



УДК 547.426.2 : 542.95

ПОДХОД К СИНТЕЗУ ФОСФАТИДИЛГОМОЭТАНОЛАМИНОВ

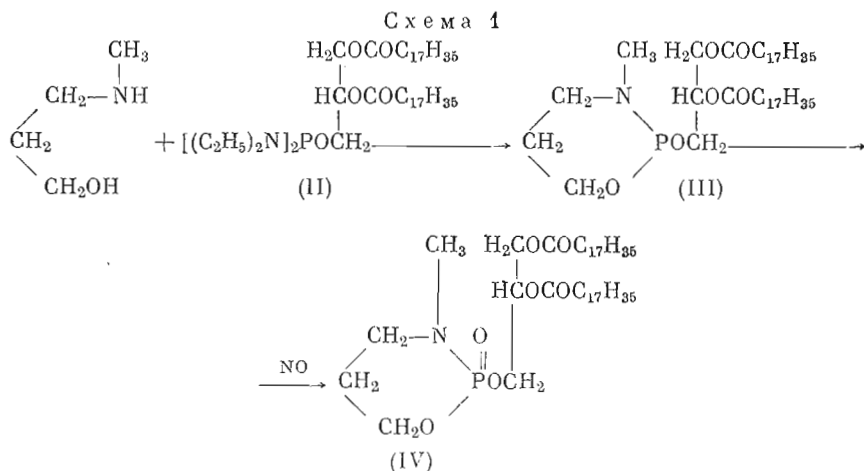
Нифантьев Э. Е., Предводителев Д. А., Грачев М. В.

*Московский государственный педагогический институт
им. В. И. Ленина*

Предложен метод синтеза фосфатидилгомоэтанололаминов на основе 1,3,2-оксазафосфоринанов, содержащих остатки диацилглицеринов. Центральным моментом новой схемы является раскрытие фосфоринанового цикла трифторуксусной кислотой. Показана возможность аналогичного синтеза соответствующих неацилированных производных.

При обработке некоторых биомембран 1,3-аминопропанолом [1, 2] или его цитидиндифосфатом [1, 3, 4] образуются фосфолипиды, содержащие вместо этаноламина его гомопроизводное. Этот факт привлек внимание к новым липидам и позволил сделать вывод о низкой специфичности ферментов, ответственных за перенос фосфориламиноспиртов на глицериды [1, 3]. Изучение гомоэтанололаминов показало также, что они способны замедлять рост клеток, который может быть опять восстановлен добавлением холина [2]. Для дальнейшего исследования новых липидов, содержащих остатки 1,3-аминопропанолов (назовем их фосфатидилгомоэтанололаминами), необходимо иметь удобный путь их синтеза. Этот вопрос мало разрабатывался — имеется только одно сообщение [5] о получении фосфатидил(-3-амино)пропанола с использованием традиционной для химии фосфолипидов схемы.

В настоящей работе излагаются результаты исследования нового подхода к синтезу фосфатидилгомоэтанололаминов с использованием принципа,



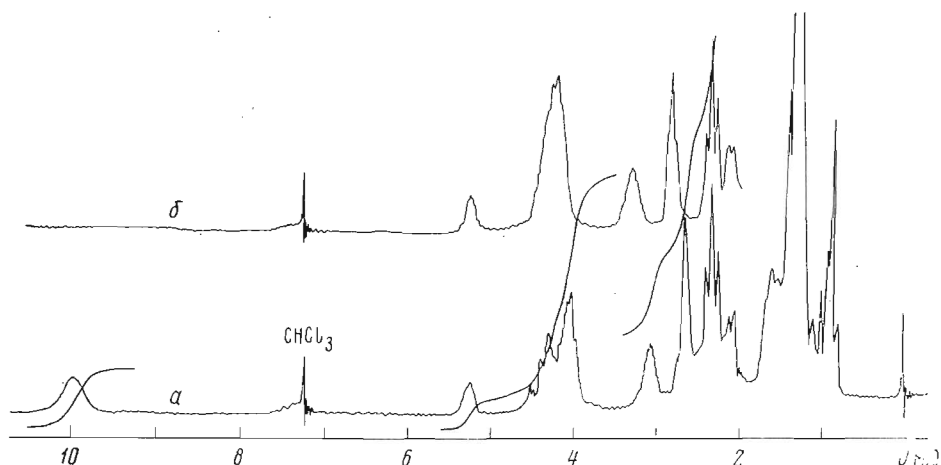


Рис. 1. Спектр ПМР 1,2-дистеароил-*rac*-глицеро-3-фосфорил-N-метил-3'-аминопропанола (1): *a* — в CDCl_3 , *б* — в CDCl_3 с добавлением CF_3COOH ; ν_0 100 МГц

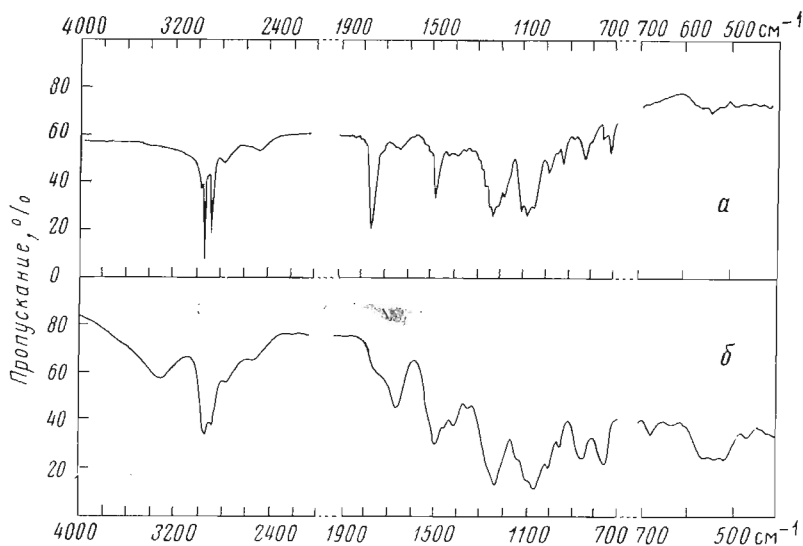
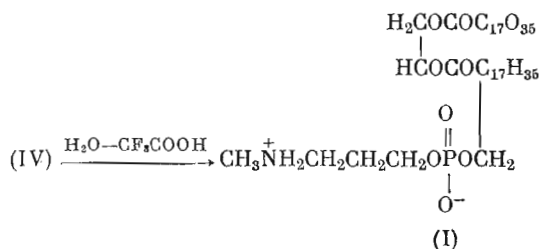


Рис. 2. ИК-спектры 1,2-дистеароил-*rac*-глицеро-3-фосфорил-N-метил-3'-аминопропанола (I) в KBr (*a*) и *rac*-глицеро-1-фосфорил-N-метил-3'-аминопропанола (V) в пленке (*б*)

рассмотренного недавно нами на примере модельных структур [6, 7]. В качестве конкретного объекта был выбран 1,2-дистеароил-*rac*-глицеро-3-фосфорил-N-метил-3'-аминопропанол (I). Для получения этого соединения тетраэтилдиамидофосфит 1,2-дистеароил-*rac*-глицерина (II) [8] был обработан N-метил-3-аминопропанолом-1 и образовавшийся оксазафосфоринан (III) без выделения окислен окисью азота (схема 1).

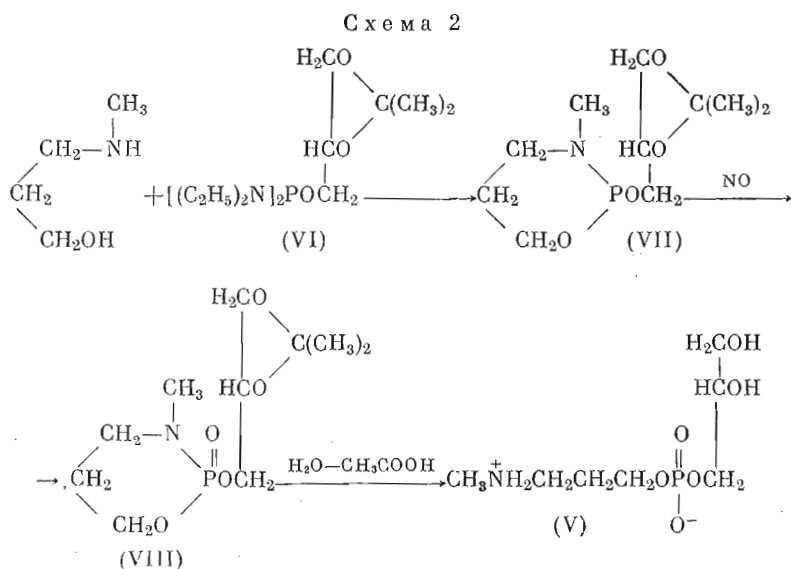
После перекристаллизации выход амидофосфата (IV) составил 61% (на две стадии). Его индивидуальность была показана хроматографическим анализом и ^{31}P -ЯМР*. Амидофосфат (IV) при гидролизе в мягких условиях действием трифторуксусной кислоты образовал липид (I).

* Эти методы использовались для определения индивидуальности и других веществ.



Полученное вещество по хроматографической подвижности и спектральным данным напоминает соответствующий N-метилфосфатидилэтанол-амин. Его строение подтверждено элементным анализом и доказано методами спектроскопии. В спектре ПМР (рис. 1) вместо дублета при δ 2,6 м. д. метильных протонов PNCH_3 -группы в амидофосфате (IV) содержится сигнал при δ 2,57 м. д. протонов группы NCH_3 и синглет протонов группы NH_2 в области δ 10 м. д. *; другие сигналы в спектре ПМР соединений (IV) и (I) примерно соответствуют друг другу. В ИК-спектре фиксировано поглощение групп CH_3NH_2 при 1640, 2480 и 2746 cm^{-1} и PO_2^- при 1220 и 1240 cm^{-1} (рис. 2).

Вторая линия нашего исследования посвящена получению *rac*-глицеро-1-фосфорил-N-метил-3'-аминопропанола (V), имеющего свободные гидроксильные группы в глицериновом остатке. Это соединение может быть превращено в N-ацильные аналоги фосфолипидов путем последующего ацилирования. Синтез соединения (V), основанный на использовании тетраэтилдиамидофосфита 1,2,О-изопропилиден-*rac*-глицерина (VI), проводился по двум схемам. По первой схеме амидофосфит (VI) обрабатывали эквимолекулярным количеством N-метил-3-аминопропанола-1 с образованием глицерооксазафосфоринана (VII), который далее окислялся окисью азота до соответствующего производного пятивалентного фосфора (VIII). Строение промежуточных продуктов доказывалось методами ИК- и ЯМР-спектроскопии (см., например, рис. 3). Вещество (VIII) гидролизовалось 20% уксусной кислотой, при этом раскрывался фосфоринановый цикл и снималась изопропилиденевая защита (схема 2).



* Отнесение сигналов этих протонов сделано на основании сравнения спектров ПМР соединения (I) в CDCl_3 и в CDCl_3 с добавлением CF_3COOH и согласуется с данными [9, 10].

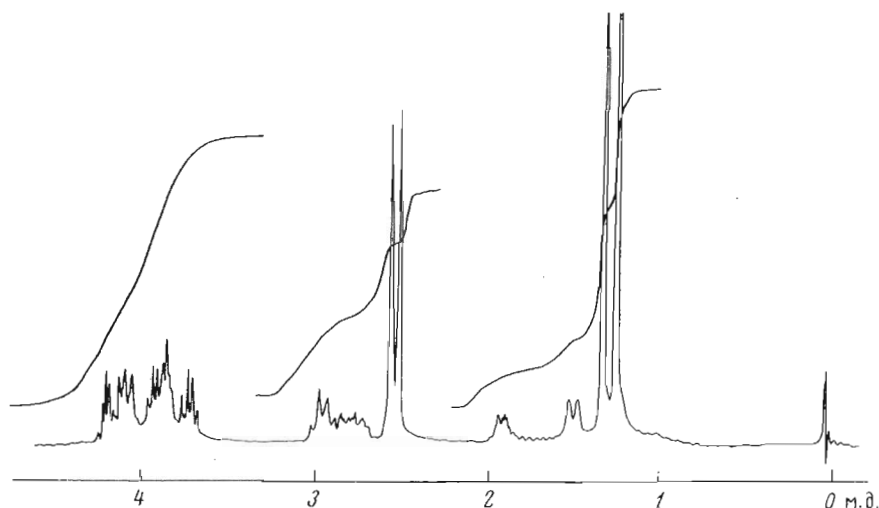
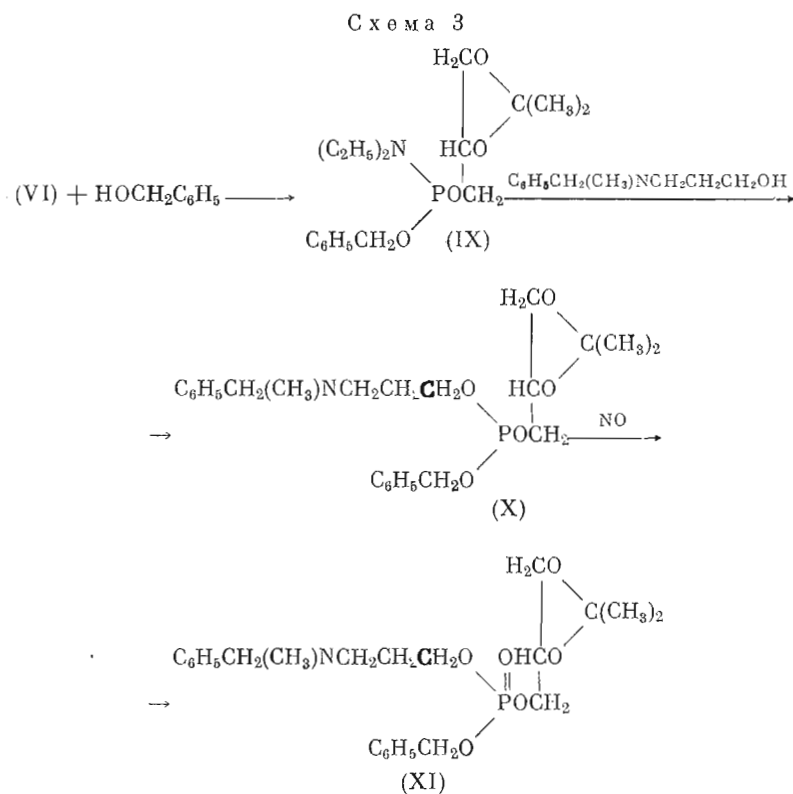


Рис. 3. Спектр ПМР 2-оксо-2-(*D, L*-2,3-изопропилидендиоксипропил)окси-3-метил-1,3,2-оксазафосфоринана (VIII) (в CHCl_3 ; ν_0 270 МГц)

Строение фосфата (V) доказывалось спектральными методами (см. рис. 2, б).

Второй путь получения фосфата (V) заключается в обработке амидофосфита (VI) эквимолярным количеством бензилового спирта с образованием бензиламидофосфита (IX)*, фосфорилирование которым *N*-метил-*N*-бен-



* Синтез соединения (IX) выполнен с участием В. Б. Квантришвили.

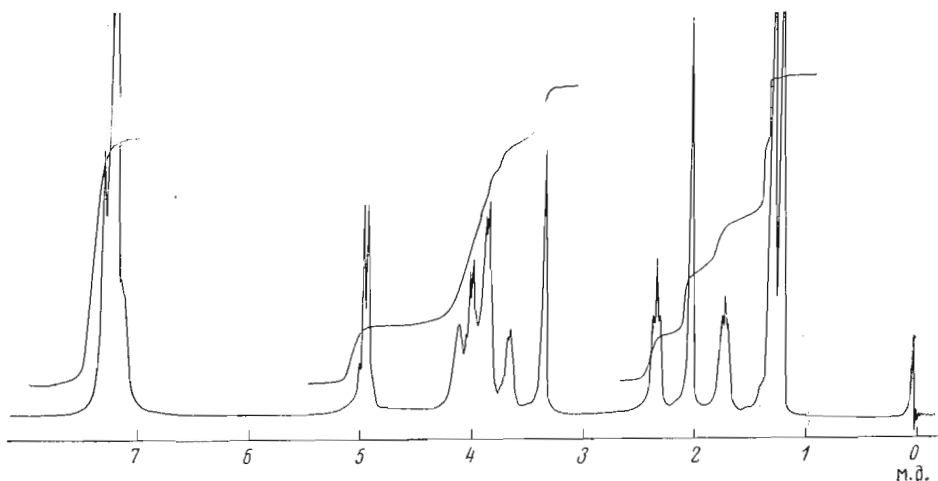


Рис. 4. Спектр ПМР бензил-(*D, L*-2,3-изопропилидендиоксипропил)-(*N*-метил-*N*-бензил-3-аминопропил)-фосфата (XI) (в CCl_4 ; ν_0 270 МГц)

зил-3-аминопропанола-1 привело к несимметричному фосфиту (X), окисленному далее в фосфат (XI) (схема 3).

Строение вещества (XI) доказано методом ИК- и ^1H -ЯМР и ^{31}P -спектроскопии (рис. 4).

Фосфат (XI) был подвергнут такому же гидролизу, как и соединение (VIII), и последующему гидрогенолизу над палладиевой чернью в метаноле с образованием фосфата (V). Свойства образцов, полученных двумя способами, полностью совпали.

Экспериментальная часть

Все синтезы с участием производных трехвалентного фосфора проводили в атмосфере сухого аргона. Тонкослойную хроматографию осуществляли в тонком слое окиси алюминия (II степени активности по Брокману) (метод 1), силикагеля Л (5/40 μ) (метод 2) и на пластинках Silufol UV₂₅₄ (метод 3), а также методом восходящей хроматографии на бумаге марки FN-1 (метод 4) с использованием систем бензол — диоксан, 3 : 1 (А), хлороформ (Б), хлороформ — метанол, 4 : 1 (В), хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (Г), гексан — диоксан — ацетонитрил, 20 : 4 : 1 (Д), метанол — 25% аммиак, 4 : 1 (Е), пропанол — 25% аммиак — вода, 6 : 3 : 1 (Ж). Обнаружение веществ на окиси алюминия проводили парами йода, а на силикагеле и на бумаге — опрыскиванием реактивом на фосфорсодержащие вещества [11]. Хроматограммы соединений, содержащих гидроксильные группы, для обнаружения веществ опрыскивали также реагентом на α -гликолевую группировку [12].

ИК-спектры снимали на спектрометре UR-20 (Zeiss, ГДР), спектры ПМР соединений (I), (IV) — на приборе JNM-PS-100 (JEOL, Япония), соединений (V), (VII) — на спектрометре JEOL JNM-MH-100 на частоте 100 МГц, а соединений (VIII), (XI) — на приборе Braker WH-270 (ФРГ) на частоте 270 МГц (внутренний стандарт — ГМДС). Спектры ^{31}P -ЯМР снимали на приборе JEOL C60-NL на частоте 24,3 МГц относительно внешнего стандарта — 85% фосфорной кислоты.

N-Метил-3-аминопропанол-1, *N*-метил-*N*-бензил-3-аминопропанол-1 и соединение (VI) получали по методам [13—15] соответственно.

2-Оксо-2-(1,2-дистеароил-глицеро)-3-метил-1,3,2-оксазифосфоринан (IV). Смесь 6,65 г диамидофосфита (II) и 0,74 г *N*-метил-4-аминопропанола-1 нагревали в колбе Кляйзена при 110° до завершения выделения рас-

четного количества диэтиламина. Остаток — белый, затвердевающий при охлаждении продукт — выдерживали 2 ч при 60°/0,5 мм. Выход соединения (III) 6,1 г (98,8%). R_f 0,8 и 0,35 (системы А и Б, метод 1). Спектр ^{31}P -ЯМР (CHCl_3 , δ , м. д.): —132 (с).

Через раствор 6,1 г амидофосфита (III) в 20 мл CHCl_3 продували при интенсивном перемешивании окись азота 3 ч при 20°, этот раствор фильтровали через 50 г окиси алюминия (слой 6 см), элюируя продукт дополнительно 30 мл CHCl_3 . Раствор упаривали, остаток дважды перекристаллизовывали из метанола и сушили в вакууме ($1 \cdot 10^{-4}$ мм) 2 ч при 60°. Выход фосфата (IV) 3,8 г (61%). Т. пл. 63—64,5°, R_f 0,7 и 0,3 (системы А и Б, метод 1), 0,6 (система А, метод 2). ИК-спектр (КВр, ν , см^{-1}): 1040, 1060, 1080, 1100 (СОС, РОС), 1220 (Р=О), 1380 (CH_3), 1740 (С=О). Спектр ПМР (в CHCl_3 , δ , м. д.): 0,86 (т, CH_2CH_3), 1,25 (м, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$), 1,62 (м, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,26 (т, OSOCN_2), 2,6 (д, $^3J_{\text{PNCN}}$ 11 Гц, NCH_3), 3,0 (м, NCH_2), 4,1 (м, OCH_2), 5,15 (квиптет, $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2\text{O}$). Спектр ^{31}P -ЯМР (CHCl_3 , δ , м. д.): —1,5 (с). Найдено, %: С 68,3; Н 11,1; Р 3,85. $\text{C}_{43}\text{H}_{84}\text{NO}_7\text{P}$. Вычислено, %: С 68,2; Н 11,2; Р 4,09.

1,2-Дистеароил-гас-глицеро-3-фосфорил-N-метил-3'-аминопропанола (I). Смесь 2,8 г амидофосфата (IV), 0,84 г CF_3COOH , 0,1 г воды в 20 мл CHCl_3 перемешивали 4 ч при 20° и оставляли на ночь. К реакционной массе добавляли раствор 0,622 г бикарбоната натрия в 10 мл воды, перемешивали 8 ч при 20° и оставляли на ночь. Хлороформный слой отделяли, промывали водой 2 раза по 5 мл и сушили Na_2SO_4 . Сушитель отфильтровывали и промывали 10 мл CHCl_3 , продукт из раствора высаживали 200 мл диоксана. Осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из диоксана. Дополнительную очистку проводили препаративной ТСХ на незакрепленном слое силикагеля с применением системы Г. Продукт наносили порциями по 0,15 г полосой 13 см на пластинку с 10 г силикагеля. Полоса продукта характерно обнаруживается по отслоению сорбента после высухания. Продукт с силикагеля экстрагировали смесью хлороформ — метанол, 1 : 1. Растворитель удаляли в вакууме и остаток сушили 2 ч при 60°/1 · 10⁻⁴ мм. Выход 1,87 г (65%). Температура размягчения 78—80 (4°/мин), т. пл. 164—166° (1°/мин). После перекристаллизации из диоксана выход 1,59 г (55,2%), т. пл. 179—181° (1°/мин), R_f 0,41 и 0,78 (системы В и Г, метод 2). ИК-спектр (КВр, ν , см^{-1}): 1040, 1060, 1100 (СОС, РОС), 1220, 1240 (PO_2^-), 1740 (С=О), 1640, 2480, 2740 ($\text{CH}_3\overset{+}{\text{N}}\text{H}_2$). Спектр ПМР (CHCl_3 , δ , м. д.): 0,86 (т, CH_2CH_3), 1,25 [м, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$], 1,62 (м, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,24 (т, OSOCN_2), 2,57 (сигнал, NCH_3), 3,0 (м, NCH_2), 4,0 (м, CH_2O), 5,15 (м, $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2\text{O}$), 10,0 (с, $\overset{+}{\text{N}}\text{H}_2$). Спектр ^{31}P -ЯМР (CHCl_3 , δ , м. д.): —0,5 (с). Найдено, %: С 66,2; Н 11,1; Р 3,92. $\text{C}_{43}\text{H}_{86}\text{NO}_8\text{P}$. Вычислено, %: С 66,5; Н 11,1; Р 3,99.

2-(D,L-2,3-Изопропилидендиоксипропилокси)-3-метил-1,3,2-оксазафосфоринан (VII). 1,71 г N-метил-3-аминопропанола-1 и 5,88 г диамидофосфита (VI) нагревали в колбе Кляйзена при 110° до завершения выделения рассчитанного количества диэтиламина, реакционную массу перегоняли. Выход 2,55 г (53%), т. кип. 100—102° (0,5 мм), n_D^{20} 1,4703, d_4^{20} 1,112, M_{R}^D 62,5, выч. 62,2; R_f 0,85 и 0,7 (системы А и Д, метод 1). ИК-спектр (пленка, ν , см^{-1}): 575 (фосфоринановый цикл), 1030, 1060, 1090, 1160 (СОС, РОС), 1380 [(CH_3)₂С]. Спектр ПМР (CHCl_3 , δ , м. д.): 1,3 [два синглета, (CH_3)₂С], 1,6; 2,0 (два мультиплета, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,35 (д, $^3J_{\text{PNCN}}$ 15 Гц, NCH_3), 3,0 (м, CH_2N), 3,9 (м, $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{OPOCH}_2$). Спектр ^{31}P -ЯМР (δ , м. д.): —138 (с). Найдено: %: С 48,3; Н 8,1; Р 12,3. $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NO}_4\text{P}$. Вычислено, %: С 48,1; Н 8,1; Р 12,4.

2-Оксо-2-(D,L-2,3-изопропилидендиоксипропилокси)-3-метил-1,3,2-оксазафосфоринан (VIII). Через раствор 1,35 г амидофосфита (VII) в 5 мл бензола при 20° пропускали 4 ч окись азота, бензол отгоняли, а оставшееся масло перегоняли. Выход 1,6 г (64%), т. кип. 120—125° (баня)/1 · 10⁻¹ мм,

n_D^{20} 1,4655, d_4^{20} 1,1620. $M R_D$ 63,2, выч. 62,9; R_f 0,5 и 0,12 (системы А и Д, метод 1). ИК-спектр (пленка, ν , см^{-1}): 575 (фосфоринановый цикл), 1030, 1060, 1090, 1160 (СОС, РОС), 1230 (Р=О), 1380 [(СН₃)₂С]. Спектр ПМР (СНCl₃, δ , м.д.): 1,3 [два синглета (СН₃)₂С], 1,6; 2,0 (два мультиплета, ОСН₂СН₂СН₂Н), 2,5 (д, $^3J_{\text{PNCN}}$ 10,5 Гц, NСН₃), 3,0 (м, СН₂Н), 3,9 (м, СН₂СН СН₂ОРОСН₂). Спектр ^{31}P -ЯМР (δ , м.д.): -5,3 (с). Найдено, %: С 45,3; Н 7,8; Р 11,6. С₁₀Н₂₀NO₅Р. Вычислено, %: С 45,2; Н 7,6; Р 11,7.

гас-Глицеро-1-фосфорил-N-метил-3'-аминопропанол (V). а. Смесь 2,3 г амидофосфата (VIII), 1,14 г СН₃СООН и 5 мл воды перемешивали 2 ч при 80°. После охлаждения к реакционной массе добавляли 30 мл ацетона, выпавшее вязкое масло отделяли, промывали два раза 15 мл ацетона и выдерживали 2 ч в вакууме при 50°/0,5 мм. Затем продукт растворяли в 10 мл метанола, добавляли 1 г амберлита IRA-93 (в ОН⁻-форме) и выдерживали 2 сут. Реакционную массу фильтровали, смолу промывали метанолом и удаляли растворитель в вакууме. Остаток сушили 6 ч в вакууме при 80°/1·10⁻⁴ мм. Выход 1,91 г (80%), n_D^{20} 1,4671; R_f 0,25 (система Е, метод 3), 0,53 (система Е, метод 4). ИК-спектр (пленка, ν , см^{-1}): 1060, 1090,

1130, 1220 (РОС, РО₂⁻), 1640, 2520, 2750 (СН₃⁺NH₂), 3350 (ОН). Спектр ПМР (CF₃СООН, δ , м.д.): 1,8 (квинт, ОСН₂СН₂СН₂Н), 2,5 (с, NСН₃), 3,0 (т, СН₂Н), 4,0 (м, СН₂СНСН₂ОРОСН₂), 6,7 (с, ОН); в СН₃ОН: 8,6 (с, NH₂⁺). Спектр ^{31}P -ЯМР (СН₃ОН, δ , м.д.): -0,8 (с) Найдено, %: С 34,4; Н 7,5; Р 12,3. С₇Н₁₈NO₆Р. Вычислено, %: С 34,6; Н 7,4; Р 12,7.

б. Аналогично методу а из 7,1 г фосфата (XI) в 1,63 г СН₃СООН и 7 мл воды получали бензил-(D, L-2,3-диоксипропил)-(N-метил-N-бензил-3-аминопропил)-фосфат. Выход 5,4 г (83%), n_D^{20} 1,5414. R_f 0,58 (система Е, метод 3), 0,66 (система Ж, метод 4). Спектр ^{31}P -ЯМР (СН₃ОН, δ , м.д.): -0,1 (с).

Гидрировали 0,5 г полученного фосфата в 5 мл метанола над 0,4 г палладиевой черни на протоке при комнатной температуре и атмосферном давлении 10 ч. Катализатор отделяли центрифугированием, промывали метанолом и раствор упаривали в вакууме. Остаток сушили 6 ч при 50°/1·10⁻⁴ мм. Выход 0,27 г (94%). n_D^{20} 1,4675. По хроматографической подвижности и спектральным данным продукт идентичен соединению, полученному по методу а.

Бензил-(D, L-2,3-изопропилидендиоксипропил)-диэтиламидофосфит (IX). По методике синтеза соединения (VII) из 6,3 г диамидофосфита (VI) и 2,2 г бензилового спирта получали соединение (IX). Выход 4,92 г (70%), т. кип. 105—110° (баня)/1·10⁻⁴ мм; R_f 0,8 и 0,55 (системы А и Д, метод 1). Спектр ^{31}P -ЯМР (δ , м.д.): -145 (с). Найдено, %: С 59,7; Н 8,2; Р 9,0. С₁₇Н₂₈NO₄Р. Вычислено, %: С 59,9; Н 8,2; Р 9,1.

Бензил-(D, L-2,3-изопропилидендиоксипропил)-(N-метил-N-бензил-3-аминопропил)-фосфат (XI). 2,99 г амидофосфита (IX) и 1,56 г N-метил-N-бензил-3-аминопропанола-1 нагревали при 110—120° до завершения выделения рассчитанного количества диэтиламина и выдерживали реакционную массу 1 ч в вакууме (0,5 мм). Выход фосфита (X) 3,95 г (90%). R_f 0,85 и 0,7 (системы А и Д, метод 1).

Через раствор 3,93 г фосфита (X) в 10 мл бензола при 20° пропускали 4 ч окись азота, бензол отгоняли и фосфат (XI) выделяли хроматографией на окиси алюминия в системе бензол — диоксан, 3 : 1. Выход 2,3 г (56%), n_D^{20} 1,5120; R_f 0,76 и 0,25 (системы А и Д, метод 1). ИК-спектр (пленка, ν , см^{-1}): 1030, 1060, 1160 (СОС, РОС), 1260 (Р=О), 1380 [(СН₃)₂С], 1500, 1580, 1600 (С₆Н₅). Спектр ПМР (СCl₄, δ , м.д.): 1,2 [два синглета, (СН₃)₂С], 1,7 (квинт, ОСН₂СН₂СН₂Н), 2,0 (с, NСН₃), 2,25 (т, СН₂СН₂Н), 3,2 (с, С₆Н₅СН₂Н), 3,9 (м, СН₂СНСН₂ОРОСН₂), 4,8 (д, $^3J_{\text{PORN}}$ 7,5 Гц, С₆Н₅СН₂О), 7,0 (м, С₆Н₅). Спектр ^{31}P -ЯМР (δ , м.д.): 0 (с.) Найдено, %: С 62,5; Н 7,8; Р 6,4. С₂₄Н₃₄NO₆Р. Вычислено, %: С 62,2; Н 7,6; Р 6,7.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chojnacki T., Korzubski T. (1963) Acta biochim. polon., 10, 233—240.
2. Bridges R. G., Ricketts J. (1967) J. Insect Physiol., 13, 835—850.
3. Chojnacki T. (1964) Acta biochim. polon., 11, 11—13.
4. Ansell G. B., Chojnacki T., Metcalf R. F. (1965) J. Neurochem., 12, 649—656.
5. Muramatsu T., Hara J. (1974) Bull. Soc. chim. France, 3335—3338.
6. Нифантьев Э. Е., Предводителев Д. А., Грачев М. К. (1976) Ж. общ. химии, 46, 477—482.
7. Грачев М. К., Предводителев Д. А., Нифантьев Э. Е. (1976) Ж. общ. химии, 46, 1677—1683.
8. Предводителев Д. А., Урванцева Г. А., Нифантьев Э. Е. (1973) Ж. общ. химии, 43, 948—951.
9. Charman D., Morrison A. (1966) J. Biol. Chem., 241, 5044—5052.
10. Defourcq J., Lussan C. (1972) FEBS Lett., 26, 35—38.
11. Vaskowsky V. E., Kostetsky E. Y. (1968) J. Lipid Res., 9, 396.
12. Усов А. И., Рехтер М. А. (1969) Ж. общ. химии, 39, 912—913.
13. Jones R. A. Y., Katritsky A. R., Trepanier D. L. (1971) J. Chem. Soc., Sec. B., 1300—1302.
14. Schlögl K., Schlögl R. (1964) Monatsh. Chem., 95, 922—941.
15. Предводителев Д. А., Поджувас Г. А., Нифантьев Э. Е. (1974) Ж. общ. химии, 41, 2195—2199.

Поступила в редакцию
4.V.1976

После доработки
2.VII.1976

SYNTHETIC ROUTE TO PHOSPHATIDYLHOMOETHANOLAMINES

NIFANTYEV E. E., PREDVODITELEV D. A., GRACHEV M. K.

V. I. Lenin State Pedagogical Institute, Moscow

The route for the synthesis of phosphatidylhomoethanolamines was proposed which is based on the use of diacylglycerol-containing 1,3,2-oxazaphosphorinanes. The most important feature of the new scheme is the cleavage of phosphorinane cycle by trifluoroacetic acid. It is shown that, in principle, a similar route can be followed for the synthesis of respective non-acylated glycerol derivatives.