

УДК 547.953.1

РЕАКЦИИ АМИДОВ ОРТОФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

Н. Н. Пребраженская

Рассмотрены механизмы гидролиза и сольволиза амидов ортофосфорной кислоты. Обсуждаются представления об амидофосфатах как донорах фосфатного остатка в реакциях фосфорилирования кислот, спиртов, аминов. Показано использование амидофосфатов как фосфорилирующих агентов в синтетической химии, а также возможное участие их в процессах биологического фосфорилирования.

Библиография — 142 наименования.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	96
II. Структура амидофосфатов	97
III. Гидролиз и сольволиз амидофосфатов	99
IV. Взаимодействие амидофосфатов с нуклеофильными реагентами	104
V. Внутримолекулярный общий кислотный катализ реакций амидофосфатов	109
VI. Имидазольные производные фосфорной кислоты	110
VII. Взаимодействие амидофосфатов с электрофильными реагентами	112
VIII. Амидофосфаты как промежуточные вещества в реакциях биологического фосфорилирования	113

1. ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия производные ортофосфорной кислоты привлекают пристальное внимание широкого круга химиков-органиков и биохимиков в связи с выдающимися успехами в изучении нуклеиновых кислот, биосинтеза белка, развитием работ по биоэнергетике, структуре сложных фосфолипидов, фосфопротеинов и т. п. Большое число исследований посвящено эфирам фосфорной кислоты и ее ангидридам, в частности пиро- и трифосфатам и ацилфосфатам. Значительный интерес в настоящее время вызывает еще один тип производных фосфорной кислоты — амидофосфаты.

К амидофосфатам относятся фосфокреатин, фосфогауроциамин, фосфоаргинин и другие фосфогуанидины, выделенные из мышц различных животных и участвующие в образовании АТФ из АДФ при мышечном сокращении (см., напр.¹). Изучение биологического фосфорилирования, проходящего с участием этих соединений, способствовало использованию амидов фосфорной кислоты как исходных соединений в синтезе пиро- и трифосфатов, в том числе нуклеозидных производных (никотинамидаденидинуклеотид, кофермент А, АДФ, АТФ и т. д.). С другой стороны, при исследовании биологического фосфорилирования обнаружено участие в нем лабильных промежуточных амидофосфатов, а именно, ферментов, фосфорилированных по имидазольному кольцу остатка гистидина.

Установление роли фосфоимидазолов в ферментативных процессах тесно связано с изучением действия фосфорорганических отравляющих веществ, пестицидов, инсектицидов и т. п. Так, имеются данные о том, что диизопропилфторфосфат — эффективнейший ингибитор ряда ферментов, обладающий сильным токсическим действием, — фосфорилирует имидазольный остаток фермента (см. напр.²). Многие сильные ОВ, инсектициды и пестициды являются амидофосфатами (табун, шрадан

и др.). Описан синтез большого числа амидофосфатов, обладающих канцеростатической активностью (например, ^{3, 4}).

Интересной разновидностью амидов фосфорной кислоты являются ($P-N$)-аминокислотные производные нуклеотидов. Имеются данные, позволяющие предположить, что ДНК- и РНК-пептиды с $P-N$ -связью между нуклеотидом и аминогруппой пептида участвуют в структурировании и функционировании нукleinовых кислот (см., например, ⁶). Один из подходов к установлению строения и роли этих амидофосфатов заключается в изучении модельных соединений — синтетических нуклеотидоамидов. В ходе этих исследований было обнаружено много интересных фактов, существенно дополняющих сведения о реакционной способности амидофосфатов, в особенности о внутримолекулярном катализе их реакций (см. обзоры ^{5, 6}).

Амиды нуклеотидов находят оригинальное применение в синтетических целях: описано использование амидного производного нуклеотида для блокирования фосфатной группы при синтезе динуклеозидфосфата ⁷; предложен способ закрепления нуклеотида на полимерном носителе при синтезе олигонуклеотидов посредством образования фосфоамидиной связи между фосфатным остатком нуклеотида и аминогруппой полимераносителя ⁸.

Еще одной причиной, стимулирующей в последние годы интерес к амидофосфатам, является обнаружение ферментов, расщепляющих эти соединения, — так называемых фосфоамида.

Несмотря на важную роль амидофосфатов и значительное количество работ по их химии и биохимии, обзоры этих работ практически отсутствуют. Амидофосфаты кратко упоминаются при рассмотрении фосфоэфиров ^{9–14}, а собственно им посвящены лишь один обзор Пикока ¹⁵ и раздел в книге Брюса и Бенковича ¹⁶.

II. СТРУКТУРА АМИДОФОСФАТОВ *

Амидофосфаты, как и другие производные ортофосфорной кислоты, имеют в основном состояния форму тетраэдра, в центре которого находится атом фосфора, а четыре связи направлены от него к вершинам тетраэдра. Вакантные $3d$ -орбитали атома фосфора могут участвовать в образовании дополнительных π -связей с неподеленными электронными парами азота и кислорода (так называемое $d_{\pi}-p_{\pi}$ -сопряжение). Таким образом, $P-N$ - и $P-O$ -связи в амидофосфатах имеют некоторый характер двоесвязанности ²². Это препятствует атаке нуклеофильных реагентов и проявляется, в частности, в значительной устойчивости амидофосфатов (в отличие от амидов карбоновых кислот) к действию щелочей ^{17–21}.

Необходимым условием реакций нуклеофильного замещения по фосфору является нарушение $d_{\pi}-p_{\pi}$ -сопряжения с тем, чтобы освободить $3d$ -орбитали фосфора и сделать их доступными для взаимодействия с p -электронами нуклеофильного реагента в переходном состоянии.

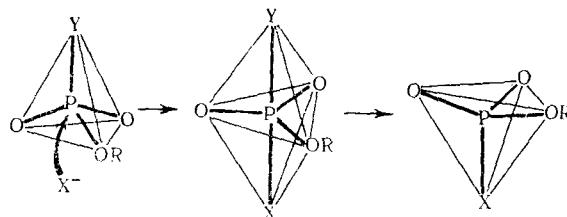
Наиболее вероятной структурой переходного состояния при нуклеофильном замещении у фосфора является тригональная бипирамида ^{12–14, 22}. При этом входящая и уходящая группа могут располагаться в вершинах бипирамиды (переходное состояние типа S_N2) и реакция будет проходить с обращением конфигурации у фосфора. Такое переходное состояние было принято для большинства реакций амидофосфатов на основании изучения нуклеофильного замещения оптически активных амидофосфатов (O-метил-N-циклогексиламидотионфосфат) ²³, а также

* Подробнее см. ^{9, 13, 14}.

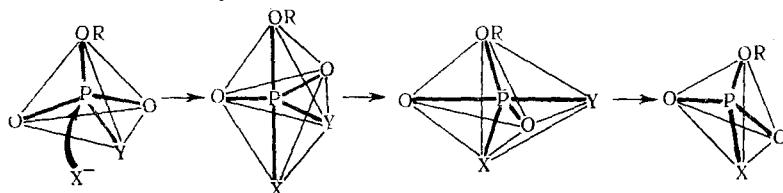
реакций внутримолекулярного замещения у амидофосфатов, содержащих дополнительную аминогруппу²⁴.

Однако эти данные не исключают полностью переходные состояния других типов. Атака нуклеофилов по фосфору может проходить легче, если она направлена не вдоль оси Р—N, так как тогда неблагоприятное распределение зарядов оказывает меньшее влияние¹⁵. Такой ход реакции сопровождается так называемым «псевдовращением», которое хорошо известно для фосфоэфиров (см. например,^{25–28}). В результате псевдовращения нуклеофил (X⁻), атакующий фосфор под углом к оси Р—N, переходит из плоскости основания бипирамиды в ее вершину. К сожалению, стереохимия нуклеофильного замещения у атома фосфора в амидофосфатах практически не изучена и поэтому можно лишь говорить о принципиальной возможности «псевдовращения».

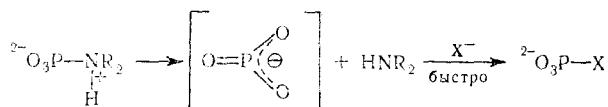
«Линейное» замещение:



Замещение с «псевдовращением»:



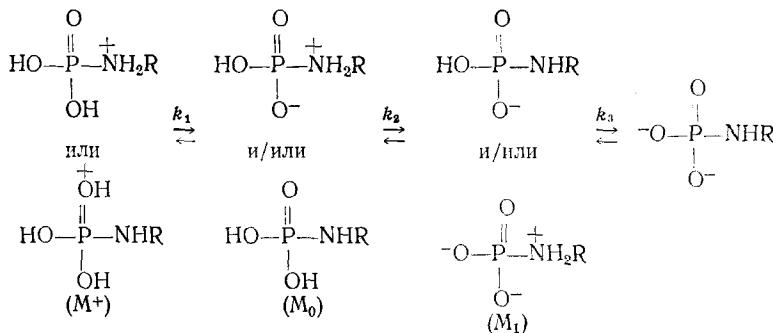
Экстремальным случаем тригональной бипирамиды с аксиальным расположением входящей и уходящей групп является переходное состояние, в котором происходит элиминирование лабильного промежуточного метафосфата²⁴. Его образование постулировано для реакций ряда ацилфосфатов, фосфоэфиров и амидофосфатов, общей чертой которых является наличие сильного электрононакцепторного заместителя при уходящем кислороде или азоте и сильная зависимость от pK_a уходящей группы²⁹. Метафосфат является плоским и потому реакции с его участием должны проходить с рацемизацией. Однако в случае амидофосфатов этот вопрос не исследован. В реакциях с участием промежуточного метафосфата стадией, определяющей скорость реакции, является мономолекулярный распад протонированного амидофосфата.



Имеется также ряд реакций, в которых предполагается переходное состояние, являющееся промежуточным между тригональной бипирамидой и плоским метафосфатом^{15, 30–32} и характеризующееся длинной Р—N-связью и короткой связью между фосфором и входящим нуклеофилом³⁰. Такие реакции обладают чертами как бимолекулярных (в частности, избирательностью к нуклеофилу), так и мономолекулярных реакций.

Реакции амидофосфатов существенно зависят от степени их ионизации. В зависимости от условий и структуры амидофосфаты могут сущ-

ствовать в виде сопряженной кислоты (M^+), нейтральной молекулы (M_0),monoаниона (M_1) и дианиона (M_2). Например:



Амидофосфат может быть протонирован как по азоту, так и по фосфорльному кислороду. Сопряженная кислота амидофосфата (M^+), по-видимому, представляет собой равновесную смесь двух форм: протонированной по кислороду и протонированной по азоту^{33, 34}. Нейтральная форма (M_0) и monoанион (M_1), по-видимому, могут существовать в виде цвиттериона^{35, 36}, причем наиболее вероятно, что производные ароматических аминов (для которых $pK_a < pK_2$ ортофосфорной кислоты) протонированы по кислороду фосфатного остатка, в то время как производные алифатических аминов (для которых $pK_a > pK_2$ ортофосфорной кислоты) существуют скорее всего в виде цвиттерионов³² (см. табл. I).

III. ГИДРОЛИЗ И СОЛЬВОЛИЗ АМИДОФОСФАТОВ

1. Гидролиз амидов фосфорной кислоты

Изучение скорости гидролиза незамещенного амида фосфорной кислоты в зависимости от pH обнаружило³⁷ наличие плато в области pH 3,5—6,5; при более высоких значениях pH гидролиз замедляется и при $\text{pH} \geqslant 10$ амидофосфат практически устойчив; при $\text{pH} < 3$ скорость гид-

ТАБЛИЦА I

Константы диссоциации амидов фосфорной кислоты

Соединение	pK_2	pK_3	Ссылки на литературу
Амид фосфорной кислоты	3,00 4,6 3,3 2,83 2,8 2,72 2,92	8,45 7,7 8,28 8,03 8,2 7,68 6,8	37 17 38 39 40 15 40
N-(<i>p</i> -Хлорфенил)амидофосфат	1,6	6,8	37
N-(<i>o</i> -Карбоксифенил)амидофосфат		7,25	32
N-(<i>p</i> -Карбоксифенил)амидофосфат		6,99	32
N-Ацетиламидофосфат	1,8	6,0	16
N-Бензоинамилофосфат	1,99 2,67	6,42 5,67	41 42
N-(<i>p</i> -Метилбензоин)амилофосфат	2,04	6,20	41
N-(<i>p</i> -Нитробензоин)амилофосфат	1,97	6,24	41
O-Метил-N-циклогексиламилофосфат	3,1		43
O-Метил-N-циклогексиламилодинифосфат	3,1		18
O-Этил-N,N-диэтиламилофосфат		7,2	42
O-Фенил-N-бензоинамилофосфат	1,9	13,4	41
N-Фосфоуретан	2,4	6,3	44

ролиза возрастает. Эти данные свидетельствуют о том, что дианион амидофосфата ($M_2, NH_2PO_3^{2-}$) устойчив к действию воды. Область pH 4,5–6,5 соответствуетmonoанионной форме (M_1), при более низких значениях pH существенный вклад вносит также нейтральная форма (M_0), при $pH < 2$ появляется катионная форма (M^+) и гидролиз амидофосфата катализируется кислотой.

При введении к фосфоамидному азоту ароматических заместителей профиль кривой зависимости скорости гидролиза амидофосфата от pH практически не изменяется⁴⁵. Лишь при $pH < 3$ гидролиз N-ариламидофосфатов проходит несколько более медленно, чем гидролиз незамещенного амидофосфата. Это объясняется, вероятно, участием электронов азота в сопряжении с ароматическим ядром, в результате чего уменьшается концентрация активной протонированной формы N-ариламидофосфата (M^+).

При введении к атому азота в амидофосфате сильных электроноакцепторных заместителей (бензоил⁴², дифенилфосфорил⁴², бензолсульfonyl⁴⁶, этоксикарбонил^{44, 46}) зависимость скорости гидролиза от pH изменяется весьма существенно: кривые зависимости имеют максимум при $pH \sim 4$, а при более высоких и более низких значениях pH скорость гидролиза резко падает. Для этих соединений кислотный катализ, как правило, не наблюдается^{46, 47} (N-бензоиламидофосфат занимает среднее положение: кислотный катализ для него проявляется лишь в очень кислой среде⁴²).

По-видимому, ацильные заместители, являясь сильными акцепторами электронов, затрудняют протонирование амидофосфата и уменьшают долю нейтральной (M_0) и катионной (M^+) форм, определяющих ускорение гидролиза амидофосфата при $pH < 3$.

Относительно возможных механизмов реакций единого мнения в настоящее время нет. Поэтому мы приводим табл. 2 предполагаемых механизмов сольволиза различных ионных форм амилофосфатов согласно представлениям различных авторов и попытаемся обсудить мотивы, побудившие их отдать предпочтение тому или иному механизму.

Амид фосфорной кислоты. Реакционноспособными ионными формами являются M_1 , M_0 и M^+ . Ченли и Фигесон³⁷ приписывают активность M_0

ТАБЛИЦА 2

Предполагаемые механизмы сольволиза амилофосфатов

Соединения	Ионные формы, подвергающиеся гидролизу			Ссыльки на литературу
	M^+	M_0	M_1	
Амид фосфорной кислоты	мономолек. бимолекул. бимолекул. *	мономолек. бимолекул.	промежут. мономолек., бимолекул. промежут.	15 48 37 11
N-Ариламилофосфаты	мономолек. * бимолекул.	мономолек.	мономолек.	37 11 32
N-Ацильамилофосфаты			мономолек. * *	44 47 42

* Авторы приводят данные в пользу как мономолекулярного, так и бимолекулярного механизмов, не отдавая предпочтения ни одному из них.

и M_1 их способности существовать в цвиттерионной форме. Выводы о механизме сольволиза делались на основании изучения состава продуктов при сольволизе в смесях метанол — вода: так как для моноанионной формы (M_1) соотношение алкилфосфат : фосфорная кислота заметно больше, чем соотношение спирт : вода в реакционной смеси, то был принят бимолекулярный S_N2 (P) механизм. С этим согласуется также катализ сольволиза пиридином и никотином, но не стерически затрудненным 2-метилпиридином.

Однако Ени и Каплоу⁴⁹ предполагают для M_1 -формы амидофосфата мономолекулярный путь сольволиза, так как она реагирует со скоростью, близкой скорости нейтральной формы (M_0). По их мнению, при бимолекулярном механизме следовало бы ожидать больших различий в скоростях сольволиза этих двух форм вследствие более сильного электростатического отталкивания нуклеофила первой по сравнению со второй.

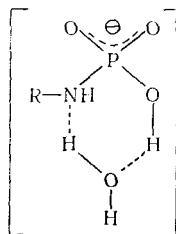
Кокс и Рамзай¹¹ приводят доводы в пользу как бимолекулярного, так и мономолекулярного механизма для M_1 -формы амидофосфата. Эти авторы полагают, что в случае прямой атаки воды на моноанион (S_N2) следовало бы ожидать, что амидофосфат будет реагировать значительно медленнее, чем ароматические амидофосфаты. Однако в действительности первый гидролизуется $\sim 10^3$ раз быстрее. С другой стороны, если бы при сольволизе в водном спирте реакция шла через метаfosфат, должно было бы получиться такое же соотношение алкилфосфата и фосфорной кислоты, как и при сольволизе в тех же условиях *p*-нитрофенилфосфата, для которого общепризнан мономолекулярный механизм. В действительности амидофосфат образует примерно вдвое больше алкилфосфата, чем *p*-нитрофенилфосфат⁴⁵. Таким образом, скорее всего сольволиз M_1 -формы амидофосфата проходит через переходное состояние, характеризующееся чертами как бимолекулярного, так и мономолекулярного механизма.

К такому же выводу приходит Пикок¹⁵ на основании рассмотрения энтропии активации сольволиза амидофосфата.

Для катионной формы (M^+) амидофосфата в соответствии с уменьшением выхода алкилфосфата при сольволизе в водном спирте по сравнению с M_0 и M_1 (8, 44 и 72 %, соответственно, в 50%-ном метаноле^{37, 49}) предполагается бимолекулярный механизм сольволиза^{11, 37, 49}. Однако скорость гидролиза амидофосфата пропорциональна функции кислотности Гамметта H_0 и имеет наклон, равный единице¹⁷, что характерно для гидролиза с элиминированием метаfosфата¹¹. В пользу мономолекулярного механизма склоняется также Пикок¹⁵.

N-Ариламидофосфаты. Для моноанионной формы (M_1) и нейтральной формы (M_0) N-ариламидофосфатов предполагается мономолекулярный механизм сольволиза, причем полагают, что M_0 гидролизуется быстрее вследствие чрезвычайно высокой реакционной способности ее цвиттериона³⁷. Однако при сольволизе в водноспиртовых смесях для различных спиртов наблюдается различная избирательность по сравнению с водой³². Это не согласуется с образованием свободного метаfosфата в ходе этих реакций, так как последний не может обладать избирательностью в отношении нуклеофила. С другой стороны, состав продуктов в смеси метанол — вода не зависит от наличия вблизи фосфоамидной группы соседней карбоксильной группы, что может быть объяснено мономолекулярным механизмом³². В соответствии с этими данными предполагается, что сольволиз моноанионов N-ариламидофосфатов включает переходное состояние, обладающее и мономолекулярным, и бимолекулярным характером³². Возможно, гидролиз моноанионов N-ариламидофосфатов включает образование циклического промежуточного соединения

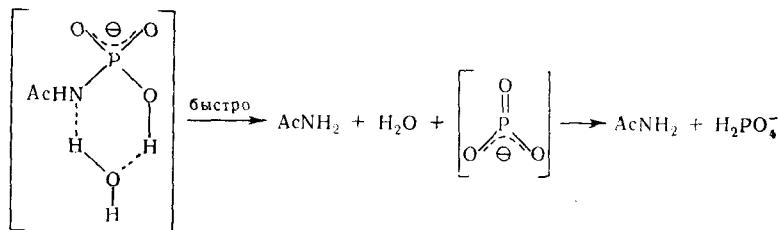
с участием молекулы воды^{11, 45} по аналогии с предложенным для гидролизаmonoанионов фосфомоноэфиров⁵⁰.



Нейтральная форма (M_0) N -ариламидофосфатов проявляет избирательность к нуклеофилу при сольволизе в водном спирте^{42, 37}. Кроме того, она очень чувствительна к стерическим факторам³². Это позволяет принять бимолекулярный механизм сольволиза M_0 -формы N -ариламидофосфатов.

Протонированная форма (M^+) N -ариламидофосфатов, как следует из рассмотрения состава продуктов сольволиза в водном спирте, гидролизуется мономолекулярно³⁷ (соотношение алкилфосфат : фосфорная кислота близко соотношению спирт : вода в растворе). Однако в работе³² предпочтение отдается бимолекулярному пути, включающему атаку растворителя на протонированный амидафосфат. По Коксу и Рамзаю¹¹ на основании обнаруженной ими линейной зависимости скорости гидролиза от молярности кислоты⁴⁵ можно считать, что гидролиз M^+ -формы включает бимолекулярную атаку водой, но исходя из соотношения продуктов реакции следует признать мономолекулярной.

N -Ациламидофосфаты, N -фосфоуретан. Реакционноспособной формой N -ациламидофосфатов, а также фосфоуретана является monoанионная (M_1). Уменьшение ее доли при переходе как к дианиону, так и к нейтральной форме замедляет гидролиз довольно резко^{42, 44, 47}, что несколько напоминает ситуацию при гидролизе моноалкилфосфатов¹⁰. Отсутствие эффекта нуклеофильных (NaF , ди-*n*-бутиламин, *n*-бутантиол, анилин) и электрофильных (Ag^+ , Cu^{+}) реагентов на гидролиз фосфоуретана⁴⁷, отсутствие обмена фосфорильного кислорода при гидролизе фосфоуретана в H_2^{18}O ⁴⁷ не согласуются ни сmono-, ни с бимолекулярной реакцией. Один из возможных механизмов гидролиза N -ациламидофосфатов и фосфоуретана^{41, 42, 47} заключается в расщеплении циклического гидратного промежуточного соединения, аналогичного рассмотренному выше при гидролизе N -ариламидофосфатов:



2. Гидролиз амидов моноэфиров фосфорной кислоты

Амиды фосфомоноэфиров расщепляются по Р—N-связи только в кислой среде^{6, 7, 48, 51–58}. Линейная зависимость константы скорости гидролиза от концентрации H^+ ионов свидетельствует о том, что гидролиз катализируется кислотой⁴⁸.

Нейтральные формы О-метиламидофосфата и незамещенного амидофосфата подвергаются как гидролизу, так и сольволизу в 50% -ном водном метаноле с близкими скоростями⁴⁸. Этот факт указывает на бимолекулярный механизм реакций обоих соединений; в случае мономолекулярной реакции, проходящей через промежуточный метаfosфат, следовало бы ожидать меньших скоростей для метилового эфира в связи с тем, что резонансная стабилизация метаfosфорных эфиров затруднена по сравнению с метаfosфат-ионом. Бимолекулярный путь гидролиза и сольволиза амидов фосфомоноэфиров был показан также на примере О-метил-N-циклогексиламидофосфата⁴³: низкий выход метилэтилфосфата (10%) при сольволизе этого соединения в 50% -ном этаноле противоречит образованию промежуточного высокоактивного метаfosфата, который не должен был бы проявлять избирательности к одному из нуклеофилов. Однако при катализе сольволиза О-метил-N-циклогексиламидофосфата пиридином, когда предполагается образование активного О-метилфосфорилпиридиния, выход метилэтилфосфата практически соответствует содержанию этанола в реакционной смеси, так что в этом случае не исключена возможность образования промежуточного метаfosфата⁴³.

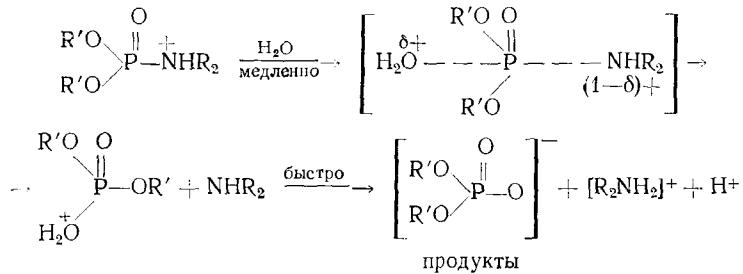
Таким образом, весьма вероятно, что механизм реакций амидов фосфомоноэфиров зависит от характера уходящей группы, иными словами — от заместителя при амидном азоте.

В литературе весьма распространено представление о том, что реакционная способность амидофосфатов возрастает с увеличением основности исходного амина^{42, 43, 51}, основанное на изучении гидролиза трех соединений: пиперидида, морфолида и *p*-анизида аденоzin-5'-монофосфата⁵¹. Однако этот выход противоречит результатам, полученным при изучении гидролиза ряда других О-алкиламидофосфатов^{34, 51, 59, 60}, для которых четко прослеживается уменьшение реакционной способности с увеличением основности исходного амина.

В связи с этим представляет интерес сравнительное изучение гидролиза ряда алифатических и ароматических амидофосфатов, производных уридин-5'-монофосфата⁶¹. Сравнение скоростей гидролиза этих соединений в 0,05 N. HCl (37°) показывает, что скорость гидролиза производных слабых аминов (ароматические и 2,2,2-трифторметиламин, pK_a 1—5,7) возрастает с увеличением основности исходного амина, в то время как скорость гидролиза производных сильных алифатических аминов (pK_a 9,34—10,64) падает с увеличением основности исходного амина. Эти результаты соответствуют представлению о двойственном влиянии заместителя при азоте на гидролиз амидов фосфорной кислоты³⁴: с одной стороны, электронодонорные заместители способствуют протонированию амидофосфата, стабилизируя возникающий положительный заряд; с другой стороны, — электроноакцепторные заместители облегчают образование переходного состояния, уменьшая плотность электронов на атоме фосфора и способствуя тем самым протеканию реакции нуклеофильного замещения по этому атому. Возможно⁶¹, что в случае производных слабых аминов преобладает первый эффект и поэтому наблюдается увеличение скорости гидролиза Р—N-связи с увеличением электронодонорных свойств заместителя. В случае же производных сильных аминов определяющим является образование переходного состояния и, соответственно, скорость гидролиза падает с увеличением электронодонорных свойств заместителя.

3. Гидролиз амидов диэфиров фосфорной кислоты

Амиды диэфиров фосфорной кислоты также гидролизуются по Р—N-связи в кислой среде и устойчивы в щелочной среде (например,⁶²). Изучение кинетики кислотного гидролиза амидов фосфодиэфиров на примере О-метил-О-(2,4-дихлорфенил)-N-алкиламидафосфатов показало, что реакция является бимолекулярной и скорее всего включает прямую атаку фосфора молекулой воды с одновременным уходом амина³⁴:



С таким механизмом согласуются результаты исследования гидролиза О,О-диметиламидафосфата в D_2O и сольволиза его в 50%-ном водном метаноле⁴⁹, а также результаты, полученные при изучении гидролиза N,N-диалкиламидов диметилфосфата^{60, 63}.

Амиды диэфиров фосфорной кислоты значительно более устойчивы в кислоте, чем соответствующие амиды фосфорной кислоты и фосфомоноэфиров^{62, 64-67}. В некоторых случаях стабилизация Р—N-связи в амидах фосфодиэфиров приводит к тому, что в кислой среде в первую очередь происходит расщепление фосфоэфирной, а не фосфоамидной связи^{34, 64}.

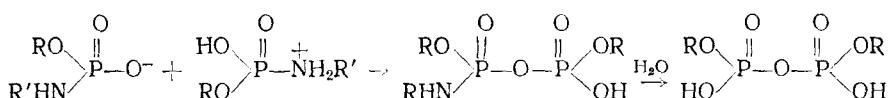
Причина такого изменения устойчивости Р—N- и Р—O-связей может заключаться⁶⁴ в изменении $d_{\pi}-p_{\pi}$ -сопряжения неподеленной электронной пары атомов азота и кислорода, связанных с реакционным центром, и степени занятости 3d-орбиталей атома фосфора в этих соединениях по сравнению с амидами фосфорной кислоты и ее моноэфиров. Как известно²², сопряжение электронов кислорода с фосфором для связи Р—OH и особенно Р—O⁻ заметно больше, чем для связи Р—OR. Это должно приводить к двум следствиям: во-первых, к уменьшению устойчивости связи Р—O в фосфодиэфирах и, во-вторых, к уменьшению степени занятости в них 3d-орбиталей атома фосфора и, следовательно, к большей их доступности для электронов азота, что должно выразиться в повышении устойчивости Р—N-связи. С таким представлением согласуется заметно большая устойчивость амидов дифенилфосфорной кислоты по сравнению с амидами ди-p-бутилфосфорной кислоты⁵⁹. Возможно также, что гидролиз амидов фосфодиэфиров замедляется по сравнению с гидролизом амидов фосфомоноэфиров в связи с тем, что из-за отсутствия способного к диссоциации гидроксила в фосфатном остатке первых для них исключается мономолекулярный путь гидролиза через промежуточный метафосфат.

IV. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АМИДОФОСФАТОВ С НУКЛЕОФИЛЬНЫМИ РЕАГЕНТАМИ

Амиды фосфорной кислоты при взаимодействии с такими нуклеофильными соединениями, как фосфорная кислота и ее эфиры, пирофосфорная кислота и ее эфиры, карбоновые кислоты, амины, спирты и т. п., могут быть донорами фосфатной группы.

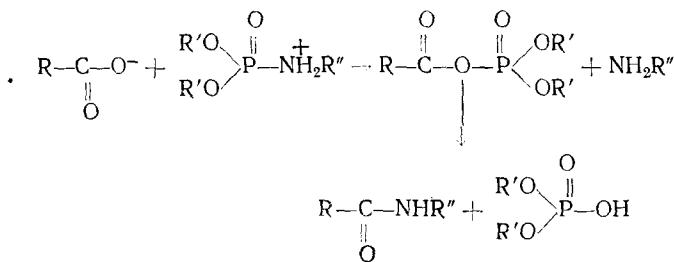
При переносе фосфатного остатка с амидофосфата на фосфорную кислоту или ее эфиры образуются пирофосфаты; если нуклеофильным реагентом является пирофосфорная кислота или ее эфиры, то образуются трифосфаты. Образование пирофосфатов из амилофосфата было обнаружено еще в прошлом веке⁶⁸. Позднее было установлено, что и другие амилофосфаты легко превращаются в симм.-пирофосфаты^{51, 67, 69, 70}.

Кинетические исследования показали, что образование пирофосфатов происходит в результате атаки аниона амилофосфата на протонированную молекулу с отщеплением 1 моля основания^{23, 36, 43, 71}.



Эта реакция, а также известная способность биологических систем использовать амилофосфаты — так называемые фосфагены, например, фосфокреатин, фосфотауроциамин, фосфогликоциамин, фосфоломбрин (см., например, ^{1, 72, 73}) — для синтеза пирофосфатов легли в основу preparativных методов синтеза пиро- и трифосфатов, в том числе нуклеотидных коферментов^{69, 74–77}. Наиболее удобными амидаами нуклеотидов для синтеза пирофосфатов являются морфолиды⁵¹. Исходя из них был синтезирован ряд нуклеозидполифосфатов. Этот вопрос подробно рассматривается в монографиях^{78, 79}. Из более поздних работ следует отметить⁸⁰, где исследуется влияние условий проведения реакции на выход нуклеозиддифосфатсахаров.

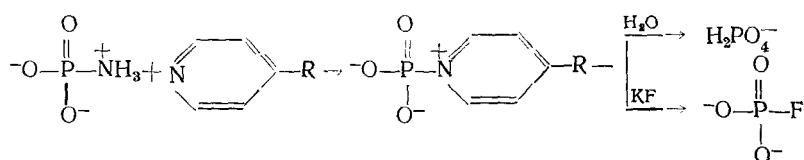
При переносе фосфатного остатка с амилофосфата на карбоновые кислоты образуются ацилфосфаты^{48, 67, 83}. При этом амин, имеющийся в реакционной смеси (это может быть специально добавленный амин^{48, 67, 70} или амин, освобождающийся в результате взаимодействия амилофосфата с карбоновой кислотой⁸¹), может реагировать с ацилфосфатом, образуя амид карбоновой кислоты. При нагревании карбоновых кислот с амидами фосфодиэфиров и особенно легко с триамидом фосфорной кислоты $\text{PO}(\text{NH}_2)_3$ образуются соответствующие амиды с выходом 40—80%⁸².



Фосфатная группа амилофосфатов может переноситься на другой амин. При этом амиды незамещенной фосфорной кислоты $(\text{HO})_2\text{PONR}_2$ ($\text{R}=\text{H}, \text{Alk}, \text{Ar}$) наименее эффективны в качестве доноров фосфата при фосфорилировании первичных аминов^{19, 39}, возможно, потому, что в условиях, когда амилофосфаты активны, большинство первичных аминов протонированы и, следовательно, не могут выступать в роли нуклеофильных реагентов. Тем не менее в последнее время описано получение N-фосфоаминокислот и N-фосфопептидов при использовании в качестве фосфорилирующего агента амилофосфата⁸⁴. Описано также фосфорилирование гидразина при его взаимодействии с амилофосфатом³⁹.

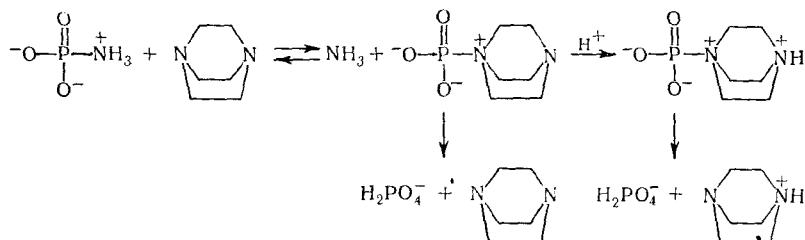
Амиды фосфомоно- и особенно диэфиров значительно более активны как доноры фосфатной группы, вероятно, в связи с их более высокими pK . Однако фосфатная группа переносится лишь на слабые амины. Так, О-метил-N-циклогексиламидофосфат и его тиоаналог вступают в реакцию переаминирования с 1-нафтиламином, 2,2,2-три trifторэтиламином, О-метилгидроксиламином^{23, 43}.

Наиболее эффективными акцепторами фосфата среди аминов являются третичные амины¹⁸, особенно пиридин и его гомологи. Синтетические реакции часто проводят в растворе пиридина (см., например, выше синтез пирофосфатов), который, как хорошо известно, катализирует перенос фосфата. В этих реакциях часто постулировалось образование промежуточного лабильного фосфорилипиридина^{18, 37, 85-90}. Образование его было показано в реакциях амида фосфорной кислоты; в присутствии пиридина ускоряется гидролиз последнего, а при добавлении фтор-иона образуется также фтор-фосфат³⁹:



Пиридины катализируют также гидролиз дизопропилфторфосфата и диметилфторфосфата, причем 3- и 4-метилпиридины более эффективны, а 1-метилпиридин столь же эффективен, как и незамещенный пиридин⁸⁵.

Аналогично действуют и другие третичные амины, например, триэтилендиамин является еще более эффективным катализатором (вероятно, потому, что вследствие стерического напряжения и легкого протонирования второго азота образуется более легко уходящая группа)³⁹:



Фосфорилированные третичные амины могут быть полезными фосфорилирующими агентами для синтетических работ благодаря их высокой активности и, в частности, тому факту, что они остаются активными в щелочном растворе — в условиях, когда другие амидофосфаты теряют протон и становятся неактивными³⁹. Примерами такого типа являются дифосфоimidазол (см. раздел VI) и N-фосфо-4-метилпиридиний, который реагирует нацело с 0,5 M раствором метиламина при pH 11,7 менее чем за 1 мин.³⁹.

Важную проблему химии амидов фосфорной кислоты составляет перенос фосфатного остатка на гидроксильную группу спиртов. Осуществление этой реакции в препаративных масштабах дало бы метод фосфорилирования спиртов, удобный по следующим причинам: а) относительная простота синтеза фосфорилирующего агента (амидосфофата); б) возможность достаточно длительного хранения его; в) возможность проведения реакции в водной среде, что особенно важно при фосфорилировании нуклеозидов и нуклеотидов, трудно растворимых в органических растворителях. В связи с этим ряд работ посвящен исследованию

сольволиза амидофосфатов в водно-спиртовых смесях. Однако, несмотря на то, что амидофосфаты эффективно фосфорилируют фосфаты, карбоновые кислоты и некоторые амины, они оказались в подавляющем большинстве случаев непригодными для фосфорилирования спиртов^{43, 67}.

Это объясняется тем, что спирты, как правило, не могут конкурировать как нуклеофилы с водой (гидролиз) или со второй молекулой амидофосфата (образование пирофосфатов). Так, хотя О-метил-N-циклогексиламидафосфат в очень разбавленном водном этаноле дает метилфосфат (продукт гидролиза) и метилэтилфосфат (продукт фосфорилирования этанола), но в более концентрированном водном этаноле образуется значительное количество пирофосфоамида, который постепенно гидролизуется, так что в итоге более 90% фосфора обнаруживается в виде метилфосфата⁴³.

Следует, однако, отметить, что соотношение продуктов гидролиза и фосфорилизации в значительной степени зависит от структуры амидофосфата, а именно от наличия и характера эфирных радикалов при фосфоре и заместителей при азоте: выход продуктов метанолиза зависит от введения метила в фосфатный остаток и составляет для незамещенного амидофосфата, О-монометил- и О,О-диметиламидафосфата 8, 21 и 12%, соответственно⁴⁹.

Выход продуктов фосфорилирования существенно зависит от условий проведения реакции, что связано, по-видимому, с конкретным механизмом сольволиза амидофосфата. Так, при сольволизе моноанионной формы амидофосфата (бимолекулярная реакция) соотношение образующихся алкилфосфата и фосфорной кислоты значительно превышает соотношение спирта и воды в реакционной смеси³⁷. Это может быть вызвано большей нуклеофильностью спирта по сравнению с водой. При переходе к мономолекулярному механизму (например, катализируемый кислотой сольволиз) влияние нуклеофильности реагентов уменьшается и соответственно уменьшается процент фосфорилизации. До последнего времени образование алкилфосфата и фосфорной кислоты при сольволизе амидофосфатов в водно-спиртовых смесях в соотношении, близком соотношению спирта и воды, рассматривалось как указание на мономолекулярный механизм с образованием промежуточного метаfosфата³⁷. Однако недавно было показано, что соотношение продуктов зависит в значительной степени от характера уходящей группы даже при заведомо одинаковом механизме^{29, 91} и от характера спирта²⁹. Последнее раньше объясняли стерическими факторами, однако такое объяснение неправомочно, так как при фосфорилировании аминов не наблюдается существенных различий в зависимости от структуры радикала. Высказано предположение, что различие в активности спиртов может быть вызвано нестатистическим распределением молекул растворителя в сольватной оболочке вокруг фосфатной группы²⁹, причем важна, по-видимому, степень сольватации переходного состояния⁴⁹. Это наводит на мысль о принципиальной непригодности амидофосфатов для фосфорилирования спиртов с громоздким радикалом.

Однако роль спиртового радикала нивелируется при фосфорилировании амидофосфатами — производными третичных аминов. Мы уже упоминали выше, что пиридины катализируют реакции амидофосфатов с фосфатами и аминами путем образования активных фосфорилированных соединений. Это наблюдается также при взаимодействии амидофосфатов со спиртами. Так, при сольволизе О-метил-N-циклогексиламидафосфата в водном этаноле (50 мол. %) в присутствии пиридина выход метилэтилфосфата возрастает до 40% по сравнению с 8% в отсутствие пиридина⁴³.

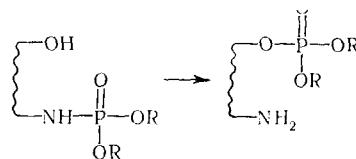
Эффективным фосфорилирующим агентом для спиртов в промышленном масштабе оказался N-бензоиламидафосфат. С его помощью успешно фосфорилированы (с выходами 40—80%) этиловый и бензиловый

спирт, циклогексанол, фенол; этаноламин фосфорилировался до О-фосфоэтаноламина. Реакцию проводили в присутствии триэтиламина; наибольшие выходы получены при использовании его в эквимолекулярном количестве по отношению к амидофосфату⁴¹.

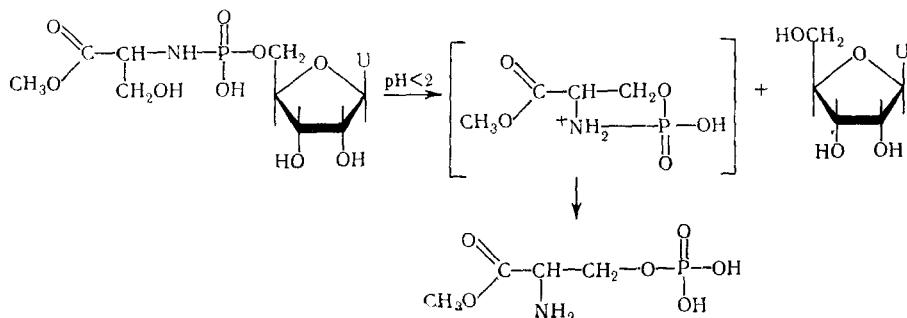
Таким образом, препаративное значение в качестве фосфорилирующих агентов для спиртов могут иметь (кроме фосфоимидазолов, которые будут рассмотрены отдельно в разделе VI) только амилофосфаты с сильными электроноакцепторными заместителями при азоте.

Иначе обстоит дело, если фосфоамидная группа и спиртовый гидроксил пространственно сближены: внутримолекулярное фосфорилирование гидроксильных групп осуществляется в широком интервале условий и с высокими выходами. При этом можно различить два типа реакций.

1. Фосфорилирована аминогруппа гидроксилсодержащего соединения. В этом случае в результате внутримолекулярного фосфорилирования происходит N→O миграция фосфатного остатка.

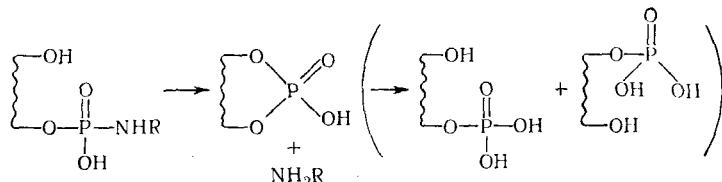


Эти реакции, как правило, проходят в кислой среде (см. например,⁹²). Обращает на себя внимание тот факт, что внутримолекулярное фосфорилирование гидроксильных групп амилофосфатами имеет место лишь для этерифицированных фосфорильных производных¹⁸. Это явление связывают с необходимостью циклического промежуточного соединения, которое в случае моно- и диэфиров может достаточно легко образовываться в результате переэтерификации, в случае же неэтерифицированной фосфорильной группы его образование затруднено¹⁸. Такого типа N→O миграция с переэтерификацией описана при кислотном гидролизе (P—N)-сериновых производных нуклеотидов⁹³:

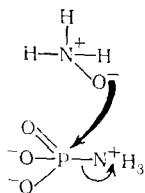


где U — остаток урацила.

2. Гидроксилсодержащее соединение обладает второй OH-группой, которая этерифицирована остатком амилофосфата. В этом случае внутримолекулярное фосфорилирование приводит к отщеплению амина и образованию циклофосфата, который в достаточно жестких условиях может гидролизоваться далее до монофосфата^{7, 94–98}.



Из других нуклеофильных реагентов, способных реагировать с амидами фосфорной кислоты, следует отметить гидроксиламин. При изучении его реакции с незамещенным амидоfosфатом при pH 7 установлено, что он атакует атом фосфора своим кислородом скорее, чем азотом³⁹:



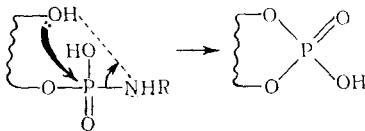
Реакция гидроксиламина с амидоfosфатами предложена для специфического расщепления нуклеотио-(P—N)-пептидов^{99, 100}. При обработке их гидроксиламином при pH 5 образуются гидроксиламиновые производные нуклеотидов и пептиды, причем последние могут быть определены количественно при помощи реакции динитрофенилирования⁹⁹. N-Метилгидроксиламин оказался более активным, а О-метилгидроксиламин менее активным, чем незамещенный гидроксиламин¹⁰⁰, что согласуется с механизмом, приведенным выше.

И, наконец, амидоfosфаты реагируют с галоидводородами. Наиболее активен в этой реакции HF. Он реагирует с любыми амидоfosфатами в отличие от HCl и HBr, которые взаимодействуют только с N,N-дизамещенными амидоfosфатами^{101, 102}.

В водных растворах амидоfosфаты реагируют с фтор-ионом с образованием фторофосфатов быстро в слабокислой среде^{17, 103} и медленно в нейтральной и щелочной³⁹. Фторофосфат образуется из амидоfosфата и KF в присутствии пиридиния или триэтилендиамина, осуществляющих нуклеофильный катализ переноса фосфатного остатка³⁹ (см. стр. 105, 106).

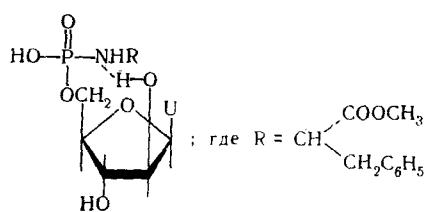
V. ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЙ ОБЩИЙ КИСЛОТНЫЙ КАТАЛИЗ РЕАКЦИЙ АМИДОФОСФАТОВ

Описанный в предыдущем разделе перенос фосфатного остатка с аминогидроксильную группу с образованием циклоfosфатов представляет собой, по-видимому, случай внутримолекулярного общего кислотного катализа, в которых гидроксильная группа выступает в качестве донора протона для амидного азота, нарушая $d_{\pi}-p_{\pi}$ -сопряжение азота и фосфора и увеличивая электрофильность последнего^{93, 98}:



В большинстве приведенных выше примеров общий кислотный катализ с участием гидроксильной группы приводит к резкому изменению свойств амидоfosфатов: P—N-связь становится лабильной не только в кислой, но и в нейтральной и щелочной средах.

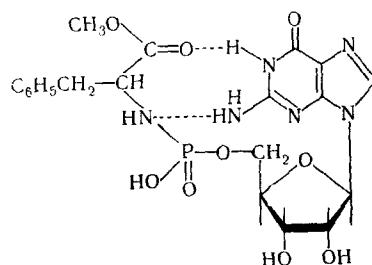
В других случаях катализ гидроксильной группой может приводить только к некоторому повышению реакционной способности амидоfosфата в кислой среде. Так, метиловый эфир арабинофуранозилурацил-5'-fosфо-(P—N)-фенилаланина гидролизуется при pH 1—5 быстрее, чем соответствующее рибозное производное, вероятно, вследствие того, что в первом 2'-ОН-группа находится в *цис*-положении к 5'-P-N-связи и может протонировать её азот⁹⁶:



Помимо гидроксильной группы, донором протонов при внутримолекулярном общем кислотном катализе реакций амидофосфатов может быть недиссоциированная карбоксильная группа. Так, о-карбоксифениламинофосфат гидролизуется (в моноионной и нейтральной форме) быстрее соответствующего *p*-карбоксипроизводного³². Аналогичное влияние карбоксильной группы наблюдается при гидролизе фосфокреатина¹⁰⁴.

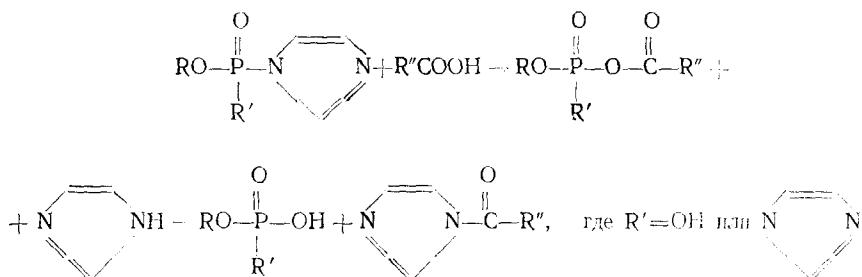
Повышение реакционной способности Р—N-связи вследствие каталического эффекта, проявляемого аминогруппой как донором протона, наблюдается при гидролизе фосфогистидинов. Производные гистидина менее устойчивы, чем соответствующие производные имидазола как при гидролизе, так и при переносе фосфатного остатка на имидазольные соединения, причем наиболее лабильна Р—N-связь в положении I имидазольного кольца. Ответственна за повышение лабильности фосфогистидинов протонированная α -аминогруппа^{84, 105}.

Внутримолекулярное ускорение гидролиза фосфоамидной связи аминогруппой обнаружено и для гуанозин-5'-fosфо-(P—N)-фенилаланина⁵⁷:



VI. ИМИДАЗОЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

Особое место среди амилофосфатов занимают имидазолиды. Они отличаются высокой реакционной способностью в отношении нуклеофилов различного типа. Так, моно- и диэфиры фосфоимидазола при реакции с фосфорной кислотой и ее эфирами дают пирофосфаты с количественными выходами^{106–109}. При реакции с карбоновыми кислотами имидазолиды фосфомоноэфиров, а также эфиры димидалилфосфорной кислоты дают ацилфосфаты, которые далее реагируют с выделившимся имидазолом с образованием ацилимидазола и фосфомоноэфира^{107, 108}:



Фосфоимидазолы являются наиболее активными донорами фосфатного остатка среди амидофосфатов по отношению к аминам. Фосфоимидазол и его эфиры фосфорилируют ароматические и алифатические амины, причем последние реагируют легче^{107, 108, 110, 111}. Особенно эффективен при фосфорилировании аминов дифосфоимидазол. Первичные алифатические амины легко фосфорилируются им при щелочных значениях рН. Дифосфоимидазол может быть использован для получения амидофосфата (75%) и фосфорилирования аминокислот^{40, 112}, этаноламина, ароматических аминов, *p*-аминобензойной кислоты, сульфаниловых кислот¹⁸.

По отношению к спиртам фосфоимидазолы являются еще более эффективными фосфорилирующими агентами, причем наиболее активны эфиры фосфоимидазолов^{107, 108, 111}.

Очевидно (см. разделы IV и V), что наиболее эффективным было бы фосфорилирование спиртового гидроксила, осуществляемое фосфоимидазолами внутримолекулярно. В связи с этим исключительно интересен синтез динуклеозидфосфатов на полинуклеотидной матрице взаимодействием имидазолида нуклеотида с нуклеозидом^{113–115}. Комплементарное взаимодействие полиуридиловой кислоты со смесью аденоzin-5'-фосфоимидазола и аденоцина обеспечивает взаимное расположение фосфоимидной группировки и спиртового гидроксила, подобное внутримолекулярному, в результате чего происходит перенос фосфатного остатка с имидазола на гидроксильную группу нуклеозида, т. е. образование динуклеозидфосфата АпА (выход 41%).

Таким образом, фосфоимидазолы являются наиболее активными донорами фосфатного остатка при фосфорилировании фосфатов, карбоновых кислот, аминов и спиртов. С другой стороны, имидазол является и наиболее эффективным акцептором фосфата с амидофосфатами^{18, 39, 116}. Это послужило основой препартивного метода фосфорилирования имидазолов амидом фосфорной кислоты^{84, 105}.

Имидазольный остаток может фосфорилироваться не только амидофосфатами, но и фосфоимидазолами. Примерами этого являются реакция между дифосфоимидазолом и гистидином с образованием фосфогистидина и гидролиз 1-фосфоимидазола, где одна молекула, по-видимому, фосфорилирует другую¹⁸, а также превращения 1-фосфогистидинов в соответствующие 3-производные⁸⁴, например: 1-фосфогистидин+гистидин→гистидин+3-фосфогистидин; 1-фосфогистидин+α-N-ацетилгистидин→гистидин+α-N-ацетил-3-фосфогистидин.

Уникальная способность фосфоимидазолов быть эффективными донорами и акцепторами фосфатного остатка, по-видимому, лежит в основе катализитического действия имидазолов при реакциях многих производных фосфорной кислоты. Так, имидазол катализирует гидролиз амидофосфата^{18, 39, 116}, *p*-нитрофенилфосфата³¹, диалкилфторфосфатов³⁵, метилэтиленфосфата¹¹⁷. Предполагается⁸⁵, что катализитическая функция имидазола объясняется промежуточным образованием фосфорилированного имидазола. Действительно, была показана исключительная лабильность дизопропилфосфоимидазола — потенциального промежуточного соединения при гидролизе дизопропилфторфосфата: в бикарбонатном буфере рН 7,6 при 30° он гидролизуется на 50% за 2,7 часа и на 100% за 13 часов⁸⁵.

Катализитическая активность имидазола при реакциях *in vitro* наводит на мысль, что фосфоимидазолы могут быть промежуточными соединениями в реакциях фосфорильных соединений *in vivo*. Имидазол в форме остатка гистидина входит в активный центр ферментов трансфорилирования. Фосфогистидин выделен в ряде случаев. Участие гистидина тем более вероятно, что его N-1-фосфат значительно более лабилен, чем N-1-фосфоимидазол⁸⁴. Как уже говорилось выше (см. раздел V), это связано

с влиянием боковой цепи гистидина, а именно его протонированной аминогруппы, сближенной с N-1. Конечно, в белке аминогруппа гистидина скорее всего завязана в пептидную связь, однако лабилизация Р—N-связи фосфоимидазола может осуществляться аминогруппой другой аминокислоты, сближенной с нею благодаря специфической конформации фермента. При этом, очевидно, в принципе могут активироваться обе фосфоамидные группы: и в положении 1, и в положении 3 имидазола, и конкретный результат будет определяться именно стерическими факторами.

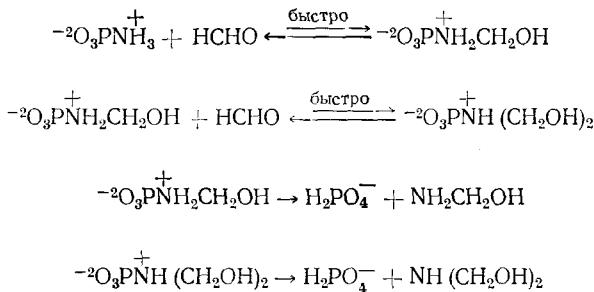
Интересно отметить, что сам имидазолид фосфорной кислоты не превосходит амид по реакционной способности, однако его эфиры значительно более активны в отношении нуклеофильной атаки. Можно предполагать в связи с этим, что фосфогистидин участвует в ферментативных процессах, связанных с переносом именно фосфоэфирного остатка (подробнее см. раздел VIII).

VII. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АМИДОФОСФАТОВ С ЭЛЕКТРОФИЛЬНЫМИ РЕАГЕНТАМИ

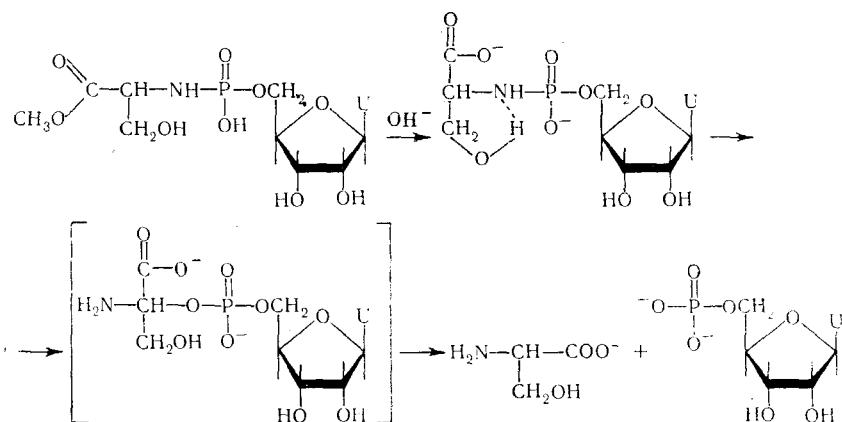
Специальными случаями электрофильного катализа являются общий и специфический кислотный катализ (см. разд. V и III) и катализ ионами металлов.

Катализ ионами металлов (Zn^{II} , Mn^{II} , Fe^{III} , Co^{II} , Cu^{II}) описан для фосфогуанидинов — природных фосфагенов¹¹⁸. Известно, что *in vitro* они значительно более устойчивы, чем простые амидофосфаты. Это связывают с делокализацией положительного заряда на амидном азоте. Каталитическое действие иона металла состоит в нарушении делокализации вследствие образования комплекса амидофосфат — катион металла^{72, 73, 118}.

Электрофильный катализ подробно изучен на примере гидролиза амидофосфата в присутствии формальдегида, пиридоксала и гипохлорита³⁹, азотистой кислоты и изоамилнитрита¹¹⁹. Роль этих катализаторов состоит, по-видимому, в том, что они превращают аминогруппу в более легко уходящую группу. Например, предполагается³⁹ следующий механизм гидролиза амидофосфата в присутствии формальдегида:



Наиболее эффективное воздействие на амидофосфаты оказывает электрофильный катализ в сочетании с нуклеофильным, в особенности, если они происходят внутримолекулярно. Например, в случае уридин-5'-фосфо-(Р—N)-серина⁹³ и других нуклеотидоамидов, содержащих OH-группу, способную сблизиться с амидным азотом⁹⁷, электрофильно-нуклеофильный катализ приводит к лабильности Р—N-связи в щелочной среде:



VIII. АМИДОФОСФАТЫ КАК ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ВЕЩЕСТВА В РЕАКЦИЯХ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Исключительная чувствительность амидофосфатов к нуклеофильному и электрофильному катализу и, в особенности, к внутримолекулярному нуклеофильно-электрофильному катализу наводят на мысль, что они могут играть роль активных промежуточных соединений в процессах биологического фосфорилирования.

Описан ряд ферментов, расщепляющих амидофосфаты,— так называемых фосфоамида (здесь мы не будем говорить о фосфагенах). Однако до сих пор во всех случаях фосфоамида зная активность являлась лишь дополнительной к основной — обычно фосфоэстеразной или фосфотрансферазной активности фермента^{120—127}. И только для рибонуклеозид-5'-фосфоамида из тканевых экстрактов млекопитающих пока не обнаружено какой-либо дополнительной активности¹²⁸. Фосфоамида зная активность проявляют также и некоторые протеолитические ферменты¹²⁷.

Фосфоэстеразная и фосфотрансферазная активность фосфоамида, а также тот факт, что свободные амидофосфаты в биологических системах не обнаружены и в качестве субстратов в ферментативных реакциях используются синтетические соединения, наводят на мысль, что фосфоамида зная активность описанных ферментативных препаратов является своего рода артефактом, отражающим определенные детали механизма действия ферментов.

Возможно, что при осуществлении фосфоэстеразной и прочих реакций образуются промежуточные фермент-субстратные соединения фосфоамида зного типа, и именно поэтому ферменты способны расщеплять амидофосфаты, если они получают их в готовом виде.

Фосфорилирование белка — фермента в процессе его действия описано для ряда ферментов^{129—142}. Для некоторых ферментов нуклеинового обмена предполагается^{110, 127, 138—140}, что субстрат может взаимодействовать сначала с активным центром фермента с образованием промежуточного активного нуклеозид-5'-фосфорилфермента. В ряде случаев было установлено, что фосфат присоединяется к имидазолу гистидинового остатка^{105, 129—135, 142}. Фосфогистидин был выделен из митохондрий и из препарата сукцинаттиоканазы и идентифицирован с синтетическим образцом 3-фосфогистидина¹⁰⁵. Однако позднее была показана исключительная легкость переноса фосфатного остатка из положения 1 гистидина на различные акцепторы, в том числе на N-3 гистидина. Таким образом, вопрос о месте фосфорилирования гистидина в ферменте остается открытым⁸⁴.

В связи с возможностью образования фермент-субстратных комплексов с Р—N-связью между фрагментами, синтетические амидофосфаты можно рассматривать как модели таких комплексов. Отличие их от природных состоит в том, что фермент как донор амидного азота заменен на остаток амина. Если амидофосфат может подойти к активному центру фермента, не нарушая существенно его структуру, то может осуществляться нуклеофильно-электрофильная активация фосфоамидного узла с участием функциональных групп фермента, в «нормальных» условиях воздействующих на собственную фосфоамидаольную систему. В итоге, при наличии акцептора фосфата происходит трансфосфорилирование, в отсутствие специфического акцептора — гидролиз амидофосфата. Такая гипотеза подробно обсуждалась для рибонуклеозид-5'-фосфоамидазы и в результате было высказано предположение, что как и другие фосфоамидазы, этот фермент не имеет самостоятельного значения и в основе его действия лежит образование промежуточных фосфоамидных структур в процессах синтеза и гидролиза межнуклеотидных связей РНК⁶¹.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ф. Б. Штрауб, Биохимия, Изд. АН Венгрии, Будапешт, 1965, стр. 613.
2. Р. О. Брайн, Токсичные эфиры кислот фосфора, «Мир», М., 1964, стр. 102, 132.
3. J. A. Stock, Chem. Brit., 6, 11 (1970).
4. М. Берстон, Гистохимия ферментов, «Мир», М., 1965, стр. 421—424.
5. Н. Н. Преображенская, З. А. Шабарова, Усп. химии, 38, 222 (1969).
6. Z. A. Shabarova, M. A. Prokofieva, Progress in N. A. Research and Mol. Biol., 10, 145 (1970).
7. E. Ohtsuka, K. Muroo, M. Ubasawa, M. Ikehara, J. Am. Chem. Soc., 91, 1537 (1969); 92, 3441 (1970).
8. G. M. Blackbourn, M. J. Brown, M. R. Haggis, J. Chem. Soc. (C), 1967, 2438.
9. Р. Хадсон, Структура и механизмы реакций фосфорорганических соединений, «Мир», М., 1967.
10. Э. Касовер, Молекулярная биохимия, «Мир», М., 1964.
11. J. R. Cox, O. B. Ramsay, Chem. Rev., 64, 317 (1964).
12. Н. А. Лощадкин, Механизм нуклеофильного замещения у тетраэдрического атома фосфора (приложение к книге Р. О. Брайна, Токсичные эфиры кислот фосфора), «Мир», М., 1964.
13. A. J. Kirby, S. G. Wagge, The Organic Chemistry of Phosphorus, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, 1967.
14. Ван Везер, Фосфор и его соединения, ИЛ, М., 1962.
15. C. J. Peacock, Naturforsch., 24b, 391 (1969).
16. T. C. Bruylants, S. J. Benkovic, Bioorganic Mechanisms, vol. 2, W. A. Benjamin, Inc., New York — Amsterdam, 1966.
17. M. Halman, A. Lapidot, D. Samuel, J. Chem. Soc., 1963, 1299.
18. T. Rathlev, T. Rosenberg, Arch. Biochem. Biophys., 65, 319 (1956).
19. J. F. Morrison, A. H. Ennol, D. E. Griffiths, Biochem. J., 68, 447 (1958).
20. E. W. Grundy, R. F. Hudson, J. Chem. Soc., 1962, 3591.
21. C. E. Северин, Успехи биол. химии, 2, 355 (1954).
22. D. W. Sruickshank, J. Chem. Soc., 1961, 5486.
23. N. K. Натер, Там же, 1965, 2731.
24. N. K. Натер, Там же, (С), 1966, 404.
25. P. C. Haake, F. H. Westheimer, J. Am. Chem. Soc., 83, 1102 (1961).
26. D. A. Usher, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 62, 661 (1969).
27. M. A. Harris, D. A. Usher, H. P. Albrecht, G. H. Jones, J. G. Moffatt, Там же, 63, 246 (1969).
28. S. J. Benkovic, K. J. Schray, J. Am. Chem. Soc., 91, 5653 (1969).
29. A. J. Kirby, A. G. Varvoglou, Там же, 89, 415 (1967).
30. W. P. Jencks, M. Gilchrist, Там же, 86, 1410 (1964).
31. A. J. Kirby, W. P. Jencks, Там же, 87, 3209 (1965).
32. S. J. Benkovic, P. A. Benkovic, Там же, 89, 4714 (1967).
33. P. S. Taylor, F. H. Westheimer, Там же, 87, 553 (1965).
34. A. W. Garrison, C. E. Boozer, Там же, 90, 3486 (1968).
35. E. Hobbs, D. E. C. Corbridge, B. Raistrick, Acta Cryst., 6, 621 (1953).
36. V. M. Clark, S. G. Warren, J. Chem. Soc., 1965, 5509.

37. J. D. Chanley, E. Feageson, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1181 (1963).
38. R. R. Irani, C. F. Callis, *J. Phys. Chem.*, **65**, 934 (1961).
39. W. P. Jencks, M. Gilchrist, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3199 (1965).
40. O. Meyerhof, K. Lohmann, *Biochem. Ztschr.*, **196**, 22 (1928).
41. C. Zioudrou, *Tetrahedron*, **18**, 197 (1962).
42. M. Halman, A. Lapidot, D. Samuel, *J. Chem. Soc.*, **1960**, 4672.
43. N. K. Намер, Там же, **1965**, 46.
44. A. Lapidot, M. Halman, Там же, **1958**, 1713.
45. J. D. Chanley, E. Feageson, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2686 (1958).
46. M. Halman, A. Lapidot, D. Samuel, *J. Chem. Soc.*, **1961**, 3158.
47. M. Halman, A. Lapidot, Там же, **1960**, 419.
48. D. F. Heath, Там же, **1956**, 3796.
49. J. Öney, M. Caplow, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 6972 (1967).
50. W. W. Butcher, F. H. Westheimer, Там же, **77**, 2420 (1955).
51. J. G. Moffatt, H. G. Khogana, Там же, **83**, 649 (1961).
52. Т. С. Рябова, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, *Биохимия*, **30**, 235 (1960).
53. Е. П. Савельев, Т. С. Рябова, И. П. Беленская, З. А. Шабарова, *ДАН*, **155**, 1457 (1964).
54. О. Е. Воробьев, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, Там же, **158**, 143 (1964).
55. Т. С. Рябова, З. А. Шабарова, *Вестник МГУ*, сер. хим., **1966**, № 1, 114.
56. В. А. Баканова, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, *Хим. природн. соед.*, **1966**, 35.
57. Н. И. Соколова, З. Стумбравичуте, П. П. Пурыгин, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, *ДАН*, **174**, 722 (1967).
58. Л. Г. Гатинская, Н. И. Соколова, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, *ЖВХО им. Менделеева*, **14**, 583 (1969).
59. J. A. Stock, W. J. Norwood, P. D. Regan, *J. Chem. Soc. (C)*, **1966**, 637.
60. M. M. Sélim, T. N. Thanh, С. г., **250**, 2377 (1960).
61. Р. К. Леднева, Н. Н. Преображенская, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, *Мол. биол.*, **5**, 264 (1971).
62. Н. И. Соколова, В. И. Мельникова, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, *Вестник МГУ*, сер. хим., **1966**, № 5, 119.
63. T. N. Thanh, M. Sélim, С. г., **250**, 2724 (1960).
64. Н. Н. Преображенская, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, *ДАН*, **174**, 100 (1967).
65. Ю. П. Швачкин, М. Т. Азарова, М. А. Прокофьев, *ЖХ*, **31**, 2107 (1961).
66. R. Rätz, *J. Org. Chem.*, **22**, 371 (1957).
67. A. R. Todd, *Proc. Chem. Soc.*, **1962**, 199.
68. H. N. Stokes, *Am. Chem. J.*, **15**, 198 (1893).
69. V. M. Clark, G. W. Kirby, A. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1957**, 1497.
70. V. M. Clark, A. R. Macghee, F. P. Richter, A. Todd, *Tetrahedron*, **1966**, Suppl. 7, 307.
71. V. M. Clark, S. G. Warren, *Proc. Chem. Soc.*, **1963**, 178.
72. V. M. Clark, S. G. Warren, *Nature*, **199**, 657 (1963).
73. V. M. Clark, *Proc. Chem. Soc.*, **1964**, 129.
74. R. W. Chambers, H. G. Khogana, *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 3749 (1958).
75. J. G. Moffatt, H. G. Khogana, Там же, **80**, 3756 (1958).
76. R. W. Chambers, H. G. Khogana, *Chem. a. Ind.*, **1956**, 1022.
77. H. Machleidt, E. Cohen, R. Tschesche, *Ann. Chem.*, **672**, 215 (1964).
78. Г. Корана, Новые направления в химии биологически важных эфиров фосфорной кислоты, «Мир», М., 1964, стр. 97.
79. А. Микельсон, Химия нуклеозидов и нуклеотидов, «Мир», М., 1966, стр. 258.
80. Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский, В. Н. Шibaев, К. С. Лебедева, *Изв. АН СССР*, сер. хим., **1969**, 897.
81. З. А. Шабарова, Л. Г. Андропова, М. Бездек, М. А. Прокофьев, *ДАН*, **130**, 346 (1960).
82. Z. Skrowaczewska, R. Mastalerz, *Roczniki Chem.*, **31**, 531 (1957).
83. Д. М. Браун, В сб. Успехи органической химии, «Мир», М., 1966, т. 3.
84. D. E. Hultquist, *Biochim. biophys. acta*, **153**, 329 (1968).
85. T. Wagner-Jauregg, B. E. Hackley, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2125 (1953).
86. J. H. Park, D. E. Kosland, *J. Biol. Chem.*, **233**, 986 (1958).
87. H. C. Khogana, J. P. Vizsolyi, *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 4660 (1959).
88. G. DiSabato, W. P. Jencks, Там же, **83**, 4393 (1961).
89. G. DiSabato, W. P. Jencks, Там же, **83**, 4400 (1961).
90. R. Letters, A. M. Michelson, *J. Chem. Soc.*, **1962**, 71.
91. C. A. Bunton, E. J. Fendler, J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 1221 (1967).
92. P. E. Plapinger, T. Wagner-Jauregg, Там же, **75**, 5757 (1953).

93. Е. П. Савельев, Б. А. Юодка, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, Вестник МГУ, сер. хим., 1967, № 5, 128.
94. С. А. Dekker, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **76**, 3522 (1954).
95. T. Ueda, Chem. Pharm. Bull., **8**, 459 (1960).
96. Н. Н. Преображенская, Н. Г. Шинский, М. Г. Ивановская, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, ДАН, **192**, 1060 (1970).
97. Н. Г. Шинский, Н. Н. Преображенская, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, ЖХХ, **40**, 1122 (1970).
98. О. Е. Воробьев, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, Вестник МГУ, сер. хим., **1964**, № 6, 66.
99. Т. С. Рябова, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, ДАН, **162**, 1068 (1965).
100. Б. А. Юодка, В. К. Недбай, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, Биохимия, **34**, 849 (1969).
101. Z. Skrowaczewska, P. Mastalerz, Roczniki Chem., **29**, 415 (1955).
102. R. Greenhalgh, J. R. Blanchfield, Canad. J. Chem., **44**, 501 (1966).
103. W. P. Jencks, Brookhaven Symp. Biol., **15**, 134 (1962).
104. A. Lapidot, D. Samuel, Biochim. biophys. acta, **111**, 537 (1965).
105. D. E. Hultquist, R. W. Moyer, P. D. Boyer, Biochemistry, **5**, 322 (1966).
106. A. H. Staab, H. Schaller, F. Cramer, Angew. Chem., **71**, 736 (1959).
107. H. Schaller, H. A. Staab, F. Cramer, Chem. Ber., **94**, 1621 (1961).
108. F. Cramer, H. Schaller, Там же, **94**, 1634 (1961).
109. I. Goldman, J. W. Marsico, G. Anderson, J. Am. Chem. Soc., **82**, 2969 (1960).
110. J. Baddiley, J. G. Buchanan, R. Letters, J. Chem. Soc., **1956**, 2812.
111. Л. Н. Николенко, Е. В. Дегтерев, ЖХХ, **37**, 1350 (1967).
112. T. Rosenberg, Arch. biochem. biophys., **105**, 315 (1964).
113. B. J. Weimann, R. Lohrmann, L. E. Orgel, H. Schneider-Berloehr, J. E. Sulston, Science, **161**, 387 (1968).
114. H. Schneider-Berloehr, R. Lohrmann, L. E. Orgel, J. Sulston, B. J. Weimann, Там же, **162**, 809 (1968).
115. H. Schneider-Berloehr, R. Lohrmann, J. Sulston, L. E. Orgel, H. T. Miles, J. Mol. Biol., **47**, 257 (1970).
116. T. Müller, T. Rathlev, T. Rosenberg, Biochim. biophys. acta, **19**, 563 (1956).
117. F. H. Westheimer, J. Am. Chem. Soc., **85**, 1773 (1963).
118. V. M. Clark, A. Todd, S. G. Warren, Biochem. Ztschr., **338**, 591 (1963).
119. M. Ikebara, S. Hesugi, T. Fukui, Chem. Pharm. Bull., **15**, 440 (1967).
120. K. M. Moller, Biochim. biophys. acta, **16**, 162 (1955).
121. N. Katunuma, Arch. biochem. biophys., **76**, 547 (1958).
122. R. A. Smith, D. J. Burrow, Biochim. biophys. acta, **34**, 274 (1959).
123. M. F. Singer, J. S. Fruton, J. Biol. Chem., **229**, 111 (1957).
124. A. Fujimoto, R. A. Smith, Biochim. biophys. acta, **56**, 501 (1962).
125. M. E. Holzer, K. D. Johnson, R. A. Smith, Там же, **122**, 232 (1966).
126. R. Parvin, R. A. Smith, Biochemistry, **8**, 1748 (1969).
127. М. Берстон. Гистохимия ферментов, «Мир», М., 1965, стр. 180—183.
128. Р. К. Леднева, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, ДАН, **172**, 977 (1967).
129. R. A. Mitchell, L. G. Butler, R. D. Boyer, Biochem. Biophys. Res. Comm., **16**, 545 (1964).
130. G. Kreil, P. D. Boyer, Там же, **16**, 551 (1964).
131. J. S. Nishimura, Biochemistry, **6**, 1094 (1967).
132. A. W. Norman, R. T. Wedding, M. K. Black, Biochim. Biophys. Res. Comm., **20**, 703 (1965).
133. O. Walinder, J. Biol. Chem., **243**, 3947 (1968).
134. R. D. Simon, M. Levinthal, F. D. Kundig, W. Kundig, B. Anderson, P. E. Hartman, S. Roseman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **58**, 1963 (1967).
135. B. Weiss, A. Thompson, C. C. Richardson, J. Biol. Chem., **243**, 4556 (1968).
136. Y. W. Little, S. B. Zimmerman, C. K. Oshinsky, M. Gellert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **58**, 2004 (1967).
137. Y. Nishizuka, K. Ueda, K. Yoshihara, H. Yamada, M. Takeda, O. Hayashi, Cold. Spring Harbor Symp., **34**, 781 (1969).
138. Z. W. Hall, I. R. Lehmann, J. Biol. Chem., **244**, 43 (1969).
139. P. L. Pedersen, Там же, **243**, 4305 (1968).
140. T. Y. Shen, Angew. Chem., **82**, 729 (1970).
141. М. Диксон, Э. Уэбб. Ферменты, «Мир», М., 1966, стр. 266—269.
142. M. DeLuca, K. E. Ebner, D. E. Hultquist, G. Kreil, J. B. Peter, R. W. Moyer, P. D. Boyer, Biochem. Ztschr., **338**, 512 (1963).