

А. Е. БЕДНЯК, В. Ф. ГУСЬКОВ

К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ Н-НИТРОЗО-Н-АЛКИЛМОЧЕВИН
НА МОНОНУКЛЕОТИДЫ. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ
АДЕНОЗИН-5'-МОНОФОСФАТА С НИТРОЗОМЕТИЛМОЧЕВИНОЙ

(Представлено академиком Д. К. Беляевым 2 IV 1973)

В настоящем сообщении приведены результаты исследования реакции нитрозометилмочевины (НММ) с аденоzin-5'-монофосфатом (АМФ).

Ранее в реакционной смеси АМФ+НММ был обнаружен только один продукт, предположительно отнесенный к метиловому эфиру АМФ⁽¹⁾, а затем и другой продукт, который не был идентифицирован⁽²⁾. (Как мы отметили в⁽³⁾, продукты метилирования гетероциклической части АМФ ранее не были обнаружены.) Однако при более детальном исследовании реакционной смеси АМФ+НММ в последнее время удалось обнаружить более десяти продуктов превращения АМФ (в том числе и продукты метилирования гетероциклической части).

В опытах использовали динатриевую соль АМФ — препарат фирмы «Reanal» (Венгрия) и НММ, синтезированную как указано в⁽³⁾. АМФ в нейтральном 0,05 М фосфатном буфере (KH_2PO_4 +NaOH) обрабатывали НММ (концентрация нуклеотида 2 мг/мл, концентрация НММ 50 мг/мл) и выдерживали в термостате при 37° в течение 36 час. (до полного разложения НММ). Полученные реакционные смеси хроматографировали на бумаге («Ленинградская С» и ватман № 3 английского производства) и на анионите ДЭАЭ-сепадексе А-25.

Хроматографирование на бумаге. Из результатов одномерного и двумерного хроматографирования в системах пропанол — раствор аммиака — вода, 7 : 1 : 2 (система 1) и насыщенный раствор сульфата аммония — 0,1 M фосфатный буфер, pH 7 — пропанол, 79 : 19 : 2 (система 2), рис. 1, видно, что реакционная смесь содержит 12 продуктов реакции. При этом часть продуктов удается наблюдать только на двумерной хроматограмме (продукты 5, 6, 7), однако одномерное хроматографирование большого количества реакционной смеси позволяет обнаружить дополнительно продукты 1a, 1b, 2a, —2.

Выход продуктов —2, —1, 1a, 1, 1b, 2, 2a, 3, 4, 5, 6 составил соответственно в %: 0,7; 1,5; 0,5; 1,0; 0,3; 25,0; 0,25; 0,15; 0,7; 1,0; 2,0, не прореагировавшего АМФ (рис. 1, пятно 0) — около 65% (выход устанавливали как указано в⁽⁴⁾), при этом молярные экстинкции продуктов реакции приравнивали к молярной экстинкции исходной АМФ; у.-ф. спектр поглощения продукта 7 не характерен для нуклеотидов). Водные элюаты из 0 и 2 одномерных хроматограмм рехроматографировали в системе 2, что позволило отделить продукты 5 и 6. Скопцентрированные элюаты из пятен этих продуктов освобождали от сульфата аммония осаждением метанолом и рехроматографировали в системе 1.

Хроматографирование на ДЭАЭ-сепадексе. Реакционную смесь (3 мл) пропускали через колонку с ДЭАЭ-сепадексом А-25, «средний» (Cl^-), размер колонки 1,5×15 см.

Элюирование продуктов реакции проводили вначале дистиллированной водой до прекращения выхода поглощающих у.-ф. свет веществ, а затем линейным градиентом 0,0—0,1 M NaCl (резервуар 400 мл 0,1 M NaCl и сме-

ситель 400 мл дистиллированной воды), скорость элюирования — около 1 мл/мин., объем фракций 5 мл. (рис. 2).

Фракции, элюированные дистиллированной водой (пик 1) после концентрирования в вакууме (40°) были подвергнуты хроматографированию на бумаге в системах 1 и 2. Обнаруженные на хроматограммах три продукта по хроматографическим свойствам, характеру электрофоретической подвижности и у.-ф. спектрам поглощения (см. идентификацию ниже) полностью соответствуют продуктам 4, 5 и 6, представленным на рис. 1. Анализ остальных фракций затруднялся наличием в них NaCl (по выходу фракций пики 2 и 3 соответствуют продукту 2 и исходному АМФ).

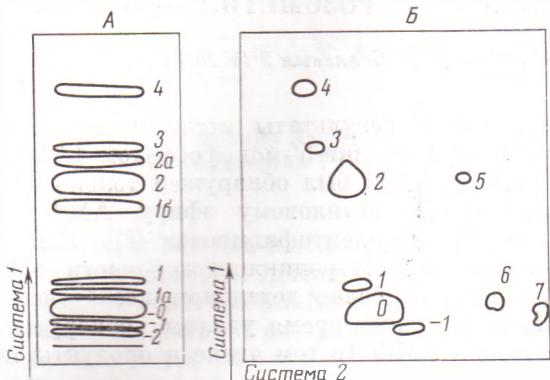


Рис. 1. Разделение продуктов реакции АМФ+НММ на хроматографической бумаге. А — одномерная хроматограмма (ватман № 3, объем реакционной смеси 5 мл); Б — двумерная хроматограмма («Ленинградская С», ватман № 3, объем реакционной смеси 0,5 мл, хроматографирование последовательно в системах 1 и 2). Пятна: 0 — исходный АМФ, -2, -1, 1a, 1, 16, 2, 2a, 3, 4, 5, 6, 7 — продукты реакции

Характеристика и идентификация некоторых продуктов реакции. Электрофорез проводили на бумаге «Ленинградская С» в 0,05 M фосфатном буфере, pH 8, и 0,05 M аммиачно-ацетатном буфере, pH 3,5 (градиент потенциала 15 в/см). При хроматографировании продуктов гидролиза — оснований использовали системы *n*-бутанол — вода, 86 : 14 (система 3) и метанол — HCl — вода, 7 : 2 : 1 (система 4). Значения R_m продуктов реакции и оснований, полученных после гидролиза, устанавливали относительно АМФ и аденина соответственно.

Продукт 1. При электрофорезе на бумаге (pH 8 и 3,5) ведет себя как анион с подвижностью, близкой к исходному нуклеотиду. При элюции из колонки с ДЭАЗ-сепадексом градиентом 0,0—0,1 M NaCl он выходит несколько раньше АМФ, но после продукта 2 (малое содержание в реакционной смеси по сравнению с АМФ не позволяет идентифицировать продукт 1 на хроматографическом профиле, рис. 2). Полученные данные указывают на наличие свободной фосфатной группы в продукте 1.

У.-ф. спектр поглощения заметно изменяется при переходе от кислой к щелочной среде (смещение λ_{max} от 260 к 265 м μ), рис. 3а. При кислотном гидролизе (1N HCl , 100° , 1 час) получено основание, которое по хроматографическим свойствам и у.-ф. спектрам поглощения идентично 6-метиламинопурину, использованному в качестве свидетеля (значения R_m в системах 3 и 4 соответственно 1,3 и 1,1; λ_{max} в 0,1N HCl и 0,1N KOH 267 и 272 м μ (5, 6) (рис. 3б). Полученные результаты и литературные данные по хроматографическим, электрофоретическим свойствам и у.-ф. спектрам поглощения 6-метиламинопуринибозид-5'-монофосфата (7) позволяют идентифицировать продукт 1 как N-6-метил-аденозин-5'-монофосфат (6-метил-АМФ).

Продукт 2. При электрофорезе (pH 8) ведет себя как анион с подвижностью, значительно меньшей, чем у АМФ, что согласуется с поведением его на анионите (рис. 2). В кислотном гидролизате обнаружен аденин (2). Так как хроматографические свойства продукта 2 и описанного в литературе монометилового эфира АМФ оказались сходными, мы получили этот эфир метилированием АМФ диазометаном и диметилсульфатом по-

методикам, указанным в (7, 8). Полное совпадение хроматографических и электрофоретических свойств продукта 2 и полученного соединения позволяют идентифицировать продукт 2 как аденоzin-5'-метилфосфат (метиловый эфир АМФ).

Продукт 6. При электрофорезе (рН 8) с середины бумажной полоски обнаруживает нейтральные (или слабоосновные) свойства. Однако при нанесении у катодного конца он проявляет заметные анионные свойства. При электрофорезе, рН 3,5 (нанесение на середину и у анодного конца полоски) проявляются катионные свойства. Данные электрофореза и поведение на анионите (рис. 2) указывают на увеличение положительного

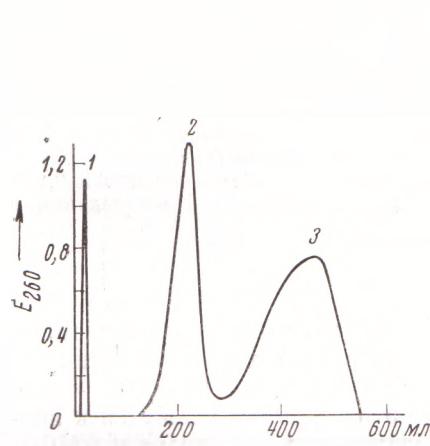


Рис. 2. Хроматографический профиль элюции реакционной смеси АМФ+НММ из ДЭАЭ-сепадекса А-25 (Cl⁻) линейным градиентом 0-0,1 M NaCl (1-3)

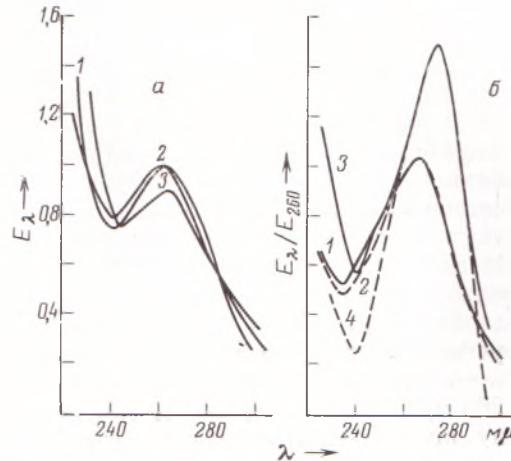


Рис. 3. У-Ф спектры поглощения продукта 1 (а), основания, полученного при его гидролизе, и 6-метиламинопурина (б). а: 1 – в дистиллированной воде, 2 – в 0,1 N HCl, 3 – в 0,1 N KOH; б: 1 – основание в 0,1 N HCl, 2 – 6-метиламинопурин в 0,1 N HCl, 3 – основание в 0,1 N KOH, 4 – 6-метиламинопурин в 0,1 N KOH

заряда по сравнению с АМФ. Из кислотного гидролизата выделено основание (хроматографированием в системе 3), идентифицированное как 1-метиладенин методом сравнения с заведомо известным 1-метиладенином по хроматографическим свойствам (R_m в системах 3 и 4 соответственно 0,4 и 1,25) и у-Ф. спектрам поглощения (λ_{\max} в 0,1 N HCl и 0,1 N KOH 260 мкм⁽⁹⁾), рис. 4б.

Обработка продукта 6 10% раствором аммиака при 45° в течение суток и последующее двумерное хроматографирование в системах 1 и 2 позволили обнаружить продукт, который по значению R_m и у-Ф. спектрам поглощения идентичен 6-метил-АМФ (перегрупировка Димрота)⁽⁷⁾. Превращение продукта 6 в 1 указывает на наличие свободной фосфатной группы в исследуемом продукте (как и результат электрофореза при нанесении у катодного конца). Это подтверждается и сравнительно легким метилированием продукта 6 диазометаном с образованием соответствующего монометилового эфира (см. ниже).

Полученные результаты позволяют идентифицировать продукт 6 как 1-метиладеноzin-5'-монофосфат (1-метил-АМФ).

Продукт 5. При электрофорезе (рН 8 и 3,5) ведет себя аналогично 6, проявляя при этом более выраженные основные свойства (что согласуется с поведением на анионите). После кислотного гидролиза идентифицирован 1-метиладенин. Для проверки предположения, что 5 является монометиловым эфиром 1-метил-АМФ, поставлен следующий опыт. 1-метил-АМФ (продукт 6) в дистиллированной воде обрабатывали эфирным рас-

творм диазометана (5), а монометиловый эфир АМФ (продукт 2) в дистиллированной воде обрабатывали диметилсульфатом, поддерживая слабокислую среду добавлением раствора KOH (7, 8). В результате двумерного хроматографирования обеих реакционных смесей в системах 1 и 2 обнаружен одинаковый продукт превращения, который по R_m в этих системах соответствует продукту 5.

Полученные результаты позволяют идентифицировать 5 как 1-метиладенозин-5'-метилфосфат.

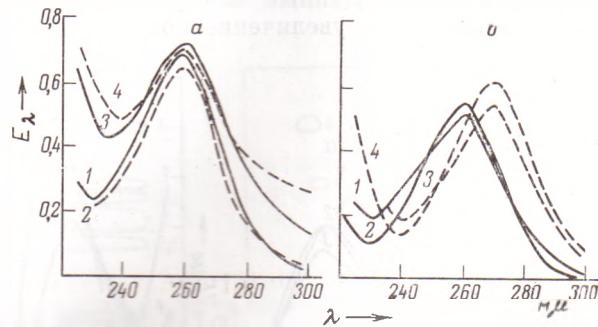


Рис. 4. УФ-спектры продуктов 5 и 6 (a), основания, полученного при их гидролизе, и 1-метиладенина (b).
 a: 1 - 5 в 0,1 N HCl, 2 - 5 в 0,1 N KOH, 3 - 6 в 0,1 N HCl, 4 - 6 в 0,1 N KOH; б: 1 - основание в 0,1 N HCl, 2 - 1-метиладенин в 0,1 N HCl, 3 - основание в 0,1 N KOH, 4 - 1-метиладенин в 0,1 N KOH

Продукты -1 и -2. Получены длительным хроматографированием реакционной смеси на бумаге в системе 1. УФ-спектры поглощения -1 и -2 аналогичны (λ_{max} этих продуктов в 0,1 N HCl и в 0,1 N KOH около 260 мкм). Электрофорез (pH 8) показал, что эти вещества движутся к аноду, причем -2 движется быстрее (-1) (подвижность -1 близка к АМФ). При хроматографировании их на ватмане ДЭАЭ-целлюлозе DE81 (элюент 0,05 N NaCl) наблюдается заметное отставание от АМФ, при этом -2 наименее подвижен. При кислотном гидролизе обнаружен аденин. Усиление кислотных свойств исследуемых веществ в сравнении с АМФ может быть связано с реакцией карбамоилирования под действием НММ (9, 10). Для подтверждения этого предположения в аналогичных условиях проводили реакцию АМФ с нитромочевиной (карбамоилирующий агент), синтезированной как указано в (11). В результате получены 2 продукта, которые по данным хроматографирования на бумаге и ватмане ДЭАЭ-целлюлозе и уФ-спектрам поглощения полностью соответствуют -1 и -2.

Для окончательного подтверждения карбамоильной природы -1 и -2 необходимо установление их химической структуры.

Выражаем благодарность Е. С. Головчинской (Всесоюзный научно-исследовательский химико-фармацевтический институт) за предоставление синтетического препарата 1-метиладенина и Б. Ф. Ванюшину (Московский университет) за предоставление 6-метиламинопурина.

Хабаровский государственный
медицинский институт

Поступило
30 III 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 А. Е. Бедняк, С. Т. Сизова, В сборн. Специфичность химического мутагенеза, «Наука», 1968, стр. 20.
- 2 В. Ф. Гуськов, В. М. Павлова и др., В сборн. Матер. юбилейн. конф., посвященной 30-летию фармацевтического факультета Иркутского медицинского института, Иркутск, 1971, стр. 68.
- 3 А. Е. Бедняк, ДАН, 195, 715 (1970).
- 4 Б. Ф. Ванюшин, В сборн. Современные методы в биохимии, 1, 1964, стр. 236.
- 5 Т. В. Венкстери, А. А. Баев, Спектры поглощения миорных оснований, их нуклеозидов, нуклеотидов и некоторых олигорибонуклеотидов, «Наука», 1965, стр. 16.
- 6 A. Wacker, M. Ebert, Zs. Naturforsch., 14b, N. 11, 709 (1959).
- 7 B. E. Griffin, C. B. Reese, Biochim. et biophys. acta, 68, 185 (1963).
- 8 A. Haines, C. B. Reese, L. Todd, J. Chem. Soc., 1964, 1406.
- 9 R. Непгу, J. Am. Chem. Soc., 72, № 7, 3287 (1950).
- 10 А. М. Серебряный, Р. М. Мнодакания, ДАН, 199, 657 (1971).
- 11 Синтезы органических препаратов, 1, ИЛ, 1932, стр. 153.