



УДК 547.963.32 : 543.422.23

**ВВЕДЕНИЕ ^{18}O В ФОСФАТНУЮ ГРУППУ ЭФИРОВ
ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ ПРИ КАТАЛИЗИРОВАННОЙ ИМИ
ГИДРАТАЦИИ ДИЦИКЛОГЕКСИЛКАРБОДИИМИДА***Браславский Б. И., Зарытова В. Ф., Гнорре Д. Г.,
Коробейничева И. К., Курбатов В. А.**Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Показано, что при действии дициклогексилкарбодиимида на фенолфосфат и 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфат в смеси пиридин — H_2^{18}O (10 : 1) при 20° происходит обмен между кислородом воды и фосфатной группы фенолфосфата и d(pT)Ac. При взаимодействии меченных ^{18}O по фосфатной группе фенолфосфата и d(pT)Ac с DCC в смеси пиридин — H_2^{18}O основное количество кислорода в образующейся дициклогексилмочевине происходит из фосфатной группы. Гидратация DCC, катализируемая эфирами фосфорной кислоты, проходит через промежуточное соединение, содержащее P—O—C-связь.

В химии нуклеотидов и других биологически важных эфиров фосфорной кислоты широко используются реакции фосфорилирования с применением в качестве конденсирующих реагентов дициклогексилкарбодиимида (DCC) и арилсульфохлоридов [1]. Однако до сих пор остаются неустановленными структуры промежуточных соединений, образующихся при действии этих реагентов на фосфомоноэфирные группы. В частности, отсутствуют прямые доказательства образования O-фосфорил-N,N'-дизамещенной мочевины, которое было постулировано в качестве первой стадии взаимодействия карбодиимидов с фосфатами [2]. Определенную помощь в решении этих задач могут оказать эфиры фосфорной кислоты, меченные ^{18}O по фосфатной группе.

Целью настоящей работы была разработка метода получения эфиров фосфорной кислоты, меченных ^{18}O , и применение этих соединений для изучения их взаимодействия с дициклогексилкарбодиимидом.

В основу метода положена обнаруженная ранее катализируемая кислотами гидратация карбодиимидов. Эта реакция была первоначально показана на примере гидратации N-циклогексил-N'-(β-этилморфолиний)-этилкарбодиимида, катализируемой уксусной кислотой [3]. Существование этой реакции для эфиров фосфорной кислоты подтверждено в работах [4, 5]. В соответствии с полученными в этих работах кинетическими дан-

Принятые сокращения: DCC — N,N'-дициклогексилкарбодиимид; d(pT)Ac — 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфат.

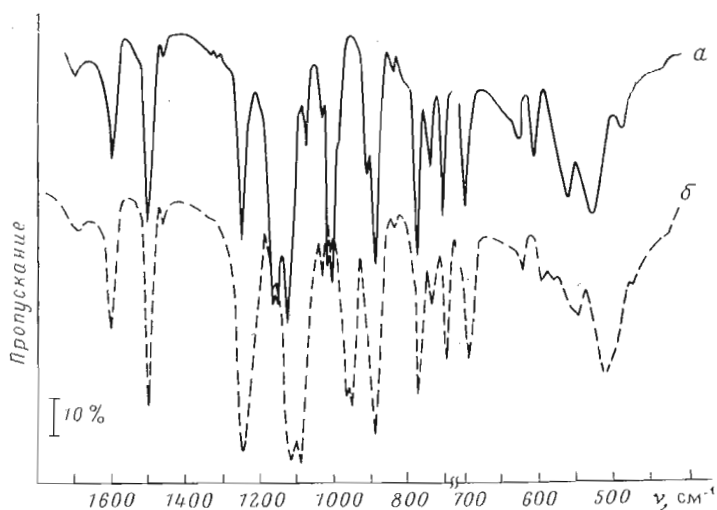
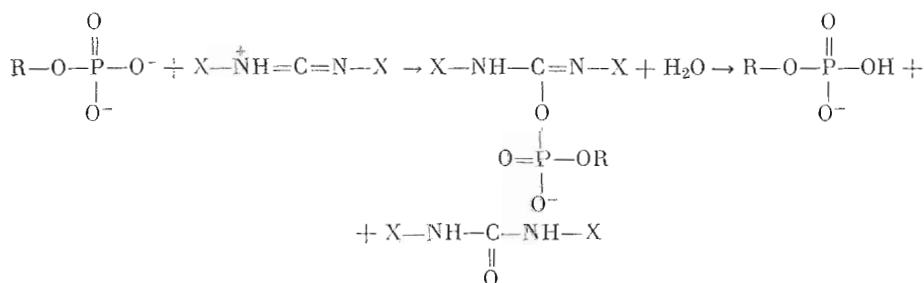


Рис. 1. ИК-спектры: *a* — динатриевой соли фенилфосфата, *б* — динатриевой соли ^{18}O фенилфосфата

выми механизм такой гидратации можно представить следующим образом:



Поскольку, согласно этой схеме, атом кислорода в регенерируемой на второй стадии молекуле фосфомоноэфира поступает из воды, при проведении реакции в присутствии H_2^{18}O должен накапливаться эфир фосфорной кислоты, обогащенный ^{18}O .

Имеющийся набор карбодиимидов позволяет проводить реакцию как в водных средах, так и в органических растворителях. В настоящей работе обогащение эфиров фосфорной кислоты изотопом ^{18}O проведено с помощью DCC на примере фенилфосфата и нуклеотида в пиридине, содержащем воду, обогащенную на 86,5% изотопом ^{18}O . Считая, что все три атома кислорода в молекуле равноценны и лимитирующей стадией обмена является бимолекулярная реакция карбодиимида с эфиром, кинетические уравнения для обмена со 100%-ной H_2^{18}O можно записать в виде

$$-\frac{d[\text{DCC}]}{dt} = k[\text{O}][\text{DCC}],$$

$$-\frac{d[^{16}\text{O}]}{dt} = k[^{16}\text{O}][\text{DCC}],$$

где $[\text{O}]$ — полная концентрация способных к обмену атомов кислорода, равная утроенной концентрации эфира, $[^{16}\text{O}]$ — концентрация атомов ^{16}O в составе группы PO_3^{2-} . Интегрирование этой системы дифференциальных уравнений для конечной концентрации ^{16}O приводит к выражению

$$[^{16}\text{O}] = [\text{O}] e^{-[\text{DCC}]/[\text{O}]}.$$

Отсюда видно, что при 10-кратном избытке DCC ($[DCC]/[O] = 10/3$) обмен должен пройти на 96%, т. е. достаточно полно.

ИК-спектры динатриевой соли исходного фенилфосфата и фенилфосфата, выдержанного с 10-кратным избытком DCC в смеси пиридин — $H_2^{18}O$ в течение суток, приведены на рис. 1.

Видно, что в спектре фенилфосфата, подвергнутого обработке DCC, полосы валентных колебаний групп PO_3^{2-} в диапазоне 1150—1400 и 1015—1000 cm^{-1} смещены на $\sim 50 cm^{-1}$, а полосы деформационных колебаний в диапазоне 550—500 cm^{-1} — на 10—15 cm^{-1} в сторону меньших частот. Это свидетельствует о замене ^{16}O в этой группе на ^{18}O [6].

Таким же образом был осуществлен обмен кислорода в PO_3^{2-} -группе 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфата.

Полученные результаты показывают, что изотопный обмен кислорода между водой и фосфатной группой можно производить в очень мягких условиях, пригодных для многих биологически важных эфиров фосфорной кислоты. С другой стороны, сам факт протекания обмена кислорода в исследованной системе свидетельствует в пользу предложенной структуры промежуточного соединения в реакции карбодимидов с кислотами [2].

В качестве дополнительного подтверждения мы провели ту же реакцию, используя $H_2^{16}O$ и меченные ^{18}O фенилфосфат и $d(pT)Ac$. Образующаяся дициклогексилмочевина была выделена и подвергнута изотопному анализу. ИК-спектры $[^{16}O]$ - и $[^{18}O]$ дициклогексилмочевины, полученной при использовании $d(pT)Ac$ или фенилфосфата, соответствуют спектрам в работе [7] и в области 1500—1700 cm^{-1} представлены на рис. 2. Данные ИК-спектров свидетельствуют, что при катализируемой эфирами фосфорной кислоты гидратации дициклогексилкарбодимида в присутствии меченого эфира происходит значительное образование $[^{18}O]$ дициклогексилмочевины. Для определения степени обогащения был записан частичный масс-спектр $[^{18}O]$ дициклогексилмочевины в области 210—230 m/e . В спектре $[^{16}O]$ дициклогексилмочевины присутствуют интенсивные пики молекулярных ионов 224 и 225 m/e . Пик ионов ($M - 1$) практически отсутствует. В спектре дициклогексилмочевины, обогащенной ^{18}O , в области молекулярных ионов наблюдаются 4 пика с массовыми числами 224, 225, 226 и 227 (отношение интенсивности 85 : 15 : 100 : 15; пики 225 и 227 соответствуют изотопным ионам, содержащим ^{13}C и ^{15}N). Соотношение линий m/e 224 и 226 указывает на то, что обогащение составляет не менее 54%. В то же время теоретическое содержание изотопа ^{18}O должно было составить $86,5 \cdot 0,96 = 83\%$. Следовательно, некоторое количество кислорода поступает в мочевину из $H_2^{16}O$. Это свидетельствует о протекании побочных реакций с участием $H_2^{16}O$ — прямой гидратации DCC, катализируемой кислотой, аналогично исследованной в работе [8] при частичном гидролизе промежуточной О-фосфорилизомочевины по С—О-связи. Обмен исходного эфира с $H_2^{18}O$ и последующая реакция с DCC в присутствии $H_2^{16}O$ проводились в идентичных условиях, поэтому любой из этих процессов может протекать в равной мере в обоих случаях. Степень обмена описанным выше методом должна быть несколько ниже расчетной.

Согласно результатам опытов, кислород в мочеvine получается в основном непосредственно от фосфатного остатка, что является веским доводом в пользу образования промежуточного соединения, содержащего С—О—Р-связи в соответствии с предполагаемой структурой О-фосфорилизомочевины.

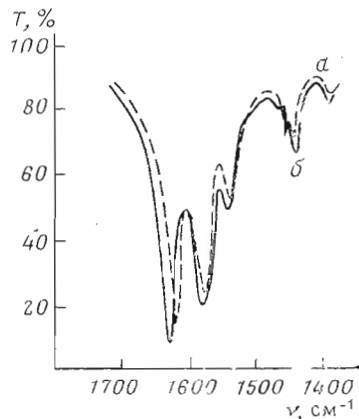


Рис. 2. ИК-спектры: *a* — дициклогексилмочевины, *b* — $[^{18}O]$ дициклогексилмочевины

Экспериментальная часть

Масс-спектры записывали на приборе AEI MS 902 (Англия) при энергии ионизирующих электронов 70 эВ, токе эмиссии 100 мкА, температуре ионизационной камеры 100° (система прямого ввода), ускоряющем напряжении 8 кВ. ИК-спектры записывали на спектрофотометре UR-20 (Carl Zeiss, ГДР). Образцы запрессовали в таблетки из KBr (2 : 800). В работе использовали воду, на 86,5% обогащенную кислородом ^{18}O . 3'-О-Ацетилтимидин-5'-фосфат получен по методике работы [9].

В качестве растворителя при проведении реакций использовали абсолютный пиридин с содержанием воды не более 0,05%.

Монофенилфосфорная кислота синтезирована по описанной методике [10]. Т. пл. 94—98°.

Получение монофенилфосфорной кислоты, меченной ^{18}O . К 10 мл пиридинового раствора, содержащего 1,24 г (6 ммоль) дициклогексилкарбодимида, добавляли 0,1 г (0,6 ммоль) фенилфосфорной кислоты, растворенной в 1 мл H_2^{18}O . Реакционную смесь оставляли при 20° на 24 ч. Полноту гидратации ДСС контролировали по исчезновению интенсивной полосы поглощения при 2140 cm^{-1} в его ИК-спектре. Выделившиеся кристаллы мочевины фильтровали, промывали 50 мл воды, фильтрат упаривали. Очистку от мочевины проводили повторно. Вес продукта в виде динатриевой соли фенилфосфата 0,11 г (85%). ИК-спектр приведен на рис. 1б.

Взаимодействие меченных ^{18}O эфиров фосфорной кислоты с дициклогексилкарбодимидом. а) К 54 мг (0,3 ммоль) [^{18}O]фенилфосфорной кислоты, полученной вышеописанным способом, добавляли 6 мл пиридина, 0,3 ммоль ДСС и 1 мл H_2^{18}O . Через несколько суток мочевины отфильтровывали, промывали водой и анализировали методами ИК- и масс-спектрометрии. ИК-спектр полученного продукта в области 1700—1400 cm^{-1} приведен на рис. 2.

б) К 206 мг (0,465 ммоль) пиридиниевой соли d(pT)Ac добавляли 1,5 мл воды, обогащенной на 86,5% изотопом ^{18}O , и раствор 1,882 г (9,12 ммоль) ДСС в 15 мл пиридина. Через 24 ч кристаллическую дициклогексилмочевину отделяли фильтрованием, раствор упаривали, добавляли воду и повторяли очистку от мочевины несколько раз. К меченому ^{18}O нуклеотиду добавляли 7 мл пиридина, 1,5 мл H_2^{18}O и 0,33 ммоль ДСС. Через несколько суток выделившуюся дициклогексилмочевину отделяли и анализировали. ИК- и масс-спектры дициклогексилмочевины, полученной методами а и б, совпадают.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корана Г. (1964) Новые направления в химии биологически важных эфиров фосфорной кислоты, «Мир», М.
2. Smith M., Moffatt J. G., Khorana H. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 6204—6212.
3. Коробейничева И. К., Кривоусова Е. Д., Миргородская О. А. (1969) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 2, вып. 1, 115—120.
4. Бабкина Г. Т., Кнорре Д. Г., Оленчик Л. Г. (1972) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 2, вып. 1, 120—127.
5. Бабкина Г. Т., Кнорре Д. Г. (1973) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 14, вып. 6, 74—80.
6. Thomas L. C. (1974) Interpretation of the infrared spectra of organophosphorus compounds, «Heyden» London.
7. Stewart R., Muenster L. J. (1961) Can. J. Chem., 39, 401—409.
8. Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Мушинская Г. С., Сайкович Е. Г. (1967) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, вып. 3, 137—140.
9. Gilham P. T., Khorana H. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 6212—6222.
10. Freeman H. F., Colven C. W. (1938) J. Amer. Chem. Soc., 60, 750—751.

Поступила в редакцию
26.X.1976

После доработки
1.XII.1976

INTRODUCTION OF ^{18}O INTO PHOSPHATE GROUPS OF PHOSPHORIC ACID
ESTERS UPON ESTER-CATALYZED HYDRATION OF
DICYCLOHEXYLCARBODIIMIDE

BRASLAVSKY B. I., ZARYTOVA V. F., KNORRE D. G.,
KOROBENICHEVA I. K., KURBATOV V. A.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Division of
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

It was shown that in the course of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) interaction with phenylphosphate and 3'-O-acetylthymidine 5'-phosphate (pT-Ac) in the mixture of pyridine and H_2^{18}O (10 : 1) at 20° , the oxygen exchange occurs between water and phosphate group of phenylphosphate and pT-Ac. In reaction of ^{18}O -labelled phenylphosphate or pT-Ac with DCC in the pyridine — H_2^{18}O mixture, the predominant portion of oxygen in dicyclohexylurea formed is derived from the ester phosphate group. The data obtained indicate that phosphoric ester-catalyzed hydration of DCC proceeds via an intermediate containing P—O—C bond.
