, а в случае **M'** таких сигналов только 2. Оставшиеся 8 сигналов расположены в области химических сдвигов от 20 до 80 м.д. для обоих

изомеров и принадлежат только первичным, вторичным и третичным атомам углерода.

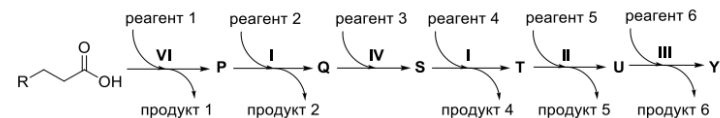
Форма аминокислоты **B**, соответствующая pH = 0, является трёхосновной кислотой и, соответственно, имеет 3 константы кислотности: pK_{a1} = 1.96, pK_{a2} = 8.18, pK_{a3} = 10.28.

2. Соотнесите константы кислотности с функциональными группами молекулы **B**, обоснуйте Ваш выбор. Рассчитайте значение изоэлектрической точки (pI) вещества **B**.

При окислении веществ **A** и **B** надкислотами (например, HCO₃N или mCPBA) образуется одно и то же вещество **X**, форма которого при pH = 0 может диссоциировать по трём ступеням, как и форма аминокислоты **B** при pH = 0.

3. Напишите структурную формулу **X** и сравните pI(**X**) с pI(**B**) (>, <, =, ≈). Объясните Ваш выбор знака равенства/неравенства.

Молекула биотина может быть вовлечена в несколько последовательных циклов β-окисления (β-деградации) жирных кислот с участием кофермента А (CoA), в результате каждого из которых происходит отщепление молекулы AcSCoA и образуются молекулы биснорбиотина **Y** (один цикл β-окисления) и тетранорбиотина **Z** (два цикла β-окисления). Каждый такой цикл состоит из шести стадий и протекает по представленной ниже на примере превращения биотина в биснорбиотин **Y** общей схеме (часть структуры биотина, не изменяющаяся в ходе одного цикла, обозначена как R). Над стрелками указано, ферменты каких классов катализируют каждую стадию: I. Оксидоредуктазы (окислительно-восстановительные реакции); II. Трансферазы (реакции переноса групп); III. Гидролазы (реакции гидролиза); IV. Лиазы (реакции отщепления небольших молекул с образованием двойной связи или цикла, либо присоединения молекул по двойной связи или с разрывом цикла); V. Изомеразы (реакции изомеризации); VI. Лигазы (образование связи, сопряжённое с гидролизом молекулы ATP или GTP).

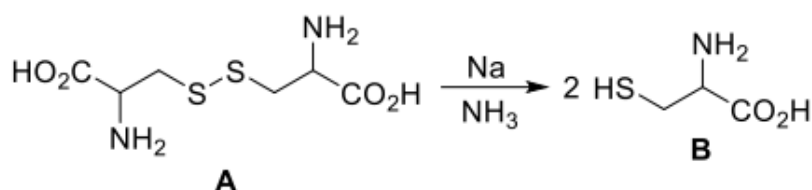


4. Напишите структурные формулы промежуточных соединений **P**, **Q**, **S** – **U** (неизменную часть структуры можно обозначать как R). Соотнесите участвующие на каждой стадии реагенты 1–6 с веществами из списка: а. NAD⁺; б. FAD с. HSCoA; д. H₂O. Учтите, что некоторые реагенты встречаются в цикле более одного раза, а вторую стадию катализирует флавопротеин.

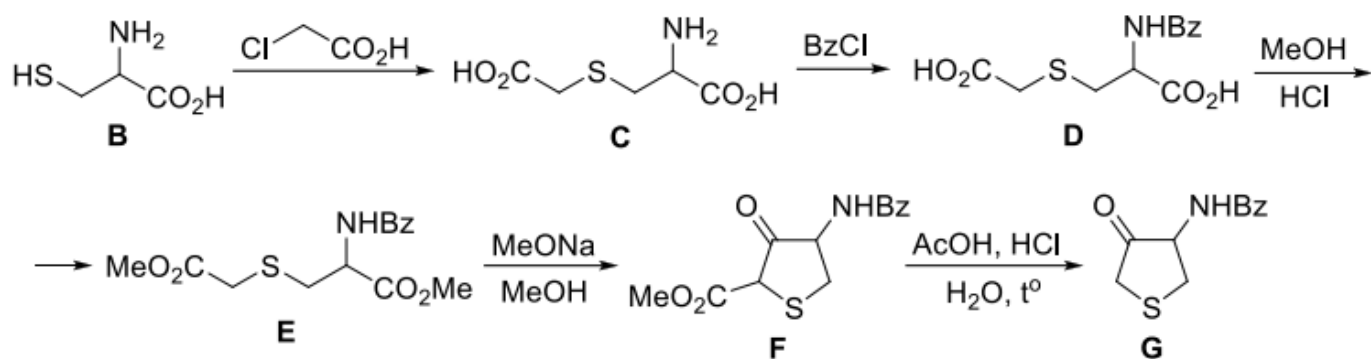
5. Напишите структурные формулы биснорбиотина **Y** и тетранорбиотина **Z** (полностью, без использования обозначения R).

Решение задачи 11-4 (автор: Качмаржик А.Д.)

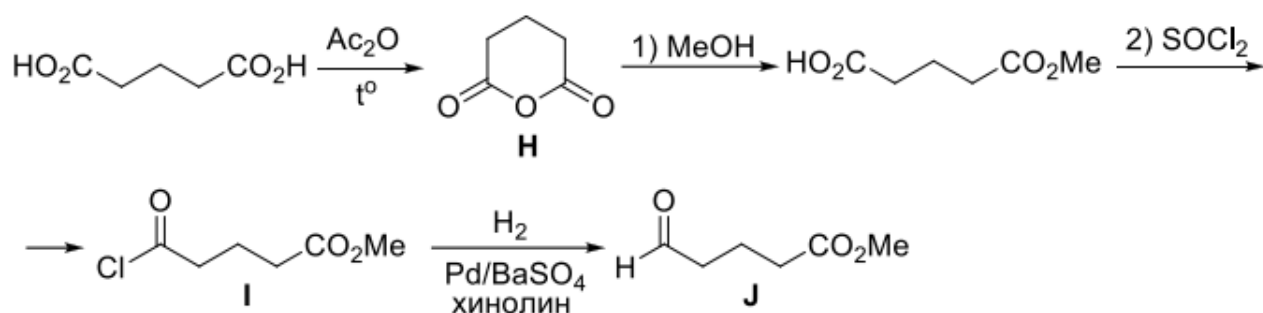
1. Вначале расшифруем схему синтеза вещества **G** из **A**. Существует всего 2 протеиногенных серосодержащих кислоты – цистеин и метионин. Из них только цистеин подходит по массовой доле серы. Таким образом, вещество **B** – цистеин. Про вещество **A** известно, что оно восстанавливается до цистеина в качестве единственного органического продукта, а также, согласно данным рамановской спектроскопии, содержит ярко выраженную неполярную связь. В данном случае единственным разумным вариантом является цистин, содержащий неполярную связь S–S.



Взаимодействие цистеина с хлоруксусной кислотой приводит к нуклеофильному замещению хлора тиольной группой с образованием вещества **C**. При действии на **C** бензоилхлорида происходит ацилирование аминогруппы. Образовавшееся вещество **D** вступает в реакцию этерификации с метанолом с образованием сложного эфира **E**, который при действии метилата натрия в метаноле вступает в конденсацию Дикмана, в ходе которой образуется тетрагидротиофеновый фрагмент. Полученное вещество **F** далее подвергается декарбоксилированию по Крапчо с образованием вещества **G**, при этом бензоильная защитная группа не удаляется, на что указывает приведённая в условии брутто-формула **G**.

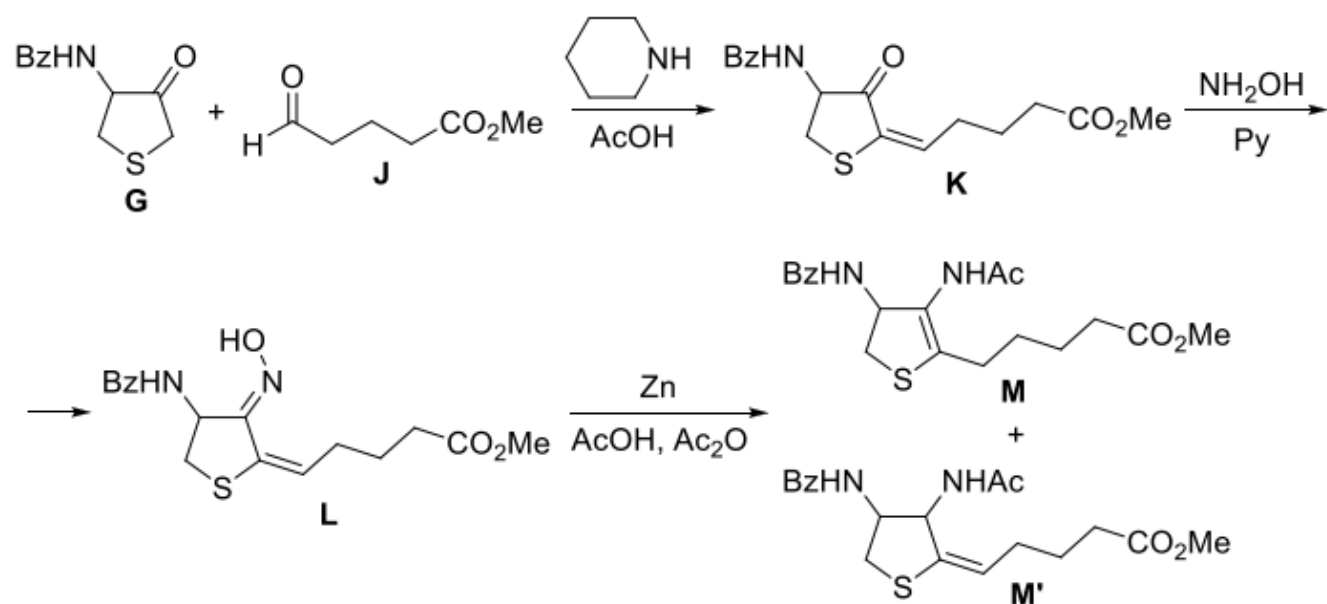


Вторая часть синтеза начинается с внутримолекулярной дегидратации глутаровой кислоты с образованием ангидрида **H**, который затем при взаимодействии с метанолом даёт метилэстер глутаровой кислоты. Свободная карбоксильная группа этого вещества взаимодействует с тионилхлоридом с образованием хлорангидрида **I**, который затем вступает в реакцию восстановления по Розенмунду с образованием вещества **J**, содержащего альдегидную группу.

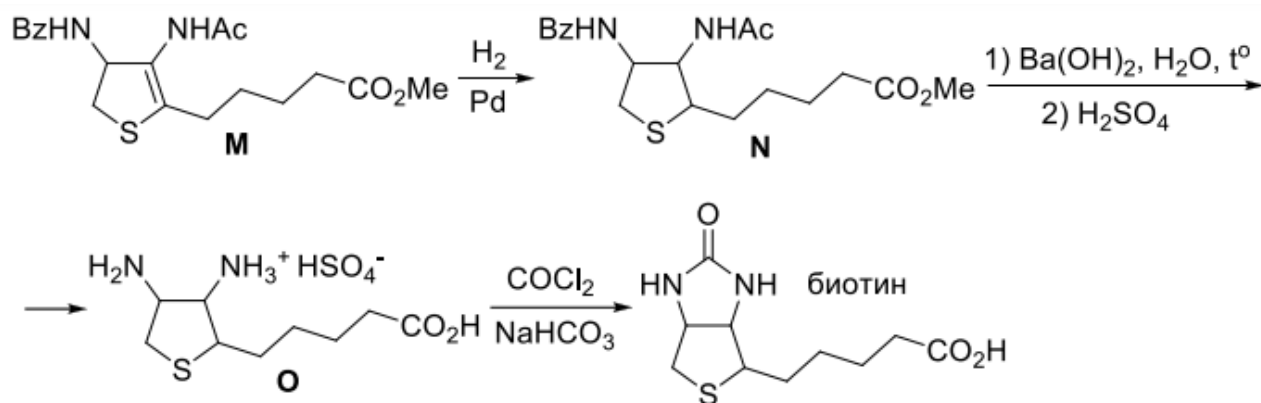


Заключительный этап синтеза биотина начинается с кротоновой конденсации веществ **G** и **J**, причём в качестве карбонильной компоненты выступает более активная в присоединении нуклеофилов альдегидная группа вещества **J**, а в качестве метиленовой компоненты — более кислое α -положение к карбонильной группе (и одновременно к атому серы) в веществе **G**. На такое направление протекания реакции также указывает структура биотина. Далее кетогруппа вещества **K** взаимодействует с гидроксиламином с образованием оксимной группы. При действии цинка оксим **L** восстанавливается в амин, который сразу же ацилируется уксусным ангидридом. На это указывает наличие в спектрах ^{13}C ЯМР обоих изомеров **M** и **M'** трёх сигналов от четвертичных атомов углерода в области 160–180 м.д., соответствующих ацильным атомам углерода в составе групп CO_2Me , NHCOMe и NHCOC_6H_5 . В обоих изомерах есть одна двойная связь $\text{C}=\text{C}$, не входящая в состав ароматического цикла, так как 4 из 6 сигналов в области 100–140 м.д. относятся именно к ароматическому циклу бензоильной защитной группы. Из сигналов ароматических атомов углерода только один принадлежит четвертичному атому. Значит, в **M'** связь $\text{C}=\text{C}$ тризамещённая, а в **M** — тетразамещённая. Первый вариант соответствует структуре, в которой

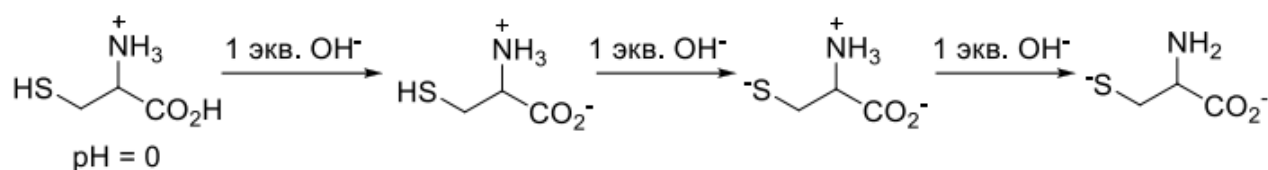
связь C=C осталась в том же положении, что и в предшественнике **L**, второй вариант соответствует термодинамически более выгодному изомеру, в котором связь C=C расположена в пятичленном цикле. Стоит отметить, что для расшифровки структур **M** и **M'** знание типичных значений химических сдвигов в спектре ^{13}C ЯМР не является необходимым: достаточно воспользоваться информацией о количестве четвертичных атомов углерода.



Гидрирование вещества **M** на палладии приводит к восстановлению связи C=C. Затем при нагревании продукта **N** с водным раствором гидроксида бария проводят гидролиз сложноэфирной группы и обеих амидных групп. В результате дальнейшей обработки серной кислотой вещество **O** выделяется в виде гидросульфата, на что указывает приведённая в условии брутто-формула. Завершает синтез взаимодействие двух аминогрупп с фосгеном с образованием тетрагидроимидазольного фрагмента биотина. Стоит отметить, что при гидрировании **M** образуется смесь двух диастереомеров, которую можно разделить за счёт разности температур плавления. При проведении последующих превращений один из этих диастереомеров даёт *рац*-биотин, а другой – его диастереомер *рац*-аллобиотин. Если же подвергнуть аналогичным превращениям вещество **M'**, то можно получить *рац*-аллобиотин и ещё один диастереомер *рац*-эпи-аллобиотин (тем не менее, стереохимические аспекты синтеза биотина в этой задаче не оцениваются).



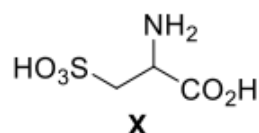
2. Цистеин при $\text{pH} = 0$ существует в протонированной форме. Вполне очевидно, что первым при повышении pH будет отрываться протон карбоксильной группы. Таким образом, $\text{pK}_{a1} = 1.96$ соответствует карбоксильной группе. Далее идут две константы кислотности с достаточно близкими значениями pK_a : 8.18 и 10.28. Первая из этих констант (pK_{a2}) достаточно близка по значению к первой константе кислотности H_2S (7.04), а для третьей $\text{pK}_{b3} = 14 - \text{pK}_{a3} = 14 - 10.28 = 3.72$, что достаточно близко к $\text{pK}_b(\text{NH}_3) = 4.74$. Обратите внимание, что не стоит сразу определять pK_a тиольной группы как заведомо наибольшую, в отличие от гидроксильных групп, так как константы кислотности воды и сероводорода по первой ступени отличаются более чем в 2 раза (15.74 и 7.04, соответственно). Итак, $\text{pK}_{a2} = 8.18$ соответствует тиольной группе, а $\text{pK}_{a3} = 10.28$ – аммонийной группе, общая схема перехода между формами при увеличении pH выглядит следующим образом:



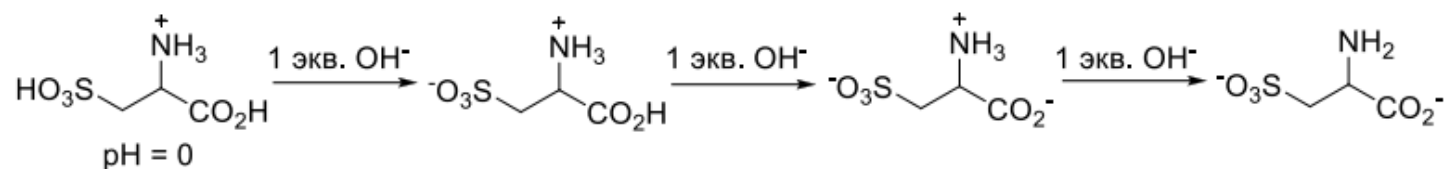
В соответствии с данной схемой изоэлектрическая точка определяется как полусумма pK_{a1} и pK_{a2} :

$$\text{pI} = \frac{\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a2}}{2} = \frac{1.96 + 8.18}{2} = 5.07$$

3. Окисление цистеина или цистина надкислотами приводит к образованию цистеиновой кислоты **X**.

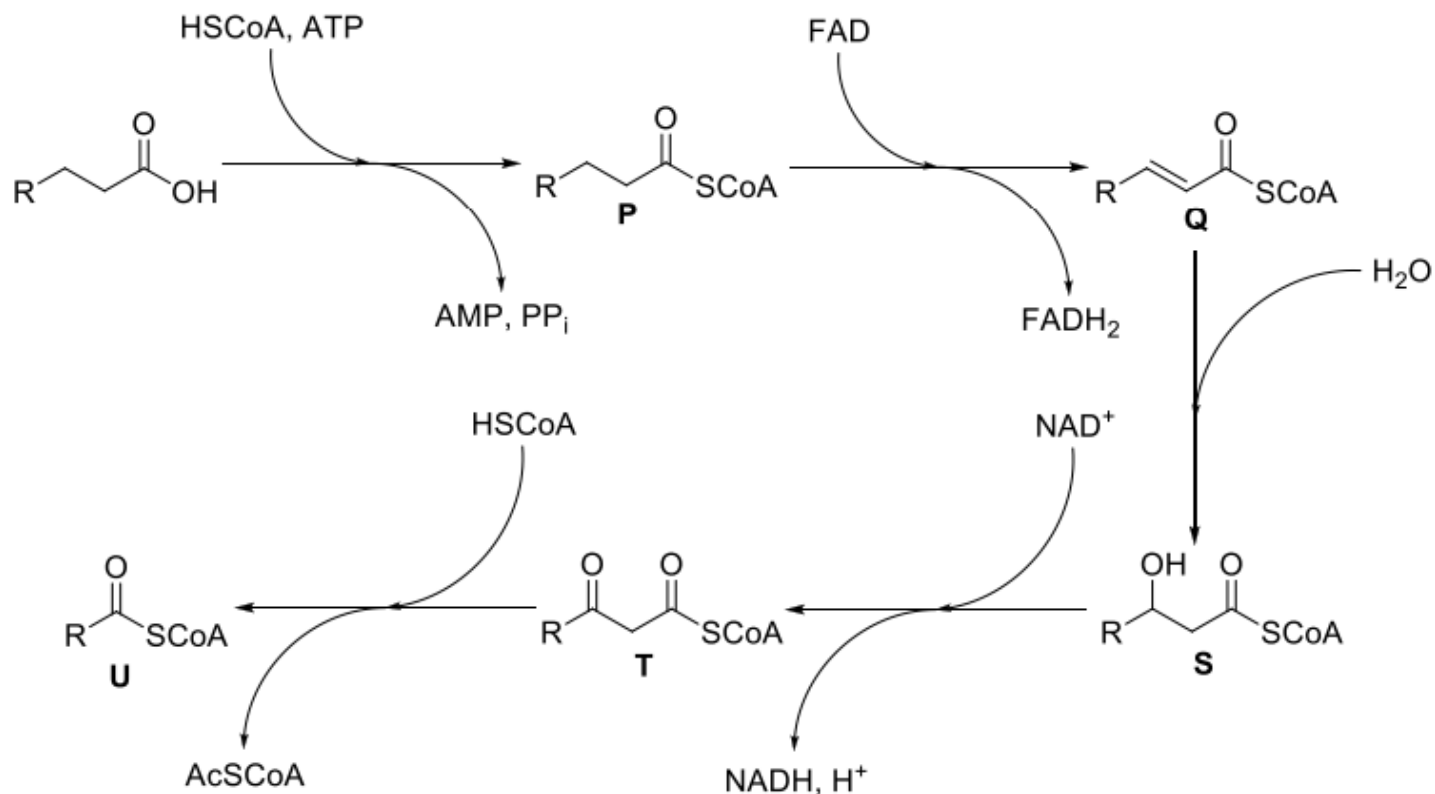


При $\text{pH} = 0$ аминогруппа протонирована, карбоксильная группа и сульфогруппа также несут на себе кислые протоны. Сульфогруппы в органических молекулах проявляют более сильные кислотные свойства, чем карбоксильные, поэтому схема перехода между формами при увеличении pH будет иметь следующий вид:

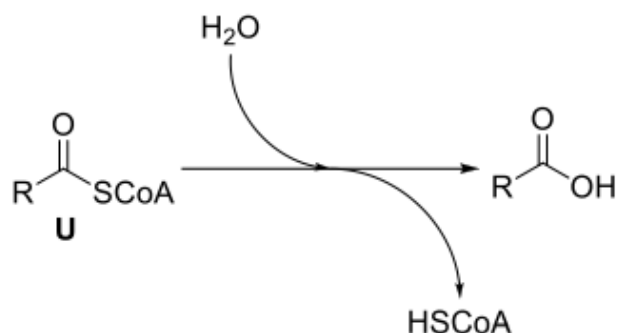


Пусть константы кислотности формы цистеиновой кислоты при $\text{pH} = 0$ будут иметь значения pK_{a1}' , pK_{a2}' и pK_{a3}' , изоэлектрическая точка имеет значение pI' . В соответствии с вышеуказанной схемой, pI' будет определяться как полусумма pK_{a1}' и pK_{a2}' . Так как $\text{pK}_{\text{a2}}' \approx \text{pK}_{\text{a1}}$, а $\text{pK}_{\text{a1}}' < \text{pK}_{\text{a2}}'$, получаем, что $\text{pI}' < \text{pI}$.

4. Из списка участвующих в цикле β -окисления реагентов NAD^+ и FAD являются коферментами оксидоредуктаз, значит, один из них используется на стадии 2, а другой – на стадии 4. При этом в биохимических процессах FAD , как правило, участвует в окислении неполярных связей $\text{C}-\text{C}$, а NAD^+ – в окислении полярных связей $\text{C}-\text{O}$. Кофермент А HSCoA может принимать участие в реакциях, катализируемых лигазами и трансферазами (стадии 1 и 5), вода – в реакциях, катализируемых лиазами и гидролазами (стадии 3 и 6). Исходя из этого несложно восстановить схему цикла β -окисления жирных кислот (без указания ферментов):

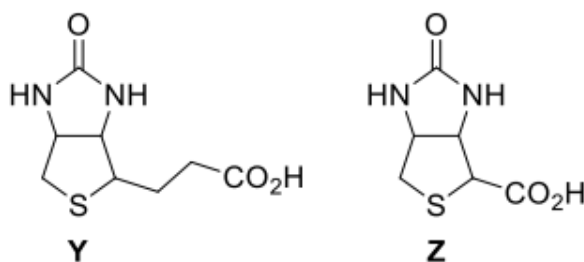


Полученный «укороченный» ацил-SCoA может вступить в следующий цикл β -окисления, либо может быть превращён в соответствующую карбоновую кислоту:



Таким образом, последовательность реагентов, необходимых для биосинтеза биснорбиотина из биотина: *HSCoA, FAD, H₂O, NAD⁺, HSCoA, H₂O* или *c, b, d, a, c, d*.

5. Зная последовательность реакций в цикле β -окисления, несложно определить структуры биснорбиотина и тетранорбиотина:



Литература:

- 1) S. A. Harris, D. E. Wolf, R. Mozingo, R. C. Anderson, G. E. Arth, N. R. Easton, D. Heyl, A. N. Wilson, K. Folkers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1944**, 66, 1756–1757.
- 2) S. A. Harris, D. E. Wolf, R. Mozingo, G. E. Arth, R. C. Anderson, N. R. Easton, K. Folkers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1945**, 67, 2096–2100.
- 3) J. Zemleni, S. S. K. Wijeratne, Y. I. Hassan, *BioFactors*, **2009**, 35, 36–46.

Система оценивания:

1.	Структуры A – L, M, M', N и O – по 0.75 балла <i>Цис/транс изомерия для связей C=C и C=N не оценивается. В качестве структуры O оценивается любой из двух вариантов протонирования аминогрупп</i>	12 баллов
2.	Соотнесение pK_a карбоксильной группы – 0.5 балла (объяснение необязательно) Соотнесение pK_a тиольной и аммонийной групп – по 0.5 балла (без объяснения – по 0.25 балла) Значение pI – 0.5 балла	2 балла
3.	Структура X – 0.5 балла Сравнение изоэлектрических точек – 0.5 балла (без объяснения – 0.25 балла)	1 балл
4.	Структуры P, Q, S – U – по 0.5 балла Правильная позиция каждого реагента – по 0.25 балла	4 балла
5.	Структуры Y и Z – по 0.5 балла	1 балл
ИТОГО:		20 баллов