

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)类似物的合成及性质

侯淑华* 曲忠国 钟克利 边延江 汤立军
(渤海大学化学化工学院 辽宁 锦州 121013)

摘 要 合成了3种新型结构稳定的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)类似物并通过¹H NMR、¹³C NMR、³¹P NMR和HRMS进行了表征。NAD⁺类似物经80℃加热24 h后,通过¹H NMR确认其结构稳定;通过循环伏安法(CV)测定了其电化学性质,表明其仍然具有良好的氧化还原性能。

关键词 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸;类似物;氧化还原活性
中图分类号:O622 文献标识码:A 文章编号:1000-0518(2016)05-0549-05
DOI:10.11944/j.issn.1000-0518.2016.05.150412

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)是NAD⁺依赖型酶的辅酶,生物体不可缺少的小分子化合物(图1)^[1]。NAD⁺作为电子载体,在各种氧化还原反应中起着重要的作用。如在催化制备手性化合物如手性醇^[2]、手性胺^[3]、羧基酸、氨基酸等具有极大的优势,因此在药物化学、农药等领域具有非常重要的用途,越来越受到人们的重视^[4-6]。NAD⁺分子中烟酰胺单核苷酸(NMN)在氧化还原反应中起到传递电子和氢的作用,吡啶环的C-4位置是NAD⁺的反应中心,能接受或给出氢负离子。然而NAD⁺烟碱环上带有正电荷,与核糖形成糖苷键,C—N键易断裂,稳定性相对较差。Slama等^[7-8]首次将核糖上的氧原子换成碳原子,合成了结构稳定的NAD⁺类似物(Carba-NAD⁺)。Carba-NAD⁺与NAD⁺依赖型组蛋白去乙酰化酶Sir2形成晶体结构,模拟NAD⁺与Sir2结合方式,解析NAD⁺在组蛋白脱乙酰化过程中的作用机理。研究还发现采用Carba-NAD⁺作为乙醇脱氢酶(ADH,来源于酵母)辅酶最大反应速率与NAD⁺相当^[9]。前期我们合成了一系列保留烟酰胺单核苷酸、改变腺嘌呤环的NAD⁺类似物^[10-15],发现部分NAD⁺类似物能够被野生型乙醇脱氢酶或突变苹果酸酶所识别,并表现出良好的催化活性。这些类似物烟碱环上仍带有正电荷,稳定性较差。因此本文拟合成结构相对稳定的

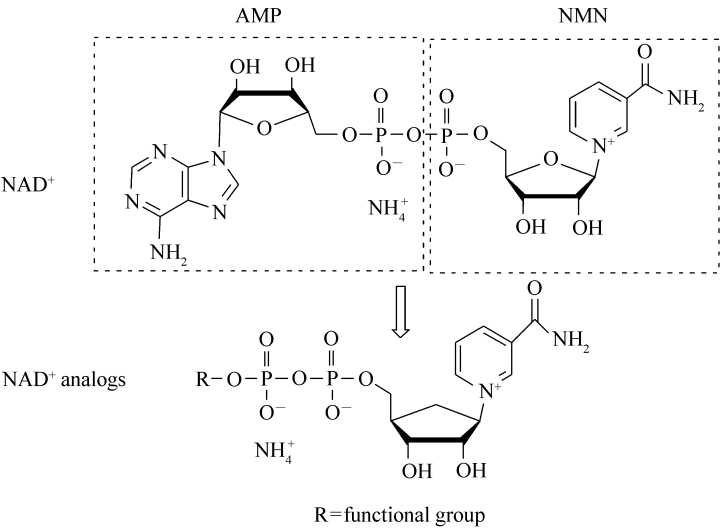


图1 吡啶核苷酸辅酶NAD⁺及其类似物的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of pyridine nucleotide coenzyme NAD⁺ and NAD⁺ analogs

NAD⁺类似物,同时对合成的 NAD⁺类似物的稳定性及电化学性质进行研究。

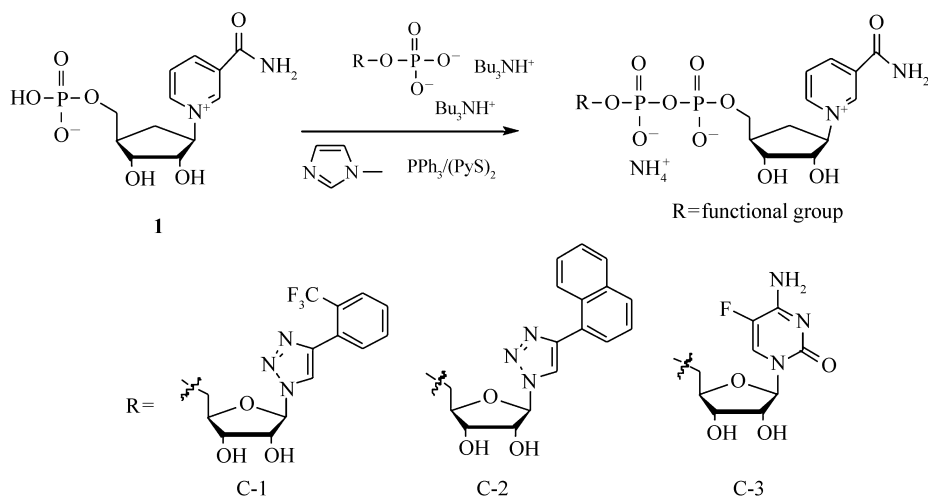
1 实验部分

1.1 仪器和试剂

三乙基硼氢化锂四氢呋喃溶液(~1 mol/L,比利时 ACROS 公司);(1*R*,4*S*)-2-氮杂二环[2.2.1]庚-5-烯-3-酮(≥98%,美国 Sigma 公司)、氯化氢甲醇溶液(~3 N,美国 Sigma 公司);烟碱(≥97%,德国 ABCR 公司);2,4-二硝基氯苯(98%,阿拉丁试剂有限公司),超干溶剂四氢呋喃购自比利时 ACROS 公司;所有溶剂均经无水处理;DRX-400 型核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司);LC/Q-TOF-MS 型液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱仪(英国 Manchester 公司);CHI 600C 型电化学仪、饱和甘汞电极(CHI 150)、Pt 电极(CHI 115)、玻碳电极(CHI 104, $\phi = 3$ mm)均购于上海辰华仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 NAD⁺类似物的合成 目标化合物 C-1、C-2、C-3 的合成路线见 Scheme 1。将烟酰胺腺嘌呤单核苷酸核糖环上的氧替换为碳的化合物 **1** 参考文献[9,16-17]方法合成,产率为 40.3%。



Scheme 1 Synthesis of NAD⁺ analogs

将冻干化合物 **1**(89 mg, 0.25 mmol)悬浮于 5 mL 重蒸二甲基亚砜(DMSO)和 1 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中,加入甲基咪唑(415 μ L, 5.2 mmol),2,2'-二硫二吡啶(2,2'-dithiodipyridine, (PyS)₂)(286 mg, 0.93 mmol)溶于 0.8 mL DMF 中、PPh₃(341 mg, 1.3 mmol)溶于 0.8 mL DMF 中,依次加入到反应体系中,室温搅拌 15 min,加入磷酸单酯(0.7 mmol,溶于 1.5 mL DMF),室温搅拌 9 h。转移至 50 mL 离心管中加入 30 mL 0.2 mol/L NaI 丙酮溶液,有沉淀产生,离心,沉淀加入 8 mL 水溶解,CH₂Cl₂(15 mL $\times$ 3)萃取,浓缩水相,调 pH 值为 2,过二乙氨基纤维素 DEAE 柱,得到目标产物。

C-1 的合成:产率为 21.5%。¹H NMR(D₂O, 400 MHz), δ : 9.23(s, 1H), 9.01(d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 8.72(d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.25(s, 1H), 8.06(dd, $J = 6.2, 8.2$ Hz, 1H), 7.71(d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.58 ~ 7.54(m, 1H), 7.50 ~ 7.46(m, 2H), 6.05(d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 4.95(ddd, $J = 8.7, 8.7, 8.7$ Hz, 1H), 4.64(dd, $J = 4.9, 4.8$ Hz, 1H), 4.43(dd, $J = 4.8, 4.8$ Hz, 1H), 4.35 ~ 4.29(m, 2H), 4.13 ~ 4.04(m, 3H), 4.02 ~ 3.96(m, 1H), 3.89 ~ 3.85(m, 1H), 2.50(ddd, $J = 8.7, 8.7, 13.2$ Hz, 1H), 2.27 ~ 2.25(m, 1H), 2.06 ~ 2.01(m, 1H); ¹³C NMR(D₂O, 100.6 MHz), δ : 165.2, 145.5, 144.9, 142.7, 133.8, 132.4, 131.9, 129.4, 128.6, 127.6, 126.5, 126.4, 125.1, 123.3, 92.1, 84.2(d, $J = 8.7$ Hz), 77.1, 75.8, 74.9, 72.1, 70.4, 66.6, 65.5, 42.9(d, $J = 8.3$ Hz), 28.6; ³¹P NMR(D₂O, 162 MHz), δ : -10.5(d, $J = 19.3$ Hz), -10.8(d, $J = 19.3$ Hz); HRMS(ESI) 计算值(C₂₆H₂₉F₃N₅O₁₃P₂)⁻ requires m/z 738.1195, 实测值 m/z 738.1198。

C-2 的合成:产率为 38.6%。¹H NMR(D₂O, 400 MHz), δ : 8.94(s, 1H), 8.71(d, $J = 6.0$ Hz, 1H),

8.50(s,1H),8.34(d, $J=8.9$ Hz,1H),7.99(m,1H),7.82~7.80(m,2H),7.74~7.70(m,1H),7.57~7.55(m,1H),7.45~7.41(m,3H),6.15(d, $J=4.9$ Hz,1H),4.74(ddd, $J=8.7,8.7,8.7$ Hz,1H),4.65(dd, $J=4.9,4.9$ Hz,1H),4.48(dd, $J=4.9,4.9$ Hz,1H),4.35~4.33(m,1H),4.19~4.16(m,1H),4.12~4.08(m,2H),3.95~3.90(m,2H),3.80~3.78(m,1H),2.22~2.15(m,2H),1.86~1.80(m,1H);¹³C NMR(D₂O,100.6 MHz), δ :164.5,146.4,144.8,144.2,142.0,133.2,132.9,129.8,129.4,128.5,128.0,127.6,127.2,126.5,126.1,125.6,124.6,122.9,92.2,84.3(d, $J=9.2$ Hz),76.9,75.4,75.0,71.8,70.6,66.5,65.5,43.0(d, $J=7.9$ Hz),28.1;³¹P NMR(D₂O,162 MHz), δ : -11.2(d, $J=20.4$ Hz),-10.8(d, $J=20.4$ Hz);HRMS(ESI)计算值(C₂₉H₃₂N₅O₁₃P₂)⁻ requires m/z 720.1477,实测值 m/z 720.1459。

C-3的合成:产率为36.0%。¹H NMR(D₂O,400 MHz), δ :9.26(s,1H),9.04(d, $J=6.2$ Hz,1H),8.82(d, $J=8.1$ Hz,1H),8.13(dd, $J=6.2,8.1$ Hz,1H),7.86(d, $J=6.4$ Hz,1H),5.71(d, $J=3.9$ Hz,1H),4.97(ddd, $J=9.4,9.4,9.4$ Hz,1H),4.38(dd, $J=5.6,9.4$ Hz,1H),4.16~4.00(m,7H),3.99~3.89(m,1H),2.60(ddd, $J=9.4,9.4,13.3$ Hz,1H),2.32~2.30(m,1H),2.05~2.02(m,1H);¹³C NMR(D₂O,100.6 MHz), δ :165.4,158.2(d, $J=14.9$ Hz),155.6,145.5,145.0,142.9,138.6(d, $J=243.4$ Hz),133.9,128.7,125.7(d, $J=32.9$ Hz),89.6,82.6(d, $J=8.5$ Hz),76.8,75.7,74.1,71.9,69.1,66.6,64.7,43.1(d, $J=8.0$ Hz),28.8;³¹P NMR(D₂O,162 MHz), δ : -10.5(d, $J=19.4$ Hz),-11.0(d, $J=19.4$ Hz);¹⁹F NMR(D₂O,376.5 MHz), δ : -161.7;HRMS(ESI)计算值(C₂₁H₂₇FN₅O₁₄P₂)⁻ requires m/z 654.1019,实测值 m/z 654.1009。

1.2.2 电化学实验 本实验中循环伏安法实验条件如下:饱和甘汞电极(CHI 150)为参比电极,Pt电极(CHI 115)为辅助(对)电极,玻碳电极(CHI 104, $\phi=3$ mm)为工作电极。为保证实验的准确性和可重复性,电极预处理如下:将电极用蒸馏水洗涤,分别用0.3和0.05 μm 氧化铝粉末抛光,超声清洗1 min,蒸馏水清洗,后在0.5 M 硫酸中以-1.0~1.0 V扫描,循环40次,在0.2 mol/L KCl中,扫描1 mmol/L K₃Fe(CN)₆,峰电位差低于80 mV,完成电极活化。

CHI 600C型电化学工作站参数:扫描速度100 mV/s,扫描范围(方向)-0.6~-1.4 V,循环次数为4次,取样间隔为0.01 V,静止时间为2 s,灵敏度为10⁻⁵ A/V。在N₂气保护下,测定温度为298 K,将类似物溶解在5 mL(浓度为0.5 mmol/L)电解液中,反复充N₂气除去电解槽内的O₂气,扫描方向为-1.4~-0.6 V,得氧化峰曲线,然后再从-0.6~-1.4 V,得到还原曲线,得出化合物在该实验条件下的氧化还原峰电位。

2 结果与讨论

2.1 NAD⁺类似物稳定性

辅酶稳定性是限制NAD⁺利用的一个重要因素,为了考察合成的NAD⁺类似物(C-1、C-2、C-3)的稳定性,将NAD⁺类似物80℃加热24 h,测定其氢谱,以NAD⁺为对照。NAD⁺在80℃加热24 h与未加热前相比¹H NMR中 δ 9.4处比例降低, δ 6.1左右一个峰消失,同时在 δ 5.1和 δ 5.2出现两个新的峰,说明与烟碱环相连的糖苷键断裂被羟基取代,水解后与羟基相连的氢化学位移向高场移动,同时由于水解后存在顺反异构体,所以在 δ 5.1和 δ 5.2出现两个新峰(图2)。NAD⁺类似物(C-1、C-2、C-3)在相同的条件下¹H NMR没有变化,保持稳定。这是由于把五元糖环上的氧原子换成了碳原子,糖苷键消失增强了其稳定性。

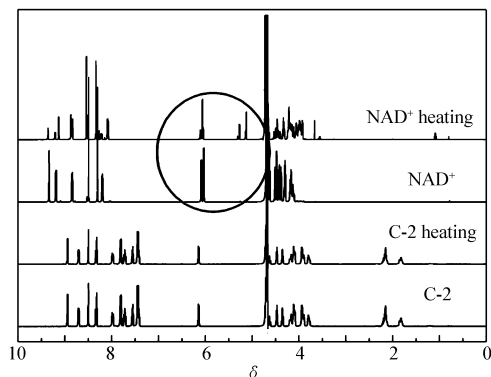


图2 NAD⁺及其类似物稳定性

Fig.2 The stability of NAD⁺ and NAD⁺ analogs

2.2 电化学性质

辅酶稳定性是限制 NAD⁺ 利用的一个重要因素,合成的 NAD⁺ 类似物(C-1、C-2、C-3)稳定性增强,保留了 NAD⁺ 分子的催化中心,为了考察其具有氧化还原活性。通过循环伏安法(Cyclic voltammetry, CV),测定类似物氧化还原电势(E_p),对其氧化还原能力进行评价,能够为催化体系的建立提供理论和实验支持。因此,有必要研究 NAD⁺ 类似物的电化学性质。

NAD⁺ 类似物 C-1 的循环伏安曲线如图 3 所示。NAD⁺ 及 NAD⁺ 类似物 C-2 和 C-3 得到相似的循环伏安曲线。在图 3 中,阴极上还原峰清晰可见,由此说明 NAD⁺ 类似物仍然具有氧化还原性。而阳极上氧化峰很弱。因此在此实验条件下,NAD⁺ 及其类似物的电极反应是不可逆过程。NAD⁺ 及其类似物峰电位如表 1。NAD⁺ 类似物的的还原电位要比 NAD⁺ 负 80 mV,说明还原 NAD⁺ 类似物要比 NAD 难;NAD⁺ 类似物的还原电位接近,说明改变的腺嘌呤环部分对还原电位没有影响。

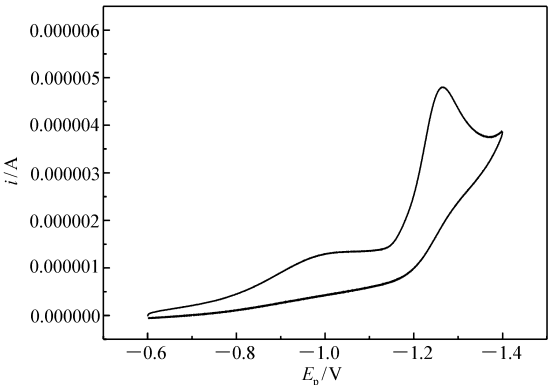


图 3 C-1 的循环伏安曲线
Fig. 3 Cyclic voltammetry of C-1

表 1 NAD⁺ 及其类似物峰电位(E_p)

Table 1 Peak potential of NAD⁺ and NAD⁺ analogs

NAD ⁺ analogs	E_p /V	NAD ⁺ analogs	E_p /V
NAD ⁺	-1.152	C-2	-1.229
C-1	-1.230	C-3	-1.231

3 结 论

本文成功合成了 3 种新型的结构比较稳定的 NAD⁺ 类似物,并通过核磁共振氢谱、碳谱和质谱进行了表征。80 ℃ 加热 24 h 后 NAD⁺ 类似物结构能够稳定存在,而天然 NAD⁺ 分子分解,表明 3 种类似物的比天然的 NAD⁺ 分子稳定;同时由于保留了氧化还原中心,仍然具有良好的氧化还原活性。

参 考 文 献

[1] Imai S. “Clocks” in the NAD World; NAD as a Metabolic Oscillator for the Regulation of Metabolism and Aging[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1804**(8):1584-1590.

[2] Huisman G W, Liang J, Krehber A. Practical Chiral Alcohol Manufacture Using Ketoreductases[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, **14**(2):122-129.

[3] Koszelewski D, Lavandera I, Clay D, et al. Formal Asymmetric Biocatalytic Reductive Amination[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2008, **47**(48):9337-9340.

[4] Liese A, Filho M V. Production of fine Chemicals Using Biocatalysis[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10**(6):595-603.

[5] Hummel W. Large-scale Applications of NAD(P)-dependent Oxidoreductases: Recent Developments [J]. *Trends Biotechnol*, 1999, **17**(6):487-492.

[6] Gaménara D, Domínguez de María P. *Candida spp.* Redox Machineries: An Ample Biocatalytic Platform for Practical Applications and Academic Insights[J]. *Biotechnol Adv*, 2009, **27**(3):278-285.

[7] Zhao K, Harshaw R, Chai X, et al. Structural Basis for Nicotinamide Cleavage and ADP-ribose Transfer by NAD⁺-dependent Sir2 Histone/Protein Deacetylases[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, **101**(23):8563-8568.

[8] Sanders B D, Zhao K, Slama J, et al. Structural Basis for Nicotinamide Inhibition and Base Exchange in Sir2 Enzymes[J]. *Mol Cell*, 2007, **25**(3):463-472.

[9] Slama J T, Simmons A M. Carbanicotinamide Adenine Dinucleotide: Synthesis and Enzymological Properties of a Carbocyclic Analog of Oxidized Nicotinamide Adenine Dinucleotide[J]. *Biochemistry*(Mosc.), 1988, **27**(1):183-193.

[10] HOU Shuhua, LIU Wujun, ZHAO Zongbao. Synthesis of Novel Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) Analogs and Their Coenzyme Activities[J]. *Chinese J Org Chem*, 2012, **32**(2):349-353 (in Chinese).

侯淑华, 刘武军, 赵宗保. 新型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)类似物的合成及其辅酶活性[J]. 有机化学, 2012, **32**

(2);349-353.

- [11] Hou S H, Ji D B, Liu W J, *et al.* Identification of Malic Enzyme Mutants Depending on 1,2,3-Triazole Moiety-Containing Nicotinamide Adenine Dinucleotide Analogs[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, **24**(5):1307-1309.
- [12] Ji D B, Wang L, Liu W J, *et al.* Synthesis of NAD Analogs to Develop Bioorthogonal Redox System[J]. *Sci China Chem*, 2013, **56**(3):296-300.
- [13] Ji D B, Wang L, Hou S H, *et al.* Creation of Bioorthogonal Redox Systems Depending on Nicotinamide Flucytosine Dinucleotide[J]. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(51):20857-20862.
- [14] Hou S H, Liu W J, Ji D B, *et al.* Synthesis of 1,2,3-Triazole Moiety-Containing NAD Analogs and Their Potential as Redox Cofactors[J]. *Tetrahedron Lett*, 2011, **52**(44):5855-5857.
- [15] HOU Shuhua, QU Zhongguo, TANG Lijun. Advances in the Synthesis of Organic Pyrophosphate[J]. *Chinese J Org Chem*, 2014, **34**(1):54-64 (in Chinese).
- 侯淑华, 曲忠国, 汤立军. 焦磷酸酯合成的研究进展[J]. *有机化学*, 2014, **34**(1):54-64.
- [16] Kam B L, Oppenheimer N J. Carbocyclic Sugar Amines; Synthesis and Stereochemistry of Racemic Alpha-Carbocyclic and Beta-Carbocyclic Ribofuranosylamine, Carbocyclic Lyxofuranosylamine, and Related Compound[J]. *J Org Chem*, 1981, **46**(16):3268-3272.
- [17] Walt D R, Findeis M A, Rios-Mercadillo V M, *et al.* An Efficient Chemical and Enzymic Synthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide[J]. *J Am Chem Soc*, 1984, **106**(1):234-239.

Synthesis and Properties of Novel Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD^+) Analogs

HOU Shuhua^{*}, QU Zhongguo, ZHONG Keli, BIAN Yanjiang, TANG Lijun
(Department of Chemistry, Bohai University, Jinzhou, Liaoning 121013, China)

Abstract Three novel stable nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) analogs were synthesized and characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR and HRMS. The NAD^+ analogs show good stability after heating at 80 $^\circ\text{C}$ for 24 h. Cyclic voltammetry (CV) measurement of the electrochemical properties of NAD^+ analogs shows that they remain good redox activities.

Keywords nicotinamide adenine dinucleotide; analogs; redox activity