



УДК 547.785.5'781'792'.791.8 + 547.913.3'455.623'418

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ N,N'-КАРБОНИЛБИСАЗОЛОВ
ДЛЯ СИНТЕЗА ПОЛИПРЕНИЛПИРОФОСФАТСАХАРОВБелоусова З. П., Пурыгин П. П., Данилов Л. Л.*,
Шибасев В. Н*.*Куйбышевский государственный университет;***Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва*

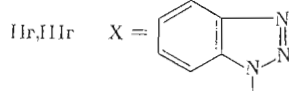
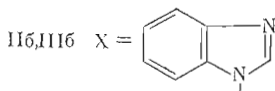
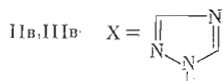
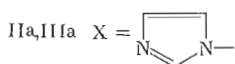
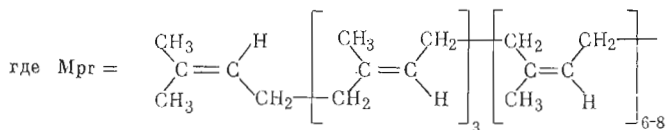
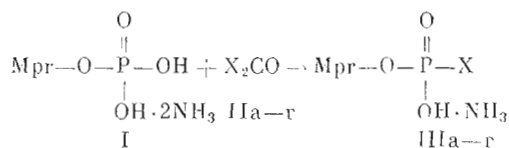
Исследована возможность применения N,N'-карбонилбисазолов — производных имидазола, 1,2,4-триазола, бензимидазола и бензотриазола — для синтеза полипренилпирофосфатсахаров. Показано, что скорость образования соответствующих морапсенилфосфазолидов из морапсенилфосфата и N,N'-карбонилбисазолов зависит от природы остатка азола и может быть увеличена прибавлением N-метилимидазола, при реакции морапсенилфосфата с карбонилбистриаолом и карбонилбисбензотриаолом образуется ряд побочных продуктов. Морапсенилфосфазолиды взаимодействием с α -D-глюкопиранозилфосфатом превращены в морапсенилпирофосфат- α -D-глюкопиранозу.

Полипренилпирофосфатсахара — важные промежуточные соединения при биосинтезе углеводсодержащих цепей сложных биополимеров бактерий [1]. Химический синтез этих соединений обычно осуществляют из активированного производного полипренилфосфата и гликозилфосфата, свободного или с ацилированными гидроксигруппами остатка сахара. Наилучшие результаты при этом достигаются при использовании фосфоимидазолидного метода синтеза, разработанного в Институте органической химии АН СССР [2—11]; в этом методе для превращения полипренилфосфата в полипренилфосфоимидазолид используется неустойчивый сульфенилбисимидазол.

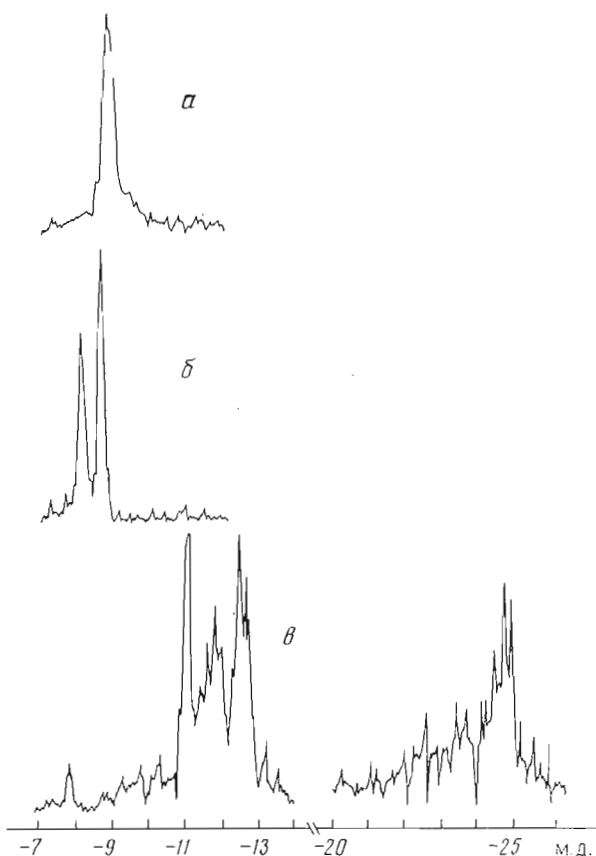
Недавно мы сообщили, что карбонилбисазолы — производные 1,2,4-триазола, бензимидазола и бензотриазола — могут быть с успехом использованы для превращения нуклеозид-5'-фосфатов в соответствующие нуклеозид-5'-фосфазолиды, которые были применены далее для синтеза нуклеозиддифосфатсахаров [12]. Цель настоящей работы — исследование возможности синтеза полипренилпирофосфатсахаров с помощью упомянутых выше карбонилбисазолов, а также карбонилбисимидазола. Некоторые результаты, описанные в данной статье, были в краткой форме упомянуты в предварительном сообщении [13].

В качестве полипренильного компонента мы использовали морапсенилфосфат (I), получаемый фосфорилированием морапсенола (α -ненасыщенного полипренола из листьев шелковицы) [14].

Активацию аммониевой соли морапсенилфосфата N,N'-карбонилбисазолами изучали при 20° С в среде абсолютного тетрагидрофурана (ТНФ) при добавлении 3 экв. реагента. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ; после завершения реакции реакцию смесь исследовали с помощью спектроскопии ³¹P-ЯМР. При обработке фосфата морапсенола карбонилбисимидазолом (IIa) через 1 ч наблюдалось полное исчезновение исходного соединения (R_f 0,45) и образование нового соединения с R_f 0,70. Спектр ³¹P-ЯМР (рисунок, а) содержал единственный сигнал при —8,9 м.д. (ТНФ — диметилсульфоксид (DMSO), 1 : 1), что соответствует области моноазолидов фосфомоноэфиров. При реакции с карбонилбисбензимидазолом (IIб) исчезновение морапсенилфосфата, по данным ТСХ, наблюдалось через 6 ч. При этом появлялись вещества, соответствующие по подвижности азолиду (IIб) с R_f около 0,7 и симметричному бис(морапсенил)пирофосфату (R_f 0,55, идентификация с известным образцом).



Спектр ^{31}P -ЯМР в этом случае (растворитель — диоксан¹ — DMSO, 1 : 1)² содержал два сигнала сопоставимой интенсивности при $-8,6$ м.д. (очевидно, соединение (IIIб)) и $-8,2$ м.д. (соответствует химическому сдвигу сигнала симметричного бис(морапсенил)пирофосфата) (рисунок, б). При взаимодействии морапсенилфосфата с карбонилбистриазолом (IIв) и карбонилбисбензотриазолом (IIг) наблюдаемая картина значительно отличалась. В первом случае уже через 30 мин ТСХ показала исчезновение



Спектры ^{31}P -ЯМР реакционных смесей взаимодействия фосфата морапсенила (I): а — с N,N'-карбонилбисимидазолом (IIa); б — с N,N'-карбонилбисбензимидазолом (IIб) в отсутствие N-метилимидазола; в — с N,N'-карбонилбистриазолом (IIв)

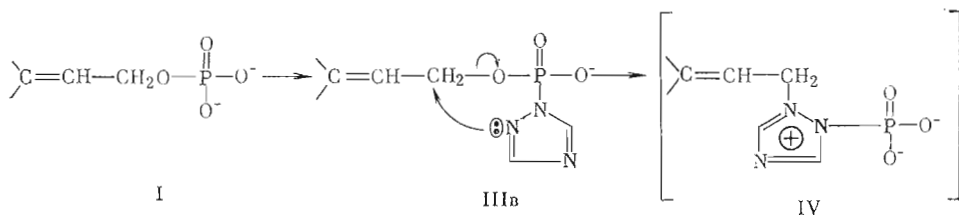
**Активация морапренилфосфата и синтез
морапренилпирофосфатглюкозы**

| Активация морапренилфосфата (ТНФ) | | Пирофосфатный синтез | |
|---|----------------------------------|---|---------------|
| Активирующий агент, моль N-метилимидазола на 1 моль (I) | Время полного превращения (I), ч | Дополнительное количество N-метилимидазола, моль/моль (I) | Выход (VI), % |
| (IIa); 0 | 1 | 0 | 47 |
| (IIб); 0 | 6 | — | — |
| 6 | 3,5 | 0 | 44 |
| | | 12 | 48 |
| 12 | 2 | — | — |
| (IIв); 0 | 0,5 | — | — |
| (IIг); 0 | 2,5 | — | — |
| 6 | 1 | 0 | 12 |
| | | 12 | 28 |
| 12 | 0,5 | — | — |

исходного вещества и наличие в реакционной смеси помимо целевого азотида ряда более полярных фосфорсодержащих продуктов и менее полярных производных пренола, не содержащих фосфата. При анализе реакционной смеси методом ^{31}P -ЯМР в спектре наблюдался ряд сигналов в области $-10 \div -13$ и $-20 \div -24$ м.д. (рисунок, в). Наличие сильнополярных сигналов в спектре указывает на присутствие в смеси (в дополнение к азотиду и симметричному пирофосфату) производных триполифосфорной и триметафосфорной кислоты [15, 16]. Подобная картина наблюдалась при реакции морапренилфосфата с карбонилбисбензотриазолом (IIг) через 2,5 ч и при взаимодействии карбонилбисазолов (IIв) и (IIг) с фарнезилфосфатом.

Как видно из таблицы, скорость превращения морапренилфосфата при реакции с карбонилбисазолами убывает, как и при активации нуклеозид-5'-фосфатов, в ряду (IIв) > (IIа) > (IIг) > (IIб), соответствующем убыванию положительного заряда на атоме углерода С=О-группы [17]. Аналогичный ряд реакционной способности наблюдали и при проведении реакции в других растворителях — хлороформе и диоксане. В последнем случае скорость реакции уменьшалась в 2—3 раза; оба растворителя менее удобны, чем ТНФ, из-за ограниченной растворимости в них карбонилбисазолов (IIв) и (IIг).

Существенное различие между активацией нуклеотидов и полипренилфосфатов под действием карбонилбисазолов состоит в том, что в последнем случае проведение реакции с производными триазола и бензотриазола сопровождается значительными побочными процессами, связанными с расщеплением полипренилфосфатной связи. Можно предполагать, что такое расщепление происходит за счет внутримолекулярной нуклеофильной атаки α -атома азота остатка гетероцикла на аллильный атом углерода, как это показано на следующей схеме для производного триазола:

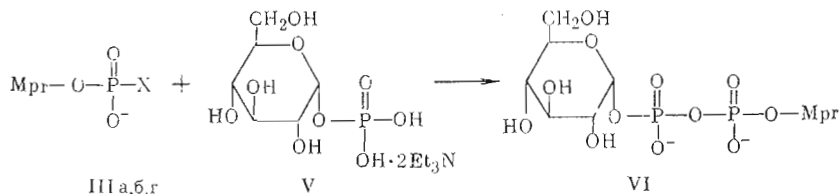


Возникающее в результате такой атаки производное (IV) должно являться активной фосфорилирующей частицей, и его взаимодействие с присутствующим в реакционной смеси исходным фосфатом (I) должно приводить к производным пиро-, а затем трифосфатов, сигналы которых

наблюдаются в спектре ^{31}P -ЯМР реакционной смеси. Таким образом, предпочтительными реагентами для активации полипренилфосфатов являются карбонилбисазолы (IIa) и (IIб) — производные имидазола и бензимидазола, при использовании которых конденсированных фосфатов не образуется.

Реакция полипренилфосфатов с карбонилбисазолами в случае производных бензимидазола и бензотриазола так же, как и в случае активации нуклеозидфосфатов [12], ускоряется при введении в реакционную смесь избытка *N*-метилимидазола (таблица). Так, при активации морапренилфосфата *N,N'*-карбонилбисбензимидазолом в присутствии 12 моль *N*-метилимидазола на 1 моль соединения (I) скорость реакции увеличивается приблизительно в 3 раза. В этом случае в спектре ^{31}P -ЯМР присутствует лишь единственный сигнал при $-8,69$ м.д. (диоксан — DMSO , 1 : 1), соответствующий морапренилфосфобензимидазолу. В присутствии *N*-метилимидазола ускоряется и взаимодействие морапренилфосфата с *N,N'*-карбонилбисбензотриазолом. При этом, по данным ТСХ и ^{31}P -ЯМР, реакционная смесь содержит относительно меньшее количество побочных продуктов.

Далее мы изучили взаимодействие морапренилфосфазолидов (IIIa), (IIIб) и (IIIг) с α -*D*-глюкопиранозилфосфатом (V). Ввиду их неустойчивости пирофосфатный синтез проводили без предварительной очистки фосфазолидов, т. е. после проведения активации полипренилфосфата соответствующим карбонилбисазолом, разложения избытка реагента метанолом и удаления растворителя остаток обрабатывали 2 экв. бис(триэтиламмониевой) соли α -*D*-глюкопиранозилфосфата.



Реакцию проводили в смеси THF — DMSO (1 : 1) в течение 17 ч при 37°C , продукты разделяли с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе. Как видно из результатов, представленных в таблице, полипренилпирофосфатсахар может быть получен с выходом 44—48% при использовании производных (IIIa) и (IIIб), при этом добавление *N*-метилимидазола не оказывает существенного влияния на выход реакции. При использовании производного бензотриазола (IIIг) выход полипренилпирофосфатсахара заметно ниже, что может быть следствием как неполного протекания синтеза фосфазолида, так и его пониженной реакционной способности [12]. В этом случае введение *N*-метилимидазола заметно увеличивает выход продукта пирофосфатного синтеза (механизм его влияния, вероятно, аналогичен предложенному для синтеза нуклеозиддифосфатсахаров [12]).

Морапренилпирофосфатглюкоза (VI), полученная в этих опытах, была идентична по ТСХ заведомому образцу соединения, полученному с применением сульфинилдиимидазола [2]. Строение соединения (VI) подтверждено с помощью методов, обычно применяемых для доказательства строения полипренилпирофосфатсахаров (см. [2]): отношение морапренил — кислотолabileный фосфат ($P_{\text{кл}}$) было найдено близким к 1 : 2, при обработке 40% водным фенолом (10 мин, 70°C) образуется α -*D*-глюкопиранозилпирофосфат, а при действии водного аммиака (40 мин, 20°C) — морапренилфосфат и 1,2-циклофосфат сахара.

Полученные результаты показывают, что *N,N'*-карбонилбисимидазол и *N,N'*-карбонилбисбензимидазол (последний в сочетании с *N*-метилимидазолом) могут служить удобными реагентами для синтеза полипренилпирофосфатсахаров с ненасыщенным α -изопреновым звеном.

Экспериментальная часть

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках (2×6 см) с силикагелем 60 (Merck) в системе хлороформ — метанол — вода (60 : 25 : 4), непрелетные соединения обнаруживали парами йода, а фосфаты — реактивом [18] с последующим прокаливанием пластинки. Электрофорез проводили на бумаге FN-11 в 0,05 М ТЕАВ (рН 7,5), обнаруживая фосфаты реагентом [19] и определяя электрофоретическую подвижность относительно α -D-глюкопиранозилфосфата ($E_{\text{ГЛСР}}$). Анионообменную хроматографию проводили на колонке ($1,2 \times 7$ см) с DEAE-целлюлозой DE-52 (OAc⁻) (Whatman), уравновешенной смесью хлороформ — метанол (2 : 1); образец наносили в 30 мл этой же смеси растворителей, промывали колонку 30 мл указанной смеси, 30 мл метанола и элюировали линейным градиентом уксусной кислоты в метаноле (0—0,1 М, рН 7,0, по 60 мл, 36 мл/ч), собирая фракции объемом 4 мл. Аналитические методики, фенольных и аммиачный гидролиз описаны в работе [2].

Спектры ^{31}P -ЯМР снимали на приборе Bruker AM-300 (121,5 МГц) с 85% H_3PO_4 в качестве внешнего стандарта, химические сдвиги (δ) приведены в миллионных долях, константы спин-спинового взаимодействия (J) — в герцах. Бис(триэтиламмониевую) соль α -D-глюкопиранозилфосфата получали пропусканьем водного раствора дикалиевой соли через колонку с избытком дауэкса 50W \times 8 (H^+), прибавлением к элюату избытка триэтиламина, упариванием и многократной отгонкой этанола и бензола с последующей двукратной лиофилизацией из абс. бензола, прибавленного к раствору бис(триэтиламмониевой) соли в небольшом количестве метанола. N,N'-карбонилбисазола (IIa—г) получали из соответствующих N-метилимидазолов и фосгена в бензольном растворе по методике, использованной в работе [20] для синтеза N,N'-тиокарбонилбисимидазола.

Взаимодействие морапренилфосфата (I) с N,N'-карбонилбисазолами (IIa—г).

А. Реакция с N,N'-карбонилбисимидазолом (IIa). 10 мкмоль морапренилфосфата (I) [14] (R_f 0,45) лиофильно высушивали из бензола, растворяли в 0,2 мл абс. THF и прибавляли 30 мкмоль N,N'-карбонилбисимидазола (IIa). Образующийся морапренилфосфимидазол (IIIa) имеет R_f 0,70, сигнал в спектре ^{31}P -ЯМР (THF — DMSO, 1 : 1) при —8,9.

Б. Реакцию морапренилфосфата (I) с N,N'-карбонилбисбензимидазолом (IIб) проводили в условиях опыта А в присутствии 6 или 12 моль N-метилимидазола на 1 моль соединения (I). В отсутствие N-метилимидазола образовывались два продукта с R_f 0,70 и 0,55 (спектр ^{31}P -ЯМР (диоксан — DMSO, 1 : 1): —8,6 и —8,2), а в присутствии 12 моль N-метилимидазола на 1 моль соединения (I) — только продукт (IIIб), R_f 0,70, δ_p —8,69.

В. Реакцию соединения (I) с N,N'-карбонилбистриазолом (IIв) проводили в условиях опыта А, получали смесь продуктов с R_f 0,95; 0,70; 0,55; 0,45; 0,15; 0,00, спектр ^{31}P -ЯМР (THF — DMSO, 1 : 1): мультиплеты в области —10 ÷ —13 и —20 ÷ —24 (рисунок, в).

Г. Реакцию (I) с N,N'-карбонилбисбензотриазолом (IIг) проводили как в опыте Б. В отсутствие N-метилимидазола образовывались продукты с R_f 0,95; 0,75; 0,65; 0,15 и 0,00, в присутствии N-метилимидазола — с R_f 0,75 и 0,65.

Д. Реакцию фарнезилфосфата с N,N'-карбонилбистриазолом (IIв) проводили, исходя из 26 мкмоль фарнезилфосфата [21], R_f 0,20, и 72 мкмоль N,N'-карбонилбистриазола (IIв) в течение 0,5 ч в условиях опыта А. Получали смесь продуктов с R_f 0,95; 0,80; 0,55; 0,25; 0,20; 0,10 и 0,00. Спектр ^{31}P -ЯМР (THF): мультиплеты в области —10 ÷ —12, —14 ÷ —16 и —20 ÷ —25.

Е. Реакцию фарнезилфосфата с N,N'-карбонилбисбензотриазолом (IIг) проводили, исходя из 10 мкмоль фарнезилфосфата и 30 мкмоль N,N'-карбонилбисбензотриазола в присутствии 0 или 12 моль N-метилимидазола на 1 моль фарнезилфосфата. Через 2 ч при 20° С в смеси присутствовали продукты с R_f 0,97; 0,82; 0,55; 0,25; 0,20; 0,10 и 0,00, спектр ^{31}P -ЯМР (THF): 2,42, —1,45, мультиплеты в области —9 ÷ —12, —19 ÷ —23. При проведении той же реакции в присутствии 12 моль N-метилимидазола на 1 моль фарнезилфосфата образуется смесь продуктов с R_f 0,98; 0,55; 0,23. Спектр ^{31}P -ЯМР (THF): —9,08, —10,50, —14,00, —19,80.

P¹-Морапренил-P²-(α -D-глюкопиранозил)пирофосфат (VI). Реакционную смесь, полученную при использовании N,N'-карбонилбисазола (IIa), (IIб) или (IIг), обрабатывали 15 мкл метанола и через 15 мин упаривали досуха в вакууме масляного насоса. К остатку прибавляли раствор 20 мкмоль бис(триэтиламмониевой) соли α -D-глюкопиранозилфосфата (V) в 0,6 мл смеси абс. THF — абс. DMSO, 1 : 1, и встряхивали до полного растворения. Содержимое колбы разделяли на две равные части (по 0,3 мл), в первую из которых N-метилимидазол не добавляли, а во вторую прибавляли 12 моль (на 1 моль соединения (I)) N-метилимидазола. Смеси выдерживали 17 ч при 37° С, прибавляли смесь хлороформ — метанол, 2 : 1, и подвергали анионообменной хроматографии как описано выше. Соединение (VI) элюировалось во фракциях 17—24, R_f 0,20, соотношение морапренол — $P_{\text{кл}}$ 1 : 1,84 (из IIa), 1 : 1,91 (из IIб), 1 : 1,91 (из IIг) (теор. 1 : 2), выходы указаны в таблице.

При фенольной деградации соединения (VI) образуется α -D-глюкопиранозилпирофосфат, $E_{\text{ГЛСР}}$ 0,80, при аммиачной — 1,2-циклофосфат α -D-глюкопиранозы, $E_{\text{ГЛСР}}$ 0,65, и морапренилфосфат, R_f 0,45.

1. *Shibaev V. N.* // *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1986. V. 44. P. 277—339.
2. *Danilov L. L., Maltsev S. D., Shibaev V. N., Kochetkov N. K.* // *Carbohydr. Res.* 1981. V. 88. № 2. P. 203—211.
3. *Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шибаев В. Н., Кочетков Н. К.* // *Биооргани. химия.* 1981. Т. 7. № 11. С. 1718—1722.
4. *Данилов Л. Л., Мальцев С. Д., Шибаев В. Н., Кочетков Н. К.* // *Биооргани. химия.* 1982. Т. 8. № 1. С. 109—113.
5. *Мальцев С. Д., Юрченко Н. Н., Данилов Л. Л., Шибаев В. Н.* // *Биооргани. химия.* 1983. Т. 9. № 8. С. 1097—1100.
6. *Торгов В. И., Шибаев В. Н., Кочетков Н. К.* // *Биооргани. химия.* 1984. Т. 10. № 7. С. 946—953.
7. *Торгов В. И., Паносян К. А., Смелянский А. Т., Шибаев В. Н.* // *Биооргани. химия.* 1985. Т. 11. № 1. С. 83—90.
8. *Шабалин Ю. А., Наумов А. В., Вагабов В. М., Кулаев И. С., Данилов Л. Л., Шибаев В. Н.* // *Биооргани. химия.* 1985. Т. 11. № 5. С. 651—654.
9. *Торгов В. И., Паносян К. А., Шибаев В. Н.* // *Биооргани. химия.* 1986. Т. 12. № 4. С. 559—561.
10. *Торгов В. И., Паносян К. А., Шибаев В. Н.* // *Биооргани. химия.* 1986. Т. 12. № 4. С. 562—564.
11. *Данилов Л. Л., Мальцев С. Д., Шибаев В. Н.* // *Биооргани. химия.* 1986. Т. 12. № 7. С. 934—939.
12. *Белоусова Э. П., Пурьгин П. П., Данилов Л. Л., Шибаев В. Н.* // *Биооргани. химия.* 1986. Т. 12. № 11. С. 1522—1529.
13. *Лалетина Э. П., Пурьгин П. П., Данилов Л. Л., Шибаев В. Н.* // *Биооргани. химия.* 1985. Т. 11. № 4. С. 565—566.
14. *Вергунова Г. И., Глухоев И. С., Данилов Л. Л., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К., Гроицкий М. Ф., Усов А. И., Шапков А. С., Шибаев В. Н.* // *Биооргани. химия.* 1977. Т. 3. № 11. С. 1484—1492.
15. *Зарытова В. Ф.* // *Итоги науки и техники. Сер. «Биоорганическая химия».* Т. 4/Ред. Шабарова З. А. М.: ВНИИТИ, 1984. С. 159—162.
16. *Glonck T., van Wazer J. R., Myers T. C.* // *Phosphorus Sulfur.* 1977. V. 3. № 2. P. 137—150.
17. *Павчихин А. В., Пурьгин П. П.* // *Строение и свойства молекул/Ред. Терентьев В. А.* Изд-во Куйбышевского гос. ун-та, 1983. С. 110—115.
18. *Vaskovsky V. E., Kostelsky E. Y., Vasendin I. M.* // *J. Chromatogr.* 1975. V. 114. № 1. P. 129—141.
19. *Hanes C. J., Isherwood F. A.* // *Nature.* 1949. V. 164. № 4183. P. 1107—1109.
20. *Pullukat T. J., Urry G.* // *Tetrahedron Lett.* 1967. № 21. P. 1953—1954.
21. *Danilov L. L., Shibaev V. N., Kochetkov N. K.* // *Synthesis.* 1984. № 5. P. 404—406.

Поступила в редакцию
3.VII.1987

USE OF N,N'-CARBONYL-BIS-AZOLES FOR SYNTHESIS OF POLYPRENYL PYROPHOSPHATE SUGARS

BELOUSOVA Z. P., PURYGIN P. P., DANILOV L. L.*, SHIBAIEV V. N.*

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

N,N'-Carbonyl-bis-azoles derived from imidazole, benzimidazole, 1,2,4-triazole and benzotriazole were studied as activating reagents for synthesis of polyprenyl pyrophosphate sugars. The rate of moraprenyl phosphoazolidate formation from moraprenyl phosphate and a corresponding carbonyl-bis-azole¹ was found to depend of the structure of the azole residue and may be increased by addition of N-methylimidazole. The reaction with the triazole and benzotriazole derivatives was complicated by side processes. P¹-Moraprenyl-P²-(α -D-glucopyranosyl)pyrophosphate was prepared by the interaction of moraprenyl phosphoazolidates with α -D-glucopyranosyl phosphate.