



УДК 547.952/953.057

© 1994 А. Ю. Замятина, В. И. Швец

РАЗДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ДИАСТЕРЕОМЕРОВ
ПО ФОСФОРУ (N,N-ДИИЗОПРОПИЛАМИДО)-2-ЦИАНОЭТИЛФОСФИТА
D-ЭРИТРО-3-БЕНЗОИЛЦЕРАМИДА

Московская академия тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Ключевые слова: сфинголипиды, синтез, фосфиттриэфирный метод; амидофосфит 3-бензоилцерамида, диастереомеры по фосфору; ЯМР, компьютерная оптимизация геометрии молекул.

Диастереомеры по фосфору (N,N-диизопропиламидо)-2-цианоэтилфосфита *D-эритро-3-бензоилцерамида*, являющиеся промежуточными соединениями в синтезе сфингофосфолипидов фосфиттриэфирным методом, разделены колоночной хроматографией. Путем оценки энергетически выгодных конформаций молекул диастереомеров по фосфору и анализа различий в их ^1H -ЯМР-спектрах осуществлено предварительное ориентировочное отнесение абсолютной конфигурации хирального фосфорного центра.

Известная для фосфолипаз субстратная специфичность к хиральному фосфорному центру [1—4] делает актуальным использование изомерно чистых аналогов по фосфору биологически активных фосфодиэфиров для выяснения биологических функций ферментов [5—7], а также для мембранных исследований на хиральных фосфолипидных бислойных матриксах.

Одним из методов, успешно используемых для построения тиофосфодиэфирного фрагмента *P*-хиральных сфингофосфолипидов, является фосфиттриэфирный [8—11]. Установлено, что в результате тетразолкатализируемой амидофосфитной конденсации образование триэфирфосфитов (промежуточных соединений в синтезе *P*-хиральных аналогов фосфодиэфиров) происходит с эпимеризацией по фосфору [12, 13]. Последующие сульфуризация фосфита и деблокирование фосфатной части молекулы приводят к диастереомерным смесям тиофосфодиэфиров, подлежащих трудоемкому и не всегда эффективному хроматографическому разделению [8].

Поэтому определенный интерес представляет получение стереохимически чистых диастереомеров по фосфору на более ранних стадиях фосфиттриэфирного синтеза. Удобный метод разделения диастереомеров хиральных по фосфору промежуточных соединений составил бы реальную основу для поиска условий стереонаправленного проведения как тетразолкатализируемой амидофосфитной конденсации, так и дальнейших превращений промежуточных фосфитов в *P*-хиральные аналоги сфингофосфолипидов.

Интересно, что для диастереомерных по фосфору производных фосфористой

Использованы сокращения: St — стеароил, Sph — сфинганин, Cer — церамид, CNEt — цианоэтил.

Адрес для переписки: 117571, Москва, пр-т Вернадского, 86, Московская академия тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова.

Данные ^1H -ЯМР-спектроскопии (δ , м. д. (J , Гц)) R_p - и S_p -диастереомеров амидофосфита (I)*

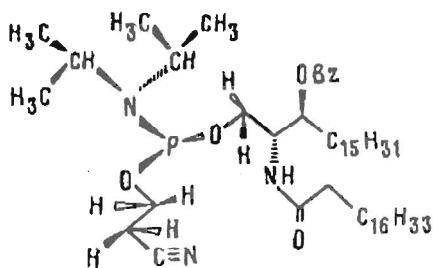
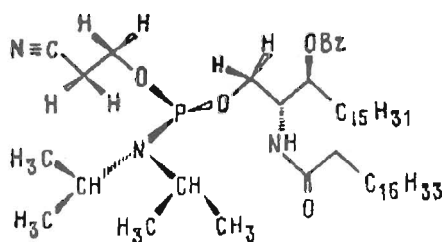
Диастереомер	CH_3 $i\text{Pr}$	CH $i\text{Pr}$	H1a Cer	H1b Cer	$-\text{CH}_2-$ CH_2-CN	NH
M (R_f 0,55)	1,06 д	3,50 м	3,71 д ($J_{1,2}$ 7)	3,73 д ($J_{1,2}$ 7)	3,80 т, 3,84 т ($J_{1,2}$ 6,5)	6,12 (J 9)
B (R_f 0,64)	1,10 т	3,45—3,65 м	3,73—3,90 м	3,45—3,65 м	3,77—3,90 м	6,16 (J 9)

Сигналы остальных протонов идентичны для обоих диастереомеров:

0,88 (т, 6H, CH_3 Sph и St), 1,32 (м, 54H, 27CH_2 Sph и St), 1,63 (м, 2H, H4' St), 1,75 (м, 2H, H4 Sph), 2,19 (т, 2H H3', St), 2,58 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 4,46 (м, 1H, H2 Sph), 5,24 (кв, 1H, H3 Sph, $J_{2,3}$ 6, $J_{3,4}$ 6,5 Гц), 7,40—8,10 (м, 5H Ph).

* TCX — в системе гексан — этилацетат — триэтиламин, 10 : 2 : 0,5.

кислоты наблюдаются большие различия в хроматографическом поведении, чем для диастереомерных соединений пятивалентного фосфора. Причем заметной разницей в подвижностях обладают только амидофосфиты с разветвленными алкильными (например, диизопропиламиновыми) группами при атоме фосфора [10] или триэфирфосфиты со стерически затрудненными (например, остаток пентазамещенного *мио*-инозита) заместителями [11]. Триэфирфосфиты слишком лабильны и поэтому неустойчивы в условиях хроматографирования. Наиболее подходящими объектами для препаративного хроматографического разделения оказались R_p - и S_p -диастереомеры (N,N-диизопропиламидо)-2-цианоэтилфосфита *D*-эритро-3-бензоилцерамида (I), которые были выделены жидкостной колоночной хроматографией.

(R_p)(S_p)

В ^1H -ЯМР-спектрах диастереомеров по фосфору (табл. 1) были обнаружены следующие различия. У диастереомера с меньшей подвижностью (M-диастереомер) (R_f 0,55 в выбранной системе хроматографирования) резонансные сигналы метильных протонов N-изопропильной группы проявлялись в виде двух дублетов. Однако в спектре быстрее элюируемого диастереомера (B-диастереомер) (R_f 0,64) различие в химических сдвигах дублетов от диастереотопических метильных протонов N-изопропильной группы было очень мало (сигнал вырожден в триплет).

В области среднего поля (2,5—4,5 м. д.) спектра M-диастереомера отмечено наличие групп сигналов спиновых систем ABX и ABX₂ (рис. 1а). Резонансные сигналы неэквивалентных протонов (AB) метиленовой группы, расположенной между атомом кислорода и C2 церамида, спиновой системы ABX вырождены в два перекрывающихся дублета (т. е. J_{AB} равна или близка нулю) с разницей в

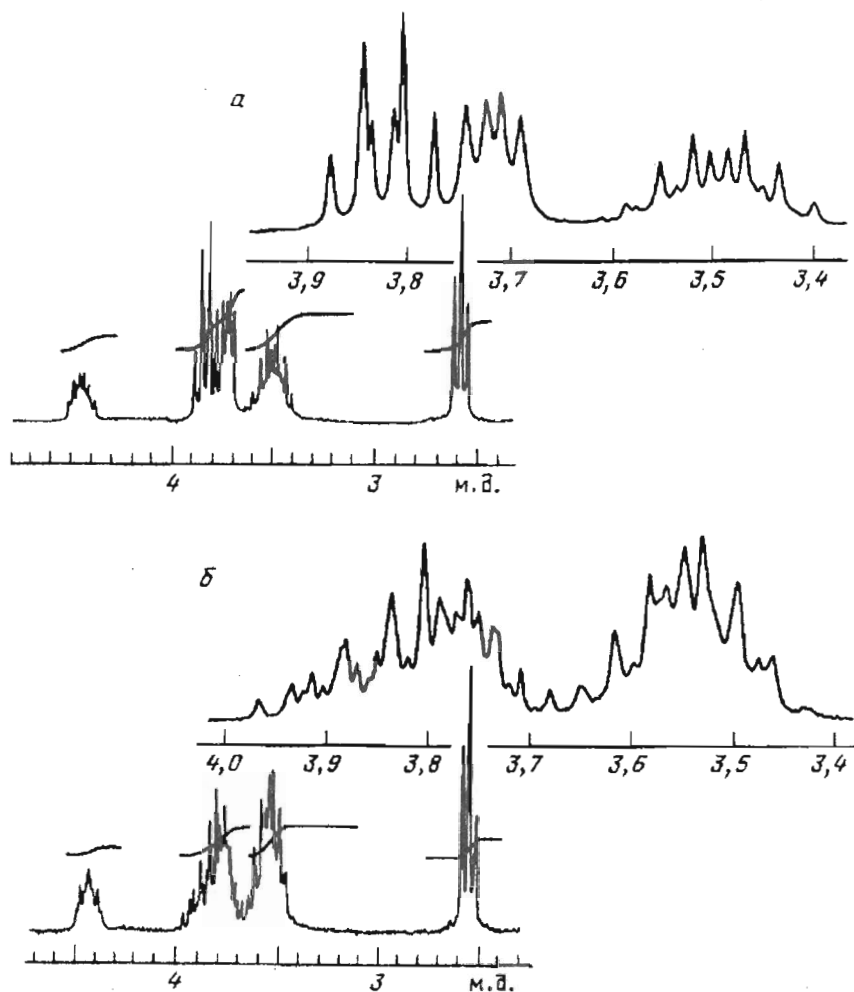


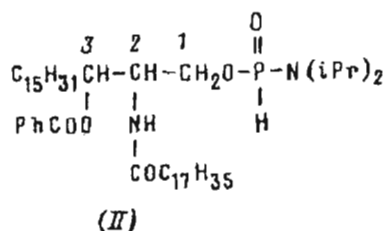
Рис. 1. Фрагменты ^1H -ЯМР-спектров диастереомеров по фосфору амидофосфита (I): диастереомер с меньшей подвижностью (а) и диастереомер с большей подвижностью (б)

химических сдвигах $\Delta\delta$ 0,02 м. д. Спектр протонов цианоэтильной группы состоит из двух перекрывающихся триплетов с $\Delta\delta$ 0,04 м. д. и триплета, т. е. представляет собой спектр спиновой системы ABX_2 .

В ^1H -ЯМР-спектре Б-диастереомера резонансные сигналы метиленовых протонов при С1 церамида спиновой системы AMX состоят из двух сложных мультиплетов, сильно различающихся химическими сдвигами ($\Delta\delta$ 0,25—0,35 м. д.), причем один из них перекрывается с сигналами протонов 1-CH_2 цианоэтильной группы, другой находится в области сигналов CH изопропильных группировок (рис. 2б). По-видимому, в данном случае вращение вокруг связей $\text{O1}_{\text{cer}}\text{—C1}_{\text{cer}}$ и $\text{C1}_{\text{cer}}\text{—C2}_{\text{cer}}$ затруднено, что приводит к большей, чем у другого диастереомера, неэквивалентности метиленовых протонов при С1 церамида.

Примечательно, что аналогичное явление различной степени эквивалентности протонов метиленовой группы, находящейся между атомом кислорода фосфитного фрагмента молекулы и С2 церамида, наблюдается у диастереомеров по фосфору (N,N-диизопропиламидо)фосфита 3-бензоилцерамида (II) (табл. 2). Разница в химических сдвигах сигналов неэквивалентных протонов при С1 церамида одного из диастереомеров (R_f 0,48) составляет 0,2 м. д., резонансные сигналы этих

Данные ^1H -ЯМР-спектроскопии диастереомеров по фосфору (N,N-диизопропиламидо)фосфита 3-бензоилцерамида (II)
 δ , м. д. (J, Гц)



Диастереомер с R_f	H1a	H1b	P-II	N-H
0,48	3,95 4д ($J_{1,2}$ 11) ($J_{\text{Ha,PH}}$ 5,5)	4,16 4д ($J_{1,2}$ 10) ($J_{\text{Hb,PH}}$ 4)	6,78 д ($^1J_{\text{P,H}}$ 632)	6,95 д (J 9)
0,64	4,0—4,20 м	4,0—4,20 м	6,85 д ($^1J_{\text{P,H}}$ 652)	7,18 д (J 9)

Сигналы остальных протонов идентичны для обоих диастереомеров: 0,87 (т, 6H, 2CH₃ Sph и St), 1,22 (м, 66H, 27CH₂ Sph и St, 4CH₃ iPr), 1,65 (м, 4H, H4 Sph, H4' St), 2,20 (т, 2H, H3' St), 3,42 (м, 2H, 2CH iPr), 4,45 (м, 1H, H2 Sph), 5,28 (кв, 1H, H3 Sph), 7,45—8,0 (м, 5H Ph).

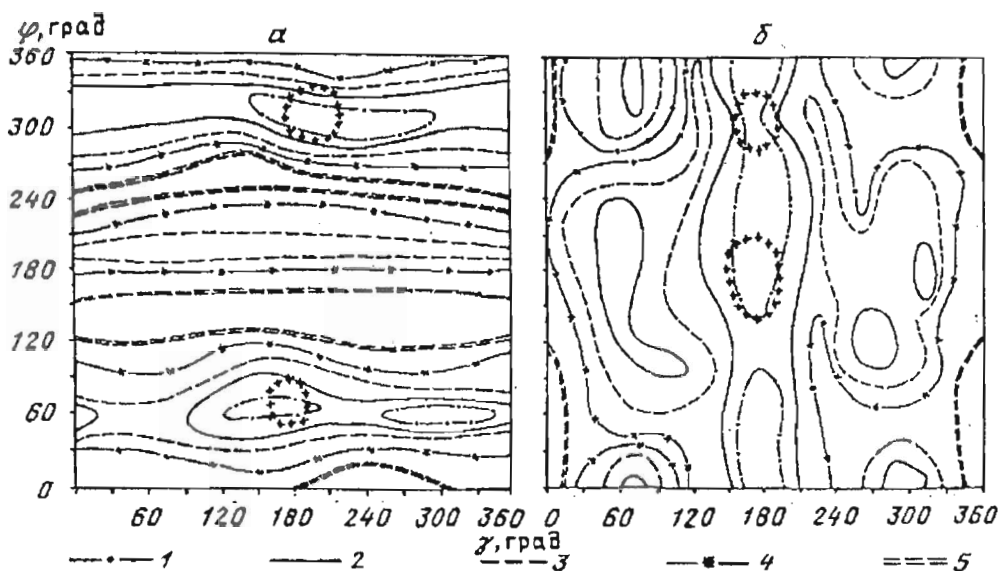
* Система для ТСХ: гексан — этилацетат, 1 : 1.

Данные ^{13}C -ЯМР-спектроскопии R_p - и S_p -диастереомеров (I)

δ , м. д. (J, Гц)	
M-диастереомер (R_f 0,55)	13,99 (2CH ₃ Sph и St), 20,42 (CH ₂ CH ₂ CN, $J_{\text{C,P}}$ 19), 22,62, 25,11, 25,67, 29,23, 29,32, 29,43, 29,66, 31,48, 31,80 (29CH ₂ Sph и St), 24,32, 24,50 (4CH ₃ iPr), 36,73 (C2, St), 42,9, 43,1 (2CH iPr), 51,50 (C2 Sph, $J_{\text{C,P}}$ 20), 58,2 (C1 CH ₂ CH ₂ CN, $J_{\text{C,P}}$ 35), 62,20 (C1 Sph, $J_{\text{C,P}}$ 60), 73,88 (C3 Sph), 117,92 (CN), 128,25, 128,82, 129,53, 132,86 (C11 Bz), 130,09 (C Bz), 165,86 (CO Bz), 172,71 (CO St)
B-диастереомер (R_f 0,64)	13,96 (2CH ₃ Sph и St), 20,40 (CH ₂ CH ₂ CN, $J_{\text{C,P}}$ 22), 22,54, 25,02, 25,61, 29,23, 29,32, 29,41, 29,55, 31,48, 31,80 (29CH ₂ Sph и St), 24,32, 24,47 (4CH ₃ iPr), 36,68 (C2 St), 42,75, 43,0 (2CH iPr), 51,27 (C2 Sph, $J_{\text{C,P}}$ 20), 58,44 (CH ₂ CH ₂ CN, $J_{\text{C,P}}$ 40), 61,48 (C1 Sph, $J_{\text{C,P}}$ 65), 72,97 (C3 Sph), 118,14 (CN), 128,04, 128,25, 128,83, 132,86 (C11 Bz), 130,09 (C Bz), 165,77 (CO Bz), 172,60 (CO St)

протонов другого диастереомера (R_f 0,64) химическими сдвигами практически не отличаются ($\Delta\delta$ менее 0,02 м. д.). Интересно, что спектр неэквивалентных метиленовых протонов при C1 церамида спиновой системы AMX состоит из 16 линий (по 8 для каждого протона), вероятно, вследствие спин-спинового взаимодействия между метиленовыми атомами водорода и фосфонатным протоном.

В ^{13}C -ЯМР-спектрах диастереомеров по фосфору амидофосфита (I) сигналы углеродов C1, C2, C3 церамида и CH изопропильных групп M-диастереомера



Обозначение линии уровня энергии	Энергия, ккал/моль	
	S_p -	R_p -
1	20,0—26,0	13,5—14,5
2	26,1—30,0	14,6—16,0
3	30,1—35,0	16,1—20,0
4	35,1—40,0	20,1—25,0
5	и выше	и выше

Рис. 2. Контурные карты конформационной энергии $E = f(\gamma, \varphi)$ молекул R_p - (а) и S_p -диастереомера (б) (N,N-диизопропиламино)-2-цианоэтилфосфита D-эритро-3-бензоилцерамида (I) как функции двугранных углов γ (P—O1_{Cer}—C1—C2) и φ (O1_{Cer}—C1—C2—C3). В отмеченных крестиками областях углов γ и φ молекулы принимают конформации с наиболее энергетически выгодной геометрией

смещены в более слабое поле, причем самая большая разница в химических сдвигах наблюдается у С3 церамида и составляет 0,9 м. д. (табл. 3).

Итак, на основе изучения ¹H-ЯМР-спектров R_p - и S_p -диастереомеров (N,N-диизопропиламино)-2-цианоэтилфосфита D-эритро-3-бензоилцерамида (I) было сделано предположение, что причиной неодинаковой хроматографической подвижности диастереомеров является различие пространственной организации фосфитного фрагмента молекул. Вероятно, в силу особенностей пространственного расположения защитные группы у атома фосфора (N-изопропильная и цианоэтильная) и церамидная часть молекулы R_p -диастереомера стерически сближены и претерпевают, по-видимому, более сильное взаимное влияние, в то время как те же группы S_p -диастереомера испытывают меньшее возмущение со стороны церамидной части молекулы.

Для R_p - и S_p -диастереомеров амидофосфита (I) были построены компьютерные изображения и оптимизированы геометрии молекул по отношению к энергии путем расчета на IBM PC с использованием методов молекулярной механики (ММ) [14, 15], молекулярной динамики (МД) [16, 17] и конформационного

Таблица 4

Расчетные данные оптимизации геометрии молекулы S_p -диастереомера амидофосфита (I) по отношению к энергии

γ	φ	Энергия, ккал/моль	Дипольный момент, Д	Площадь поверхности, Å^2	
				неполярной	полярной
182	186	20,3	18,9	560	77
172	192	20,9	17,2	665	82
177	196	23,6	19,7	679	79
183	173	25,4	26,2	669	84
187	312	25,9	21,7	672	74
178	303	27,5	17,7	670	75

Таблица 5

Расчетные данные оптимизации геометрии молекулы R_p -диастереомера амидофосфита (I) по отношению к энергии

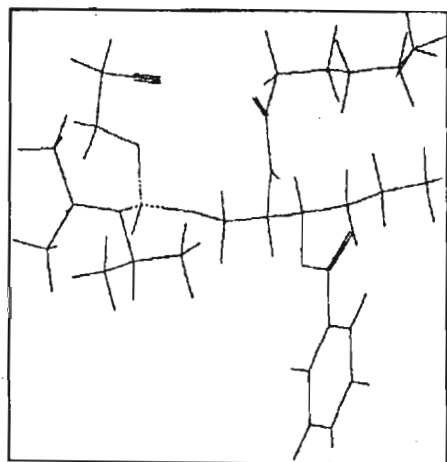
γ	φ	Энергия, ккал/моль	Дипольный момент, Д	Площадь поверхности, Å^2	
				неполярной	полярной
182	57	13,7	12,5	633	70
200	316	13,7	15,3	660	71
215	318	14,1	12,6	647	68
190	321	14,3	16,5	654	71

анализа (КА) [18]. Анализ ^1H -ЯМР-спектров диастереомеров дает основания полагать, что способность вращения вокруг связей $\text{O1}_{\text{Cer}}-\text{C1}_{\text{Cer}}$ и $\text{C1}_{\text{Cer}}-\text{C2}_{\text{Cer}}$, которой Б-диастереомер обладает, по-видимому, в меньшей степени, является решающей для геометрии молекул. Поэтому с помощью драйвера двугранных углов были получены контурные карты энергии молекул R_p - и S_p -диастереомеров (I) как функции двугранных углов $\gamma(\text{P}-\text{O1}_{\text{Cer}}-\text{C1}-\text{C2})$ и $\varphi(\text{O1}_{\text{Cer}}-\text{C1}-\text{C2}-\text{C3})$ (рис. 2).

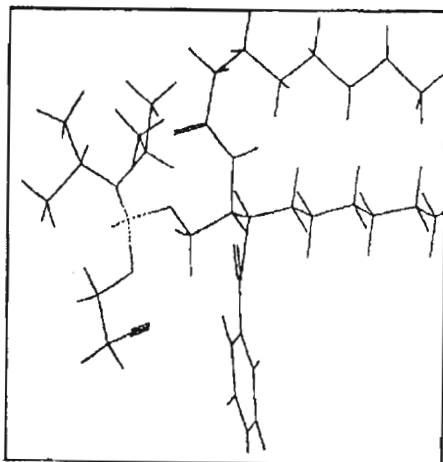
Оказалось, что молекула S_p -диастереомера может принимать конформации, геометрия которых близка к оптимальной, в узком интервале значений двугрannого угла $\gamma = 170-190^\circ$ и довольно широком диапазоне для двугрannого угла $\varphi = 0-70$ и $130-360^\circ$, причем вращению вокруг связи $\text{C1}_{\text{Cer}}-\text{C2}_{\text{Cer}}$ (при котором изменяется двугранный угол φ) при постоянных значениях угла $\gamma = 170-190^\circ$ не препятствуют существенные энергетические барьеры.

Наиболее энергетически выгодные конформации молекулы R_p -диастереомера должны реализовываться лишь при некоторых определенных наборах значений углов φ и γ : в интервале $300-330$ и $50-70^\circ$ для угла φ и интервале $150-200^\circ$ для двугрannого угла γ . Вращение вокруг связи $\text{C1}_{\text{Cer}}-\text{C2}_{\text{Cer}}$, судя по контурной карте $E = f(\gamma, \varphi)$, должно быть энергетически невыгодным.

Далее геометрии конформеров каждого из диастереомеров со значениями углов φ и γ , выбранными на основании контурных карт равномерн. из областей с меньшей конформационной энергией, были оптимизированы по отношению к энергии с использованием методов ММ и МД. В результате расчетов (табл. 4, 5) все минимизируемые молекулы приобрели энергетически выгодные конформации со значениями углов φ и γ , попадающими в области с меньшей структурной энергией: на контурных картах $E = f(\varphi, \gamma)$; однако полученные значения φ и γ ,

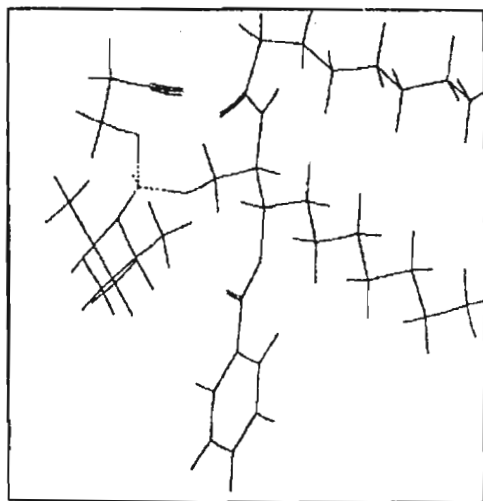


$$\gamma = 172^\circ, \varphi = 192^\circ$$

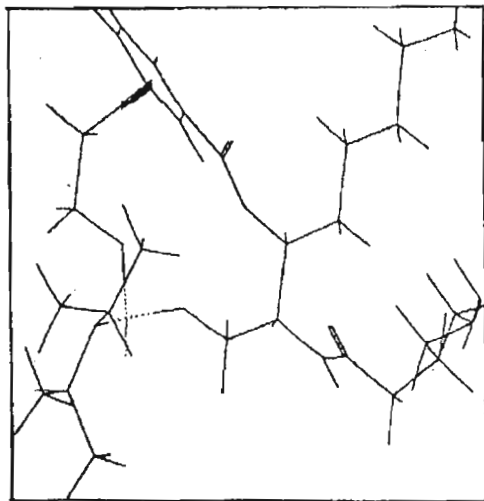


$$\gamma = 178^\circ, \varphi = 303^\circ$$

Рис. 3. Компьютерные изображения энергетически выгодных конформаций молекулы S_p -диастереомера (N,N-диизопропиламино)-2-цианоэтилфосфита *D*-эритро-3-бензоилцерамида (I)



$$\gamma = 215^\circ, \varphi = 318^\circ$$



$$\gamma = 182^\circ, \varphi = 57^\circ$$

Рис. 4. Компьютерные изображения энергетически выгодных конформаций молекулы R_p -диастереомера (N,N-диизопропиламино)-2-цианоэтилфосфита *D*-эритро-3-бензоилцерамида (I)

при которых геометрия молекул приближается к энергетически выгодной, концентрированы в узких зонах (рис. 2). С помощью эмпирической модификации уравнения Карплуса [19] для S_p -диастереомера были получены усредненные константы спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов при C1, C2 церамида и C1, C2 цианоэтильной группы, которые составили 7,7—8,4 и 7,2—8,0 Гц соответственно, что удовлетворительно согласуется с экспериментальными значениями.

Компьютерные изображения фрагмента молекул диастереомеров R_p - и S_p -конфигураций с минимальными конформационными энергиями и различными величинами двугранных углов φ и γ приведены на рис. 3 и 4.

Возможность вращения вокруг связей $O1_{Cer}-C1_{Cer}$ и $C1_{Cer}-C2_{Cer}$ определялась



Рис. 5. Изменение структурной энергии молекул R_p - (а) и S_p - (б) диастереомеров амидофосфита (I) при повороте вокруг связи $C1_{Cer}-C2_{Cer}$

также по изменению структурной энергии молекулы при различных углах поворота вокруг них. Полученные расчетные данные (рис. 5) позволяют полагать, что у R_p -диастереомера имеются меньшие возможности для вращения вокруг указанных связей по сравнению с диастереомером S_p -конфигурации, поскольку изменение углов поворота вокруг них приводит к более существенному изменению энергии молекулы R_p -диастереомера. Такой результат не противоречит энергетическим расчетам, представленным в виде контурных карт $E = f(\gamma, \varphi)$, и согласуется с экспериментальными данными 1H -ЯМР-спектроскопии, согласно которым для молекулы Б-диастереомера (по-видимому, диастереомер R_p -конфигурации) реализуются одна или несколько предпочтительных конформаций с определенным углом $\varphi(O1_{Cer}-C1-C2-C3)$ и ограниченным вращением вокруг связи $C1_{Cer}-C2_{Cer}$, что и является причиной неэквивалентности метиленовых протонов при $C1$. Для М-диастереомера вращение вокруг связи $C1_{Cer}-C2_{Cer}$ более свободно, что приводит к эквивалентности протонов при $C1$ церамида и усреднению констант спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов при $C1$ и $C2$.

При сравнении расчетных физических характеристик (табл. 4, 5) видно, что S_p -диастереомер, обладая большим по сравнению с R_p -диастереомером дипольным моментом, имеет также большую площадь полярной поверхности (расчет ведется с учетом ван-дер-ваальсовых взаимодействий). По-видимому, это определяет различия в хроматографическом поведении диастереомеров, менее подвижным из которых в выбранных нами условиях хроматографирования является диастереомер с S -конфигурацией фосфорного центра. Оценивая энергетические параметры молекул, можно предположить, что S_p -диастереомер термодинамически менее устойчив, поскольку структурная энергия его наиболее выгодных конформаций больше, чем у R_p -диастереомера.

Таким образом, на основе анализа ^1H -ЯМР-спектров и оценки энергетически выгодных конформаций молекул диастереомеров по фосфору амидофосфита 3-бензоилцерамида оказалось возможным предварительное ориентировочное отнесение абсолютной конфигурации хирального P(III)-центра.

Экспериментальная часть

Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (230—400 меш, ASTM, Merck), ТСХ — на стеклянных пластинках с силикагелем КСКГ 5/20 мкм («Ляэне Калур», Эстония). Обнаружение пятен осуществляли раствором молибдата аммония в 30% серной кислоте с последующим прокаливанием при 250° С.

Оптическое вращение измеряли в хлороформе на поляриметре Perkin-Elmer 241.

Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР получены на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker MSL-200 (ФРГ) с рабочей частотой 200 МГц в дейтерохлороформе с гексаметиладисилоксаном в качестве внешнего стандарта для ^1H -ЯМР, и с рабочей частотой 50,32 МГц в дейтерохлороформе для ^{13}C -ЯМР. Спектры ^{13}C -ЯМР записаны с широкополосным подавлением спин-спинового взаимодействия ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$, для упрощения интерпретации ^{13}C -ЯМР-спектры получены с помощью импульсной последовательности АРТ (attached proton test) так, что резонансные сигналы первичных/третичных и вторичных/четвертичных атомов углерода находятся в противофазе. Спектры ^{31}P -ЯМР записывали на спектрометре Bruker HSL-250 (ФРГ) с фурье-преобразованием на частоте 101,05 МГц в дихлорметане с широкополосным подавлением спин-спинового взаимодействия ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ (для соединений со связью P—H также и без подавления); сдвиги приведены относительно 85% орто-фосфорной кислоты (внешний стандарт).

3-Бензоил-2-стеароил-D-эритро-сфинганин-1-(N,N-диизопропиламидо)-2-цианоэтилфосфит (I), R_p - и S_p -диастереомеры. К раствору 0,5 г (0,75 ммоль) *D-эритро-3-бензоилцерамида* и 86 мг (0,5 ммоль, 0,67 экв.) диизопропиламмонийтетразолида в дихлорметане в атмосфере аргона через резиновую пробку шприцем вносили 0,476 мл (1,5 ммоль, 2,0 экв.) бис(N,N-диизопропиламидо)-2-цианоэтилфосфита [20, 21], через 2 ч реакционную массу выливали в насыщенный раствор NaHCO_3 , экстрагировали хлористым метиленом, соединенные экстракты промывали насыщенным NaCl , сушили Na_2SO_4 , упаривали, остаток хроматографировали при градиентном элюировании системами растворителей гексан — этилацетат — триэтиламин от 10 : 1 : 0,5 до 10 : 2 : 0,5. Общий выход диастереомеров по фосфору 0,6 г (93%). Т. пл. 40,5—41,5° С. М-Диастереомер — R_f 0,55, Б-диастереомер — R_f 0,64 (гексан — этилацетат — триэтиламин, 10 : 2 : 0,5). $[\alpha]_D^{20}$, град: +10,3 (М-диастереомер), +44,5 (Б-диастереомер). ^{31}P -ЯМР, δ , м. д.: 147,6 (М-диастереомер), 148,4 (Б-диастереомер).

3-Бензоил-2-стеароил-D-эритро-сфинганин-1-(N,N-диизопропиламидо)фосфит (II) (Н-фосфонатная форма), диастереомеры по фосфору

А. К раствору 0,5 г (0,72 ммоль) 3-бензоилцерамида в 2 мл CH_2Cl_2 и 0,2 мл (1,5 ммоль) триэтиламина при перемешивании в атмосфере аргона добавляли раствор 0,24 г (0,9 ммоль) бис(N,N-диизопропиламидо)хлорфосфита [22—24] в 2 мл THF. Через 1,5 ч с помощью ТСХ (R_f 0,6, гексан — триэтиламин, 20 : 1)

и ^{31}P -ЯМР (δ 123,2 м. д.) фиксировали образование 3-бензоил-2-стеароил-*D*-эритро-сфинганин-1-бис(*N,N*-диизопропиламино)фосфита, остаток гидрохлорида триэтиламина отделяли на фильтре, фильтрат упаривали, растворяли в 5 мл ТНФ, при перемешивании добавляли 2 мл 0,5 М раствора 1*H*-тетразола в ацетонитриле и 0,2 мл H_2O . Через 1 ч реакционную массу разбавляли CH_2Cl_2 , промывали водой (3×50 мл), органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , упаривали. Остаток хроматографировали в градиентной системе хлороформ — метанол от 10 : 0,2 до 10 : 1, элюируя по отдельности диастереомеры по фосфору (II). Общий выход 0,54 г (94,0%), R_f 0,48 и 0,64 (гексан — этилацетат, 1 : 1). ^{31}P -ЯМР, δ , м. д.: 17,1 ($J_{\text{P,H}}$ 630 Гц) и 14,9 ($J_{\text{P,H}}$ 650 Гц).

Б. Фосфонат (II) получали из фосфита (I) обработкой *трет*-бутиламином.

Расчеты проведены на компьютере IBM PC/AT-286 по программам ALCHEMY-II (TRIPOS Associates, St. Louis, Mo., Sigma Chemical Company, каталог 1991 г., N A 9806) и PCMODEL (SERENA Software, модифицированная версия программы MODEL — vax version 1.1, 1990). Итерационная оптимизация геометрии молекул проводилась по методу сопряженного силового поля с использованием сопряженно-градиентного алгоритма. Так как по условиям программы PCMODEL молекула может состоять не более чем из 128 атомов, количество атомов в молекулах диастереомеров по фосфору амидофосфита (I) было сокращено до 121 за счет укорачивания алкильных радикалов.

В основе использованных программ лежат методы молекулярной механики (ММ). Энергия молекулы в основном электронном состоянии представляет собой функцию ее ядерных координат (или положения ядер) и описывается в ММ многомерной поверхностью потенциальной энергии [14, 15]. ММ использует для данной поверхности эмпирически выведенную систему уравнений. Эта система потенциальных функций, называемая силовым полем, содержит некоторые варьируемые параметры, численное значение которых выбирается оптимальным образом так, чтобы получить наилучшее согласие рассчитанных и экспериментальных характеристик молекулы (таких, как геометрическое строение, конформационные энергии, теплоты образования). Метод использует общее допущение о возможности переноса соответствующих параметров и силовых постоянных из одной молекулы в другую (для родственных соединений). Энергия молекулы в силовом поле приближенно представлена как сумма энергетических вкладов от: энергий растяжения связи и угловой деформации, торсионной энергии, энергии невалентных (ван-дер-ваальсовых, электростатических) взаимодействий и водородных связей. Минимизация энергии по методу ММ заключается в итерационной оптимизации геометрии первоначально заданной конформации молекулы. Параметры, определяющие геометрию системы, изменяются до тех пор, пока общая структурная энергия не достигнет первого локального минимума.

При расчете использованы также методы молекулярной динамики (МД), позволяющие моделировать мгновенные (1—100 пс) подвижки всей системы, причем каждый атом при этом принимается за частицу,двигающуюся в соответствии с ньютоновским уравнением движения. МД позволяет преодолевать небольшие энергетические барьеры, высота которых зависит от прикладываемой в период динамического моделирования температуры. Таким образом, последовательное применение методов ММ и МД (т. е. за первоначальной минимизацией энергии следует период динамического воздействия, затем вновь минимизация и т. д.) более эффективно для достижения глубокого локального минимума, чем простая минимизация. Для достижения глобального минимума необходимы систематический поиск и проверка всех разрешенных конформаций молекулы, заключающиеся, например, в переборе всех возможных положений вокруг вращающихся связей. Модифицированный метод Монте-Карло [18] — метод поиска торсионных углов — по-видимому, является одним из наиболее эффективных подходов для конформационного анализа (КА) небольших молекул и позволяет получать контурную карту энергии как функции двух двугранных углов. Алгоритм расчета наиболее энергетически выгодных конформаций диастереомеров по фосфору амидофосфита (I) включает применение методов ММ, МД и КА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bruzik K. S., Tsai M.-D.*//Biochemistry. 1984. V. 23. № 8. P. 1656—1661.
2. *Rosario-Jansen T., Jiang R.-T., Tsai M.-D.*//Biochemistry. 1988. V. 27. № 13. P. 4619—4624.
3. *Rosario-Jansen T., Pownal H., Jiang R.-T., Tsai M.-D.*//Bioorgan. Chem. 1990. V. 18. P. 179—184.
4. *Loffredo W. M., Tsai M. D.*//Bioorgan. Chem. 1990. V. 18. № 1. P. 78—84.
5. *Lin G., Bennett C. F., Tsai M. D.*//Biochemistry. 1990. V. 29. № 11. P. 2747—2757.
6. *Jiang R. T., Shy Y. J., Tsai M.-D.*//Biochemistry. 1984. V. 23. № 8. P. 1661—1667.
7. *Tsai M.-D., Brusik K., Hart J., Jiang R.-T., Rosario-Jansen T., Tsai T.-C., Wisner D. A.*//Mechanizms Enzym. React. Stereochem. Proc. 15th St. Symp. New York, 1986. P. 115—126.
8. *Bruzik K. S.*//J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1986. № 4. P. 329—331.
9. *Bruzik K. S.*//J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1988. № 3. P. 423—431.
10. *Франтова А. Ю., Бушнев А. С., Звонкова Е. Н., Швец В. И.*//Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 11. С. 1562—1573.
11. *Замятина А. Ю., Бушнев А. С., Степанов А. Е., Звонкова Е. Н., Швец В. И.*//Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 3. С. 347—353.
12. *Stec W. J., Zon G.*//Tetrahedron Lett. 1984. V. 25. № 46. P. 5279—5282.
13. *Stec W. J., Zon G., Uznanski B.*//J. Chromatogr. 1985. V. 326. P. 263—266.
14. *Burkert U., Allinger N.* Molecular Mechanics. Washington: Amer. Chem. Soc., 1982.
15. *Clark T.* A Handbook of Computational Chemistry. A Practical Guide to Chemical Structure and Energy Calculation. N. Y.: Wiley Intersci. Publ., 1985.
16. *Karplus M., McCammon J. A.*//Annu. Rev. Biochem. 1983. V. 52. P. 263—269.
17. *McCammon J. A., Harvey S. C.* Dynamics of Protein and Nucleic Acids. Cambridge University Press, 1987.
18. *Chang G., Still W. C., Guida W. C.*//J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. P. 4379—4385.
19. *Jaime C., Ortuno R. M., Font J.*//J. Org. Chem. 1987. V. 52. P. 3946—3951.
20. *Dreef C. E., Elie C. J. J., Hoogerhout P., van der Marel G. A., van Boom J. H.*//Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. P. 6513—6516.
21. *Elie C. J. J., Dreef C. E., Verdun R., van der Marel G. A., van Boom J. H.*//Tetrahedron. 1989. V. 45. P. 4377.
22. *Marugg J. E., Burik A., Tromp M., van der Marel G. A., van Boom J. H.*//Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 20. P. 2271—2274.
23. *Hamamoto S., Takaku H.*//Chem. Lett. 1986. № 8. P. 1401—1404.
24. *Marugg J. E., Tromp M., Kuyl-Yeheskiely E., van der Marel G. A., van Boom J. H.*//Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 23. P. 2661—2664.

Поступила в редакцию 28.IV.1993

После доработки 2.III.1994

A. Yu. Zamyatina, V. I. Shvets

**SEPARATION AND CHARACTERIZATION OF DIASTEREOMERS
AT PHOSPHORUS OF
2-STEAROYL-3-BENZOYL-*D*-ERYTHRO -SPHINGANINE
1-(N,N-DIISOPROPYLAMINO)-2-CYANOETHYLPHOSPHITE**

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

Key words: sphingolipids synthesis; phosphite-triester method; phosphoramidites of 3-benzoylceramide; diastereomers at phosphorus; NMR.

Phosphoramidites of 3-benzoylceramide diastereomeric at phosphorus have been separated by column chromatography. Absolute configurations of the chiral P(III)-centre were preliminarily assigned on the basis of ¹H-NMR spectra analysis and evaluation of the energetically advantageous conformations of the diastereomeric molecules.

Address: Department of Biotechnology, Moscow Academy of Fine Chemical Technology, Prospekt Vernadskogo, 86. 117511, Moscow.