



УДК 542.914.4'118+543.42

СТРУКТУРА МОРАПРЕНОЛА И СИНТЕЗ МОРАПРЕНИЛФОСФАТА

*Вергунова Г. И., Глуходед И. С., Данилов Л. Л.,
Елисеева Г. И., Кочетков Н. Б., Троицкий М. Ф.,
Усов А. И., Шапков А. С., Шибаев В. Н.*

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Разработана упрощенная методика получения полипренолов из листьев шелковицы (морапренолов). С помощью масс-спектрометрии показано, что главным компонентом смеси олигомергомологов является морапренол-11. Применение ^{13}C -ЯМР позволило установить, что *транс*-изопреновые звенья расположены в виде блока на ω -конце полипренольной цепи растительного полипренола. Фосфорилированием морапренола с помощью *о*-фениленхлорфосфата получен морапренилфосфат.

Биосинтез многих бактериальных полисахаридов, в частности *O*-специфических цепей липополисахаридов салмонелл, протекает через промежуточное образование липид-углеводных предшественников — производных монофосфатов или пирофосфатов полипренолов (обзоры — см. [1, 2]). Основным липидным компонентом этих соединений в клетках бактерий является ундекапренол — полиненасыщенный спирт, построенный из изопреновых остатков; помимо ундекапренола обычно присутствуют небольшие количества нона-, дека- и додекапренолов. Из 10 внутренних изопреновых звеньев бактериального ундекапренола восемь имеют *цис*-конфигурацию двойных связей, а два — *транс*-конфигурацию.

Химический синтез такого рода соединений в настоящее время не осуществлен, а использование бактериальных полипренолов в исследованиях по синтезу полипренилфосфосахаров и изучению специфичности биосинтеза бактериальных полисахаридов затруднено из-за малой их доступности. Богатыми источниками полипренолов, близких по структуре к бактериальному ундекапренолу, могут служить листья многих растений. Так, описано получение смеси олигомергомологов полипренолов, главным компонентом которой является ундекапренол, из листьев фикуса [3], конского каштана [4], шелковицы [5, 6] и ряда других растений [7—10]. Вопрос о том, идентичны ли полипренолы из различных источников, остается открытым, однако для всех изученных растительных ундекапренолов характерно отношение внутренних *цис*- и *транс*-изопреновых звеньев, равное 7 : 3, т. е. присутствие дополнительного *транс*-изопренового звена по сравнению с бактериальным ундекапренолом. Тем не менее было показано, что фосфат полипренола из листьев фикуса (фикапренилфосфат) способен заменять бактериальный ундекапренилфосфат в процессе биосинтеза полипренилфосфосахаров в бактериях [11—16]. Таким образом, использование растительных полипренолов — аналогов бактериальных полипренолов — представляется перспективным для получения биологически активных аналогов бактериальных полипренилфосфосахаров.

В настоящей работе мы сообщаем о полном установлении структуры морапренола — полипренола из листьев шелковицы (*Morus alba*) — и химическом его фосфорилировании до морапренилфосфата. Данные о

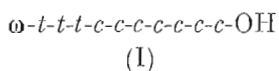
способности морапренилфосфата заменять бактериальный ундекапренилфосфат в системе биосинтеза O-специфической цепи липополисахарида *Salmonella anatum* будут опубликованы отдельно.

Выделение морапренолов из листьев шелковицы и их частичная характеристика были описаны японскими исследователями [5, 6]. Мы несколько изменили описанную процедуру очистки, отказавшись от стадий молекулярной перегонки и низкотемпературной кристаллизации; предлагаемый нами вариант методики обеспечивает быстрое получение смеси олигомергомологов морапренолов с высоким выходом. Он включает в себя экстракцию листьев ацетоном, омыление липидов щелочью в водном спирте и последующую хроматографию неомыляемых липидов на силикагеле. Полученный препарат морапренолов был однороден при ТСХ на силикагеле, его ИК- и ПМР-спектры соответствовали спектрам, описанным японскими авторами [5] (см. также [17]).

Анализ препарата морапренола с помощью распределительной ТСХ показал, что препарат представляет собой смесь олигомергомологов препонов. Сопоставление с заводскими образцами (полученными из лаборатории проф. Т. Хойнацкого, Институт биохимии и биофизики Польской АН) позволило установить, что главным компонентом смеси является C_{55} -пренол, присутствует заметное количество C_{60} -пренола и небольшие количества C_{45} -, C_{50} - и C_{65} -пренолов.

Присутствие смеси олигомергомологов в препарате морапренола и общий тип построения молекулы были подтверждены данными масс-спектрометрии. Масс-спектр морапренола оказался весьма близким к описанным в литературе спектрам растительных полипренолов [3, 4] и содержал характерные пики, отвечающие молекулярным ионам олигомергомологов (m/e 902, 834, 766, 698, 630) и продуктам их дегидратации (m/e 884, 816, 748, 680, 612). Основное направление фрагментации отвечало отщеплению от последних ионов ω -концевого изопренового звена (m/e 69) и последовательному отщеплению внутренних изопреновых звеньев, приводящему к образованию серии пиков с массовыми числами, различающимися на 68 единиц (m/e 679, 611, 543, 475, 407, 339, 271, 203, 135). Отношение интенсивностей молекулярных ионов и ионов $(M - H_2O)^+$ в масс-спектре соответствует отношению морапренолов-9, -10, -11, -12 и -13, равному 4 : 11 : 62 : 23 : 1.

Для растительных полипренолов на основании биогенетических соображений предполагалась как наиболее вероятная структура (I) (и для клеомепренолов была подтверждена биосинтетическим экспериментом *in vivo* [10]), но она не была доказана химическими или физико-химическими методами:



(ω , t и c — концевое, *транс*- и *цис*-изопреновые звенья соответственно — см. пояснения к таблице).

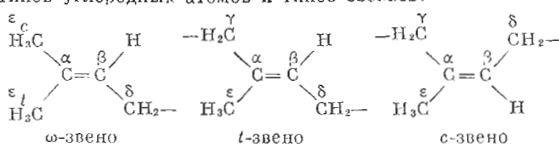
В настоящей работе с помощью ^{13}C -ЯМР-спектроскопии однозначно решен вопрос о распределении *цис*- и *транс*-звеньев в молекуле морапренола.

В таблице приведены данные спектра ^{13}C -ЯМР для морапренола и одновременно полученного спектра синтетического *цис,цис*-фарнезола (препарат любезно предоставлен Н. Я. Григорьевой, Институт органической химии АН СССР). При интерпретации спектров были использованы также литературные данные по спектрам ^{13}C -ЯМР *цис*- и *транс*-полиизопренов [18, 19]. Съемка спектров производилась по методике, основанной на применении очень коротких импульсов ($\sim 10^\circ$), что дает возможность в значительной степени преодолеть несорпорциональность интегральной интенсивности сигналов количеству атомов углерода за счет различных времен релаксации для неэквивалентных ядер (см. [20]) и позволяет с достаточной

Спектры ¹³C-ЯМР *цис*, *цис*-фарнезола и морапренола

Область спектра	Хим. сдвиги, м.д.		Отнесение сигнала *		Интегральная интенсивность сигнала в спектре морапренола	
	<i>цис</i> , <i>цис</i> -фарнезол	морапренол	тип атома	тип звена	найде-но **	вычислен для структуры (А)
a	-	15,99	ε	-t-	3,0	3
	17,62	17,62	ε _t	ω-	0,4	1
	23,34	-	ε	-c-	8,9	7
	23,47	23,47				
	25,68	25,67	ε _c	-ω-	1,1	1
б	26,39	26,46	δ	-c-c-	6,2	6
	26,59	-		ω-c-	-	-
	-	26,72		-t-t- и -t-c- ***	3,0	3
	-	26,85		ω-t- ***	1,1	1
	в	31,91		32,05	γ	-t-c- или ω-c-
32,24		32,31	-c-c-	6,9		6
-		39,85	-t-t- и ω-t-	3,0		3
г	58,63	58,96	δ	-c-OH	1,0	1
	д	124,29		124,22	-c-OH	0,5
-		124,35	-t-t-t- ***	1,1	1	
-		124,48	-t-t-c- или ω-t- ***	0,6	1	
124,68		124,68	ω- и ω-t- или -t-t-c- ***	2,0	2	
125,0		125,07	-c-c-	4,8	6	
e	131,16	131,11	α	ω-	1,0	1
	-	134,82		-t-t-t- ***	1,8	1
	-	134,87		-t-t-c- ***		
	-	135,21		-c-c-c-	5,0	5
	-	135,34		-c-c-OH ***	2,5	1
	135,66	-		ω-c-	-	-
	-	136,05		ω-t- ***	1,8	1
	138,78	139,69		-c-OH	0,8	1

* Обозначения типов углеродных атомов и типов звеньев:



** Нормировка проводилась в каждой области спектра отдельно, использованные для нормировки интегральные интенсивности подчеркнуты.

*** Интерпретация неоднозначна.

точностью использовать этот параметр при сравнении сигналов от аналогичных атомов углерода, однотипных с точки зрения усиления за счет эффекта Оверхаузера.

Анализ ¹³C-ЯМР-спектра полностью подтверждает основные черты предполагаемой структуры морапренола. В области a резонанса метильных групп сигналы при 15,99 и 23,47 м. д. относятся к резонансу CH₃-групп в *транс*- и *цис*-изопреновых звеньях (в полиизопренах аналогичные сигналы находятся при 16,0 и 23,6 м. д. [18]). Их отношение близко к 3 : 7, что соответствует структуре морапренола. Сигналы при 17,62 и 26,67 м. д. принадлежат CH₃-группам ω-концевого звена цепи. В области б спектра (~ 26 м. д.) присутствуют сигналы групп CH₂CH= (δ-углерод-

ных атомов по принятой для полиизопренов номенклатуре, см. формулы под таблицей), а в области ϵ (~ 32 и 39 м. д.) — сигналы группы $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=$ (γ -углеродных атомов). Слабопольные сигналы в области δ (124 — 125 м. д.) и ϵ (131 — 139 м. д.) относятся к атомам углерода при двойной связи (соответственно β - и α -атомы). Вывод об отношении *цис*- и *транс*-изопреновых звеньев в молекуле морапренола может быть сделан на основании интегральных интенсивностей сигналов не только в области a , но и в областях b и ϵ .

Детальный анализ спектра в области ϵ позволяет сделать заключение об относительном расположении изопреновых звеньев *цис*- и *транс*-типа в молекуле морапренола. Наличие интенсивных сигналов при $32,31$ и $39,85$ м. д. и единичного сигнала при $32,05$ м. д. указывает на присутствие в молекуле одного блока, составленного из *цис*-изопреновых звеньев, одного блока из *транс*-звеньев и единственного узла связи, в котором δ -атом *цис*-изопренового звена соединен с γ -атомом *транс*-изопренового звена. При ином распределении звеньев в молекуле следовало бы ожидать появления дополнительного сигнала вблизи 40 м. д., отвечающего узлу связи с участием γ -атома *цис*-изопренового звена и δ -атома *транс*-изопренового звена, и близкой интенсивности различных сигналов в этой области (см. [19]).

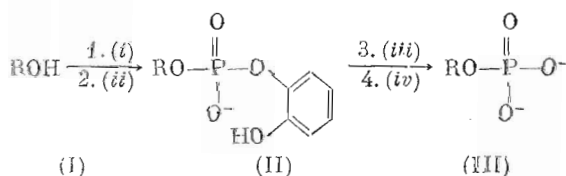
Интерпретация сигналов в области ϵ , другой области, рекомендованной для установления распределения *цис*- и *транс*-звеньев в полиизопренах [19], в случае морапренола не столь проста, по-видимому, из-за значительного влияния концевых групп цепи на химические сдвиги α -атомов углерода в предпоследних звеньях. Однако и в этом случае интенсивный сигнал при $135,21$ м. д. свидетельствует о существовании блока, построенного из *цис*-изопреновых звеньев.

Наконец, анализ сигналов в области δ также подтверждает сделанное заключение. Присутствие сигнала шести атомов углерода при $125,07$ м. д. и сигнала одного атома углерода при $124,22$ м. д. соответствует наличию блока из шести *цис*-изопреновых звеньев и концевого звена *цис*-типа, остальные сигналы в этой области отвечают резонансу β -атомов углерода *транс*-звеньев, находящихся в неидентичном окружении.

Полученные результаты соответствуют структуре (I) для морапренола-11, главного компонента полученной смеси олигомергомологов.

Насколько нам известно, это первый случай доказательства распределения изомерных изопреновых звеньев и, следовательно, полного установления структуры для растительного полипренола с помощью физико-химических методов. Можно надеяться, что применение ^{13}C -ЯМР позволит однозначно установить распределение изомерных изопреновых звеньев и в других растительных полипренолах.

Полученная смесь олигомергомологов морапренола с преобладанием C_{35} -пренола была использована далее для получения морапренилфосфата. Для этой цели было применено фосфорилирование с помощью *o*-фениленхлорфосфата с последующим окислительным расщеплением *o*-оксифенильного остатка с помощью тетраацетата свинца [21]. Применимость этого метода для фосфорилирования полипренолов была на примере фикапренола продемонстрирована Уорреном с сотр. [22, 23].



- (i) — *o*-фениленхлорфосфат + 2,6-пиридин;
(ii) — 2,6-пиридин + H_2O ; (iii) — $\text{Pb}(\text{OAc})_4$;
(iv) — KOH ; R — остаток морапренола.

Окисление фосфодиэфира (II) тетраацетатом свинца сопровождается образованием окрашенных продуктов, которые трудно отделяются от желаемого фосфата (III). Уоррен и Жанло описывают калиевую соль фикапренилфосфата как «коричневый сироп» [22] или «светло-коричневый порошок» [23]; отделения окрашенных примесей им, по-видимому, удалось добиться лишь при помощи ТСХ. Использование методики получения фикапренилфосфата для фосфорилирования морапренола также привело к продукту, содержащему окрашенные примеси, причем окраска препарата и его эффективность как субстрата в реакции биосинтеза О-специфической цепи бактериального липополисахарида менялись от опыта к опыту. Попытки очистки окрашенного препарата морапренилфосфата с помощью ТСХ не дали удовлетворительных результатов.

В связи с этим мы модифицировали методику Уоррена и Жанло, изменив условия проведения фосфорилирования, окислительного расщепления диэфира и выделения конечного продукта реакции, причем была исследована возможность получения морапренилфосфата (III) как с промежуточным выделением *o*-оксифенилфосфата морапренола (II) и последующим его окислением тетраацетатом свинца (способ А), так и без промежуточного выделения (способ Б).

В первом случае стадии фосфорилирования и окислительного расщепления проводили в абс. диоксане, во втором — в абс. бензоле. На стадии окисления диэфира (II) необходим тщательный контроль с помощью ТСХ за количеством прибавляемого тетраацетата свинца, так как при недостатке последнего в реакционной смеси остается непрореагировавший фосфодиэфир, а при избытке выход продукта резко снижается. При проведении окисления в среде абс. бензола удается легко избежать избытка тетраацетата свинца, очевидно, вследствие малой его растворимости в бензоле.

Очистку морапренилфосфата проводили переосаждением его калиевой соли из смеси хлороформ — метанол, превращением калиевой соли в пиридиниевую и ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе в условиях, описанных в работе [25]. Превращение морапренилфосфата в пиридиниевую соль является необходимой стадией, так как при пропускании раствора калиевой соли (III) в смеси хлороформ — метанол через колонку с ДЕАЕ-целлюлозой адсорбции фосфата на колонке не происходит, по-видимому, из-за малой растворимости образующегося в результате обмена ацетата калия в используемом растворителе. Ионообменная хроматография обеспечивает полное удаление окрашенных примесей из препарата морапренилфосфата.

Полученный морапренилфосфат (III) охарактеризован результатами анализа на фосфор, причем весь фосфор препарата определяется как кислотолabileный (полипренилфосфат полностью гидролизуеться до неорганического фосфата при обработке разбавленной кислотой в водном этаноле). ИК- и ПМР-спектры полученного вещества соответствуют структуре полипренилфосфата.

Экспериментальная часть

Адсорбционную ТСХ проводили на пластинках с закрепленным слоем силикагеля КСК в системах растворителей: бензол — хлороформ, 4 : 1 (А), бензол (Б), петролейный эфир — эфир — уксусная кислота, 70 : 30 : 2 (В), петролейный эфир — эфир, 1 : 1 (Г), хлороформ — метанол, 5 : 1 (Д), хлороформ — метанол — вода, 60 : 30 : 6 (Е), хлороформ — метанол — вода — конц. аммиак, 60 : 25 : 4 : 0,5 (Ж). Для распределительной хроматографии использовали пластинки с целитом 545 (38/100 меш, LPS Chemicals, Англия) и целлюлозой (Whatman, Англия). Пластинки после нанесения адсорбента в виде водной суспензии высушивали при 105°, погружали на 2 мин в 5% раствор вазелинового масла в петролейном эфире (т. кип. 40—70°), высушивали 10 мин при комнатной температуре и

25 мин при 105°. Система растворителей: ацетон — вода, 23 : 2 (3). Реагенты для обнаружения веществ на хроматограммах: пары иода (а), 1% раствор перманганата калия в 2% растворе карбоната натрия (б), смесь анисовый альдегид — серная кислота — спирт, 1 : 1 : 18, с последующим нагреванием (в), реактив для обнаружения фосфолипидов по Васьяковскому с сотр. (з) [25]. Для колоночной хроматографии использовали силикагель L 40/100 μ (ЧССР) и DEAE-целлюлозу DE-52 (Whatman, Англия). Последнюю перед работой обрабатывали 0,1 М HCl, водой, 0,1 М KOH, промывали метанолом и ледяной уксусной кислотой. Колонку заполняли в ледяной уксусной кислоте, промывали метанолом и смесью хлороформ — метанол, 2 : 1.

Колориметрическое определение фосфора проводили с помощью реагента, описанного в работе [26]. Для определения общего фосфора аликвоту анализируемого раствора упаривали в термостойкой пробирке, к остатку добавляли 0,2 мл 57% хлорной кислоты, нагревали 15 мин при 200°*, после охлаждения прибавляли 0,6 мл реагента и воду до 5 мл, нагревали 15 мин при 100°, доливали воду до 10 мл и измеряли оптическую плотность при 825 нм. Для определения кислотолабильного фосфата к аликвоте анализируемого раствора добавляли 1,2 мл 1 М H₂SO₄ и 2 мл этанола, встряхивали до гомогенности, выдерживали 15 мин при комнатной температуре, нагревали 10 мин при 100° для упаривания органических растворителей, прибавляли 0,6 мл реагента и воду до 5 мл и заканчивали определение как указано выше.

Масс-спектр получен на спектрометре CH-6 Varian MAT (прямой ввод вещества в источник, 280°). ПМР-спектры снимали на спектрометре Varian DA-60-IL и Varian HX-60 с рабочей частотой 60 МГц в CCl₃ (внутренний стандарт — ТМС). ¹³C-ЯМР-спектрометрию производили на спектрометре Varian HX-90 E с рабочей частотой 22,625 МГц в CCl₃, внутренний стандарт — ТМС, стабилизация по ядрам дейтерия в растворителе, продолжительность импульса 1 мкс (~ 10°), интервал между импульсами 0,7 с, 8/4 К, 20 Гц/см. ИК-спектры снимали на спектрофотометрах UR-20 и Spered в CCl₃.

Выделение морапренола. 83 г высушенных и измельченных листьев шелковицы (собраны в Ферганской области осенью 1972 г.) экстрагировали 3 ч в аппарате Сокслета 600 мл ацетона, экстракт упаривали. Остаток (4 г) растворяли в 60 мл смеси этанол — вода (17 : 3), прибавляли 9 г KOH; кипятили 2 ч, охлаждали, добавляли 60 мл воды и экстрагировали гексаном (5 × 50 мл). Экстракт сушили сульфатом натрия, упаривали и получали 1,83 г неомыляемых липидов. Раствор этого препарата в 4 мл гексана наносили на колонку с силикагелем (80 г), колонку промывали гексаном и смесями петролейный эфир (т. кип. 40—70°) — эфир, содержащими 4,6,8 и 10% последнего (порции по 600 мл). Морапренол получали из фракций, смываемых последним растворителем, выход 0,59 г. ТСХ на силикагеле: R_f 0,27 (А), 0,5 (Б), 0,3 (В), 0,67 (Г), 0,98 (Д) (обнаружение реагентами а и б). ТСХ в системе (Ж) на пластинках с обращенной фазой: R_f 0,63; 0,55; 0,42; 0,35 (целит), 0,87; 0,70; 0,60; 0,54 (целлюлоза). ПМР-спектр (δ, м. д.): 5,44 (т, J 7 Гц, =CHCH₂O, 1 H), 5,1 (м, =CHCH₂C, 11 H), 3,97 (д, J 7 Гц, =CHCH₂O, 2H), 2,06 и 2,00 (=CCH₂, 42H), 1,67 (*транс*-CH₃, 24H), 1,60 (*цис*-CH₃, 12H). ИК-спектр (ν, см⁻¹): 3620 (OH), 3040 (C—H в тризамещенном олефине), 2950, 2870 (CH₃ + CH₂), 1667 (C=C в тризамещенном олефине), 1450, 1380 (CH₃ + CH₂). Масс-спектр (приведены все пики с m/e > 270 и интенсивностью выше 2,5% от интенсивности пика с m/e 69, а также характерные пики в области меньших масс или меньшей интенсивности): m/e 69 (100), 135 (30), 203 (15), 271 (7, 8), 339 (5,7), 407 (3,9), 475 (3,6), 543 (3,4),

* Прибор должен находиться за защитным экраном — возможен взрыв.

611 (3,2), 612 (2,1), 630 (0,43), 679 (2,4), 680 (3,0), 698 (1,1), 748 (14), 749 (8,5), 766 (6,4), 767 (3,3), 816 (4,6), 817 (2,8), 834 (2,3), 884 (0,21), 902 (0,05).

Морапренилфосфат (III). А. Раствор 65 мг (85 мкмоль в пересчете на морапренол-11) морапренола (I) в 1 мл абс. диоксана, содержащий 50 мкл (440 мкмоль) 2,6-лутидина, замораживали охлаждением в смеси сухой лед — ацетон и быстро вносили раствор 65 мг (340 мкмоль) *о*-фениленхлорфосфата в 0,5 мл диоксана. Позволяли смеси нагреться до комнатной температуры и оставляли еще на 30 мин. Осадок отфильтровывали, промывали диоксаном, к фильтрату добавляли 50 мкл 2,6-лутидина и 20 мкл воды. Через 15 мин при комнатной температуре раствор упаривали, от остатка отгоняли толуол (4 раза), растворяли остаток в 1 мл толуола и наносили на колонку (1,9 × 20 см) с силикагелем. Колонку промывали гексаном (50 мл), смесями хлороформ — гексан, 2 : 1 (60 мл), 8 : 1 (30 мл), хлороформом (25 мл) и смесью хлороформ — метанол (10 : 1). Последним растворителем смывали диэфир (II), R_f 0,50 (Д, реагенты б, в, г). Соответствующие фракции упаривали, от остатка отгоняли толуол (3 раза), растворяли его в 5 мл диоксана и добавляли при перемешивании 70 мг (158 мкмоль) тетраацетата свинца.

Через 20 мин анализировали реакционную смесь ТСХ и наблюдали превращение диэфира (II) в продукты с R_f 0,1 и 0,9 (Д, реагент г). При сохранении в реакционной смеси исходного вещества добавляли небольшую порцию окислителя. К смеси добавляли 4 мл 1 М раствора КОН в метаноле до pH 11—12 и через 30 мин — 0,4 мл ледяной уксусной кислоты до pH 5—6. Полученный раствор упаривали, от остатка отгоняли 5 мл толуола, добавляли 6,5 мл смеси хлороформ — метанол (5 : 1). Осадок отфильтровывали и промывали той же смесью, фильтрат упаривали. К остатку добавляли 1,5 мл смеси хлороформ — метанол (5 : 1) и затем 15 мл метанола. Выпавший осадок калиевой соли (III) отделяли декантацией, промывали 5 мл метанола. Переосаждение повторяли еще 2 раза, осадок растворяли в смеси хлороформ — метанол (5 : 1). Полученный светло-желтый раствор содержал 29 мкмоль кислотолабильного и общего фосфора, что соответствует выходу морапренилфосфата (III) в 34%. Анализ раствора ТСХ (обнаружители в и г) показал присутствие единственного продукта с R_f 0,1 (Д), 0,36 (Е), 0,18 (Ж).

Аликвоту раствора, содержащую 6 мкмоль соединения (III), упаривали, растворяли в 6 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1), добавляли ~ 0,3 г дауэкса 50 W × 8 (Ру⁺-форма). Перемешивали 10 ч, ионообменник отделяли фильтрованием и промывали 10 мл смеси хлороформ — метанол (2 × 1). Раствор пропускали через колонку (0,8 × 8 см) с DEAE-целлюлозой, колонку промывали смесью хлороформ — метанол, 2 : 1 (40 мл) и метанолом (25 мл). Элюцию проводили линейным градиентом концентрации ацетата аммония в метаноле от 0 до 0,02 М (по 100 мл) со скоростью 30 мл/ч, собирая фракции по 5 мл. Разделение контролировали, определяя в аликвотах (1 мл) кислотолабильный фосфор. Единственный пик обнаруживали во фракциях 1—18. Эти фракции объединяли и концентрировали приблизительно до 1 мл, добавляли 8 мл хлороформа и промывали водой (5 × 1 мл). Органический слой упаривали досуха, остаток 3 раза упаривали с *n*-пропанолом и 3 раза с толуолом, сушили в вакууме масляного насоса. Выход аммониевой соли (III) 5,1 мг (4,8 мкмоль, 27% в пересчете на морапренол-11).

Б. Раствор 100 мг (130 мкмоль в пересчете на морапренол-11) морапренола (I) в 1,5 мл абс. бензола, содержащий 100 мкл (880 мкмоль) лутидина, замораживали охлаждением в смеси сухой лед — ацетон и быстро вносили раствор 130 мг (680 мкмоль) *о*-фениленхлорфосфата в 1 мл абс. бензола. Смеси позволяли нагреться до комнатной температуры и оставляли еще на 30 мин. К реакционной смеси добавляли 10 мкл лутидина и 40 мкл воды и перемешивали 15 мин, раствор отделяли от осадка деканта-

цией, осадок 3 раза промывали абс. бензолом, бензольный раствор упаривали досуха, остаток растворяли в абс. бензоле и лиофилизировали. Сиропообразное вещество растворяли в 5 мл абс. бензола, прибавляли 140 мг (316 мкмоль) тетраацетата свинца и перемешивали 30 мин. Бензольный раствор отделяли от оставшихся кристаллов декантацией и промывали кристаллы абс. бензолом. К объединенному бензольному раствору прибавляли 8 мл 1 М раствора КОН в метаноле до pH 11—12 и перемешивали 30 мин.

Смесь подкисляли 0,8 мл ледяной уксусной кислоты до pH 5,6, прибавляли 13 мл смеси хлороформ—метанол (5 : 1), осадок отфильтровывали и промывали той же смесью. Фильтрат упаривали, к остатку добавляли 3 мл смеси хлороформ — метанол (5 : 1) и 30 мл метанола. Выпавший осадок калиевой соли (III) отделяли декантацией и промывали 10 мл метанола. Переосаждение повторяли еще 2 раза. Осадок, растворенный в 6 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1), содержал 81 мкмоль кислотолабильного и общего фосфора, что соответствует выходу морапренилфосфата (III) 62,3% (в пересчете на морапренол-11). К раствору прибавляли 4 г дауэкса 50 W×8 (Pu⁺-форма) и перемешивали 10 ч. Ионообменник отфильтровывали, промывали 30 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1) и объединенный раствор пропускали через колонку (0,8 × 8 см) с DEAE-целлюлозой. Колонку промывали смесью хлороформ — метанол, 2 : 1 (50 мл) и метанолом (40 мл).

Элюцию проводили линейным градиентом концентрации ацетата аммония в метаноле от 0 до 0,02 М (по 150 мл) со скоростью 24 мл/ч, собирая фракции по 6 мл. Разделение контролировали, определяя в аликвотах (0,3 мл) кислотолабильный фосфор. Соединение (III) элюировалось одним пиком во фракциях 12—32, которые объединяли и концентрировали приблизительно до объема 2 мл. К раствору добавляли 10 мл хлороформа и промывали водой (5 × 2 мл). Органический слой упаривали досуха, остаток 3 раза упаривали с *n*-пропанолом и 2 раза с абс. бензолом, растворяли в абс. бензоле и лиофилизировали. Соединение однородно по данным ТСХ (реагенты *в* и *г*), R_f 0,1 (Д), 0,36 (Е), 0,18 (Ж). Выход аммониевой соли (III) 58,3 мг (72,2 мкмоль, 56% в пересчете на морапренол-11). Найдено, %: P 3,84. C₅₅H₉₇N₂O₄P (фосфат морапренола-11). Вычислено, %: P 3,51.

ИК-спектр (ν , см⁻¹): 3040 (C—H в тризамещенном олефине), 2950, 2870 (CH₃ + CH₂), 1675 (C=C в тризамещенном олефине), 1455, 1380 (CH₃ + CH₂), 1260 (P=O), 1120 (*цис*-изопреновое звено), 1020 (P—O + аллильный C—O). ПМР-спектр (δ , м. д.): 5,05 (м, =CHCH₂, 1H), 3,71 (т, J 7,5 Гц, =CHCH₂OP, 2H), 1,99 и 1,96 (=CCH₂, 42H), 1,61 (*транс*-CH₃, 24H), 1,53 (*цис*-CH₃, 12H).

ЛИТЕРАТУРА

1. Шibaев В. Н. (1976) Успехи биол. химии, **17**, 187—216.
2. Lennarz W. J., Scher M. G. (1972) Biochim. et biophys. acta, **265**, 417—441.
3. Stone K. J., Wellburn A. R., Hemming F. W., Pennock J. F. (1967) Biochem. J., **102**, 325—330.
4. Wellburn A. R., Stevenson J., Hemming F. W., Morton R. A. (1967) Biochem. J., **102**, 313—324.
5. Fukawa H., Toyoda M., Shimizu T., Murohashi C. (1966) Tetrahedron Lett., 6209—6213.
6. Toyoda M., Fukawa H., Shimizu T. (1969) J. Agr. Chem. Soc. Jap., **43**, 688—693; Chem. Abstr. (1970) **72**, 62856d.
7. Dunphy P. J., Kerr J. D., Pennock J. F., Whittle K. J., Fenney J. (1967) Biochim. et biophys. acta, **136**, 136—147.
8. Wellburn A. R., Hemming F. W. (1966) Phytochemistry, **5**, 969—975.
9. Sasak W., Chojnacki T. (1973) Acta biochim. polon., **20**, 343—350.
10. Suga T., Shishibori T., Kosela S., Tanaka Y., Iton M. (1975) Chem. Lett., 771—776.
11. Higashi Y., Siewert G., Strominger J. L. (1970) J. Biol. Chem., **245**, 3683—3690.
12. Umbreit J. N., Strominger J. L. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**, 1972—1974.
13. Lomax J. A., Poxton I. R., Sutherland I. W. (1973) FEBS Lett., **34**, 232—234.
14. Lahav M., Chiu T. H., Lennarz W. J. (1969) J. Biol. Chem., **244**, 5890—5898.

15. Schultz J., Elbein A. D. (1974) Arch. Biochem. and Biophys., **160**, 311—322.
16. Jankowski W., Mankowski T., Choinacki T. (1974) Biochim. et biophys. acta, **337**, 153—162.
17. Feeney J., Hemming F. W. (1967) Anal. Biochem., **20**, 1—15.
18. Duch M. W., Grant D. M. (1970) Macromolecules, **3**, 165—174.
19. Tanaka Y., Sato H., Seimiya T. (1975) Polymer J., **7**, 264—266.
20. Фаррар Т., Беккер Э. (1973) Импульсная и фурье-спектроскопия ЯМР, с. 122, «Мир», М.
21. Khwaja T. A., Reese G. B., Stewart J. G. M. (1970) J. Chem. Soc. ser. C, 2092—2100.
22. Warren C. D., Jeanloz R. W. (1972) Biochemistry, **11**, 2565—2572.
23. Warren C. D., Konami Y., Jeanloz R. W. (1973) Carbohydr. Res., **30**, 257—279.
24. Adamany A. M., Spiro R. G. (1975) J. Biol. Chem., **250**, 2842—2854.
25. Vaskovskii V. E., Kostetskii E. Ya., Vasendin I. M. (1975), J. Chromatogr., **114**, 129—141.
26. Lucena-Gonde F., Prat L. (1957) Anal. chim. acta, **16**, 473—479.

Поступила в редакцию
21.IV.1977

THE STRUCTURE OF MORAPRENOL AND THE SYNTHESIS OF MORAPRENYL PHOSPHATE

VERGUNOVA G. I., GLUKHOED I. S., DANILOV L. L.,
ELISEEVA G. I., KOCHETKOV N. K., TROITSKY M. F.,
USOV A. I., SHASHKOV A. S., SHIBAEV V. N.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A simplified procedure for isolation of polyprenols from *Moris alba* leaves (moraprenols) has been developed. The main component in the mixture of polyprenol oligomer-homologs was found to be moraprenol-11. The molecule of moraprenol was shown by ¹³C-NMR spectroscopy to comprise a cluster of *trans*-isoprenoid units joined to the ω-unit at the end of polyprenol chain. Phosphorylation of moraprenol with *o*-phenylenephosphorochloridate afforded moraprenyl phosphate.
