



УДК 661.183.123:547.964

ПЕРИДАТНЫЕ ФОРМЫ СИЛЬНООСНОВНЫХ АНИОНИТОВ – РЕАГЕНТЫ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ РИБОФУРАНОЗИДОВ

© 1996 г. Н. А. Брусенцов[#], М. Н. Преображенская**Онкологический научный центр РАМН, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;*** Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков РАМН, Москва*

Поступила в редакцию 01.06.95 г. После доработки 23.10.95 г.

Получены периодатные формы сильноосновных анионитов АВ-17-8чС (ОН⁻), дауэкса-1 (ОН⁻) или амберлита IRA-900 (ОН⁻), которые селективно окисляют рибофуранозиднуклеозиды до соответствующих 2',3'-диальдегидов в присутствии глюкопиранозидов и галактопиранозидов. При соотношениях анионов $\text{IO}_4^- - \text{CH}_3\text{COO}^-$ 1 : 2–1 : 3, pH 2.3–2.6, температуре реакции 20–30°C и времени реакции 40–50 мин выход 2',3'-диальдегидных производных рибофуранозидов превышает 90%.

Ключевые слова: рибофуранозиды, сильноосновные аниониты, периодат-ацетаты, селективное окисление.

Периодатное окисление нуклеозидов приводит к 2',3'-диальдегидным производным рибофуранозидов [1, 2], которые представляют интерес в связи с их противоопухолевыми свойствами [3–5]. Кроме того, они применяются для метки протеинов, при получении искусственных антигенов [6–8] и при синтезе противоопухолевых веществ, иммобилизованных на полимерных носителях [8–17]. Чаще других при окислении сахаров применяется метапериодат натрия NaIO_4 [2, 18, 19], реже KIO_4 [20]. Обычно при действии метапериодата натрия одновременно окисляются различные соединения с вицинальными диольными группами. При этом реакция не прекращается на образовании 2',3'-диальдегидных производных рибофуранозидов, а сопровождается их дальнейшим окислением. Для выделения 2',3'-диальдегидных производных рибофуранозидов из реакционной смеси обычно применяют экстракцию и хроматографию [2].

В настоящей работе описана методика получения периодат-ацетатных форм сильноосновных анионитов и их использование для селективного окисления рибофуранозидов до соответствующих 2',3'-диальдегидов.

Действием уксусной кислоты на сильноосновные аниониты АВ-17-8чС (ОН⁻), дауэкс-1 (ОН⁻) и амберлит IRA-900 (ОН⁻) были получены их ацетатные формы с содержанием ацетат-анионов от 2.0 до 2.1 ммоль/г, которые последующим частич-

ным замещением ацетат-анионов на периодат-анионы превратили в смешанные периодат-ацетатные формы (ПА) с молярным соотношением ионов $\text{IO}_4^- - \text{CH}_3\text{COO}^-$ 1 : 4–4 : 1. При этом наблюдалось увеличение размеров зерен анионита и занимаемого им объема.

Постепенное частичное замещение ацетат-аниона на периодат-анион до соотношения ионов $\text{IO}_4^- - \text{CH}_3\text{COO}^-$, равного 4 : 1, достигалось как путем перемешивания ацетатных форм анионитов в растворе иодной кислоты, так и методом частичного обмена в проточной системе, т.е. пропуском раствора иодной кислоты через слой анионита на колонке.

Полученные ПА, содержащие от 0.1 до 2.0 ммоль IO_4^- /г смолы и от 0.1 до 2.0 ммоль CH_3COO^- /г смолы, были стабильны в течение 1 нед при –20°C. Их успешно использовали для селективного окисления рибофуранозидов. При 20–25°C влажные ПА инактивируются в течение 3–6 ч с восстановлением иона IO_4^- до IO_3^- . Постепенная инактивация окислительной способности ПА происходит также при их высушивании над P_2O_5 при комнатной температуре. В ИК-спектрах высушенных ПА, снятых в таблетках с бромистым калием, наблюдается сильная полоса поглощения при 740–770 см^{-1} , соответствующая частоте колебаний аниона IO_3^- , тогда как частота колебаний аниона IO_4^- обнаруживается при 791 см^{-1} . Содержание ацетат-анионов (CH_3COO^-) и общее содержание смешанных анионов ($\text{IO}_4^- - \text{CH}_3\text{COO}^-$) определяли элюцией CH_3COO^-

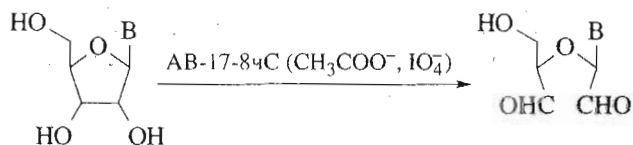
Сокращения: ДВБ – дивинилбензол, ПА – иониты в периодат-ацетатной форме.

[#] Автор для переписки.

или $\text{IO}_4^- - \text{CH}_3\text{COO}^-$ из соответствующих форм анионитов избытком 0.5 М NaOH, который затем оттитровывали 0.5 М уксусной кислотой. Содержание периодат-анионов (IO_4^-) в ПА определяли элюцией IO_4^- из образца ПА 0.5 М NaOH с последующим иодометрическим титрованием или же весовым методом с хорошим совпадением результатов обоих измерений.

Молекулярная проницаемость анионитов непрерывно-гелевой структуры обратно пропорциональна количеству дивинилбензола (ДВБ) в сополимере. Чем меньше размеры молекул, которые предполагается окислять, тем большее содержание дивинилбензола допустимо в ПА-смолах. Экспериментально найдено, что аниониты с содержанием ДВБ 8%, зернением 20–400 меш обладают оптимальной проницаемостью для соединений с молекулярной массой 100–400 Да (нуклеозиды).

С помощью ПА были получены продукты периодатного окисления инозина, аденозина, цитидина, урацила, ксантозина, гуанозина, рибамидила (виразола) и 6-азауридина:



В – основания нуклеозидов.

В ИК-спектрах полученных соединений имеется широкая полоса поглощения С–О-связей при 1100–1250 см^{-1} , характерная для диальдегидных производных нуклеозидов. Увеличение количества периодат-аниона в ПА до молярного соотношения $\text{IO}_4^- - \text{CH}_3\text{COO}^-$ 4 : 1 приводило к неполной элюции 2',3'-диальдегидных производных нуклео-

Окисление нуклеозидов на периодатных формах сильноосновных анионитов при соотношении $\text{IO}_4^- - \text{CH}_3\text{COO}^-$ 1 : 3

Рибозид	Анионит (IO_4^- , CH_3COO^-)	Молярный избыток IO_4^- по отношению к нуклеозиду	Выход диальдегида, %
Инозин	АВ-17-8чС	1.24	97.0
Ксантозин	Дауэкс-1	1.08	95.4
Аденозин	»	1.12	94.3
Уридин	Амберлит IRA-900	1.068	94.0
Цитидин	»	1.06	97.7
Азауридин	»	1.06	89.2
Виразол	»	1.10	98.8

зидов и соответственно к снижению их выхода. При дополнительном промывании такой ПА разбавленной уксусной кислотой вымывались остатки 2',3'-диальдегидных производных нуклеозидов, в которых обнаруживались анионы IO_3^- . При содержании анионов IO_4^- от 0.3 до 0.7 ммоль/г и соотношениях $\text{IO}_4^- - \text{CH}_3\text{COO}^-$ 1 : 2–1 : 3 выход 2',3'-диальдегидных производных рибофуранозидов превышал 90%. Дальнейшее понижение соотношения анионов $\text{IO}_4^- - \text{CH}_3\text{COO}^-$ сопровождалось понижением выхода диальдегидов. Оптимальные значения рН 2.3–2.6. При рН реакционной смеси 1.1 происходило частичное расщепление гликозидной связи. Повышение рН до 3–9 прибавлением к реакционной смеси щелочи приводило к загрязнению диальдегидов неорганическими примесями и к снижению их выхода.

Оптимальными условиями, при которых выход 2',3'-диальдегидных производных рибофуранозидов превышает 90%, являются: содержание анионов IO_4^- от 0.3 до 0.7 ммоль/г и соотношение анионов $\text{IO}_4^- - \text{CH}_3\text{COO}^-$ 1 : 2–1 : 3, рН 2.3–2.6, температура реакции 20–30°C и время реакции 40–50 мин.

При окислении в данных условиях были получены совпадающие результаты для инозина, аденозина, цитидина, урацила, ксантозина, гуанозина, рибамидила (виразола) и 6-азауридина (таблица).

ПА избирательно окисляют рибофуранозиды в присутствии глюкопиранозидов или галактопиранозидов, действуют мягко, возможность отщепления агликонов исключена. По сравнению с традиционным периодатным окислением выделение продуктов окисления упрощается, повышается их выход. В конце процесса отработанные аниониты отделяют от продуктов реакции фильтрованием. Количественное определение продуктов окисления проводят спектрофотометрическим и весовым методами.

В реакциях ПА с чистыми природными и модифицированными нуклеозидами и их смесями, содержащими до 50% глюкопиранозидов или галактопиранозидов, получили 2',3'-диальдегидные производные только соответствующих рибофуранозидов с выходом 84–96%. Устойчивость глюкопиранозидов и галактопиранозидов к воздействию ПА, по-видимому, связана со стерическими трудностями твердофазного окисления таких видциальных *транс*-диолов.

Таким образом, разработана методика получения с хорошим выходом периодатных форм сильноосновных анионитов, которые селективно окисляют в гетерогенной среде рибофуранозиды в присутствии глюкопиранозидов или галактопиранозидов с образованием 2',3'-диальдегидных производных рибофуранозидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческие аниониты и кислоты (Мосхимреактив) и нуклеозиды (Олайнфарм). Окисление рибофуранозидов проводили в сосуде из темного стекла. Продукты окисления смесей нуклеозидов разделяли на пластинках Кизельгель 60F₂₅₄ (Merck) в системе *n*-бутанол-этанол-вода (4 : 1 : 5). Для определения полноты окисления и разделения при анализе полученных соединений использовали ТСХ на силуфолу UV-254 в той же системе растворителей. Контроль восстановления IO₄⁻ до IO₃⁻ и ИК-спектроскопию полученных соединений проводили в таблетках с KBr на приборе Perkin-Elmer-283; УФ-спектры определяли на спектрофотометре Unicam Sp-800.

АВ-17-8чС (CH₃COO⁻, IO₄⁻). Суспензию 600 г анионита АВ-17-8чС (ОН⁻, 20–400 меш, 8% ДВБ, обменная емкость 1.7 мг-экв/г, влажность 43%) в 900 мл 20% уксусной кислоты перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Смолу отфильтровали, промыли холодной водой на фильтре до нейтральной реакции промывных вод, охладили до -2°C и прибавили к ней охлажденный до 1°C раствор 46.44 г иодной кислоты в 320 мл дистиллированной воды. Смесь перемешивали до достижения pH 2.3, после чего отфильтровали при температуре от 0 до 2°C и анионит промыли холодной водой, получили 611.0 г АВ-17-8чС (CH₃COO⁻, IO₄⁻, 10–300 меш, содержание IO₄⁻ 0.33 ммоль/г, соотношение IO₄⁻-CH₃COO⁻ 1 : 3, влажность 24%). Объединенный фильтрат упарили и возвратили 0.44 г дигидрата иодной кислоты. Выход анионита составил 99%, считая на вошедшую в реакцию иодную кислоту.

Дауэкс-1 (CH₃COO⁻, IO₄⁻). Из 60 г дауэкса-1 (ОН⁻, 200–400 меш, 8% ДВБ, обменная емкость 1.7 мг-экв/г, влажность 43%) обработкой 150 мл 20% уксусной кислоты и раствором 11.6 г иодной кислоты в 80 мл воды по вышеприведенной методике получили 61.0 г (91%) дауэкса-1 (CH₃COO⁻, IO₄⁻, 150–300 меш, 0.403 ммоль/г IO₄⁻, соотношение IO₄⁻-CH₃COO⁻ 1 : 3, влажность 21%). Объединенный фильтрат упарили и возвратили 1.1 г дигидрата иодной кислоты.

Амберлит IRA-900 (CH₃COO⁻, IO₄⁻). Из 10 г амберлита IRA-900 (ОН⁻, 200–400 меш, 8% ДВБ, обменная емкость 1.8 мг-экв/г, влажность 43%) обработкой 25 мл 20% уксусной кислоты и раствором 1.3 г иодной кислоты в 20 мл воды по вышеприведенной методике получили 11.0 г (92%) амберлита IRA-900 (CH₃COO⁻, IO₄⁻, 150–350 меш, 0.51 ммоль/г IO₄⁻, соотношение IO₄⁻-CH₃COO⁻ 1 : 3,

влажность 26%). Объединенный фильтрат упарили, возвратили 0.1 г дигидрата иодной кислоты.

Окисление инозина. Суспензию, содержащую 700.0 г АВ-17-8чС (CH₃COO⁻, IO₄⁻, 10–300 меш, 0.33 ммоль/г IO₄⁻, соотношение IO₄⁻-CH₃COO⁻ 1 : 3) и 50.0 г инозина в 200 мл воды, перемешивали 40 мин при 30°C. Анионит отфильтровали на стеклянном фильтре № 4 и промыли водой (5 × 150 мл) до отсутствия в промывных водах вещества, дающего флуоресцирующее пятно на силуфолу UV-254. Полученный раствор профильтровали, фильтрат упарили в вакууме и остаток сушили над P₂O₅ в присутствии NaOH. Получили 51.0 г (96%) моногидрата 9-(2'-гидроксиметил-3'-оксапентандиаль-1',5'-ил-4')гипоксантина, R_f 0.52, идентичного заведомому образцу по данным ТСХ и ИК-спектрам [1, 2]. Найдено, %: С 42.12; Н 4.41; N 19.63. Вычислено для C₁₀H₁₀N₄O₅ · H₂O, %: С 42.23; Н 4.24; N 19.72.

Окисление ксантозина. Суспензию 180.0 г дауэкса-1 (CH₃COO⁻, IO₄⁻, 150–300 меш, 0.403 ммоль/г IO₄⁻, соотношение IO₄⁻-CH₃COO⁻ 1 : 3) перемешивали 60 мин при 28°C в растворе, содержащем 19.0 г ксантозина дигидрата в 2000 мл воды, и выделили целевой продукт по вышеописанной методике. Получили 17 г (95%) моногидрата 9-(2'-гидроксиметил-3'-оксапентандиаль-1',5'-ил-4')ксантина (моногидрат 2',3'-диальдегидного производного ксантозина) в виде аморфного порошка, R_f 0.55. УФ-спектр водного раствора, λ_{макс} (lgε): 260 нм (3.96). Найдено, %: С 39.57; Н 4.12; N 18.53. Вычислено для C₁₀H₁₀N₄O₆ · H₂O, %: С 40.00; Н 4.00; N 18.67.

Избирательное окисление рибофуранозида в присутствии глюкопиранозида. Суспензию 0.1 г дауэкса-1 (CH₃COO⁻, IO₄⁻, 150–300 меш, 0.403 ммоль/г IO₄⁻, соотношение IO₄⁻-CH₃COO⁻ 1 : 3), 90 мг инозина и 10 мг 1-β-D-глюкопиранозил-5-фторурацила в 5 мл дистиллированной воды перемешивали 30 мин при 30°C. Анионит отфильтровали, промыли водой (10 × 1 мл), объединенный фильтрат упарили до объема 1 мл и продукты реакции разделили. Получили 7.48 мг (75.4%) моногидрата 9-(2'-гидроксиметил-3'-оксапентандиаль-1',5'-ил-4')гипоксантина (моногидрат 2',3'-диальдегидного производного инозина), R_f 0.52, и 8.2 мг (82%) 1-β-D-глюкопиранозил-5-фторурацила, R_f 0.47, выделенного в неизменном виде.

Избирательное окисление рибофуранозида в присутствии галактопиранозида. Суспензию 0.1 г амберлита IRA-900 (CH₃COO⁻, IO₄⁻, 150–350 меш, 0.5 ммоль/г IO₄⁻, соотношение IO₄⁻-CH₃COO⁻ 1 : 3), 10 мг инозина и 10 мг 1-О-метил-β-D-галактопиранозида в 5 мл воды обработали по вышеприведенной методике. Получили 7.16 мг (72.2%)

моногидрата 9-(2'-гидрокси-метил-3'-оксапентандиаль-1',5'-ил-4')гипоксантина (моногидрат 2',3'-диальдегидного производного инозина; R_f 0.52; УФ-спектр водного раствора, $\lambda_{\text{макс}}$ (lg ϵ): 248 см⁻¹ (4.09)) и 8.3 мг (83%) 1-О-метил- β -D-галактопиранозиды (R_f 0.2), выделенного в неизменном виде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khyt J.X., Cohn W.E.* // J. Am. Chem. Soc. 1960. V. 82. P. 6380–6386.
2. *Jones A.S., Markham A.F., Walker R.T.* // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1976. P. 1567–1570.
3. *Cusy R.L., Adamson R.H.* // Cancer Trit. Rep. 1976. V. 60. P. 555–562.
4. *Cusy R.L.* // Cancer Chemother. Rep. 1975. V. 59. P. 685–687.
5. *Брусенцов Н.А., Добрынин Я.В., Николаева Т.Г., Сергеева Е.В., Юрченко Н.Я., Преображенская М.Н.* // Хим.-фармацевт. журн. 1995. Т. XXIX. С. 22–27.
6. *King M.M., Colman R.F.* // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 1656.
7. *Lewis M., Miller J., Caron N., Matson C., Bartel A., Kimball A.P.* // Am. Assoc. Cancer Res. 1979. P. 145. Abstr. 585.
8. *Cusy R.L., Adamson R.H.* // Cancer. Trit. Rep. 1976. V. 60. P. 563–570.
9. *Bell J.P., Faures M.L., Le Page G.A., Kimball A.D.* // Cancer Res. 1968. V. 28. P. 782–787.
10. *Dvonch W., Fletcher H., Gregory F., Healy E., Warren G., Alburn H.* // Cancer Res. 1966. V. 26. P. 2386–2389.
11. *Брусенцов Н.А., Бухман В.М., Белицкий Г.А., Славина Е.Г., Лейпунская И.Л., Кикоть Б.С., Преображенская М.Н.* // Хим.-фармацевт. журн. 1980. Т. XIV. С. 5–14.
12. *Бухман В.М., Брусенцов Н.А., Лесная Н.А., Софьина З.П., Преображенская М.Н.* // Эксперим. онкология. 1983. Т. 5. С. 55–57.
13. *Бухман В.М., Лесная Н.А., Белицкий Г.А., Славина Е.Г., Лейпунская И.Л., Брусенцов Н.А., Басиева Т.Х., Преображенская М.Н.* // Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Т. 2 / Отв. ред. Н.П. Коновалова. Черноголовка: Изд. ОИХФ АН СССР, 1980. С. 130–133.
14. *Kimball A.D., Wilson M.* // Cancer Res. 1968. V. 28. P. 661.
15. *Spoor T.C., Evans J.E., Kimball A.D.* // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1971. V. 136. P. 605–607.
16. *Соколов И.К., Каплан Е.Я., Брусенцов Н.А., Преображенская М.Н.* // Хим.-фармацевт. журн. 1982. Т. XVI. С. 23–27.
17. *Брусенцов Н.А., Фросина Л.Д.* // Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Т. 1 / Отв. ред. Н.П. Коновалова. Черноголовка: Изд. ОИХФ АН СССР, 1980. С. 165–168.
18. *Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents.* Sigma Chemical Company, 1990. P. 1643.
19. *Смирнова И.Г., Корбелайнен Э.С., Стуков А.Н., Мовсесян К.С., Кильмаева Н.Е., Коростелева Т.А., Филов В.А., Ивин Б.А.* // Хим.-фармацевт. журн. 1991. С. 57–59.
20. *Autenshlyus A.I., Brusentsov N.A., Lockshin A.* // J. Magn. Magn. Mater. 1993. V. 122. P. 360–363.

Periodate Forms of the Strongly Basic Anion Exchangers As the Reagents for the Selective Oxidation of Ribofuranosides

N. A. Brusentsov¹ and M. N. Preobrazhenskaya*

Blokhin Research Center of Oncology, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia

**Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Bol'shaya Pirogovskaya 11, Moscow, 119867 Russia*

Abstract—From the strongly basic anion exchangers AV-17-8 chS (OH⁻), Dowex-1 (OH⁻), and Amberlite IRA-900 (OH⁻), the periodate forms were obtained that can selectively oxidize ribofuranoside nucleosides (in their mixtures with glucopyranosides and galactopyranosides) to the corresponding 2',3'-dialdehydes. The yield of 2',3'-dialdehyde derivatives exceeded 90% at a ratio of IO₄⁻/CH₃COO⁻ anions from 1 : 2 to 1 : 3, pH 2.3–2.6, and the reaction temperature of 20–30°C.

Key words: ribofuranosides; strongly basic anion exchangers, periodates and acetates; selective oxidation.

¹ To whom correspondence should be addressed.