



УДК 547.455'913.3'118.057

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ЦИТРОНЕЛЛИЛ- И ДОЛИХИЛФОСФАТОВ АЦЕТОБРОМГЛЮКОЗОЙ

© 1999 г. С. Д. Мальцев, Л. Л. Данилов, В. Н. Шibaев[#]

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 117913, Москва, ГСП-1, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 26.07.98 г.

Принята к печати 24.08.98 г.

Исследовано взаимодействие 2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- α -*D*-глюкопиранозилбромида с солями цитронеллилфосфата, долихилфосфата и цитронеллилбензилфосфата. Показано, что результат зависит от строения фосфатного реагента, в том числе природы солеобразующих катионов, и условий проведения реакции. Подобраны условия гликозилирования, позволяющие осуществить синтез цитронеллил- β -*D*-глюкопиранозилфосфата, цитронеллил- α -*D*-глюкопиранозилфосфата и долихил- β -*D*-глюкопиранозилфосфата.

Ключевые слова: цитронеллилфосфат; цитронеллилбензилфосфат; долихилфосфат; цитронеллилфосфатглюкоза; долихилфосфатглюкоза.

Полипиренилмонофосфатсахара образуются в живых организмах путем переноса углеводных остатков от нуклеозидифосфатсахаров на полипиренилфосфаты и служат важными промежуточными соединениями при сборке углеводных цепей природных гликоконъюгатов. В частности, долихил- β -*D*-глюкопиранозилфосфат является закрепленным в биологических мембранах донором остатков глюкозы при образовании *N*-связанных углеводных цепей гликопротеинов (обзор – см., например, [1]). Современные биохимические исследования требуют доступности соединений этого ряда с разной длиной полипиренильной цепи, важное значение имеет получение производных, содержащих радиоактивную метку в остатке моносахарида.

Описанные в литературе методы синтеза долихил- β -*D*-глюкопиранозилфосфата и его короткоцепного модельного аналога – цитронеллил- β -*D*-глюкопиранозилфосфата – (обзор – см. [2]) основаны на взаимодействии соответствующих спиртов с защищенными производными β -*D*-глюкопиранозилфосфата [3] или *N*-фосфоната [4] в присутствии конденсирующих агентов. На примере синтеза цитронеллил- β -*D*-глюкопиранозилфосфата была продемонстрирована возможность и другого подхода, основанного на гликозилировании цитронеллилбензилфосфата [5] или цитронеллилфосфата [6] 1,2-*O*-алкилортоацетатами глюкозы.

В рамках наших исследований по синтезу полипиренилгликозилфосфатов нами недавно был успешно осуществлен эффективный синтез долихил- β -*D*-маннопиранозилфосфата из 4,6-ди-*O*-ацетил-

2,3-*O*-карбонил- α -*D*-маннопиранозилбромида и аммониевой соли долихилфосфата в присутствии триэтиламина [7].

В настоящей работе мы исследовали возможность аналогичного подхода к синтезу долихил- β -*D*-глюкопиранозилфосфата (VIIIб) и родственных соединений путем взаимодействия 2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- α -*D*-глюкопиранозилбромида (I) с солями цитронеллилфосфата (II), цитронеллилбензилфосфата (III) и долихилфосфата (IV).

Оказалось, что гликозилирование долихилфосфата бромидом (I) в условиях, примененных в работе [7] (бензол – ацетонитрил, 2 : 1, 20°C), происходит очень медленно, и после 72 ч в реакционной смеси присутствуют только следы фосфоидиэфира. В связи с этим было проведено более детальное изучение влияния экспериментальных условий на скорость реакции, выход продуктов и стереохимический результат гликозилирования на примере взаимодействия бромида (I) и различных солей цитронеллилфосфата (II).

Были исследованы реакции с солями тетра-*n*-бутиламмония, диизопропилэтиламмония и триэтиламмония с использованием в качестве растворителей хлористого метилена, бензола и ацетонитрила. В присутствии катиона тетра-*n*-бутиламмония во всех трех растворителях, по данным ТСХ, при 20°C происходило достаточно быстрое частичное превращение бромида (I) в фосфоидиэфир (около 20 ч), после чего в реакционной смеси происходило накопление не содержащих фосфата соединений (по-видимому, продуктов разложения целевого продукта и ацетобромглюкозы). Бис(диизопропилэтиламмониевая) соль цитронеллилфосфата (II) не вступала в реакцию с бромидом (I). В случае бис(триэтиламмониевой) соли реак-

Сокращения: Cit – цитронеллил; Dol – долихил.

[#] Автор для переписки.

Таблица 1. Спектры ^1H -ЯМР фосфодиэфиров (VIб), (Vб) и (VIIIб)

Атомы	(VIб) (CD_3OD)	(Vб) ($\text{CCl}_4 - \text{CD}_3\text{OD} - \text{D}_2\text{O}$, 3 : 10 : 1)	(VIIIб) ($\text{CDCl}_3 - \text{CD}_3\text{OD} - \text{D}_2\text{O}$, 10 : 7 : 1)
Химические сдвиги			
Пренилфосфатные фрагменты (для производных цитронеллола в скобках – номер атома, см. формулу)			
CH_2O	m^* (H1)	3.90м (H1)	3.92м
$-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-$	1.73м (H2), 1.05–1.51м (H3, H4)	1.05–1.50м (H2, H3, H4)	1.00–1.50м
$\text{CH}_2-\text{C}=\text{}$	2.02м (H5)	1.92м (H5)	2.00м
$\text{HC}=\text{}$	5.13м (H6)	5.03м (H6)	5.06м
$\text{CH}_3-\text{C}=\text{}$	1.69с (H8), 1.62с (H7 ¹)	1.61с (H8), 1.53с (H7 ¹)	1.65с (<i>цис</i> -), 1.56с (<i>транс</i> -)
CH_3-CH	0.95д ^{2*} (H3 ¹)	0.87д ^{2*} (H3 ¹)	0.87д ^{2*}
Glc			
H1'	5.51дд	4.80дд	4.82дд
H2'	3.43ддд	3.19 ^{3*}	m^{4*}
H3'	3.71дд	3.36дд	3.40дд
H4'	3.37дд	3.24 ^{3*}	m^{4*}
H5'	m^*	3.34ддд	3.38ддд
H6a'	3.84дд	3.81дд	3.84дд
H6b'	3.72дд	3.60дд	3.62дд
КССВ первого порядка (J , Гц)			
$J_{1', 2'}$	3.5	7.2	7.5
$J_{1', \text{p}}$	7.0	7.2	7.5
$J_{2', 3'}$	9.7	9.0	9.0
$J_{2', \text{p}}$	2.2	–	–
$J_{3', 4'}$	9.2	9.0	9.0
$J_{4', 5'}$	9.0	9.0	9.0
$J_{5', 6a'}$	2.5	12.0	12.0
$J_{5', 6b'}$	6.3	5.8	5.8
$J_{6a', 6b'}$	12.0	12.0	12.0

* В составе мультиплета 3.90–4.03.

2* J 6.2.3* Частично перекрыты сигналом H-содержащей примеси в CD_3OD .4* В составе мультиплета 3.15–3.32, частично перекрыты сигналом H-содержащей примеси в CD_3OD .

ция при комнатной температуре протекала медленно (несколько недель) и помимо образования фосфодиэфира наблюдалось накопление заметного количества фосфорсодержащего продукта со значительно большей хроматографической подвижностью, вероятно, бис(глюкозил)цитронеллилфосфата.

Было обнаружено, что большей эффективности реакции способствует прибавление к реакционной смеси прокаленных порошкообразных молекулярных сит 3 Å; несколько увеличивает скорость реакции введение в исходную реакционную смесь дополнительного количества безводного триэтиламина. Наиболее удачным оказалось применение смешанной соли цитронеллилфосфата (II) с триэтиламином и диизопропилэтиламином – в этом случае реакция протекала с минимальным образованием побочных продуктов.

Повышение температуры реакционной смеси до 37°C приводило к увеличению скорости реакции: взаимодействие смешанной соли цитронеллилфосфата (II) с бромидом (I) в бензоле заканчивалось за 120 ч. Продукт реакции был выделен анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе. Удаление ацетильных групп действием водного раствора гидроксида натрия и очистка с помощью гель-проникающей хроматографии на сорбенте TSK-40S дали целевое соединение с выходом 37% в виде смеси (9 : 1) β - и α -аномеров [(Vб) и (VIб), по данным ^1H - и ^{13}C -ЯМР (см. табл. 1 и 2) и по соотношению интегральных интенсивностей сигналов H1' с химическими сдвигами 4.86 и 5.52 м.д. в спектре ^1H -ЯМР]. О характерных различиях в спектрах ^1H - и ^{13}C -ЯМР α - и β -аномеров глюкозилфосфатов для сопоставления с полученными нами данными см. [8].

Таблица 2. Спектры ^{13}C -ЯМР фосфодиэфиров (VIб), (Vб) и (VIIIб)

Атомы	(VIб) (CD_3OD)	(Vб) ($\text{CCl}_4 - \text{CD}_3\text{OD} - \text{D}_2\text{O}$, 3 : 10 : 1)	(VIIIб) ($\text{CDCl}_3 - \text{CD}_3\text{OD} - \text{D}_2\text{O}$, 10 : 7 : 1)
Химические сдвиги; в квадратных скобках – КССВ [$J_{\text{C}, \text{P}}$]			
Пренилфосфатные фрагменты (для производных цитронеллола в скобках – номер атома, см. формулу)			
$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$	65.3д [5.2] (C1)	65.8д [5.0] (C1)	65.3д*
$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{O}$	38.9д [7.2] (C2)	38.8д [7.2] (C2)	38.5д*
$\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$	38.4 (C3)	38.5 (C3)	30.0
$\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$	26.5 (C4)	26.6 (C4)	25.8
$-\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}=\text{}$	30.4 (C5)	30.5 (C5)	40.3, 32.9, 32.7, 30.2
$\text{HC}=\underline{\text{C}}$	125.7 (C6)	126.1 (C6)	126.1, 125.7, 125.1, 124.9
$(\text{CH}_3)_2\underline{\text{C}}=\text{}$	131.9 (C7)	132.0 (C7)	131.7 ^{2*}
$\underline{\text{C}}\text{H}_3-\text{C}=\text{(цис-)}$	25.9 (C8)	26.4 (C8)	27.4, 27.2, 27.1, 27.0, 26.1, 24.0
$\underline{\text{C}}\text{H}_3-\text{CH}$	19.8 (C3 ¹)	20.1 (C3 ¹)	19.5
$\underline{\text{C}}\text{H}_3-\text{C}=\text{(транс-)}$	17.7 (C7 ¹)	18.2 (C7 ¹)	18.5, 16.4
Glc			
C1'	96.7д [5.0]	99.2д [5.0]	98.5д*
C2'	73.7д [7.2]	75.6д [6.7]	74.9д*
C3'	74.8	77.4	76.7
C4'	71.4	71.4	70.7
C5'	74.7	78.3	77.6
C6'	62.6	62.8	62.6

* Уширенный сигнал, КССВ не определена.

^{2*} В этой области находятся также дополнительные сигналы атомов внутрипочечных $-\text{CH}_2\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)-$ групп при 135.8 и 135.5 м. д.

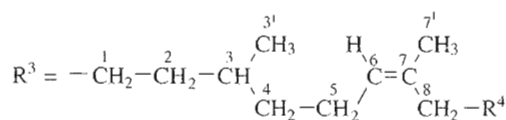
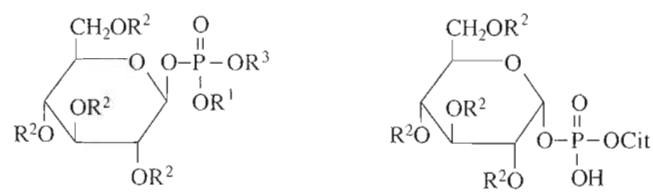
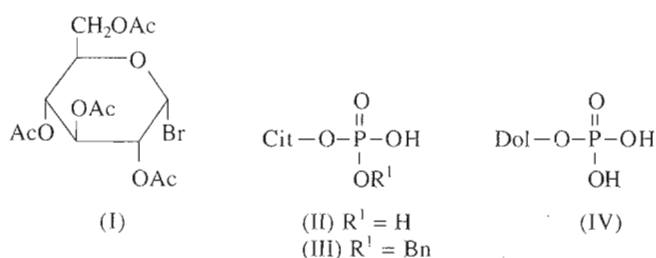
Дальнейшее повышение температуры приводило к значительному ускорению реакции (в бензоле при 80°C она завершалась за 8 ч). После выделения защищенного фосфодиэфира (VIa) колоночной хроматографией на силикагеле, дезацетилирования водным аммиаком и хроматографии на сорбенте TSK-40S с выходом 60% был получен цитронеллил- α -D-глюкопиранозилфосфат (VIб) в качестве единственного продукта. Его строение подтверждено данными спектров ЯМР (табл. 1 и 2), представляющими собой суперпозицию спектров цитронеллилфосфата и α -D-глюкопиранозилфосфата. В спектре ^1H -ЯМР этого соединения сигнал H2 цитронеллилфосфатного фрагмента наблюдается при 1.73 м.д. в отличие от β -аномера, у которого этот сигнал входит в состав мультиплета в области 1.05–1.50 м.д. и подобного слабопольного сдвига не претерпевает.

Нами было исследовано далее взаимодействие бромидов (I) с цитронеллилбензилфосфатом (III). Это производное было получено реакцией бис(тетра-*n*-бутиламмониевой) соли цитронеллилфосфата (II) с хлористым бензолом (ср. монобензилирование глюкозилфосфата [9]) с выходом 60% и охарактеризовано данными спектров ^1H - и ^{31}P -ЯМР (см. "Эксперимент. часть"). Ранее сообщалось [5] о получении этого соединения через

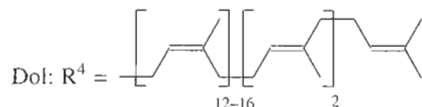
цитронеллилдибензилфосфат, однако данных ЯМР-спектров в работе приведено не было.

Взаимодействия фосфодиэфира (III) с бромидом (I) при 37°C не наблюдалось (контроль по ТСХ); образование целевого продукта эффективно происходило лишь с использованием триэтиламмониевой соли при повышенной температуре (бензол, 80°C, 8 ч). Первоначально образующийся фосфотриэфир (VII) после очистки хроматографией на силикагеле был подвергнут анионному дебензилированию действием иодистого натрия в ацетоне до диэфира (Va). После хроматографической очистки последнего и его дезацетилирования был выделен в качестве единственного продукта цитронеллил- β -D-глюкопиранозилфосфат (Vб) с общим выходом 36%. Данные спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР (табл. 1 и 2) подтверждают его строение и однозначно указывают на отсутствие заметных количеств α -аномера (VIб). Таким образом, в аналогичных условиях гликозилирование цитронеллилфосфата (II) и цитронеллилбензилфосфата (III) приводило к фосфодиэфирам различной аномерной конфигурации.

Можно предполагать, что β -аномерные производные являются первичными продуктами гликозилирования при реакции как с фосфомоноэфирами, так и с фосфодиэфирами, однако в первом случае происходит их дальнейшее превращение в



Cit: $R^4 = H$



термодинамически более устойчивые α -аномеры за счет повторного замещения при C1 остатка моносахарида. Полученные экспериментальные данные позволяют считать, что в исследуемом случае скорость нуклеофильной атаки как на стадии гликозилирования, так и при аномеризации определяется, в первую очередь, повышенной нуклеофильностью дианионов фосфомоноэфиров по сравнению с моноанионами фосфодиэфиров, а не стабильностью аниона уходящей от электрофильного центра группы. Если бы последний фактор имел более важное значение, следовало бы ожидать более быстрой аномеризации фосфотриэфира (VII) по сравнению с фосфодиэфиром (Va), чего не наблюдается в действительности.

Взаимодействие бромиды (I) с долихилфосфатом (IV) в виде смешанной соли с диизопропилэтиламинном и триэтиламинном в бензоле при 37°C может быть использовано для получения аномерно чистого долихил- β -D-глюкопиранозилфосфата (VIIIб), в отличие от реакции цитронеллилфосфата (I) в аналогичных условиях (см. выше). Полученный тетраацетат-фосфодиэфир (VIIIa), был без выделения подвергнут дезацетилированию метилатом натрия в метаноле. Образующий-

ся целевой фосфодиэфир (VIIIб) был очищен анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе с последующим отделением от остаточного долихилфосфата (IV) экстракцией метанолом, содержащим небольшое количество аммиака. После упаривания объединенных экстрактов с выходом 65% был получен долихил- β -D-глюкопиранозилфосфат (VIIIб), строение которого однозначно следовало из данных спектров 1H - и ^{13}C -ЯМР (о характерных особенностях ЯМР-спектров фосфатов полипренолов и дигидрополипренолов см. обзор [10]; аналогичные данные для гликозилфосфатов см. обзор [8]), так как они представляют собой суперпозицию спектров долихилфосфата (IV) и β -D-глюкопиранозилфосфата. Спектры 1H -ЯМР соединения (VIIIб) были подобны описанным ранее [4]; в настоящей работе удалось подобрать систему растворителей для съемки спектров ($CDCl_3$ - CD_3OD - D_2O), обеспечивающую значительно более высокое разрешение сигналов (табл. 1). Таким путем для этого соединения впервые удалось получить также хорошо разрешенный спектр ^{13}C -ЯМР (табл. 2). Как 1H -, так и ^{13}C -ЯМР-спектры соединения (VIIIб) были подобны таковым для цитронеллил- β -D-глюкопиранозилфосфата (Vб) и существенно отличались от спектров соответствующего α -аномера (VIб).

Можно предполагать, что увеличение объема алкильного радикала в долихилфосфате (IV) по сравнению с цитронеллилфосфатом (II) приводит к заметному замедлению скорости аномеризации ацилированного фосфодиэфира, что делает возможным получение стереохимически однородного продукта.

Таким образом, проведенная работа показывает, что стереохимический результат реакции фосфатов 2,3-дигидропренолов с бромидом (I) в значительной степени зависит от условий проведения эксперимента. В модельных опытах были найдены условия прямого гликозилирования цитронеллилфосфата (II), позволяющие получать либо неприродный α -аномер фосфодиэфира (VIб), либо смесь аномеров с преобладанием β -аномера (Vб). Гликозилирование цитронеллилбензилфосфата (III) с образованием фосфотриэфира (VII) и последующим удалением защитных групп позволяет получить чистый β -аномер (Vб). В то же время при использовании долихилфосфата (IV) при 37°C образуется долихил- β -D-глюкопиранозилфосфат (VIIIб) с выходом, сопоставимым с полученным ранее в описанном методе синтеза этого соединения через гликозил-*H*-фосфонат [4]. Подход, основанный на прямом гликозилировании долихилфосфата, развитый в настоящей работе, благодаря своей простоте и малостадийности, представляет особый интерес для получения природного долихил- β -D-глюкопиранозилфосфата (VIIIб), содержащего радиоактивную метку в остатке моносахарида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР записывали на приборах Bruker WM-250 (250 МГц по ^1H), Bruker AM-300 (75 МГц по ^{13}C) и Bruker AC-200 (81.015 МГц по ^{31}P). Величины химических сдвигов приведены в шкале δ , м.д., относительно Me_4Si для ^1H и ^{13}C и относительно 85% H_3PO_4 (внешний стандарт) для ^{31}P , константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) выражены в герцах. Для количественного определения содержания фосфора использовали реагент, описанный в работе [11], после нагревания образца в течение 15 мин при 200°C с 57% хлорной кислотой. Колоночную адсорбционную хроматографию проводили на силикагеле 40–100 мкм ("Ласма", Россия). Анионообменную хроматографию осуществляли на колонках с DEAE-целлюлозой DE-52 (Whatman, Англия, OAc-форма). ТСХ проводили на пластинках (5 × 2 см) с силикагелем (Silica Gel 60, Merck, ФРГ) в системе хлороформ–метанол–вода, 60 : 25 : 4 (А) или хлороформ–метанол–вода–конц. NH_4OH , 10 : 10 : 2 : 1 (Б). Непредельные соединения обнаруживали проявлением в парах I_2 , фосфорсодержащие соединения – с помощью реактива Васьковского [12] с последующим прокаливанием пластинок для обнаружения зон хорошо обугливаемых соединений. Гель-проникающую хроматографию проводили на колонке (1.6 × 90 см) с сорбентом TSK-40S (Toyo Soda Company, Япония) в системе вода–метанол–конц. NH_4OH , 85 : 14.9 : 0.1 (система В) при скорости подачи элюента 0.5 мл/мин, контролируя разделение с помощью дифференциального рефрактометра (Клауег, Германия). Фракции анализировали с помощью ТСХ (системы А и Б). Образцы перед нанесением на колонку растворяли в 1.2 мл системы В и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин.

Долихилфосфат (IV) в виде аммониевой соли был получен фосфорилированием смеси олигомергомологов долихола (из печени человека, содержит в среднем 19 изопреновых звеньев) дигидрофосфатом тетра-*n*-бутиламмония и трихлорэтонитрилом (метод описан в [10]). Аналогичным образом было проведено фосфорилирование цитронеллола; цитронеллилфосфат (II) был выделен с выходом 80% в виде аммониевой соли после анионообменной хроматографии и удаления ацетата аммония.

Гликозилирование цитронеллилфосфата при 37°C . К раствору 50 мкмоль цитронеллилфосфата (II, аммониевая соль) в 0.5 мл метанола прибавляли 7 мкл (50 мкмоль) триэтиламина и 9 мкл (50 мкмоль) диизопропилэтиламина. Через 10 ч при 20°C к реакционной смеси прибавляли 1 мл метанола и 5 мл толуола и упаривали растворители досуха. Остаток растворяли в смеси 0.1 мл метанола и 3 мл бензола и лиофильно высушивали.

К остатку прибавляли раствор 75 мкмоль бромида (I) в 0.85 мл абс. бензола, 14 мкл (100 мкмоль) триэтиламина и 5 мг порошкообразных прокаленных молекулярных сит 3 Å. Реакционную смесь выдерживали при 37°C в течение 120 ч, охлаждали до 20°C , прибавляли 10 мл толуола и выдерживали 18 ч при 4°C . Надосадочную жидкость отделяли и упаривали, остаток растворяли в 50 мл метанола и раствор наносили на колонку (1.8 × 13 см) с DEAE-целлюлозой, уравновешенную метанолом. Колонку промывали 65 мл метанола и элюировали 300 мл 5 мМ раствора NH_4OAc в метаноле, собирая фракции объемом 9 мл и контролируя элюцию с помощью ТСХ. Фракции, содержащие защищенные фосфодиэфиры (Va) и (VIa), R_f 0.55(А), объединяли и упаривали досуха. Остаток растворяли в 5 мл метанола, прибавляли 0.2 мл водного 5 н. NaOH и выдерживали 18 ч при 20°C . К реакционной смеси прибавляли избыток дауэкса 50W × 8(Py^+) и перемешивали в течение 2 ч. Смолу отфильтровывали, промывали 6 мл метанола, к фильтрату прибавляли 12 мл толуола и растворители упаривали досуха. От остатка отгоняли смесь толуол–метанол (1 : 1, 3 × 6 мл), растворяли его в 6 мл метанола и перемешивали с избытком дауэкса 50W × 8(NH_4^+) в течение 2 ч. Смолу отфильтровывали и промывали 10 мл метанола, полученный раствор упаривали досуха. Остаток подвергали гель-проникающей хроматографии. Фракции, содержащие целевой фосфодиэфир, объединяли и упаривали досуха, остаток растворяли в метаноле (5 мл). Выход цитронеллил-*D*-глюкопиранозилфосфатов (Vб, VIб, аммониевая соль) 7.8 мг (37%), R_f 0.20 (А), 0.64 (Б). Найдено %: P 7.84. $\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{NO}_9\text{P}$. Вычислено %: P 7.47. Спектр ^{31}P -ЯМР (CD_3OD): 0.02.

Гликозилирование цитронеллилфосфата при 80°C . Реакционную смесь, приготовленную как в предыдущем опыте, выдерживали 8 ч при 80°C , охлаждали, прибавляли 3 мл толуола и выдерживали 18 ч при 4°C . Надосадочную жидкость отделяли декантацией и упаривали, остаток растворяли в 1 мл хлороформа и нанесли на колонку (1 × 4.5 см) с силикагелем. Колонку промывали 20 мл хлороформа и защищенный фосфодиэфир (VIa), R_f 0.55(А), элюировали 15 мл смеси хлороформ – метанол, 2 : 1. Элюат упаривали досуха, остаток растворяли в смеси 3 мл метанола и 0.1 мл конц. NH_4OH . Раствор выдерживали 18 ч при 20°C , прибавляли 9 мл метанола и 1 мл воды, небольшой осадок отделяли центрифугированием (13 000 об/мин, 10 мин), растворители упаривали досуха, остаток подвергали гель-проникающей хроматографии. Фракции, содержащие целевое соединение, объединяли и упаривали досуха, остаток растворяли в 5 мл метанола. Выход цитронеллил- α -*D*-глюкопиранозилфосфата (VIб, аммониевая соль) 12.5 мг (60%), R_f 0.20 (А), 0.64 (Б).

Найдено %: P 7.62. $C_{16}H_{34}NO_9P$. Вычислено %: P 7.47. Спектр ^{31}P -ЯМР (CD_3OD): 0.02.

Цитронеллилбензилфосфат, аммониевая соль (III). К раствору 200 мкмоль цитронеллилфосфата (II) (аммониевая соль) в 2 мл метанола прибавляли 266 мкл 40% водного раствора гидроксида тетра-*n*-бутиламмония (400 мкмоль) и 3 мл толуола, выдерживали 2 ч при 20°C. Растворители удаляли в вакууме. Остаток растворяли в 1 мл смеси бензол-ацетонитрил (1 : 1), прибавляли 23 мкл (200 мкмоль) хлористого бензила и кипятили 4 ч с обратным холодильником без доступа влаги. Растворители удаляли, к остатку прибавляли 3 мл ацетонитрила и оставляли на 18 ч при 4°C. Надосадочную жидкость отделяли декантацией, растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в 3 мл смеси изопропанол – вода – конц. NH_4OH (1 : 1 : 0.01) и раствор пропускали через колонку (1 × 10 см) с катионитом КУ-2(NH_4^+), уравновешенную той же системой растворителей.

Растворители удаляли в вакууме, остаток растворяли в 1 мл метанола, добавляли и отгоняли толуол (3 × 5 мл) и растворяли остаток в 5 мл толуола. Раствор выдерживали 24 ч при 4°C, отделяли от небольшого осадка и упаривали досуха. Остаток растворяли в 30 мл метанола, наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (1.2 × 15 см), промывали 30 мл метанола и элюировали продукт 150 мл 8 мМ раствора NH_4OAc в метаноле. Растворитель упаривали почти досуха, прибавляли и отгоняли толуол (5 × 5 мл), прибавляли 10 мл толуола и выдерживали раствор 18 ч при 4°C. Осадок ацетата аммония отделяли, толуол упаривали досуха, остаток лиофилизировали из бензола и получали (III). Выход 41.7 мг (60%), R_f 0.50 (A). Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 7.23 (м, 5H, C_6H_5), 5.07 (тк, 1H, 2J 7.0, 3J 1.5, H6), 4.89 (д, 2H, $J_{H,P}$ 7.5, $ArCH_2OP$), 3.82 (м, 2H, H1), 1.90 (м, 2H, H5), 1.67 (с, 3H, H8), 1.58 (с, 3H, H7¹), 1.50-1.05 (м, 5H, H2, H3, H4), 0.78 (д, 3H, $J_{3,3'}$ 6.0, H3¹). Спектр ^{31}P -ЯМР ($CDCl_3$): 0.13.

Глюкозилирование цитронеллилбензилфосфата. К раствору 69 мкмоль цитронеллилбензилфосфата (III, аммониевая соль) в 0.5 мл смеси метанол-толуол (1 : 1) прибавляли 10 мкл (71.4 мкмоль) триэтиламина. Через 10 ч растворители упаривали досуха. К остатку прибавляли раствор 70 мкмоль бромид (I) в 0.7 мл абс. бензола, 10 мкл (70 мкмоль) триэтиламина и 5 мг молекулярных сит 3 Å. Смесь выдерживали 8 ч при 80°C, охлаждали, прибавляли 5 мл толуола и выдерживали 40 ч при 4°C. Раствор отделяли от осадка декантацией, упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл хлороформа и наносили на колонку (0.85 × 2.4 см) с силикагелем. Продукт элюировали 12 мл хлороформа. Элюат упаривали досуха и получали 27 мг (65%) фосфотриэфира (VII), R_f 0.86 (A). Остаток растворяли в 0.6 мл абс. ацетона, прибавляли

30 мг сухого иодистого натрия и выдерживали 10 ч при 60°C в отсутствие света. Реакционную смесь разбавляли 4 мл толуола, упаривали досуха, к остатку прибавляли 10 мл толуола и выдерживали 18 ч при 4°C. Раствор отделяли от осадка декантацией, упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл хлороформа и наносили на колонку указанного выше размера с силикагелем. Колонку промывали 8 мл хлороформа и элюировали ацелированный фосфодиэфир (Va) 13 мл смеси хлороформ-метанол, 9 : 1. Элюат упаривали досуха, получали 15.9 (39%) соединения (Va), R_f 0.55 (A), остаток растворяли в 1.5 мл абс. метанола и прибавляли 0.2 мл 1 н. раствора $MeONa$ в абс. метаноле. Через 2.5 ч при 20°C к реакционной смеси прибавляли 5 мл метанола и избыток дауэкса 50W × 8(Py^+), перемешивали в течение 2 ч, смолу отфильтровывали, промывали 5 мл метанола. Метанольный раствор обрабатывали 20 мг активированного угля Darco G60 (Fluka, Швейцария) в течение 12 ч при 20°C. Надосадочную жидкость отделяли декантацией, упаривали досуха, отгоняли толуол (2 × 5 мл), остаток растворяли в 10 мл метанола и обрабатывали избытком дауэкса 50W × 8(NH_4^+) в течение 2 ч при 20°C. Смолу отфильтровывали, промывали 5 мл метанола, растворители удаляли в вакууме масляного насоса. Выход аммониевой соли цитронеллил-β-*D*-глюкопиранозилфосфата (Vb) 10.3 мг (35%), R_f 0.20 (A), 0.64 (B).

Долихил-β-*D*-глюкопиранозилфосфат, аммониевая соль (VIIIb). К раствору 30 мкмоль долихилфосфата (IV, аммониевая соль) в 3 мл абс. бензола прибавляли 3 мл метанола, 4 мкл (30 мкмоль) триэтиламина и 5 мкл (30 мкмоль) диизопропилэтиламина. Через 48 ч при 20°C растворители удаляли в вакууме масляного насоса, остаток растворяли в 3 мл абс. бензола и лиофильно высушивали. К остатку прибавляли раствор 42.8 мкмоль бромид (I) в 0.25 мл абс. бензола, 8 мкл (57.8 мкмоль) триэтиламина и 3 мг прокаленных порошкообразных молекулярных сит 3 Å. Реакционную смесь выдерживали при 37°C в течение 120 ч в отсутствие света. После охлаждения надосадочную жидкость отделяли, осадок промывали 0.8 мл абс. бензола. Объединенные бензольные растворы упаривали досуха и высушивали в течение 1 ч в вакууме масляного насоса. Остаток обрабатывали 1.6 мл гептана и выдерживали 18 ч при 4°C. Гептановый слой отделяли от осадка, осадок промывали гептаном (2 × 1 мл), объединенные растворы упаривали. Остаток, содержащий ацелированный фосфодиэфир (VIIIa), R_f 0.78 (A), растворяли в смеси толуол-абс. метанол (1 : 1, 0.8 мл), прибавляли 0.1 мл 1 н. раствора $MeONa$ в метаноле (100 мкмоль) и выдерживали 2 ч при 20°C. Добавляли 1 мл толуола и выдерживали еще 1 ч при этой же температуре, после чего прибавляли

2.5 мл толуола, 0.5 мл метанола и 200 мг безводного даукса 50W × 8(Pu⁺). Перемешивали 8 ч и промывали смесью толуол–метанол, 2 : 1 (5 × 5 мл). Растворители удаляли, остаток растворяли в 30 мл смеси хлороформ – метанол, 2 : 1, и наносили на колонку (1 × 12 см) с ДЕАЕ-целлюлозой, уравновешенную той же смесью растворителей. Промывали колонку 30 мл смеси растворителей и элюировали раствором NH₄OAc (8 мМ и далее 12 мМ по 50 мл) в той же системе. Элюат упаривали почти досуха, прибавляли и упаривали 10 мл гептана, прибавляли еще 10 мл гептана, взбалтывали и оставляли на 18 ч при 4°C. Надосадочную жидкость отделяли, осадок промывали 2 × 3 мл гептана, объединенные растворы упаривали досуха и высушивали в вакууме масляного насоса. Остаток экстрагировали смесью 10 мл метанола и 0.04 мл конц. NH₄OH в течение 18 ч при 4°C. Экстракт удаляли, остаток вновь обрабатывали 5 мл гептана, упаривали и экстрагировали. Операцию повторяли 5 раз. Суммарный экстракт упаривали, остаток растворяли в 5 мл гептана, упаривали досуха и высушивали в вакууме масляного насоса. Выход аммониевой соли долихил-β-D-глюкопиранозилфосфата (VIIIб) 23 мг (65%), R_f 0.43 (А), 0.81 (Б).

Работа проводилась при финансовой поддержке РФФИ (грант № 96-03-32473).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kornfeld R., Kornfeld S. // Ann. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 631–664.
2. Shibaev V.N., Danilov L.L. // Glycopeptides and Related Compounds / Ed. D.C. Large, C.D. Warren. New York; Basel; Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., 1997. P. 427–504.
3. Warren C.D., Jeanloz R.W. // Meth. Enzymol. 1978. V. 50. P. 122–137.
4. Уткина Н.С., Мальцев С.Д., Данилов Л.Л., Шибачев В.Н. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 376–381.
5. Данилов Л.Л., Волкова Л.В., Евстигнеева Р.П. // Журн. общ. химии. 1977. Т. 47. С. 2137–2139.
6. Себякин Ю.Л., Русанова Е.Е., Волкова Л.В., Евстигнеева Р.П. // Химия природ. соединений. 1982. № 12. С. 246.
7. Уткина Н.С., Мальцев С.Д., Данилов Л.Л., Шибачев В.Н. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 314–315.
8. O'Connor J.V., Nunez H.A., Barker R. // Biochemistry. 1979. V. 18. P. 500–507.
9. Staathof A.J.J., Kieboom A.P.G., van Bekkum H. // Rec. Trav. Chim. 1985. V. 104. P. 65–68.
10. Danilov L.L., Shibaev V.N. // Studies in Natural Products Chemistry. V. 8 / Ed. Atta-ur-Rahman. Amsterdam; Oxford; New York; Tokyo: Elsevier, 1991. P. 63–114.
11. Данилов Л.Л., Уткина Н.С., Шибачев В.Н. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. С. 780–782.
12. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin J.M. // J. Chromatogr. 1975. V. 114. P. 129–141.

Glycosylation of Citronellyl and Dolichyl Phosphates with 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-α-D-glucopyranosyl Bromide

S. D. Maltsev, L. L. Danilov, and V. N. Shibaev[#]

Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Leninskii pr. 47, GSP-1 Moscow, 117913 Russia

The interaction of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-glucopyranosyl bromide with salts of citronellyl, dolichyl, and citronellyl benzyl phosphates was studied. It was shown that the result of the reaction depends upon the structure of the phosphate reagent, particularly, on the nature of the salt-forming cations and conditions of the reaction. Glycosylation conditions for synthesizing citronellyl β-D-glucopyranosyl-, citronellyl α-D-glucopyranosyl-, and dolichyl β-D-glucopyranosyl phosphates were developed.

Key words: citronellyl benzyl phosphate, citronellyl glucosyl phosphate, citronellyl phosphate, dolichyl glucosyl phosphate, dolichyl phosphate

[#] To whom correspondence should be addressed.