



УДК 547.426.22'118'455.623.057

© 1990 г.

*Н. Г. Морозова, Ю. Г. Сачкова, И. Н. Кривойченко,
Г. А. Серебренникова, Л. В. Волкова, Р. П. Евстигнева*

СИНТЕЗ (1,2-ДИ-О-ПАЛЬМИТОИЛ-*rac*-ГЛИЦЕРО)-
(β -*D*-ГЛЮКОПИРАНОЗИЛ)ФОСФАТА

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Осуществлен стереоселективный синтез (1,2-ди-О-пальмитоил-*rac*-глицеро)-(β -*D*-глюкопиранозил)фосфата взаимодействием бензилового эфира фосфатидной кислоты с ортоэфиром или трихлорацетимидатом замещенной *D*-глюкозы с выходом 78 и 51% соответственно. Проводится сравнительная оценка двух рассматриваемых подходов в синтезе фосфатидилсахаров.

Соединения липидной природы, содержащие гликозилфосфатную связь, выделены из ряда природных источников, прежде всего из растений и микроорганизмов [1—3]. Они играют важную роль в биохимии клетки как компоненты биополимеров клеточной стенки и внутриклеточных мембран (липотейхоевые кислоты, липид А, полипренилпирофосфатсахара).

Настоящая работа посвящена синтезу углеводного аналога природных глицерофосфолипидов, содержащего в полярной «головке» вместо азотистого основания β -*D*-глюкозилный остаток и известного в литературе как фосфатидилглюкоза [4].

Ключевым моментом синтеза фосфатидилсахаров является создание β -гликозилфосфорной связи, сопряженное с рядом трудностей. К ним прежде всего относится высокая лабильность β -гликозилфосфатов, приводящая или к полному разрыву связи, или к аномеризации с образованием более устойчивых α -аномеров. Все это ограничивает выбор методов построения β -гликозилфосфорной связи.

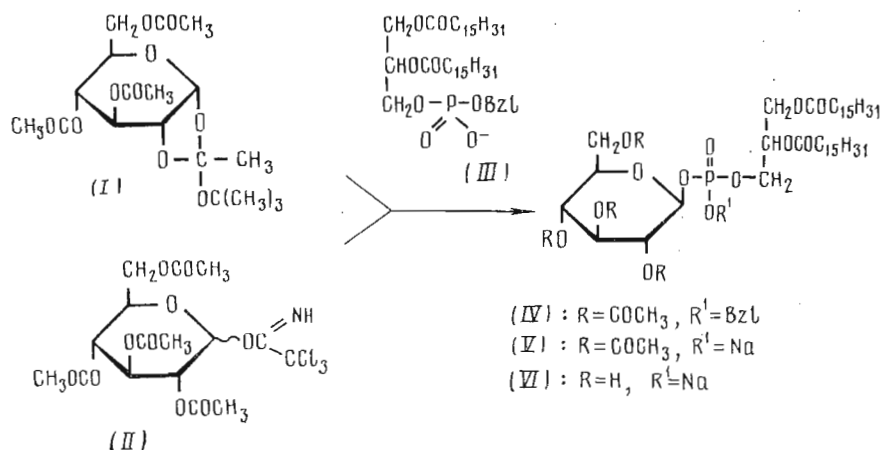
Впервые β -фосфатидилглюкоза была получена по методу «серебряных солей» на основе перацетил- или пербензилглюкозилбромидов с выходами 41% [5] и 55% [6].

Среди существующих подходов к синтезу 1,2-*транс*-гликозилфосфатов наиболее надежны разработанный нами ортоэфирный метод [7] и «трихлорацетимидатный», предложенный Шмидтом с сотр. [8]. Поэтому в целях создания препаративного синтеза β -фосфатидилглюкозы нами были изучены эти два возможных подхода.

В ортоэфирном варианте образование β -гликозилфосфорной связи достигается размыканием ортоэфира *D*-глюкозы бензилфосфатидной кислотой, в «трихлорацетимидатном» — взаимодействием бензилфосфатидной кислоты с трихлорацетимидатом *D*-глюкозы.

Глюкозилные доноры в реакциях гликозилирования бензилфосфатидной кислоты были получены известными методами: *трет*-бутилортоацетат *D*-глюкозы (I) по методу Лемье из ацетобромглюкозы [9] и трихлорацетимидат *D*-глюкозы (II) обработкой 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-*D*-глюкозы трихлорацетонитрилом в присутствии гидрида натрия [10]. Тетраацетат *D*-глюкозы легко образуется из соответствующего пентаацетилового эфира [11]. Бензилфосфатидная кислота (III) была получена по описанной схеме [12].

Взаимодействие бензилфосфатидной кислоты (III) с *трет*-бутилортоацетатом *D*-глюкозы (I) протекает в среде безводного бензола при 10% избытке липидной составляющей. Уже через 10 мин ТСХ указала на появ-



ление в реакционной массе нового фосфорсодержащего соединения. Полное исчезновение ортоэфира (I) было достигнуто за 45—60 мин. Затем реакционную массу пропускали через слой окиси алюминия для удаления избытка бензилфосфатидной кислоты и триэфир (IV) без выделения (ввиду высокой лабильности) сразу же переводили в натриевую соль (V) при помощи анионного дебензилирования. Выход соединения (V) на исходный ортоэфир (I) составил 78%.

Небольшая величина угла оптического вращения $[\alpha]_D^{20} + 10,6^\circ$ (с 1, CHCl₃) указывает на преимущественное образование β-аномера, что согласуется с литературными данными [5].

Для подтверждения предполагаемой конфигурации аномерного центра в соединении (V) использовалась ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопия. В ¹H-ЯМР-спектре наблюдается сигнал аномерного протона в виде триплета при δ 5,11 м. д. Расщепление сигнала на триплет обусловлено прямым спин-спиновым взаимодействием протона H-1 с ядром фосфора. Величина константы спин-спинового взаимодействия ($J_{1,2} = J_{1,\nu} = 7,25$ Гц) свидетельствует о β-конфигурации аномерного центра. В ¹³C-ЯМР-спектре соединения (V) обнаружен один сигнал атома углерода при аномерном центре (δ 95,26 м. д.), что подтверждает присутствие лишь одного аномера.

Гликозилирование бензилфосфатидной кислоты (III) действием трихлорацетимидата D-глюкозы (II) проводилось в сухом дихлорметане при соотношении реагентов (II) : (III) 1 : 1,1 и температуре 18—20° С и завершилось за 90 мин. После удаления избытка бензилфосфатидной кислоты, как указано выше, и дебензилирования продукта реакции (IV) Na-соль (V) была получена с выходом 51% на исходный имидат (II). Сравнение кривых дисперсии оптического вращения, ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектров, температур плавления образцов соединения (V), полученных различными методами, указало на их полную идентичность.

Деацетилирование натриевой соли перацетата β-D-фосфатидилглюкозы (V) проводилось нами в двух вариантах: 1) действием гидразингидрата в метаноле при кипении; 2) действием буфера гидразингидрат — уксусная кислота при pH 9,7 и 18—20° С.

Щелочной гидролиз действием гидразингидрата в кипящем метаноле — это традиционный метод деацетилирования нейтральных и фосфорсодержащих гликолипидов. Контроль за ходом реакции с помощью ТСХ показал, что уже через 15 мин появляется ряд новых фосфорсодержащих веществ. Спустя 30 мин, по данным ТСХ, в реакционной массе содержится в основном ожидаемое соединение и незначительное количество побочных, являющихся продуктами как неполного деацетилирования, так и частичного омыления остатков пальмитиновой кислоты. После хроматографической очистки на колонке с силикагелем выход соединения (VI) составил 60%.

Деацетилирование под действием буфера дает сходную картину распределения пятен, однако содержание целевого продукта несколько ниже.

Необходимо отметить, что полученная Na-соль фосфатидилглюкозы (VI) достаточно лабильное соединение, которое следует хранить в холодильнике при -5°C .

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР снимали на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker WM-250 (ФРГ) с рабочей частотой на ^1H 250 МГц, на ^{13}C 62,9 МГц. Внутренний стандарт для ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров — гексаметилдисилоксан. Температуры плавления определены на приборе Voetius (ГДР). Углы оптического вращения измерены на фотоэлектрическом спектрополяриметре Perkin — Elmer, модель 241 MC (Англия). ТСХ проводили на пластинках Silufol (ЧССР) в системах растворителей бензол — этилацетат, 1 : 1 (А), хлороформ — ацетон, 8 : 1 (Б), хлороформ — метанол — NH_4OH , 65 : 18 : 1 (В), хлороформ — метанол — NH_4OH , 65 : 25 : 4 (Г). Проявляли при $\sim 350^{\circ}\text{C}$ или реактивом на фосфор — «молибденовым синим».

В работе использовали трихлорацетонитрил (Fluka) без дополнительной перегонки, цианид ртути (Merck), бромид ртути (Aldrich), эфират трехфтористого бора (СССР) перед употреблением перегоняли над натрием, гидрид натрия (60% суспензия в минеральном масле) фирмы Aldrich перед употреблением промывали сухим гексаном, гидразингидрат (СССР) — без дополнительной перегонки.

Вещества очищали колоночной хроматографией на силикагеле L40/100 мкм (ЧССР).

О-(2,3,4,6-Тetra-O-ацетил- α,β -D-глюкопиранозил)трихлорацетимидат (II) получали по методу [10] с выходом 51%, смесь аномеров, R_f 0,67 (А), 0,81 (Б), $[\alpha]_{578}^{20} + 99,2^{\circ}$ (с 1,2, хлороформ). Найдено, %: С 39,20; Н 4,30; Cl 21,49. $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{Cl}_3\text{NO}_{10}$. Вычислено, %: С 39,00; Н 4,09; Cl 21,59. По данным [10], $[\alpha]_{573}^{20} + 103^{\circ}$ (с 1,2, хлороформ).

3,4,6-Три-O-ацетил-1,2-трет-бутилортоацетил- α -D-глюкопираноза (I) синтезирована по известной методике [9] с выходом 62%, т. пл. 151—152° С, $[\alpha]_D^{20} + 33^{\circ}$ (с 0,5, хлороформ), R_f 0,82 (Б). По данным [9], т. пл. 152,5—154,5° С, $[\alpha]_D^{20} + 34,5^{\circ}$ (с 1,6, хлороформ).

(1,2-Ди-O-пальмитоил-гас-глицеро)бензилфосфат, Na-соль (III) получали через ряд стадий [12] исходя из соответствующего иодгидринглицерина и Ag-соли дибензилфосфата.

(1,2-Ди-O-пальмитоил-гас-глицеро)-(2,3,4,6-тетра-O-ацетил- β -D-глюкопиранозил)бензилфосфат (IV). а) *Ортоэфирный метод*. Раствор 0,52 г Na-соли (1,2-ди-O-пальмитоил-гас-глицеро)бензилфосфата (III) в смеси 20 мл сухого ацетона и 20 мл сухого хлористого метилена перемешивали при 18—20° С с ионообменной смолой Dowex 50W \times 8 (H^+). Через 60—90 мин смолу отфильтровывали, раствор упаривали на роторном испарителе при температуре не выше 40° С. Остаток растворяли в 8 мл сухого бензола, при перемешивании и 18—20° С прибавляли порциями 0,26 г трет-бутилового ортоэфира D-глюкозы (I). Спустя 40—60 мин реакционную массу пропустили через слой окиси алюминия (II степень активности по Брокману), промыли бензолом, упарили на роторном испарителе. Получили 0,58 г соединения (IV), которое без выделения вводили в следующую стадию, R_f 0,77 (Б).

б) *«трихлорацетимидатный» метод*. К раствору 0,26 г бензилфосфатидной кислоты (III), полученной из 0,26 г ее Na-соли, в 10 мл сухого хлористого метилена при перемешивании и 18—20° С добавили 0,4 г трихлорацетимидата D-глюкозы (II). Через 90—100 мин реакционную массу обрабатывали, как описано для случая «а». Получили 0,47 г соединения (IV), R_f 0,77 (Б). Вещество без дополнительной очистки использовали на следующей стадии.

(1,2-Ди-O-пальмитоил-гас-глицеро)-(2,3,4,6-тетра-O-ацетил- β -D-глюкопиранозил)фосфат, Na-соль (V). Раствор 0,54 г (1,2-ди-O-пальмитоил-гас-глицеро)-(2,3,4,6-тетра-O-ацетил- β -D-глюкопиранозил)бензилфосфата (IV) в 5 мл сухого ацетона кипятили с 0,1 г прокаленного иодистого натрия в течение 1,5—2 ч. Реакционную массу выдерживали ночь в холо-

дильнике, осадок отфильтровывали, промывали холодным ацетоном, сушили над Na_2SO_4 . Выход 0,47 г (78% на ортоэфир (I), 51% на имидат (II)), т. пл. 173—176° С, $[\alpha]_D^{20} +10,6^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0,86 (Г). Найдено, %: С 58,90; Н 8,66; Р 3,08. $\text{C}_{49}\text{H}_{86}\text{NaO}_{17}$ Р. Вычислено, %: С 58,79; Н 8,66; Р 3,09. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): 0,82 (6H, т, 2 CH_3), 1,25 (48H, с, CH_2), 1,92; 1,94; 1,96; 2,00 (12H, 4с, 4 COCH_3), 5,11 (дд, Н1 глюкозы, $J_{1,2} = J_{1,P} = 7,25$ Гц). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): 95,259 (С1 глюкозы).

(1,2-Ди-О-пальмитоил-гас-глицеро)(β -D-глюкопиранозил)фосфат, Na-соль (VI). К раствору 0,1 г соединения (V) в 5 мл метанола прибавили 0,05 мл гидразингидрата и кипятили 0,5 ч. Охлажденную реакционную массу нейтрализовали 85% муравьиной кислотой и выдерживали в холодильнике 10—15 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали холодным метанолом. Вещество очищали колоночной хроматографией на силикагеле L 40/100 мкм, элюируя смесью хлороформ — метанол, 4 : 1. Выход 0,05 г (60%), т. пл. 152—158° С, $[\alpha]_D^{20} +4,9^\circ$ (с 9, хлороформ — метанол; 2 : 1), R_f 0,31 (В), 0,81 (Г). Найдено, %: С 59,08; Н 9,65; Р 3,89, $\text{C}_{41}\text{H}_{78}\text{NaO}_{13}$ Р. Вычислено, %: С 59,11; Н 9,44; Р 3,72.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шибеев В. Н. // Успехи биол. химии. 1976. Т. 17. С. 187—216.
2. Shockman G. D. // Chemistry and biological activities of bacterial surface amphiphiles / Eds Shockman G. D., Wicken A. J. Acad. Press, 1981. P. 21—40.
3. Fischer W. // Chemistry and biological activities of bacterial surface amphiphiles / Eds Shockman G. D., Wicken A. J. Acad. Press, 1981. P. 201—228.
4. Henrikson C. V. // J. Lipid Res. 1965. V. 6. P. 106—111.
5. Vercheiy H. M., Smith P. F., Bensen P. P. M., van Deenen L. L. M. // Biochim. et biophys. acta. 1970. V. 218. P. 97—101.
6. Волкова Л. В., Лучинская М. Г., Каримова Н. М., Евстигнеева Р. П. // Журн. общей химии. 1972. Т. 42. Вып. 2. С. 1405—1408.
7. Volkova L. V., Danilov L. L., Evstigneeva R. P. // Carbohydr. Res. 1974. V. 32, P. 165—166.
8. Schmidt R. R., Stumpp M. // Liebigs Ann. Chem. 1984. № 4. S. 680—691.
9. Lemieux R. U., Morgan A. R. // Can. J. Chem. 1965. V. 43. P. 2199—2204.
10. Schmidt R. R., Stumpp M. // Liebigs Ann. Chem. 1983. № 7. S. 1249—1256.
11. Практикум по химии углеводов / Ред. Жданов Ю. А. М.: Высшая школа, 1973. С. 62, 80.
12. Hessel L. W., Horton L. D., Todd D. R., Verkade P. E. // Rec. trav. chim. 1954. V. 73. № 2. P. 150—156.

Поступила в редакцию
10.V.1989

N. G. MOROSOVA, U. G. SACHKOVA, I. N. KRIVOICHENKO, G. A. SEREBRENNIKOVA,
L. V. VOLKOVA, R. P. EVSTIGNEEVA

SYNTHESIS OF (1,2-DI-O-PALMITOYL-*rac*-GLYCERO)-(β -D-GLUCOPYRANOSYL)PHOSPHATE

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

A stereoselective synthesis of β -phosphatidylglucose based on glycosylation of benzylphosphatidic acid using D-glucose trichloroacetimidate' or 3, 4, 6-tri-O-acetyl- α -D-glucopyranose 1, 2-(*tert*-butyl orthoacetate) is described. Two different methods of the β -phosphatidylglucose synthesis have been investigated.