



УДК 547.426.2

СИНТЕЗ И ГИДРОЛИЗ *rac*-1-АЛКИЛ-2-АЦИЛГЛИЦЕРО-3-ФОСФОДИХЛОРИДОВ

© 1996 г. С. И. Малекин, Н. Ю. Хромова, А. В. Кисин, М. Ю. Аксенова,
Ю. Л. Кругляк[#], В. К. Курочкин

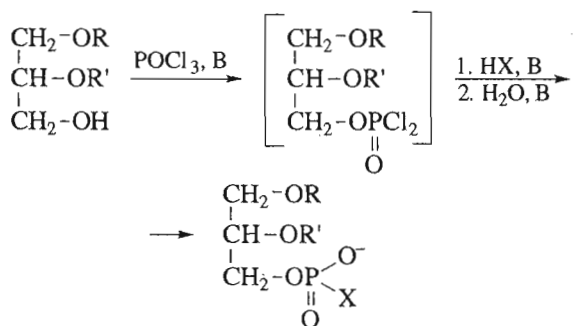
*Государственный научно-исследовательский институт органической химии и технологии,
111024, Москва, шоссе Энтузиастов, 23*

Поступила в редакцию 27.12.95 г.

rac-1-Гексадецил-2-пальмитоилглицеро-3-фосфодихлорид образуется с количественным выходом при взаимодействии соответствующего глицерида с избытком хлороксида фосфора в присутствии амина при 0–3°C, что подтверждено данными спектроскопии ¹H-, ¹³C-, ³¹P-ЯМР при низкой температуре. В виде раствора в хлороформе соединение устойчиво при 0–3°C, что позволяет использовать его в препаративных целях. Изучен гидролиз соединения. В кислой среде при комнатной температуре происходит деструкция соединения – расщепление фосфоэфирной связи, миграция ацильной группы из положения 2 в положение 3 глицеринового скелета и хлорирование. Гидролиз соединения в присутствии оснований (триэтиламина, КНСО₃) при 0–3°C приводит к образованию солей соответствующей фосфатидовой кислоты.

Ключевые слова: фосфорилирование, алкилацилглицерин, 1-алкил-2-ацилглицеро-3-фосфодихлорид, ацильная миграция, соли фосфатидовой кислоты.

Глицерофосфолипиды представляют интерес в исследованиях многих биологических процессов, физикохимии мембран клеток, а также в качестве лекарственных средств [1, 2]. Наиболее доступные методы получения этих соединений (например, 1,2-дизамещенных фосфатидовых кислот, фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов и т.п.) основаны на фосфорилировании 1,2-дизамещенных глицеринов хлороксидом фосфора по схеме [3–6]:

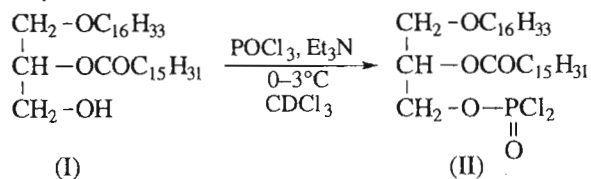


где В – основание; R, R' – алкил, ацил; X – ОСН₂СН₂N⁺(СН₃)₃ и др.

Образующиеся в ходе реакции глицерофосфодихлориды ввиду неустойчивости никогда не были выделены, и их физико-химические характеристики не описаны. Выходы целевых веществ в этих реакциях колеблются в широких пределах (от 20 до 95%), что, на наш взгляд, можно объяс-

нить неконтролируемым разложением промежуточных 1,2-дизамещенных глицерофосфодихлоридов. Цель настоящей работы – выяснение устойчивости этих соединений для обеспечения направленного синтеза новых веществ.

В настоящей работе впервые, на примере взаимодействия *rac*-1-гексадецил-2-пальмитоилглицерина (I) с хлороксидом фосфора в присутствии триэтиламина, была предпринята попытка выделить соответствующий фосфодихлорид (II) в индивидуальном состоянии. Идентификация веществ проводилась с помощью спектроскопии ЯМР при низкой температуре. Было показано, что это взаимодействие приводит к количественному образованию фосфодихлорида (II). После обработки реакционной смеси холодной водой (0–3°C) и отделения водного слоя получен практически индивидуальный фосфодихлорид (II) в виде раствора в CDCl₃:



Соединение (II), растворенное в хлороформе, устойчиво при 0–3°C, что позволяет с успехом использовать его в препаративных целях. Выделение соединения (II) из раствора в чистом виде нецелесообразно, так как при комнатной температуре оно разлагается.

[#] Автор для переписки.

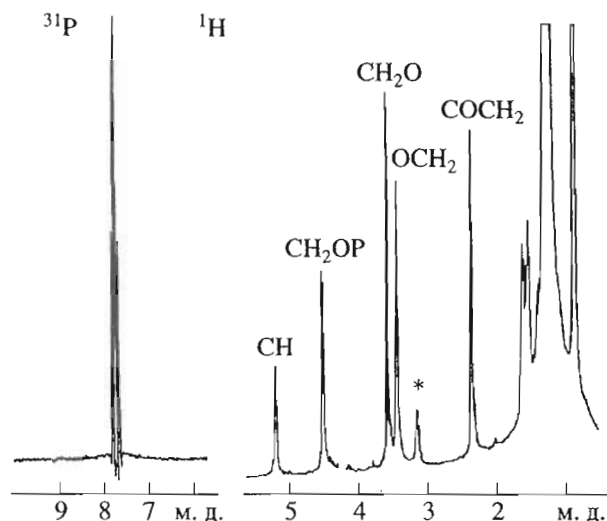


Рис. 1. Спектры ЯМР ^1H и ^{31}P (без развязки от протонов) в CDCl_3 соединения (II) при 3°C . Звездочкой отмечен сигнал примеси $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{HCl}$.

Спектры ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР (рис. 1, 2) подтверждают строение фосфодихлорида (II).

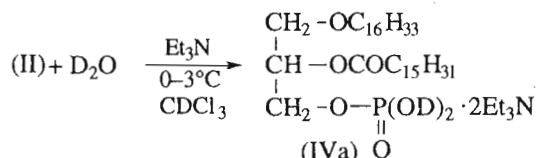
Химический сдвиг ядра фосфора в дихлориде (II) составляет 7.7 м. д., сигнал проявляется в спектре без развязки от протонов в виде триплета за счет спин-спинового взаимодействия с протонами, что указывает на наличие в молекуле фосфата (II) фрагмента CH_2OP .

В спектре ^{13}C -ЯМР сигналы углеродных атомов C2 и C3 глицеринового скелета проявляются в виде дублетов с константами соответственно 9.4 и 8.8 Гц вследствие спин-спинового взаимодействия с ядром фосфора (отнесение сигналов ^1H и ^{13}C сделано при помощи импульсной последовательности DEPT и двумерных экспериментов типа HETCOR) [7].

В спектре ^{31}P -ЯМР реакционной массы, полученной при взаимодействии глицерида (I) с POCl_3 и хранившейся 48 ч при $0-3^\circ\text{C}$, наряду с сигналами POCl_3 и фосфодихлорида (II) появился дополнительный сигнал с химическим сдвигом 3.1 м. д. В спектре без развязки от протонов этот сигнал

проявлялся в виде квинтета ($J_{\text{P,H}}$ 9.1 Гц). Мультиплетность объясняется образованием бис(1-гексадецил-2-пальмитоилглицеро)-3-фосфохлорида (III), содержащего фрагмент $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{Cl})-\text{O}-\text{CH}_2-$.

Методом спектроскопии ЯМР оценена устойчивость фосфодихлорида (II) в зависимости от кислотно-основных свойств среды и температуры. В кислой среде при $0-3^\circ\text{C}$ гидролиз соединения (II) с образованием фосфатидовой кислоты не наблюдается. Однако скорость низкотемпературного гидролиза этого вещества быстро возрастает при переходе от кислой среды к основной. Добавление водного раствора триэтиламина к раствору фосфодихлорида (II) в CDCl_3 приводит к полному гидролизу вещества (II) в течение 15 мин:



Строение соединения (IVa) подтверждают спектры ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР, зафиксированные при низкой температуре ($0-3^\circ\text{C}$). Отметим, что при переходе от фосфодихлорида (II) к соли (IVa) наблюдается смещение сигналов ^1H , ^{13}C и ^{31}P фрагмента $-\text{CH}_2\text{O}-\text{P}(\text{O})$ в сторону сильного поля (см. "Экспер. часть"). Соединение (IVa) устойчиво при $0-3^\circ\text{C}$; при нагревании до комнатной температуры в его спектре ^{31}P -ЯМР уже через 15–20 мин наряду с сигналом соли (2.5 м. д., триплет) появляются сигналы побочных соединений.

В отличие от триэтиламиниевой соли (IVa) калиевая соль фосфатидовой кислоты (IVб) устойчива. Она была получена при взаимодействии соединения (II) с бикарбонатом калия в смеси хлороформ–диоксан.

При повышении температуры до комнатной гидролиз соединения (II) значительно усложняется и сопровождается дефосфорилированием, ацильной миграцией из положения 2 в положение 3 глицеринового скелета и образованием продукта хлорирования. Совокупность этих процессов при повышенной температуре можно представить следующей схемой:

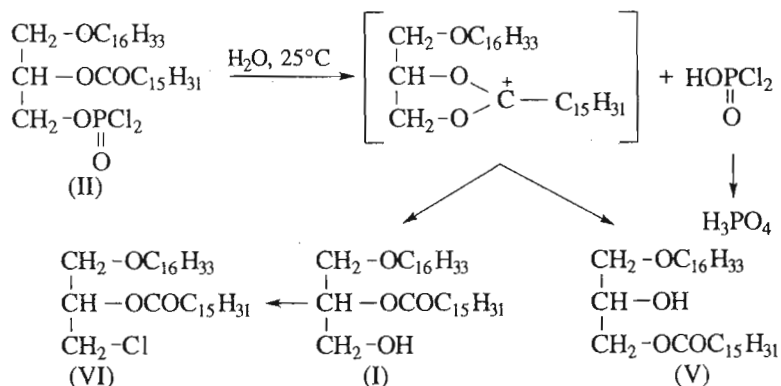


Схема.

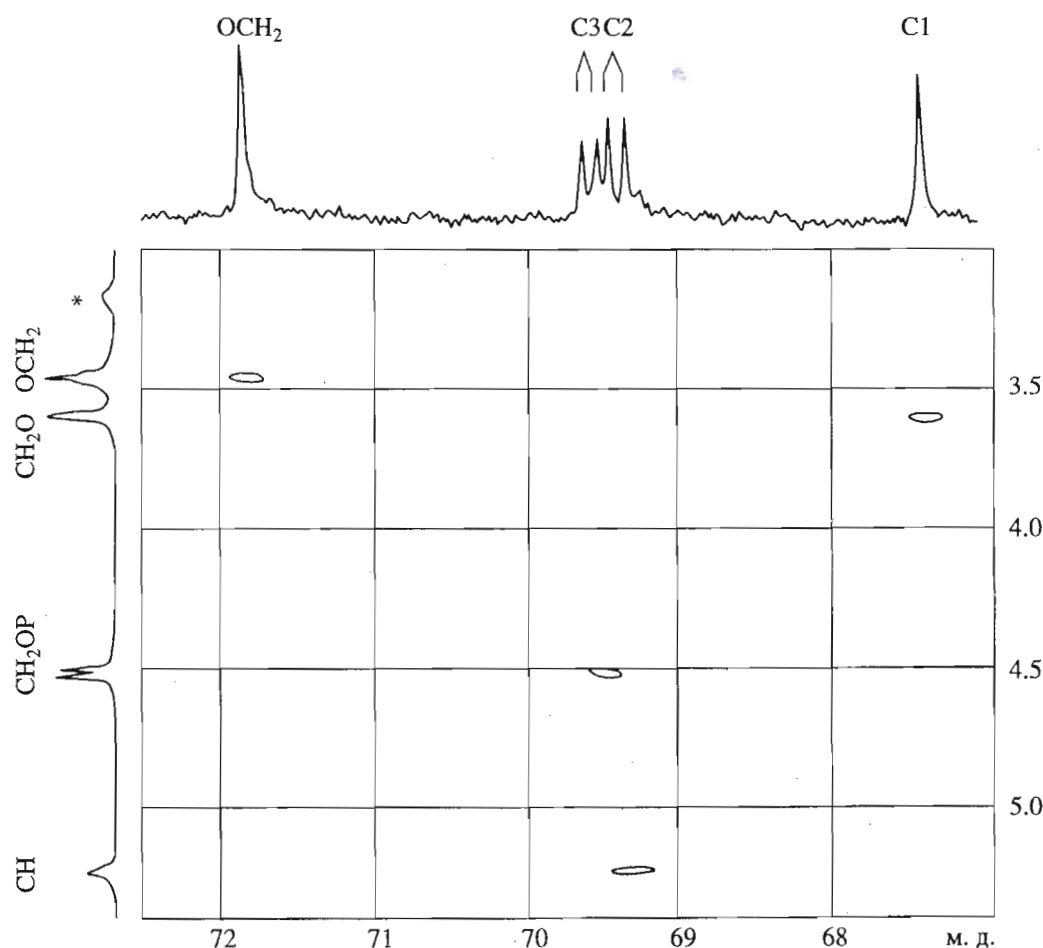


Рис. 2. Фрагмент спектра гетероядерной корреляции химических сдвигов (HETCOR) ^1H - ^{13}C соединения (II) в CDCl_3 при 3°C . Звездочкой отмечен сигнал примеси $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{HCl}$.

Методом спектроскопии ^{31}P -ЯМР выявлено, что после инкубирования фосфодихлорида (II) в смеси $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$ при 25°C в течение 0.4 ч наблюдался только сигнал исходного фосфодихлорида (7.7 м. д.), т.е. гидролиз еще не был заметен. Через 6 ч помимо сигнала дихлорида (II) зарегистрированы еще два сигнала, относящихся соответственно к дихлорфосфорной (4.5 м. д.) и ортофосфорной (0.0 м. д.) кислотам; через 48 ч в системе остался сигнал лишь ортофосфорной кислоты. Таким образом, соединение (II) полностью гидролизуется с образованием ортофосфорной кислоты.

В спектрах ^1H -ЯМР (см. рис. 3) через 0.4 ч наблюдались только сигналы, относящиеся к соединению (II), через 6 ч помимо сигналов фосфодихлорида (II) в спектре появляются сигналы, относящиеся к глицериду (I) (3.8 м. д. – CH_2OD ; 5.0 м. д. – CHOCO) и его изомеру (V) (4.15 м. д. – CH_2OSO ; 3.98 м. д. – CH), через 48 ч остались только сигналы протонов соединений (V) и (VI) (3.65 и 3.74 м. д. – CH_2Cl ; 5.15 м. д. – CHOCO) в соотношении ~ 1 : 4; при этом сигналы соединений (I) и (II) исчезли.

Отнесение сигналов протонов для соединений (V) и (VI) было сделано после выделения этих веществ из реакционной среды в индивидуальном состоянии; спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР глицерида (I) описаны в литературе [8].

Следует отметить, что наблюдаемые процессы – расщепление фосфоэфирной связи, миграция ацильной группы из положения 2 в положение 3 глицеринового скелета – не являются неожиданными и имеют аналогии в литературе [9, 10].

Проведенное исследование позволяет судить о характере возможных превращений, протекающих при взаимодействии различных 1,2-дизамещенных глицеринов с хлороксидом фосфора. На первой стадии превращений образуются интермедиаты, аналоги соединения (II), устойчивые при низкой температуре и разлагающиеся при ее повышении. Естественно, устойчивость этих интермедиатов будет зависеть от заместителей в положениях 1 и 2 глицерина. В условиях, когда устойчивость интермедиатов обеспечена (для соединения (II) охлаждение до 0°C), возможно дальнейшее целенаправленное замещение атомов

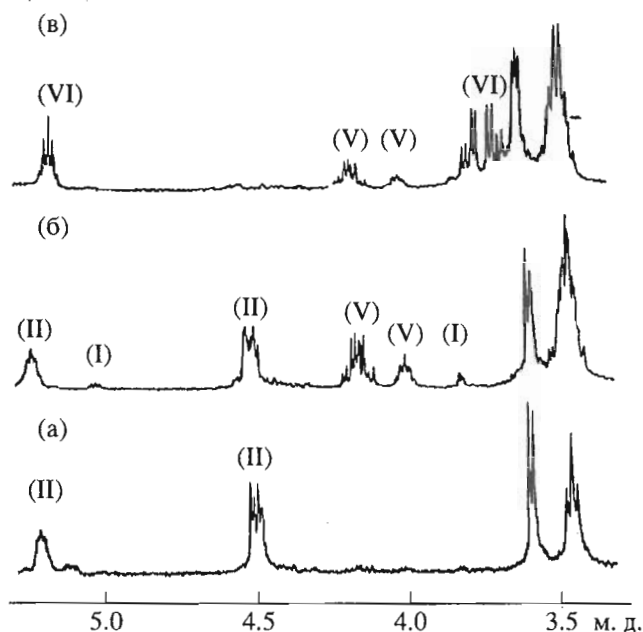


Рис. 3. Спектры ^1H -ЯМР соединения (II), инкубируемого в смеси $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$ при 25°C через: 0.4 (а), 6 (б) и 48 ч (в). Указаны номера соединений, к которым относится сигнал.

хлора и получение целевых веществ с высокими выходами без образования побочных соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы хлороксид фосфора, триэтиламин и пиридин отечественного производства, очищенные перегонкой. Деутерированные хлороформ (фирмы Janssen), вода и метанол (Государственный институт прикладной химии, Санкт-Петербург) использованы без дополнительной очистки. *rac*-1-Гексадецил-2-пальмитоилглицерин (I) был синтезирован по известной методике [8].

Спектры ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР (δ , м. д.) получены на фурье-спектрометре Bruker AM-360 на частотах 360.13, 90.58 и 145.78 МГц соответственно. Внутренний эталон для ядер ^1H и ^{13}C – тетраметилсилан, внешний эталон для ядер ^{31}P – 85%-ная H_3PO_4 . Одномерный эксперимент DEPT и двумерный HETCOR осуществляли по стандартным методикам фирмы Bruker. Для определения мультиплетности сигналов фосфора в спектрах монорезонанса ^{31}P использовали методику улучшения разрешения при преобразовании лоренцевой линии в гауссову [7]. ТСХ осуществляли на пластинках Kieselgel 60 (Merck) в системах хлороформ-метанол-вода, 65 : 25 : 4 (А), гексан-эфир, 1 : 1 (Б), пятна обнаруживали прокаливанием.

***rac*-1-Гексадецил-2-пальмитоилглицеро-3-фосфодихлорид (II).** К раствору 0.28 г (1.8 ммоль) POCl_3 в 3 мл CDCl_3 при перемешивании и охлажде-

нии ($0-3^\circ\text{C}$) прибавляли в течение 15 мин раствор 0.15 г (0.27 ммоль) глицерида (I) и 0.18 г (1.8 ммоль) Et_3N в 5 мл CDCl_3 . Через 0.5 ч из реакционной массы отбирали пробу, в которой при 3°C методом спектроскопии ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР определяли наличие соединения (II), $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{HCl}$ и POCl_3 . Далее реакционную массу промывали холодной водой и на холоду (около 3°C) отделяли водный слой. Получали раствор фосфодихлорида (II) в CDCl_3 , в спектрах ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР которого при 3°C зарегистрированы только сигналы соединения (II) (см. рис. 1, 2). ^{31}P -ЯМР: 7.7 (т, $J_{\text{P,H}}$ 9.4). ^{13}C -ЯМР: 14.2 (CH_2CH_3); 22.8, 24.8, 26.0, 29.1, 29.4, 29.8, 31.9 (CH_2) $_{14}\text{CH}_3$ и (CH_2) $_{13}\text{CH}_3$; 34.1 (COCH_2); 67.4 (C1 Gro); 69.4 ($J_{\text{C,P}}$ 9.4, C2 Gro); 69.6 ($J_{\text{C,P}}$ 8.8, C3 Gro); 71.8 (OCH_2CH_2); 173.1 (CO); ^1H -ЯМР: 0.86 (6H, м, CH_3); 1.26 (50H, м, (CH_2) $_{13}\text{CH}_3$ и (CH_2) $_{12}\text{CH}_3$); 1.55 (4H, м, OCH_2CH_2 и $\text{OSCOCH}_2\text{CH}_2$); 2.36 (2H, т, COCH_2); 3.46 (2H, м, OCH_2CH_2); 3.58 (2H, м, CH_2OCH_2); 4.51 (2H, м, CH_2OP); 5.21 (1H, м, CHOCO).

Хлороформный раствор соединения (II) устойчив при $0-3^\circ\text{C}$ в течение нескольких суток. В реакционной массе, содержащей соединение (II), $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{HCl}$ и POCl_3 , при хранении в течение 48 ч при $0-3^\circ\text{C}$ образуется примесь бис(1-гексадецил-2-пальмитоилглицеро)фосфохлорида (III). По данным спектров ^{31}P -ЯМР, соотношение веществ (II) : (III) равно 1 : 1.5.

Бис(триэтиламмониевая) соль *rac*-1-гексадецил-2-пальмитоилглицеро-3-фосфорной кислоты (IVa). В охлажденный хлороформный раствор фосфохлорида (II) добавляли при $0-3^\circ\text{C}$ 4-кратный избыток раствора Et_3N в D_2O и отделяли водный слой. По данным спектров ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР (3°C), количественно образуется соль (IVa). Сигналы соединения (II) отсутствуют. ^{31}P -ЯМР: 2.5 (т, $J_{\text{P,H}}$ 7.6). ^{13}C -ЯМР: 65.3 ($J_{\text{C,P}}$ 6.3, C3 Gro); 69.1 (C1 Gro); 71.1 ($J_{\text{C,P}}$ 9.3, C2 Gro); 71.6 (OCH_2CH_2); 173.4 (CO). ^1H -ЯМР: 3.44 (2H, м, OCH_2CH_2); 3.61 (2H, м, CH_2OCH_2); 4.16 (2H, м, CH_2OP); 5.23 (1H, м, CHOCO).

Дикалиевая соль *rac*-1-гексадецил-2-пальмитоилглицеро-3-фосфорной кислоты (IVб). К 0.56 г (3.6 ммоль) POCl_3 в 10 мл сухого CHCl_3 при перемешивании и охлаждении ($0-3^\circ\text{C}$) добавляли раствор 0.3 г (0.54 ммоль) глицерида (I) и 0.36 г (3.6 ммоль) Et_3N в 20 мл сухого CHCl_3 , перемешивали 0.5 ч и добавляли 20 мл диоксана. К полученной реакционной массе по каплям прибавляли 10 мл насыщенного водного раствора KHCO_3 при $0-3^\circ\text{C}$ и выдерживали при этой температуре 48 ч. Выпавший осадок фильтровали, промывали ацетоном, эфиром и высушивали. Выход соли (IVб) 0.3 г (78%). Т.пл. 116°C . R_f 0.2 (А). ^{31}P -ЯМР: 0.2. ^{13}C -ЯМР: 14.2 (CH_2CH_3); 22.8, 25.1, 26.1, 29.3, 29.5, 29.7, 32.1

((CH₂)₁₄CH₃ и (CH₂)₁₃CH₃); 34.5 (COCH₂); 64.4 (*J*_{C,P} 4.4, C3 Gro); 69.3 (C1 Gro); 71.8 (*J*_{C,P} 7.9, C2 Gro); 72.0 (CH₂OCH₂); 174.2 (CO). ¹H-ЯМР: 0.86 (6H, м, CH₃); 1.26 (50H, м, (CH₂)₁₃CH₃ и (CH₂)₁₂CH₃); 1.57 (4H, м, CH₂OCH₂CH₂ и COCH₂CH₂); 2.34 (2H, т, COCH₂); 3.45 (2H, м, OCH₂CH₂); 3.60 (2H, м, CH₂OCH₂); 4.01 (2H, м, CH₂OP); 5.17 (1H, м, CHOCO).

Гидролиз хлороформного раствора фосфоди-хлорида (II) при комнатной температуре. В охлажденный хлороформный раствор соединения (II) добавляли D₂O; реакцию смесь нагревали до комнатной температуры (25°C) и регистрировали спектры ¹H-ЯМР через интервалы 0.4, 6 и 48 ч (рис. 3).

Эксперимент повторяли с использованием H₂O вместо D₂O. При этом соединения (V) и (VI) выделяли в индивидуальном состоянии. Приводим константы и данные сигналов спектров ¹H- и ¹³C-ЯМР для соединений (V) и (VI), образующихся в результате гидролиза.

***rac*-1-Гексадецил-3-пальмитойлглицерин (V).** Т. пл. 64–65°C. *R*_f 0.4 (Б). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 0.86 (6H, м, CH₃); 1.24 (50H, м, (CH₂)₁₃CH₃ и (CH₂)₁₂CH₃); 1.5–1.6 (4H, м, OCH₂CH₂ и OCOCH₂CH₂); 2.33 (2H, т, OCOCH₂); 3.0 (1H, уш. с, OH); 3.47 (4H, м, CH₂OCH₂); 3.98 (1H, м, CHOH); 4.15 (2H, м, CH₂OCO). ¹³C-ЯМР: 14.2 (CH₂CH₃); 22.7, 24.8, 26.0, 29.4, 31.9 ((CH₂)₁₃CH₃ и (CH₂)₁₂CH₃); 34.1 (COCH₂); 65.3 (C3 Gro); 68.6 (C2 Gro); 71.2 (C1 Gro); 71.6 (CH₂OCH₂); 174.2 (CO).

***rac*-1-Гексадецилокси-2-пальмитойлокси-3-хлор-пропан (VI).** ¹H-ЯМР (CDCl₃): 0.88 (6H, м, CH₃); 1.26 (50H, м, (CH₂)₁₃CH₃ и (CH₂)₁₂CH₃); 1.5–1.6 (4H, м, OCH₂CH₂ и OCOCH₂CH₂); 2.33 (2H, т,

OSOCH₂); 3.45 (2H, м, CH₂OCH₂); 3.58 (2H, м, CH₂OCH₂); 3.65 и 3.74 (2H, м, CH₂Cl); 5.14 (1H, м, CHOCO). ¹³C-ЯМР: 14.1 (CH₂CH₃); 22.7, 24.9, 26.0, 29.1, 29.2 ((CH₂)₁₃CH₃ и (CH₂)₁₂CH₃); 34.3 (COCH₂); 42.9 (C3 Gro); 68.7 (C1 Gro); 71.4 (C2 Gro); 71.7 (CH₂OCH₂); 172.9 (CO).

Авторы благодарят Международный научно-технический центр за финансовую поддержку настоящей работы (грант № 127).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Степанов А.Е., Краснопольский Ю.М., Швец В.И. Физиологически активные липиды. М.: Наука, 1991.
2. Евстигнеева Р.П., Звонкова Е.Н., Серебренникова Г.А., Швец В.И. Химия липидов. М.: Химия, 1983.
3. Hong C.I., An S.-H., Buchheit D.J., Nechaev A., Kirisits A.J., West C.R., Berdel W.E. // J. Med. Chem. 1986. V. 29. P. 2038–2044.
4. Eibl H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 75. P. 4074–4077.
5. Brockerhoff H., Ayengar N.K.N. // Lipids. 1979. V. 14. P. 88–89.
6. Волкова Л.В., Морозова С.Ф., Преображенский Н.А. // Журн. общей химии. 1965. Т. 35. С. 84–85.
7. Дероум Э. Современные методы ЯМР для химических исследований. М.: Мир, 1992.
8. Морозова Н.Г., Кривойченко И.Н., Аникин М.В., Серебренникова Г.А. // Журн. орган. химии. 1991. Т. 27. С. 2584–2588.
9. Швец В.И., Волкова Л.В., Васильева В.В., Филонова Л.М., Преображенский Н.А. // Журн. общей химии. 1963. Т. 33. С. 1843–1847.
10. Аваева С.М., Склянкина В.А. // Журн. общей химии. 1971. Т. 41. С. 2081–2085.

Synthesis and Hydrolytic Behavior of *rac*-1-Alkyl-2-acylglycerol-3-phosphodichlorides

S. I. Malekin, N. Yu. Khr̄omova, A. V. Kisin, M. Yu. Aksenova, Yu. L. Kruglyak, and V. K. Kurochkin

State Research Institute of Organic Chemistry and Technology, sh. Entuziastov 23, Moscow, 111024 Russia

Abstract—*rac*-1-Hexadecyl-2-palmitoylglycerol-3-phosphodichloride was quantitatively obtained in the reaction of an appropriate glycerol derivative with an excess phosphoryl chloride in the presence of amine at 0–3°C, and its structure was confirmed at low temperature ¹H, ¹³C, and ³¹P NMR. The substance proved to be stable in a chloroform solution at 0–3°C and, thus, useful for preparative syntheses. At room temperature in the acidic medium, it was revealed that the compound prepared undergoes hydrolytic degradation, which includes the splitting of a phosphodiester bond, the migration of its 2-acyl group to the position 3 in the glycerol backbone, and chlorination. At 0–3°C, its basic hydrolysis (e.g., in the presence of triethylamine or KHCO₃) resulted in the formation of the corresponding salts of phosphatidic acid.

Key words: phosphorylation, alkylacylglycerol, 1-alkyl-2-acylglycerol-3-phosphodichloride, acyl migration, phosphatidic acid salts.