



УДК 547.915.5+547.953.

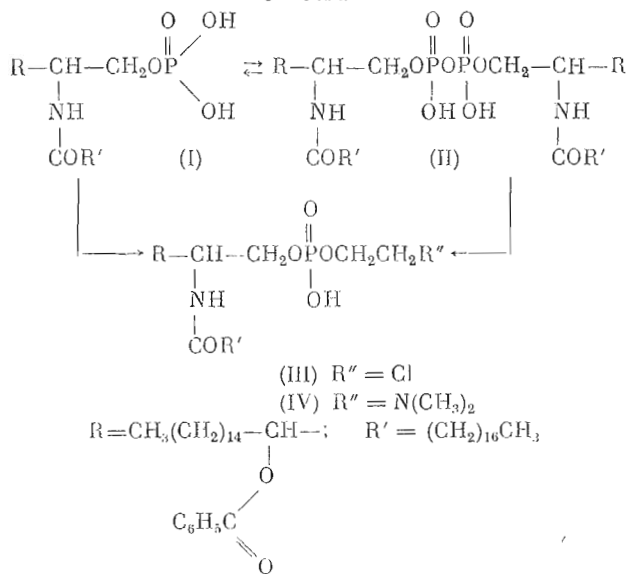
**ИЗУЧЕНИЕ ПУТИ СИНТЕЗА СФИНГОФОСФОЛИПИДОВ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ТРИИЗОПРОПИЛБЕНЗОЛСУЛЬФОХЛОРИДА***Карышев И. И., Бушев А. С., Василенко И. А.,
Звоноква Е. Н., Евстигнев Р. П.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Установлено, что при действии триизопропилбензолсульфохлаорида на 3-бензоилцерамид-1-фосфат в определенных условиях образуется Р,Р'-бис(3-бензоилцерамид-1-)пирофосфат, который далее может быть использован для построения диэфиров фосфорной кислоты заданной структуры. Изучены свойства этого пирофосфата и показана возможность применения спектроскопии ^{31}P -ЯМР для идентификации орто- и пирофосфатов в ряду сфингофосфолипидов.

Триизопропилбензолсульфохлаорид (TPS), широко используемый для создания межнуклеотидной связи [1], в последнее время применяется и в химии фосфолипидов [2, 3]. Так, ранее нами была описана реакция образования диметиламинового предшественника сфингомилина из 3-бензоилцерамидфосфата (I) и диметиламиноэтанола в присутствии TPS [3], а также осуществлен синтез церамидфосфоглицерина [4] и церамидфосфоаминопропандиола [5] с использованием того же метода. При обработке реакционной массы мы в некоторых случаях выделяли наряду со следами исходного фосфата (I) соединение, по данным ИК-спектра и элементного анализа, близкое к исходному, но отличающееся от него хроматографически. Мы предположили, что выделенное нами соединение является симметричным дизамещенным пирофосфатом (II), образующимся в качестве побочного вещества при активации фосфатной группы конденсирующим агентом по известному механизму [6-8].

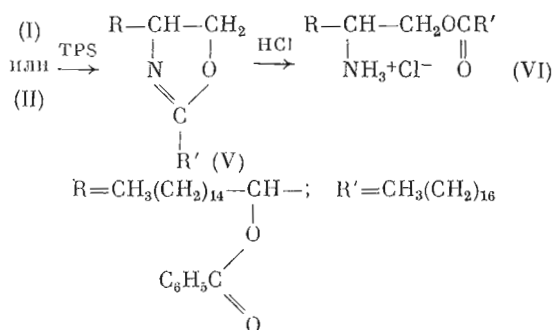
В связи с этим был осуществлен направленный синтез пирофосфата (II) (схема 1) взаимодействием рацемического 3-бензоилцерамид-1-фосфата (I) с 0,6 экв. TPS в пиридине. Некоторый избыток конденсирующего агента по сравнению с теоретически необходимыми (0,5 моль TPS на 1 моль фосфата) требуется, по-видимому, для связывания следов воды в веществе и растворителе. Полученный таким образом Р,Р'-бис(3-бензоилцерамид-1-)пирофосфат по своим физическим свойствам, спектральным характеристикам и хроматографической подвижности оказался идентичным соединению, выделенному нами ранее при синтезе диэфиров. Его поведение в химических реакциях, а также данные физико-химического анализа подтверждают предложенную структуру (II). В условиях, приводящих к расщеплению пирофосфатной связи [9-11], соединение (II) полностью превращается в исходный фосфат (I). Нами показано, что пирофосфат (II) так же пригоден для синтеза диэфиров, как и соответствующий ему моноэфир фосфорной кислоты (I), что согласуется с характером химического поведения симметричных дизамещенных пирофосфа-

Схема 1



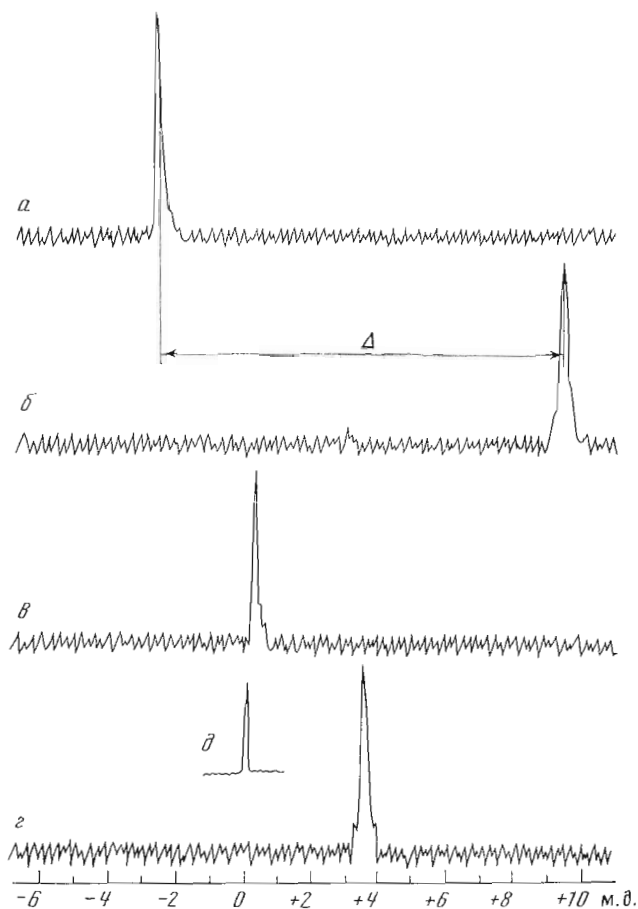
тов [12, 13]. Продукты конденсации P,P'-бис(3-бензоилцерамид-1-)пирофосфата (II) с 2-хлорэтанолом или 2-диметиламиноэтанолом идентичны соответственно 3-бензоилцерамид-1-фосфо-1'-(2'-хлорэтанолу) (III) и 3-бензоилцерамид-1-фосфо-1'-(2'-N,N-диметиламиноэтанолу) (IV) (схема 1), полученным в присутствии TPS из фосфата (I). Во всех случаях конденсация протекает с приблизительно одинаковыми выходами — около 60% (см. также [3–5]). Меньшие выходы диэфиров, получаемых конденсацией фосфата (I) или пирофосфата (II) со спиртом в присутствии TPS в ряду сфингофосфолипидов, по сравнению с глицерофосфолипидами в значительной степени объясняются образованием оксазолинового производного (V) в момент активации фосфатной группы [14] (схема 2).

Схема 2



Это подтверждается тем, что после обработки реакционной массы соляной кислотой (см. «Эксперим. часть») среди продуктов реакции обнаруживается соединенное, по данным качественных реакций, имеющее свободную аминогруппу, но без фосфата; его хроматографическая подвижность такая же, как у описанного ранее продукта раскрытия оксазолина (V) в кислой среде — 1-стеароил-2-бензоилсфинганина (VI) [14].

ИК-спектр синтезированного пирофосфата (II) имеет характерные полосы поглощения амидной, сложноефирной и фосфатной группировок, что не противоречит предложенной структуре, но и не является очевидным доказательством наличия пирофосфатной связи, поскольку дан-



Спектры ^{31}P -ЯМР соединений: *a* — (I), *b* — (II), *v* — (III), *z* — (IV), *d* — ортофосфат

ный спектр не имеет явных отличий от ИК-спектров 3-бензоилцерамид-1-фосфата (I) [15] и диэфиров (III) и (IV). По данным работы [11], не имеют существенных различий также спектры ПМР фосфата и соответствующего ему пирофосфата. В то же время спектры ^{31}P -ЯМР соединений (I) — (IV) представляют собой синглетные сигналы, значительно отличающиеся друг от друга по химическому сдвигу (рисунок), и данный метод анализа может быть весьма полезен при идентификации сфингофосфолипидов. Фосфат (I) дает сигнал при $-2,5$ м.д., а синтезированный из него пирофосфат (II) — при $9,5$ м.д. ($\Delta=12$ м.д.). Аналогичные данные для фосфатидной и пирофосфатидной кислот представляют соответственно $-6,1$ и $7,8$ м.д. ($\Delta=13,9$ м.д.) [11], а для ацетилтимидин-5'-фосфата и соответствующего ему симметричного пирофосфата $-1,2$ и $10,3$ м.д. ($\Delta=11,5$ м.д.) [7]. Сигналы диэфиров (III) и (IV) расположены между сигналами соединений (I) и (II), при $0,4$ и $3,7$ м.д. соответственно.

При сравнении хроматографического поведения 3-бензоилцерамид-1-фосфата (I) и пирофосфата (II) нами отмечена аналогия с соответствующими глицерофосфолипидами, описанными ранее [11]. По хроматографической подвижности пирофосфат (II) значительно превосходит исходный фосфат (I). Интересно также, что лиловая окраска пятна на ТСХ при опрыскивании реактивом на фосфатную группу, отмеченная для пирофосфатидной кислоты, наблюдается и в случае пирофосфата (II), в противоположность ярко-голубым пятнам, даваемым моноэфиром (I) и диэфирами (III) и (IV).

Экспериментальная часть

Спектры ^{31}P -ЯМР записывали на спектрометре WP-60 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-НС 28 (Bruker-Physik AG, ФРГ) на частоте 24, 28 МГц в смеси хлороформ — метанол — 25% NH_4OH (15:3:0,5) при концентрации веществ 0,2 М. Химические сдвиги приведены относительно 85% H_3PO_4 как внешнего стандарта. Спектры записаны с широкополосным подавлением гетероядерного спин-спинового взаимодействия ^{31}P -{ ^1H }. ИК-спектры сняты на приборе Perkin-Elmer 257 (Англия) в таблетках с КВг. Хроматографический контроль осуществлялся на пластинках Silufol, активированных 2 ч при 110°C , в системе хлороформ — метанол — 25% NH_4OH , 15:5:1. Обнаружение пятен производили опрыскиванием серникозлостным раствором молибдата аммония [16].

гас-3-Бензоилцерамид-1-фосфат (I) получали согласно [15]. R_f 0,19. Аммониевую соль фосфата (I) получали добавлением к эфирному раствору *гас-3-бензоилцерамид-1-фосфата* смеси ацетон — 25% NH_4OH (10:1) и отделением выпавшего осадка, т. пл. $136\text{--}138^\circ\text{C}$. ИК-спектр, см^{-1} : 3300—3000 с, 1720 с, 1650 с, 1550 с, 1415 с, 1280 с, 1180 с, 1120 с, 1070 с, 950 ср. Найдено, %: P 3,89. $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_7\text{P}$. Вычислено, %: P 3,94.

гас-P,P'-бис(3-бензоилцерамид-1-)пирофосфат (II). Раствор 0,49 г (0,65 ммоль) 3-бензоилцерамид-1-фосфата (I) и 0,12 г (0,40 ммоль) TPS в 20 мл пиридина выдерживали 1 ч при 20°C , разбавляли 200 мл влажного эфира, осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток наносили на колонку (120×25 мм) с силикагелем Л 40/100 мкм, суспендированным в смеси хлороформ — метанол — 25% NH_4OH , 15:5:1, вымывая вещество той же смесью. Выход диаммониевой соли (II) 0,42 г (84%), т. пл. $71\text{--}75^\circ\text{C}$ (из ацетона — 25% NH_4OH). R_f 0,67. ИК-спектр, см^{-1} : 3300—3000 с, 1720 с, 1650 с, 1550 с, 1280 с, 1250 с, 1120 с, 1075 с, 950 ср. Найдено, %: C 67,72; H 10,51; N 3,32; P 3,98. $\text{C}_{86}\text{H}_{160}\text{N}_4\text{P}_2\text{O}_{13}$. Вычислено, %: C 67,94; H 10,62; N 3,69; P 4,08. Для получения пирофосфата (II) в виде свободной кислоты раствор 110 мг диаммониевой соли в 10 мл смеси хлороформ — метанол — вода (15:5:1) перемешивали 10 мин с даэксом 50W в H^+ -форме, смолу отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток перекристаллизовывали из хлороформа — метанола. Выход 90 мг, т. пл. $83\text{--}84^\circ\text{C}$. ИК-спектр, см^{-1} : 3500—2500 шир, 3300 с, 1720 с, 1650 с, 1550 с, 1280 с, 1240 с, 1030 с, 970 ср.

гас-3-Бензоилцерамид-1-фосфо-1'-(2'-хлорэтанола) (III). а) Раствор 0,85 г (0,55 ммоль) диаммониевой соли пирофосфата (II), 1,00 г (3,3 ммоль) TPS и 0,18 г (2,2 ммоль) 2-хлорэтанола в 40 мл пиридина выдерживали 3,5 ч при 20°C , добавляли 2 мл воды, через 30 мин разбавляли реакционную массу 500 мл эфира, промывали 3 н. соляной кислотой и водой, затем упаривали. Остаток растворяли при кипении в 20 мл эфира, оставляли на 20 ч при 5°C , выпавший осадок отфильтровывали и сушили. Выход 0,49 г (56%), т. пл. $97\text{--}98^\circ\text{C}$ (из хлороформа — ацетона). R_f 0,77. ИК-спектр, см^{-1} : 3300 с, 1720 с, 1650 с, 1550 с, 1270 с, 1245 с, 1120 с, 1110 с, 1050 с. Лит. данные [17]: т. пл. $97\text{--}98^\circ\text{C}$.

б) Раствор 0,50 г (0,67 ммоль) фосфата (I), 0,61 г (2,01 ммоль) TPS и 0,11 г (1,34 ммоль) 2-хлорэтанола в 30 мл пиридина выдерживали 5 ч при 20°C , добавляли 1 мл воды и далее обрабатывали, как указано выше. Выход 0,33 г (59%). R_f 0,77.

гас-3-Бензоилцерамид-1-фосфо-1'-(2'-N,N-диметиламиноэтанола) (IV). а) Раствор 0,26 г диаммониевой соли пирофосфата (II), 0,41 г TPS и 0,08 мл диметиламиноэтанола в 15 мл пиридина выдерживали 8 ч при 14°C и обрабатывали далее как описано ранее [3]. Выход 0,17 г (61%), т. пл. $90\text{--}92^\circ\text{C}$. R_f 0,64. ИК-спектр, см^{-1} : 3300 шир, 1730 с, 1650 с, 1550 с, 1220 с, 1070 шир. Лит. данные [3]: т. пл. $91\text{--}92,5^\circ\text{C}$.

б) Методика получения диэфира (IV) из фосфата (I) приведена в [3].

Расщепление пирофосфата (II). а) Раствор 0,33 г аммониевой соли

(II) в 20 мл пиридина и 5 мл уксусного ангидрида выдерживали 20 ч при 20° С, добавляли 10 мл воды и оставляли на 16 ч. Реакционную массу разбавляли 250 мл эфира, органический слой промывали 3 н. соляной кислотой, водой, упаривали досуха, остаток растворяли в 5 мл эфира и высаживали аммониевую соль фосфата (I) смесью ацетон—25% NH₄OH, 10:1. Выход 0,30 г (91%).

б) К раствору 0,15 г аммониевой соли (II) в 10 мл тетрагидрофурана и 2 мл воды добавляли 3 капли концентрированной соляной кислоты, кипятили 6 ч, упаривали, остаток растворяли в 100 мл эфира, промывали водой, вновь упаривали до объема 3 мл и высаживали аммониевую соль фосфата (I). Выход 0,12 г (80%).

в) Аналитический образец аммониевой соли пиррофосфата (II) в смеси 2 мл пиридина и 0,2 мл воды нагревали 10 ч при 100° С. Хроматографический контроль показал полное превращение пиррофосфата (II) в фосфат (I).

ЛИТЕРАТУРА

1. Михайлов С. Н., Флорентьев В. Л. (1976) Биоорган. химия, 2, 1293—1316.
2. Lammers J. G., Van Boom J. H. (1977) Rec. trav. chim., 98, 216—218.
3. Звонкова Е. Н., Мицнер Б. И., Бушнев А. С., Орлова Е. Г., Крушина Г., Маркина Н. Н., Талагаева С. В., Евстигнеева Р. П. (1975) Биоорган. химия, 1, 1746—1754.
4. Бушнев А. С., Карпышев Н. Н., Ульяшин В. В., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. (1979) Биоорган. химия, 5, 234—237.
5. Карпышев Н. Н., Бушнев А. С., Полстянов А. Е., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. (1979) Биоорган. химия, 5, 238—241.
6. Smith M., Khorana H. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 1141—1145.
7. Knorre D. G., Lebedev A. N., Levina A. S., Rezvukhin A. J., Zarytova V. F. (1974) Tetrahedron, 30, 3073—3079.
8. Adamiak R. W., Biala E., Grześkowiak K., Kierzek R., Kraszewski A., Markiewicz W. T., Okupniak J., Stawiński J., Wiórowski M. (1978) Nucleic Acids Res., 5, 1189—1904.
9. Van Vazer J. R., Griffith E. J., McCullough J. F. (1955) J. Amer. Chem. Soc., 77, 287—291.
10. Khorana H. G., Vizsolyi J. P., Ralph R. K. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 414—418.
11. Itoh T., Kaneko H. (1974) J. Biochem., 75, 1291—1300.
12. Cramer F., Scheit K.-H., Baldauf H.-F. (1962) Chem. Ber., 95, 1657—1663.
13. Weimann G., Khorana H. G. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 4329—4341.
14. Бушнев А. С., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. (1971) Ж. орган. химии, 7, 2313—2316.
15. Бушнев А. С., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. Авт. свидетельство СССР № 598905. Бюлл. изобретений № 11 (1978).
16. Dittmer J. C., Lester R. L. (1964) J. Lipid Res., 5, 126—127.
17. Звонкова Е. Н., Мицнер Б. И., Бушнев А. С., Эллер К. И., Солдатова С. А., Евстигнеева Р. П. (1974) Химия природн. соед., 553—558.

Поступила в редакцию
30.I.1979

После доработки
2.III.1979

A STUDY ON THE SYNTHETIC ROUTE TO SPHINGOLIPIDS INVOLVING TRISOPROPYLBENZENESULPHONYL CHLORIDE

KARPYSHEV N. N., BUSHNEV A. S., VASILENKO I. A.,
ZVONKOVA E. N., EVSTIGNEEVA R. P.

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

It was shown that from 3-benzoylceramide-1-phosphate in the presence of triisopropylbenzenesulphonyl chloride, under certain condition, the formation of P,P'-bis(3-benzoylceramide-1)-pyrophosphate takes place. The latter may prove useful for synthesizing the phosphodiester of a desired structure. The properties of this pyrophosphate were investigated and the potentialities of ³¹P NMR for identifying ortho- and pyrophosphates in the sphingophospholipid series were demonstrated.