



УДК 547.426.22'455.623'111*2

© 1994 С. И. Дубовская, М. В. Аникин, В. В. Чупин,
Г. А. Серебrenникова

СИНТЕЗ ДЕЙТЕРОМЕЧЕННЫХ ДИАСТЕРЕОМЕРОВ ГЛЮКОЗИЛДИГЛИЦЕРИДОВ

Московская академия тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Ключевые слова: тиогликозилдиглицериды, гликозилдиглицериды, диастереомеры, дейтеромеченные тиогликозилдиглицериды.

Ацилированием рацемического *S*-(2,3,4,6-тетраацетил- β -*D*-глюкопиранозил)-3-тио-*rac*-глицерина пальмитоилхлоридом, содержащим дейтериевую метку в α -положении, синтезирован 1,2-ди[2-²H₂]пальмитоил-*S*-(2,3,4,6-тетраацетил- β -*D*-глюкопиранозил)-3-тиоглицерин в виде смеси диастереомеров. Разделение диастереомеров достигалось многократной кристаллизацией из метанола. Последующее удаление ацетильных защитных групп приводило к получению 1,2-ди[2-²H₂]пальмитоил-*S*- β -*D*-глюкопиранозил-3-тио-*sn*-глицерина и 2,3-ди[2-²H₂]пальмитоил-*S*- β -*D*-глюкопиранозил-1-тио-*sn*-глицерина.

Глицерогликолипиды, как известно, являются основными мембранными компонентами растительных клеток и микроорганизмов, а также присутствуют в тканях и биологических жидкостях животных [1]. Для выяснения структурообразующих свойств и биологической роли этих соединений в плазматических мембранах проводятся исследования различных модельных систем методами ДСК, рентгеновской дифракции [2, 3] и ²H-ЯМР-спектроскопии [4, 5]. Для исследования с помощью дейтериевого магнитного резонанса необходимы дейтеромеченные соединения.

В данной работе представлены результаты синтеза и выделения стереоизомерных тиоглюкозилдиглицеридов, содержащих дейтериевую метку в α -положении жирнокислотных остатков. Нами применен подход, использованный ранее для синтеза тиоаналогов β -галактозилдиглицеридов [6], позволяющий вводить дефицитные дейтеромеченные жирнокислотные остатки на предпоследней стадии синтеза.

Основная проблема химии глицерогликолипидов — получение стереохимически чистых соединений. Направленные синтезы очень сложны и не исключают частичной рацемизации на некоторых стадиях [7]. Более простым способом является синтез диастереомерной смеси с последующим разделением методом рециклической ВЭЖХ, осуществленный нами ранее для тиогликозидных аналогов галактозилдиглицеридов [6]. Однако этот метод оказался ограниченным, и попытки разделения диастереомерных смесей *O*- и *S*-глюкозилдиглицеридов, *O*-га-

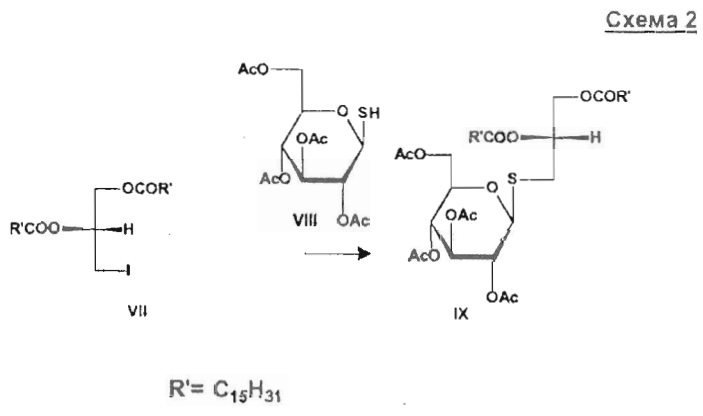
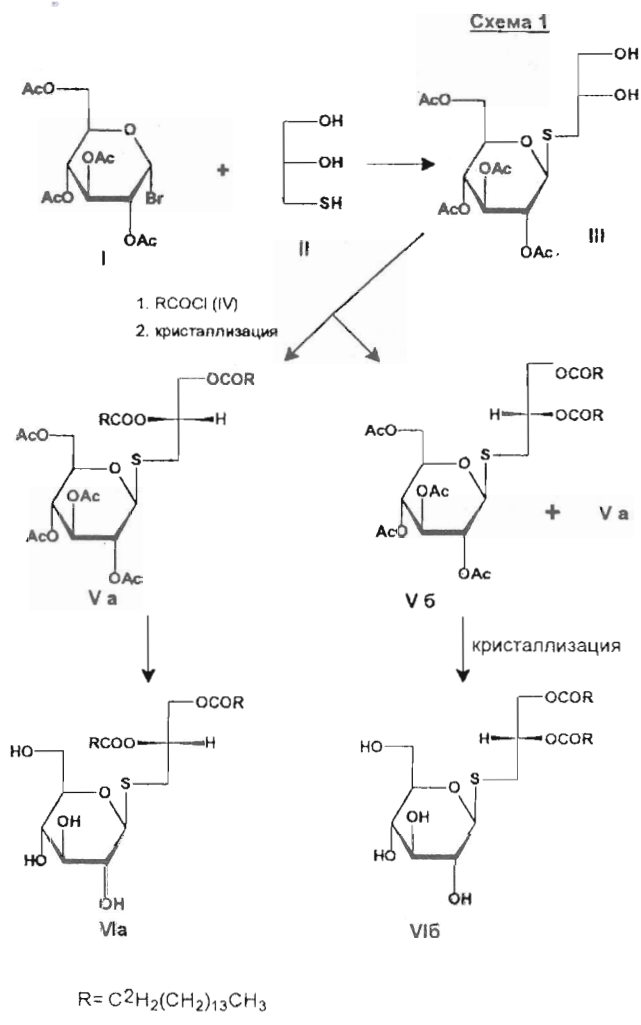
Данные спектров ¹H-ЯМР соединений (III), (Va), (VIa, б), (IX)
 а) Химические сдвиги, м.д.

Номер соед.	Углеводородные цепи				Gго			Gсг						Ацетильные группы
	2	3	4—15	16	1	2	3	1	2	3	4	5	6	
III*					а : 3,51 и 3,54 б : 3,59 и 3,62	3,71— 3,82	а : 2,66 и 2,73 б : 2,83 и 2,91	4,58 и 4,63	4,99	5,22	5,05	3,83 и 3,90	а : 4,12 и 4,13 б : 4,21 и 4,22	1,99, 2,02, 2,05 и 2,08
Va ^{2*}	(2,29) ^{3*}	1,59	1,24	0,86	а : 4,22 б : 4,36	5,23	а : 2,79 б : 2,89	4,56	4,98	5,21	5,06	3,84	а : 4,13 б : 4,22	1,99, 2,01, 2,03 и 2,06
VIa ^{4*}	(2,30) ^{3*}	1,58	1,24	0,86	а : 4,16 б : 4,42	5,27	а : 2,79 б : 2,91	4,39		3,17—3,46			а : 3,71 б : 3,85	
VIb ^{4*}	(2,29) ^{3*}	1,58	1,24	0,86	а : 2,76 б : 2,94	5,23	а : 4,13 б : 4,42	4,39		3,17—3,46			а : 3,69 б : 3,85	
IX ^{2*}	2,29	1,59	1,24	0,86	а : 4,21 б : 4,35	5,23	а : 2,78 б : 2,89	4,56	4,98	5,21	5,06	3,84	а : 4,14 б : 4,24	1,99, 2,01, 2,03 и 2,06

б) Константы спин-спинового взаимодействия, Гц

соед.	Глю	Глиц
III*	$J_{1a,2}$ 7,3 и 5,1; $J_{1b,2}$ 6,9 и 5,1; $J_{1a,1b}$ 13,5 и 14,6; $J_{2,3a}$ 2,9 и 2,6; $J_{2,3b}$ 2,6 и 2,2; $J_{3a,3b}$ 11,3 и 11,3	$J_{1,2}$ 9,9 и 9,9; $J_{2,3}$ 9,2 и 9,2; $J_{3,4}$ 9,2 и 9,2; $J_{4,5}$ 9,8 и 9,8; $J_{5,6a}$ 1,1 и 1,4; $J_{5,6b}$ 1,8 и 2,2; $J_{6a,6b}$ 12,4 и 12,4
Va ^{2*}	$J_{1a,2}$ 6,2; $J_{1b,2}$ 3,4; $J_{1a,1b}$ 12,1 $J_{2,3a}$ 6,0; $J_{2,3b}$ 7,2; $J_{3a,3b}$ 14,3	$J_{1,2}$ 10,1; $J_{2,3}$ 10,1; $J_{3,4}$ 9,8; $J_{4,5}$ 9,9; $J_{5,6a}$ 3,3; $J_{5,6b}$ 3,3; $J_{6a,6b}$ 12,8
VIa ^{4*}	$J_{1a,2}$ 6,6; $J_{1b,2}$ 4,4; $J_{1a,1b}$ 12,4 $J_{2,3a}$ 6,2; $J_{2,3b}$ 2,9; $J_{3a,3b}$ 14,4	$J_{1,2}$ 9,1; $J_{5,6a}$ 4,8; $J_{5,6b}$ 2,2; $J_{6a,6b}$ 12,8
VIb ^{4*}	$J_{1a,2}$ 6,9; $J_{1b,2}$ 6,9; $J_{1a,1b}$ 13,9; $J_{2,3a}$ 6,2; $J_{2,3b}$ 2,6; $J_{3a,3b}$ 12,0	$J_{1,2}$ 9,5; $J_{5,6a}$ 4,4; $J_{5,6b}$ 1,8; $J_{6a,6b}$ 12,4
IX ^{2*}	$J_{1a,2}$ 6,2; $J_{1b,2}$ 3,4; $J_{1a,1b}$ 12,1 $J_{2,3a}$ 6,0; $J_{2,3b}$ 7,2; $J_{3a,3b}$ 14,3	$J_{1,2}$ 10,1; $J_{2,3}$ 10,1; $J_{3,4}$ 9,8; $J_{4,5}$ 9,9; $J_{5,6a}$ 3,3; $J_{5,6b}$ 3,3; $J_{6a,6b}$ 12,8

* C²HCl₃ — C²H₃O²N; 5 : 1, смесь диастереомеров. 2* C²HCl₃. 3* остаточные сигналы протонов. Значение J для аналогичных протонов диастереомеров приведены в том же порядке, что и значения химических сдвигов. 4* C²HCl₃ — C²H₃O²N — 2H₂O, 1 : 1 : 0,15.



лактозилдиглицеридов в различных хроматографических системах [6] не привели к ожидаемому результату.

После получения нами данных о различиях в способности к кристаллизации в метаноле и других растворителях 1,2-дипальмитоил-S- α -D-галактопиранозил-3-тио-sn-глицерина, 2,3-дипальмитоил-S- α -D-галактопиранозил-1-тио-sn-глице-

рина, а также их тетраацетатов [6] мы предположили, что эти особенности будут сохраняться для диастереомерных пар с другими углеводными заместителями, в том числе и для тиоаналогов глюкозилдиглицеридов, которые мы предполагали разделить кристаллизацией, что и осуществлено в данной работе.

Для получения дейтеромеченных тиоглюкозилдиглицеридов проводили гликозилирование тиоглицерина (II) ацетобромглюкозой (I) (схема 1). По данным ^1H -ЯМР-спектроскопии, α -аномера в продуктах реакции обнаружено не было (табл. 1). Полученный S-(2,3,4,6-тетраацетил- β -D-глюкопиранозил)-3-тио-*rac*-глицерин (III) ацилировали пальмитоилхлоридом, содержащим дейтерий в α -положении (IV). Полученную смесь диастереомеров (Va) и (Vб) подвергали многократной кристаллизации из метанола. Контроль за разделением осуществляли с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии по сигналам C3 глицериновых протонов, используя для идентификации стереоизомеров в качестве стандарта параметры, полученные для 1,2-дипальмитоил-S-(2,3,4,6-тетраацетил- β -D-глюкопиранозил)-3-тио-*sn*-глицерина (IX) ($\delta_a = 2,79$, $\delta_b = 2,89$, $J_{2,3A} = 6,0$, $J_{2,3B} = 7,2$, $J_{3A,3B} = 14,3$ Гц) (табл. 1). По данным ^1H -ЯМР было установлено, что выделенный в результате кристаллизации осадок содержал 1,2-ди[2- $^2\text{H}_2$]пальмитоил-S-(2,3,4,6-тетраацетил- β -D-глюкопиранозил)-3-тио-*sn*-глицерин (Va) (сигналы диастереомера (Vб) отсутствовали), а объединенный фильтрат состоял из смеси диастереомеров (Va) и (Vб) в соотношении 1 : 8.

Стандарт (IX) синтезировали гликозилированием 1,2-дипальмитоил-3-дезоксид-3-иод-*sn*-глицерина (VII) тетраацетатом α -D-тиоглюкозы (VIII) (схема 2). Примесь α -аномера (20%) отделяли методом ВЭЖХ на силикагеле.

После удаления гидразиолизом ацетильных защитных групп с соединения (Va) в ранее разработанных условиях [6] был получен чистый 1,2-ди[2- $^2\text{H}_2$]пальмитоил-S- β -D-глюкопиранозил-3-тио-*sn*-глицерин (VIa), а после дезацетилирования смеси (Va) и (Vб) выделена смесь диастереомеров (VIa) и (VIб) в соотношении 1 : 8. После многократной кристаллизации из метанола, контролируемой при помощи ^1H -ЯМР-спектроскопии по сигналам C1 глицериновых протонов ($\delta_a = 2,76$, $\delta_b = 2,94$, $J_{2,1A} = 6,6$, $J_{2,1B} = 4,4$, $J_{1A,1B} = 12,4$ Гц), удалось выделить 2,3-ди[2- $^2\text{H}_2$]пальмитоил-S- β -D-глюкопиранозил-1-тио-*sn*-глицерин (VIб) (табл. 1).

Таким образом, в результате проделанной работы предложен простой и удобный метод разделения диастереомерных смесей тиоглюкозилдиглицеридов, и, по-видимому, он может быть использован и для других гликозилдиглицеридов, содержащих насыщенные жирнокислотные остатки.

Экспериментальная часть

Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР записаны на импульсном ЯМР-спектрометре Вгльер MSL-200 (Германия), рабочие частоты 200,13 и 50,32 МГц соответственно, внутренний стандарт — тетраметилсилан. Спектры ДОВ измерены на поляриметре Perkin — Elmer 241 (Великобритания) при 20° С. Температуры плавления определяли на приборе Веттус (Германия).

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Kovo с рефрактометрическим детектором RIDK-102 (ЧСФР); препаративный вариант осуществляли на приборе Liqueschrom (Венгрия) с использованием колонок, изготовленных НПП «Элсико» (Москва).

Для колоночной хроматографии использовали силикагель L 40/100 и 100/160 мкм (Chemapol, ЧСФР). ТСХ проводили на пластинках Silufol UV-254 (Kavalier, ЧСФР). Пятна на хроматограммах обнаруживали прокаливанием пластинок, а также опрыскиванием фосфорномолибденовой кислотой с последующим нагреванием (150° С).

1,2-Дипальмитоил-3-дезоксид-3-иод-*sn*-глицерин, $[\alpha]_D^{20} +5,7$ (с 1, хлороформ), был синтезирован из соответствующего тозилата [8]. Тетраацетат β -D-тиоглюкозы синтезировали по методу [9], $[\alpha]_D^{20} +5,9$ (с 2,2, хлороформ) ([9]: $[\alpha]_D^{20} +5,8$

(с 2,2, хлороформ). Хлорангидрид [2-²H₂]пальмитиновой кислоты получали действием хлористого тионила на [2-²H₂]пальмитиновую кислоту, синтезированную по методу [10]. По данным ЯМР-спектроскопии, степень дейтерирования превысила 95%.

Данные элементного анализа соответствуют расчетным.

S-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)-3-тиоглицерин (III). К раствору 1,0 г (9,2 ммоль) триоглицерина (II) в 30 мл безводного ацетонитрила и 2 мл (14 ммоль) триэтиламина при интенсивном перемешивании добавляли 2,0 г (4,8 ммоль) ацетобромглюкозы (I). Реакционную смесь выдерживали 15 ч, упаривали в вакууме, остаток растворяли в 50 мл хлороформа и промывали дистиллированной водой (2×25 мл). После упаривания в вакууме остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (L 40/100), элюируя смесью хлороформ — ацетон, 9 : 1. Выход 1,8 г (82%). *R_f* 0,52 (хлороформ — изопропанол, 10 : 1); т.пл. 85—86° С. ¹³C-ЯМР (C²HCl₃, δ, м.д.): 20,3 (2 CH₃CO); 20,4 (2 CH₃CO); 33,7 и 34,3 (S-CH₂); 61,5 и 61,6, 64,7 и 65,0 (CH₂OH) и (C6 Glc); 67,9 и 69,3, 70,9, 71,2 и 73,4, 75,6, 76,3 (CHOH), (C2 Glc), (C3 Glc), (C4 Glc), (C5 Glc); 83,4 и 83,7 (C1 Glc); 169,1, 169,2, 169,9, 170,6 (4 COCH₃). Спектр ДОВ, [α], град (λ, нм) (с 1, хлороформ): —11,5 (589); —12,0 (578); —12,5 (546); —21,5 (436); —30,5 (365).

*1,2-Ди[2-²H₂]пальмитоил-S-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)-3-тио-*sn*-глицерин (Va)*. К раствору 1,4 г (3,2 ммоль) соединения (III) в 50 мл безводного хлороформа и 1,1 мл (12,8 ммоль) пиридина при охлаждении добавляли по каплям за 15 мин раствор 2,6 г (9,6 ммоль) [2-²H₂]пальмитоилхлорида (IV) в 50 мл безводного хлороформа. Реакционную смесь выдерживали при 20° С 5 ч, промывали водой (3×40 мл), высушивали над Na₂SO₄, упаривали в вакууме, остаток растворяли в 100 мл толуола и растворитель отгоняли в вакууме. Реакционную смесь хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью гексан — диэтиловый эфир, 19 : 1. Выход 2,3 г (68%, смесь диастереомеров (Va) и (Vб)). *R_f* 0,45 (гексан — диэтиловый эфир, 2 : 3). Диастереомерную смесь многократно кристаллизовали из метанола (5×20 мл), выход выпавшего в осадок диастереомера (Va) 1,0 г; т.пл. 73,5—74,5° С, спектр ДОВ, [α], град (λ, нм) (с 1, хлороформ): —16,5 (589), —17,0 (578), —19,0 (546), —33,0 (436), —53,0 (365). Фильтраты объединяли и упаривали в вакууме, затем полученную диастереомерную смесь (Va) и (Vб) (1 : 8) подвергали гидразинолизу.

*1,2-Ди[2-²H₂]пальмитоил-S-β-D-глюкопиранозил-3-тио-*sn*-глицерин (VIa)*. Раствор 0,60 г (0,64 ммоль) соединения (Va) в 50 мл метанола нагревали до кипения, добавляли 60 мкл гидразингидрата, кипятили 4 ч. Добавляли 0,6 г цетилтриметиламмонийбромида и 16 мл дистиллированной воды и кипятили 3,5 ч. Охлажденную до 20° С реакционную массу нейтрализовали муравьиной кислотой и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью хлороформ — метанол, 49 : 1. Вещество перекристаллизовывали из метанола и высушивали в вакууме. Выход 0,32 г (65%). *R_f* 0,5 (хлороформ — метанол — ацетон, 8 : 1 : 1); т.пл. 156—157° С (полиморфный переход 89—90° С). Спектр ДОВ, [α], град (λ, нм) (с 1, хлороформ): —18,5 (589), —19,5 (578), —21,5 (546), —37,0 (436), —56,5 (369).

*2,3-Ди[2-²H₂]пальмитоил-S-β-D-глюкопиранозил-1-тио-*sn*-глицерин (VIб)*. 0,9 г смеси диастереомеров (Va) (Vб) (соотношение 1 : 8) обрабатывали гидразинолизом аналогично соединению (Va). Выход на стадии гидразинолиза 0,44 г (60%). *R_f* 0,5 (хлороформ — метанол — ацетон, 8 : 1 : 1). Полученный продукт многократно кристаллизовали из метанола (6×20 мл) и высушивали в вакууме. Выход 0,35 г, т.пл. 155—156° С (полиморфный переход 85—87° С). Спектр ДОВ, [α], град (λ, нм) (с 1,5, хлороформ): —1,2 (589), —1,2 (578), —1,4 (546), —2,5 (436), —4,1 (365).

*1,2-Дипальмитоил-S-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)-3-тио-*sn*-глицерин (IX)*. Раствор 0,30 г (0,82 ммоль) тетраацетата триоглюкозы (VIII),

0,54 г (0,80 ммоль) иодида (VII) и 0,13 мл (0,84 ммоль) 1,8-дизабицикло[5,4,0]ундец-7-ена в 25 мл безводного тетрагидрофурана выдерживали 2 ч при 20° С, добавляли 50 мл смеси гептан — этилацетат, 3 : 1. Полученный раствор промывали водой (3×30 мл), высушивали Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (L 100/250), элюируя смесью петролейный эфир — диэтиловый эфир, 1 : 1. Выход 0,30 г (42%, смесь α- и β-аномеров). Примесь α-аномера отделяли методом ВЭЖХ. Колонка 10×250 мм, Silasorb 600, 8 мкм; подвижная фаза — гептан — этилацетат, 84 : 16; расход 8 мл/мин. В каждом разделении на колонку наносили 50 мг смеси в 0,5 мл подвижной фазы. Выход (IX) 0,26 г (36%).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ishizuka I., Yamakawa T.*//New Compr. Biochem. 1985. V. 10. P. 101—198.
2. *Mannock D. A., Lewis R. N. A. H., McElhanev R. N., Akiyama M. A., Turner D. C., Gruner S. M.*//Biophys. J. 1992. V. 63. № 10. P. 1355—1368.
3. *Mannock D. A., McElhanev R. N.*//Biochem. Cell Biol. 1991. V. 69. P. 863—867.
4. *Auger M., Carrier D., Smith I. C. P., Jarrell H. C.*//J. Amer. Chem. Soc. 1990. V. 112. P. 1373—1381.
5. *Jarrell H. C., Jovall P. A., Giziewicz J. B., Turner L. A., Smith I. C. P.*//Biochemistry. 1987. V. 26. № 7. P. 1805—1811.
6. *Аникин М. В., Дубовская С. И., Чупин В. В., Серебренникова Г. А.*//Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 11. С. 1102—1110.
7. *Mannock D. A., Lewis R. N. A. H., McElhanev R. N.*//Chem. Phys. Lipids. 1987. V. 43. № 2. P. 113—127.
8. *Hessel L. W., Morton I. D., Todd A. R., Verkade P. E.*//Recueil trav. chim. 1954. V. 73. № 2. P. 150—156.
9. *Lee R. T., Lee Y. C.*//Carbohydr. Res. 1979. V. 77. P. 149—156.
10. *Чудинов М. В., Аникин М. В., Аникин А. В., Брагина Н. А., Чупин В. В., Серебренникова Г. А.*//Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 2. С. 250—261.

Поступила в редакцию
1.XII.1993

После доработки
16.IV.1994

*S. I. Dubovskaya, M. V. Anikin, V. V. Chupin,
G. A. Serebrennikova*

SYNTHESIS OF DEUTERIUM LABELLED DIASTEREOMERS OF GLUCOSYLDIGLYCERIDE

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

Key words: glycosyldiglyceride, thio-glycosyldiglyceride, diastereomers, deuterium labelled thio-glycosyldiglyceride.

1,2-Di[2-²H₂]palmitoyl-S-(2,3,4,6-tetraacetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-thioglycerol as a mixture of two diastereomers was obtained by acylation of S-(2,3,4,6-tetraacetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-thio-*rac*-glycerol with deuterium-labelled palmitoylchloride. The separation by repeated crystallization from metanol and the removal of the protecting groups gave 1,2-di[2-²H₂]palmitoyl-S-β-D-glucopyranosyl-3-thio-*sn*-glycerol and 2,3-di[2-²H₂]palmitoyl-S-β-D-glucopyranosyl-1-thio-*sn*-glycerol.

Address: Vernadskii Ave., 86, Moscow, 117571, Russia.