



УДК 547.953

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СТАБИЛЬНЫЕ РАДИКАЛЫ

IX *. СИНТЕЗ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА,
СОДЕРЖАЩЕГО СПИН-МЕЧЕНЫЙ АЦИЛЬНЫЙ ОСТАТОК
В ПОЛОЖЕНИИ 1(3)

*Суханов В. А., Жданов Р. И., Швец В. И.,
Евстигнеева Р. П.*

*Научно-исследовательский институт по биологическим
испытаниям химических соединений, Кунава, Московская область;*

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

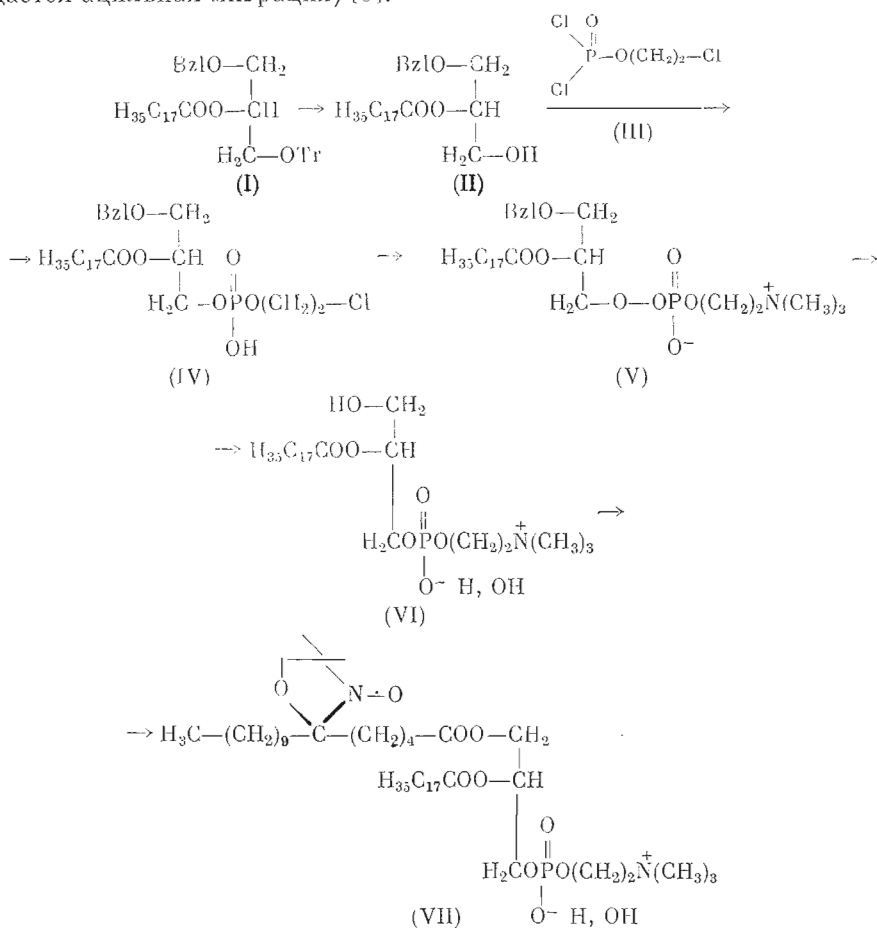
Предложен метод получения фосфатидилхолина, содержащего спин-меченый ацильный остаток в положении 1(3), позволяющий варьировать состав ацильных цепей молекулы, на примере синтеза 1-[гексадекап-6-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметил-оксазолидин)-оил]-2-стеароил-*rac*-глицеро-3-фосфохолина.

Спин-меченый по углеводородной части фосфатидилхолин широко используется при изучении различных мембранных структур, их конформационных изменений и липид-белковых взаимодействий [2]. Обычный путь синтеза спин-меченого по гидрофобной части фосфатидилхолина основан на выделении лецитина достаточной степени чистоты из природных источников, его гидролизе при действии фосфолипазами типа А и последующем ацилировании образующегося лизолецитина спин-мечеными производными жирных кислот известными методами [3, 4]. Для однозначного введения спин-меченых кислот по 1- или 2-ОН-группе глицериновой части молекулы необходимо получать соответствующие лизолецитины при действии специфических фосфолипаз типа A_1 или A_2 , не обладающих В-активностью. Малая доступность фосфолипазы A_1 в чистом виде затрудняет выделение лизофосфатидилхолина со свободной ОН-группой в первом положении глицериновой части молекулы. Кроме того, метод не позволяет изменять или по крайней мере однозначно определить другой ацильный остаток фосфолипида.

Предлагаемый нами метод синтеза удобен для получения такого типа соединений, необходимых для исследования различий между 1-О- и 2-О-ацильными остатками, часто выполняющих разную роль в биологических системах. Положение свободной ОН-группы и состав другого ацильного остатка в предлагаемом методе задается строением исходного глицерина. Так, например, для данного синтеза удобным исходным соединением является 1-бензил-2-стеароил-*rac*-глицерин (II), полученный из 1-бензил-3-тритил-*rac*-глицерина ацилированием его хлорангидридом стеариновой кислоты с последующим удалением тритильной защитной группы при дей-

* Сообщение VIII см. [1].

ствии борной кислотой в диоксане (в этих условиях практически не наблюдается ацильная миграция) [5].



Фосфорилирование спирта (II) проводили в пиридине при -15° действием трехкратного избытка β -хлорэтилдихлорфосфата (III) с последующим гидролизом водой образующегося хлорфосфата. Соединение (IV) подвергали кватернизации триметиламином [6] и после очистки на ионообменных смолах выделяли бензильное производное (V), гидрогенолиз которого в присутствии Pd-черни привел к лизофосфатидилхолину (VI) с количественным выходом. 2-Стеароил-*rac*-глицеро-3-фосфохолин (VI) ацилировали по методу Босса и сотр. [4] — незначительным избытком имидазолида спин-меченой пальмитиновой кислоты в расплаве при $40-45^\circ$. Preparативной хроматографией на силикагеле выделили 1-[гексакан-6-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилоксазолидин)-оил]-2-стеароил-*rac*-глицеро-3-фосфохолин (VII) с выходом 43,5% в виде воскообразного вещества, по хроматографическим свойствам подобного яичному лецитину.

Следует отметить, что имидазолидный метод ацилирования глицерофосфатов удобен и при ацилировании вторичной гидроксильной группы, например лизолецитина, полученного из яичного лецитина действием фосфолипазы A_2 . В этом случае, по нашим данным, при введении спин-меченых кислот выход достигает 25–30% через 6–8 ч реакции. Увеличение длительности реакции (в работе [4] — 3 сут при 50°) ведет к осмолению реакционной массы и накоплению неидентифицированных продуктов (контроль за ходом реакции осуществлялся методом ТСХ). Кроме того, образование побочных продуктов затрудняет очистку и выделение искомого соединения. Preparативной хроматографией нами был выделен спин-

спиртовых растворов (20% этанола) спин-меченых фосфатидилхолинов (VII) и (VIII) в присутствии Ca^{2+} быстро увеличивалась подвижность спиновой метки в случае производного (VIII) до величины, характерной для свободной спин-меченой по $\text{C}_{(6)}$ углеводородной цепи пальмитиновой кислоты (подвижность оценивали по соотношению интенсивностей высокополюсного (а) и центрального (в) компонентов спектра, рисунок) [2]. Для фосфатидилхолина (VII) в этих условиях методом ЭПР изменений не обнаружено ($a/v = 0,52$ до и после добавления фосфолипазы), хотя в обоих случаях, по данным ТСХ, происходил гидролиз 2-О-сложноэфирной связи (гидролиз фосфолипида (VII) проходил медленнее и не до конца из-за его рацемической природы).

Экспериментальная часть

ИК-спектры снимали на спектрометре «Perkin-Elmer-257» (США) в пленке или вазелиновом масле (кроме специально оговоренных случаев, когда спектры снимались в хлороформе), спектры ЭПР — на радиоспектрометре «Varian E-109» (США) в этаноле и водно-солевых растворах.

Определение содержания радикалов проводилось сравнением интегральных интенсивностей линий спектра истинных растворов испытуемого образца в этаноле и чистого иминоксильного радикала с известным содержанием числа спинов на моль, а также сравнением с исходной спин-меченой кислотой [8].

Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Л 100/160 μ , ТСХ — на силикагеле Л5/40 и Л40/100 μ (Chemapol, ЧССР) в системах: гексан — эфир, 7 : 3 (А), хлороформ — ацетон — метанол, 4 : 1 : 1 (Б), хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (В), хлористый метилен — метанол — вода, 75 : 25 : 4 (Г). Пятна обнаруживали парами иода, опрыскиванием серной кислотой (уд. вес 1,84) или реактивом на фосфорсодержащие вещества [9] с последующим прокаливанием в двух последних случаях пластинок при 300—400°. Фосфолипиды, содержащие холин, обнаруживали реактивом Драгендорфа [9]. Пятна, содержащие ароматические соединения, обнаруживали по свечению в УФ-свете. При проведении препаративной ТСХ полосы с веществами, содержащими иминоксильные радикалы, обнаруживали по характерному желтому окрашиванию.

Все синтезированные вещества имели удовлетворительный элементный анализ, за исключением соединения (VIII), для которого элементный анализ не проводился.

В работе применялась фосфолипаза A_2 (КФ 3.1.1.4) яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*, выделенная в лаборатории химии белка Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР по методике [10]. Использовали раствор фосфолипазы A_2 ($2 \cdot 10^{-4}$ М) в трис-буфере (рН 8).

1-Бензил-2-стеароил-3-тритил-гас-глицерин (I). К 6,5 г 1-бензил-3-О-тритилглицерина (n_D^{20} 1,6013) [11] в 20 мл бензола и 2 мл пиридина при перемешивании и охлаждении до 0° прибавляли раствор 5,0 г стеароилхлорида (т. пл. 26°) [12] в 15 мл бензола. Реакционную массу перемешивали 20 ч при 40°, отфильтровывали от выпавшего осадка, упаривали и остаток хроматографировали на силикагеле, смывая вещество (I) смесью петролейный эфир — бензол, 4 : 1. Получали 10,1 г (98%) аморфного соединения (I), R_f 0,8 (А). ИК-спектр (см^{-1}): 3020, 3010, 1500 (ароматика); 1740 ($\text{C}=\text{O}$).

1-Бензил-2-стеароил-гас-глицерин (II). Смесь 3,5 г тритильного производного (I) и 4,0 г тонкоизмельченной борной кислоты в 30 мл диоксана кипятили 48 ч при перемешивании. Смесь упаривали, остаток экстрагировали гексаном (3×50 мл), отфильтровывали от осадка, растворитель отгоняли. Остаток хроматографировали на колонке, вымывая вещество (II) смесью четыреххлористый углерод — хлороформ (85 : 15). Получали

1,07 г (50%) воскообразного соединения (II), R_f 0,3 (А). ИК-спектр (см^{-1}) (хлороформ): 3610 (ОН), 3020, 3010, 1500 (ароматика), 1740 ($\text{C}=\text{O}$).

Литературные данные [13]: воскообразный материал, т. пл. 32—33°.

1-Бензил-2-стеароил-гас-глицеро-3-фосфо-2'-хлорэтанол (IV). К 0,45 г глицерида (II) в 2 мл пиридина при -15° и перемешивании за 30 мин добавляли 0,6 г β -хлорэтилдихлорфосфата (III) (т. кип. 123—124° при 10 мм рт. ст.) [14]. Смесь выдерживали еще 30 мин при -15° , а затем 1 ч при комнатной температуре, добавляли 1 мл воды и упаривали. Остаток экстрагировали эфиром (5×30 мл). Остаток из экстракта разделяли хроматографией на колонке, вымывая соединение (IV) смесью хлороформ — метанол (99 : 1). Получали 0,46 г (76,7%) аморфного фосфолиэфира (IV), R_f 0,4 (Б). ИК-спектр (см^{-1}): 3100, 3080, 3040, 3020, 1500 (ароматика), 1740 ($\text{C}=\text{O}$), 1240 ($\text{P}=\text{O}$), 1050, 1030 ($\text{P}-\text{O}-\text{C}$ и $\text{C}-\text{O}-\text{C}$).

1-Бензил-2-стеароил-гас-глицеро-3-фосфохолин (V). К 0,19 г фосфата (IV) в 2 мл бензола в ампуле добавляли 4 мл триметиламина при охлаждении жидким азотом. Ампулу запаивали и выдерживали смесь при 80—100° в течение 40 ч. Ампулу охлаждали жидким азотом и вскрывали. Содержимое упаривали досуха, растворяли в метаноле, добавляли смесь ионообменных смол амберлит IRA-400 (OH^-) и дауэкс 50W $\times$ 8 (H^+) в соотношении 1 : 1 и встряхивали 15 мин. Отфильтровывали раствор, промывая смолы метанолом (5×25 мл), упаривали растворители. Маслообразный остаток высушивали (2 ч при 0,1 мм рт. ст.) и растирали с 10 мл ацетона. Декантировали раствор и повторяли эту операцию дважды. Остаток высушивали (4 ч, 0,1 мм рт. ст.) и получали 0,13 г (64,3%) хроматографически однородного аморфного вещества (V), R_f 0,11 (В). ИК-спектр (см^{-1}): 3400 (ОН), 3100, 3080, 3040, 3020, 1500 (ароматика), 2740, 1640 ($\text{P}-\text{O}^-$), 1740 ($\text{C}=\text{O}$), 1240 ($\text{P}=\text{O}$), 1100, 1070 ($\text{P}-\text{O}-\text{C}$ и $\text{C}-\text{O}-\text{C}$).

2-Стеароил-гас-глицеро-3-фосфохолин (VI). 0,10 г вещества (V), растворенного в 5 мл смеси этилацетат — метанол (1 : 9), гидрировали в токе водорода в присутствии Pd-черни. После окончания поглощения водорода реакционную смесь фильтровали, катализатор промывали метанолом (3×20 мл). Фильтраты объединяли и упаривали. Получали 0,085 г (98%) воскообразного вещества (VI), R_f 0,08 (В), 0,3 (Г). ИК-спектр (см^{-1}): 3500—3150 (ОН), 1740 ($\text{C}=\text{O}$), 1240—1210 ($\text{P}=\text{O}$), 1100—1030 ($\text{P}-\text{O}-\text{C}$ и $\text{C}-\text{O}-\text{C}$).

1-[Гексадекан-6-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилоксазолидин)-оил]-2-стеароилглицеро-3-фосфохолин (VII). В атмосфере аргона к 0,023 г гексадекан-6-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилоксазолидин)-овой кислоты (т. пл. 30—31°) [8] добавляли 0,018 г карбонилдимидазола в 1 мл бензола и перемешивали смесь при комнатной температуре 15 мин. Добавляли 0,030 г лизосоединения (VI), упаривали в вакууме реакционную массу, приливали 2 мл четыреххлористого углерода и снова упаривали смесь досуха. Выдерживали 2 ч при 0,1 мм рт. ст., расплавляли и перемешивали реакционную массу при 40—45° в течение 8 ч. Добавляли 1 мл воды и 3 мл хлороформа, отгоняли растворители. Остаток разделяли с помощью препаративной ТСХ в системе (В). Выделяли 0,022 г (43,5%) бледно-желтого вещества (VII), R_f 0,3 (В), 0,19 (Б). ИК-спектр (см^{-1}): 3300—3100 (ОН), 2720 ($\text{P}-\text{O}^-$), 1740 ($\text{C}=\text{O}$), 1230 ($\text{P}=\text{O}$), 1070 ($\text{P}-\text{O}-\text{C}$ и $\text{C}-\text{O}-\text{C}$). ЭПР-спектр (этанол): $a_N = 15,0$ Гс, $(5,0 \pm 0,5) \cdot 10^{23}$ спин/моль.

Авторы благодарят А. И. Мирошникову за любезное предоставление препарата фосфолипазы A_2 , В. В. Оханова — за помощь в снятии ЭПР-спектров и А. П. Каплуна — за выделение яичного лизолецитина. †

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhdanov R. I., Kapitanova N. G., Rozantsev E. G. (1977) Synthesis, 312—313.
2. Schreier-Muccillo S., Smith J. (1973) in Progress in Surface and Membrane Science (Danielli J. E., Rosenberg M. D., Cadenhead D. A., eds.), vol. 9, pp. 1—85, Acad. Press, N.Y.

3. Hubbell W. L., McConnell H. M. (1971) J. Amer. Chem. Soc., **93**, 314—326.
4. Boss W. F., Kelley C. J., Landsberger F. R. (1975) Analyt. Biochem., **64**, 289—292.
5. Pfeiffer F. R., Miao C. K., Weisbach J. A. (1970) J. Org. Chem., **35**, 221—224.
6. Shapiro D., Flowers H. M., Spector-Shefer S. (1958) J. Amer. Chem. Soc., **80**, 2339—2340.
7. Lipolytic enzymes (1974) Brockerhoff H., Jensen R. G. (eds.), pp. 229—231, Acad. Press, N. Y.
8. Жданов Р. И., Суханов В. А., Капитанова Н. Г., Шве́ц В. И., Евстигнеева Р. П., Розанцев Э. Г. (1976) Биооргани. химия, **2**, 395—398.
9. Новицкая Г. В. (1972) Методическое руководство по ТСХ липидов, с. 44—45, «Наука», М.
10. Апсало́н У. Р., Шамбора́нт О. Г., Мирошников А. И. (1977) Биооргани. химия, **3**, 1553—1559.
11. Волкова Л. В., Шве́ц В. И., Хандка́рова В. С., Рыже́нкова С. Ф., Преображе́нский Н. А. (1963) Ж. общ. химии, **33**, 1848—1851.
12. Бюлер Н., Пирсон Д. (1973) Органические синтезы, т. 2, с. 348—351, М.
13. Haas G. H., Van Deenen L. L. (1965) Biochim. et biophys. acta, **106**, 315—325.
14. Renshaw R. R., Hopkins C. Y. (1929) J. Amer. Chem. Soc., **51**, 953—956.

Поступила в редакцию
11.VII.1977

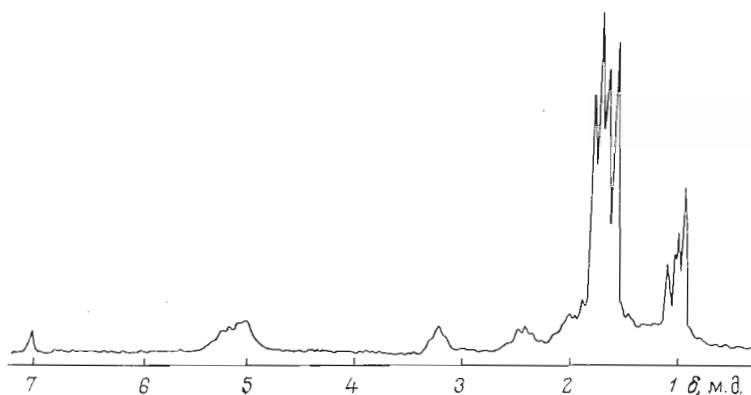
После доработки
27.XII.1977

BIOLOGICALLY ACTIVE STABLE RADICALS. IX. SYNTHESIS OF PHOSPHATIDYLCHOLINE CONTAINING A SPIN-LABELED ACYL GROUP IN POSITION 1(3)

SUKHANOV V. A., ZHDANOV R. I., SHVETS V. I.,
EVSTIGNEEVA R. P.

*Institute for Biological Testing of Chemical Compounds, Kupavna;
M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow*

A method has been proposed for preparing phosphatidylcholine analogs containing a spin-labeled acyl group in position 1 (3). The method, which also allows to vary the composition of acyl moiety, was illustrated by synthesizing 1-[hexadecane-6-spiro-2'-(N-oxy-4',4'-dimethyloxazolidine)-oyl]-2-stearoyl-*rac*-glycero-3-O-phosphocholine.



Спектр ЯМР гиперфорина (I) в CCl_4 при 100 МГц

об ионогенном характере его хромофорной группировки, которая, по данным спектрофотометрического титрования, имеет $\text{pK}_{a4,8}$. Судя по спектру ЯМР (см. рисунок), антибиотик содержит 11 С-метильных групп, одна из которых находится при четвертичном, две — при третичных и восемь — при олефиновых С-атомах. Кроме того, он имеет четыре олефиновых протона (δ 4,8—5,3 м. д.) и один Н-атом ($\delta \sim 7$ м. д.), который легко обменивается на дейтерий в D_2O и, очевидно, должен принадлежать енольному гидроксилу.

Для определения природы хромофорной группировки гиперфорина были изучены спектральные свойства его производных. Так, было найдено, что при ацетилировании уксусным ангидридом в пиридине образуется О-моноацетильное производное гиперфорина (IV), у которого максимум УФ-поглощения (250 нм) сильно сдвинут в коротковолновую область по сравнению с исходным антибиотиком. Метилирование гиперфорина диазотетаном приводит к О-метильному производному (III) ($\lambda_{\text{макс}}$ 270 нм), УФ-спектр которого не зависит от концентрации и pH раствора. В результате алкилирования антибиотика иодистым метилом и гидридом натрия в диметилсульфоксиде образуется его С-монометильное производное (V). УФ-спектр этого соединения указывает на присутствие не сопряженного кетонного хромофора ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{еион}}$ 294, 303 нм, ϵ 142, 138), а судя по его спектру ЯМР, новая метильная группа (синглет при 1,54 м. д.) связана с четвертичным атомом углерода. Таким образом, характерные изменения УФ-спектра гиперфорина при О-ацилировании и С-алкилировании, зависимость положения максимума поглощения и величины экстинкции от концентрации и pH раствора, а также кислотные свойства антибиотика свидетельствуют о том, что его ионогенная хромофорная группировка имеет строение енолизovanного α -замещенного β -дикетона и что при С-метилировании входящая группа занимает положение между карбонилами, препятствуя их енолизации.

При восстановлении гиперфорина избытком LiAlH_4 образуется тетрагидропроизводное (IX). УФ-спектр этого соединения аналогичен спектру гиперфорина, и, следовательно, оно сохраняет енолизованную дикетонную группировку антибиотика. В то же время в отличие от гиперфорина это тетрагидропроизводное имеет три активных Н-атома, обменивающихся с D_2O на дейтерий (определено масс-спектрометрически). Поскольку один $\text{H}_{\text{акт}}$ содержится в енолизованной β -дикетонной группировке, два других должны принадлежать гидроксилам, образовавшимся в результате восстановления двух кетонных групп антибиотика. При действии на тетрагидрогиперфорин уксусным ангидридом в пиридине был получен моноацетат (X), в ИК-спектре которого присутствует полоса 1775 см^{-1} , характерная для ацильных производных енолов. При его последующей обработ-

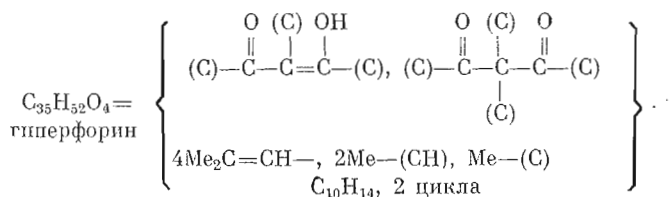
ке фосгеном и диметиламином с целью получения бис-уретана образовался циклический карбонат (XI). Присутствие в его ИК-спектре полосы поглощения $\text{C}=\text{O}$ при 1765см^{-1} свидетельствует о том, что карбонатный цикл является шестичленным, откуда, в свою очередь, вытекает 1,3-расположение спиртовых групп в енолацетате и соответствующих кетонных групп в гиперфторине. Следовательно, антибиотик содержит две β -дикетонные группировки: одну сопряженную, енолизованную, и одну неенолизованную.

При гидрировании над Pt-или Pd-катализаторами гиперфорин быстро поглощает 4 моль водорода, образуя октагидропроизводное (XII), которое, судя по УФ-спектру, сохраняет β -дикетонный хромофор антибиотика. В спектре ЯМР октагидрогиперфорина сигналы имевшихся у антибиотика олефиновых протонов отсутствуют, а сигналы 8 метильных групп, находившиеся при 1,5—1,8 м. д., смещены в сторону сильного поля. Это показывает, что антибиотик содержит четыре $\text{C}=\text{C}$ -связи.

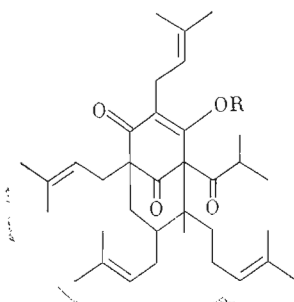
Подобно гиперфторину С-метилгиперфорин при каталитическом гидрировании с Pd легко поглощает 4 моль водорода, образуя соответствующее октагидропроизводное (VIII). Это вещество оказалось устойчивым к действию сильных кислот и таких окислителей, как KMnO_4 . Используя это обстоятельство, мы подвергли С-метилоктагидрогиперфорин кислотнокатализируемому дейтерированию с помощью D_2SO_4 в растворе D_2O — диоксан и нашли (масс-спектрометрически), что даже в этих форсированных условиях только один атом водорода заменяется на дейтерий, т. е. в его молекуле имеется только одна CH -группа в α -положении к кетонному карбонилу.

С другой стороны, учитывая инертность С-метилоктагидрогиперфорина к действию KMnO_4 (и следовательно, устойчивость основной части углеродного скелета гиперфорина), мы предприняли направленную деградацию антибиотика по олефиновым связям. При окислении С-метилгиперфорина смесью $\text{KMnO}_4 + \text{NaIO}_4$ было установлено, что в качестве единственного летучего продукта образуется ацетон, количество которого превышает 3 моль (определено йодометрически и в виде 2,4-динитрофенилгидразона). Из нелетучих продуктов окисления была выделена кислота (VI), названная метилгиперфориновой, которая при действии диазометана дала тетраметильный эфир (VII). Отсюда вытекает, что в С-метилгиперфторине (а следовательно, и в самом антибиотике) имеются 4 изобутенильные группы — $\text{CH}=\text{CMe}_2$.

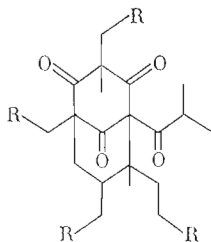
Эмпирическая формула гиперфорина указывает на наличие 10 инкрементов двойных связей и циклов. Как было показано выше, четыре из них должны быть приписаны изобутенильным группам, а еще четыре — карбонильным. Очевидно, что оставшиеся два инкремента обусловлены присутствием двух углеродных колец. Таким образом, гиперфорин представляет собой бициклический енолизованный тетракетон и имеет одну третичную и две вторичные С-метильные группы, а также четыре боковые цепи, которые оканчиваются изобутенильными остатками:



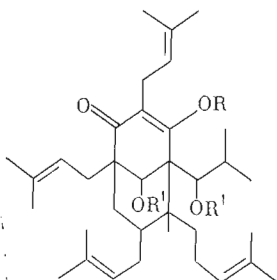
Изображенная выше развернутая формула суммирует сведения о строении антибиотика, полученные на данном этапе его изучения. Ниже для удобства приведены также полные структурные формулы обсуждаемых соединений, установленные в конечном итоге всей серии исследований.



- (I) R=H
 (II) R=COC₆H₃(NO₂)_{2-3,5}
 (III) R=Me
 (IV) R=Ac



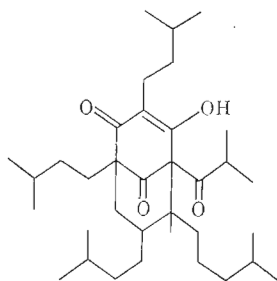
- (V) R=CH=CMe₂
 (VI) R=CO₂H
 (VII) R=CO₂Me
 (VIII) R=CH₂CHMe₂



- (IX) R=R'=H

- (X) R=Ac, R'=H

- (XI) R=Ac, R'+R'= >CO



- (XII)

Экспериментальная часть

ИК-, УФ-, ЯМР- и масс-спектры получены соответственно на приборах UR-10, Specord UV-VIS, Jeol 4H-100 или Varian HA-100, LKB-9000; приняты следующие обозначения: ш — широкий, с — синглет, д — дублет, дд — дублет дублетов, м — мультиплет. УФ-спектры измерены в 96% спирте ($\lambda_{\text{макс}}$), 0,05 н. спиртовом NaOH ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{HO}^-}$), 0,05 н. спиртовой HCl ($\lambda_{\text{макс}}^{\text{H}^+}$). Молекулярные веса определены масс-спектрометрически и рассчитаны по основным изотопам: ¹H, ¹²C, ¹⁴N, ¹⁶O. Для препаративной ТСХ использованы незакрепленные слои адсорбента толщиной 1 мм, а для аналитической ТСХ — толщиной 0,5 мм. Вещества обнаруживали по гашению флуоресценции индикатора в УФ-свете и после опрыскивания хроматограмм 1% водным раствором KMnO₄ или щелочным раствором бромтимолового синего.

Выделение гиперфорина в виде 3,5-динитробензоата (II). 2,5 кг сухой травы зверобоя экстрагировали 10 л ацетона 2 сут при 10–15°, экстракты встряхивали с 250 г активированного угля, фильтровали и упаривали. Темно-коричневый остаток (45 г) растворили в 250 мл смеси бензол — петролейный эфир (1:1), содержащей 0,01% иопола, и хроматографировали на колонке с кремневой кислотой (2,5 л, 75–100 меш, III акт.). Элюировали 3 л такой же смеси растворителей, анализируя фракции ТСХ на кремневой кислоте в системе гексан — эфир (4:1), в которой антибиотик имеет R_f 0,5. Полученный в виде масла гиперфорин (20 г) ацилировали в 400 мл бензола и 25 мл пиридина 30 г 3,5-динитробензоилхлорида 12 ч при 20° и 1 ч при 80°. Раствор промыли 5% HCl и 5% NaHCO₃, концентрировали в вакууме и хроматографировали на колонке с кремневой кислотой, вымывая бензолом. Полученный 3,5-динитробензоат гиперфорина (II)

последовательно кристаллизовали из смеси спирт — эфир (95:5) и из спирта, выход 7 г, т. пл. 121—123°; ИК (C_2Cl_4 , ν , cm^{-1}): 1745, 1720, 1710, 1660, 1635 (ν); УФ: λ_{max} 230 нм (ϵ 27 000); ЯМР ($CDCl_3$, δ , м. д.): 1,02 (3H, д, J 7 Гц), 1,08 (3H, с), 1,15 (3H, д, J 7 Гц), 1,5—1,76 (24H), 5,06 (4H, м), 9,13 (2H, д, J 2 Гц), 9,33 (2H, д, J 2 Гц). Найдено, %: С 69,2; Н 7,5; N 3,9. M 730. $C_{42}H_{54}O_9N_2$. Вычислено, %: С 69,0; Н 7,1; N 3,8. M 730.

Получение гиперфорина (I). 730 мг динитробензоата (II) в 35 мл спирта при 20° смешали с 4 мл 1 н. КОН, через 1,5 ч нейтрализовали 10% H_2SO_4 до pH 7 и упарили. Остаток растворили в бензоле, промыли насыщенным раствором $NaHCO_3$ и фильтровали через небольшой слой кремневой кислоты. Получили 520 мг (97%) гиперфорина (I) в виде бесцветного масла, которое кристаллизовали из гексана, содержащего 0,05% ионола, т. пл. 79—80°; $[\alpha]_D^{18} + 41^\circ$ (с 5, EtOH); ИК (C_2Cl_4 , ν , cm^{-1}): 3340, 1730, 1650, 1620, 1610; УФ: см. таблицу; ЯМР (CCl_4 , δ , м. д.): 0,9—1,14 (9H), 1,5—1,8 (24H), 4,8—5,3 (4H, м), 6,97 (1H, с; обменивается с D_2O). Найдено, %: С 78,3; Н 9,8. M 536. $C_{36}H_{52}O_4$. Вычислено, %: С 78,3; Н 9,8. M 536.

С-Метилирование гиперфорина. К 1 г гиперфорина в 10 мл диметилсульфоксида при 20° прибавили 50 мг NaN и 1 мл иодистого метила, через 16 ч избыток MeI удалили в вакууме, раствор разбавили водой и экстрагировали петролейным эфиром. Объединенные экстракты промыли водой, профильтровали через слой Al_2O_3 (II акт., 10 мл), адсорбент промыли смесью эфир — петролейный эфир (1:10) и фильтрат упарили. После кристаллизации остатка из спирта получили 750 мг (72%) С-метилгиперфорина (V), т. пл. 62—64°; ИК (CCl_4 , ν , cm^{-1}): 1725, 1700, 1690 (ν); УФ (гексан, λ_{max}): 294, 303 нм (ϵ 142, 133); ЯМР (CCl_4 , δ , м. д.): 1,02 (3H, с), 1,02 (3H, д, J 7 Гц), 1,15 (3H, с), 1,20, (3H, д, J 7 Гц), 1,54 (3H, с), 1,6—1,75 (24H), 4,8—5,3 (4H, м). Найдено, %: С 78,5; Н 9,8; О 11,6. M 550. $C_{36}H_{54}O_4$. Вычислено, %: С 78,5; Н 9,8; О 11,6. M 550.

О-Метилирование гиперфорина. 540 мг гиперфорина выдержали с избытком 0,5 М эфирного раствора диазометана в течение 30 мин. После отгонки растворителя получили метиловый эфир (III) с количественным выходом, ИК (C_2Cl_4 , ν , cm^{-1}): 1725, 1660, 1630; УФ: λ_{max} 270 нм (ϵ 9000). Найдено: M 550. $C_{36}H_{54}O_4$. Вычислено: M 550.

Ацетилирование гиперфорина. Раствор 540 мг гиперфорина в 2 мл пиридина и 1 мл уксусного ангидрида выдержали 16 ч при 20°, обработали обычным способом и препаративной ТСХ на кремневой кислоте в системе гексан — эфир (4:1), выделили 275 мг (47%) ацетата гиперфорина (IV); ИК (CCl_4 , ν , cm^{-1}): 1775, 1720, 1650; УФ: λ_{max} 250 нм (ϵ 10 000). Найдено: M 578. $C_{37}H_{54}O_5$. Вычислено: M 578.

Каталитическое гидрирование гиперфорина. 500 мг гиперфорина в 10 мл спирта гидрировали над 50 мг 5% Pd/C при 20° до прекращения поглощения водорода (всего около 4 ммоль). После хроматографии на кремневой кислоте в смеси гексан — эфир (4:1) получили 500 мг октагидрогиперфорина (XII); ИК (C_2Cl_4 , ν , cm^{-1}): 3360 (ν), 1720, 1620; УФ: $\lambda_{max}^{H^+}$ 275 нм (ϵ 8000), $\lambda_{max}^{HO^-}$ 300 нм (ϵ 11 600); ЯМР (CCl_4 , δ , м. д.): 0,82—1,20 (33H), 7,0 (1H, с; обменивается с D_2O). Найдено: M 544. $C_{33}H_{60}O_4$. Вычислено: M 544.

3,5-Динитробензоат: т. пл. 120—121° (из спирта); ЯМР ($CDCl_3$, δ , м. д.): 0,9—1,2 (33H), 9,1 (2H, д, J 2 Гц), 9,3 (2H, д, J 2 Гц). Найдено: M 738. $C_{42}H_{52}O_9N_2$. Вычислено: M 738.

Каталитическое гидрирование С-метилгиперфорина провели по методике предыдущего опыта. Выход С-метилоктагидрогиперфорина (VIII) количественный, т. пл. 99—101°; ИК (CCl_4 , ν , cm^{-1}): 1725, 1700; ЯМР (CCl_4 , δ , м. д.): 0,9—1,15 (33H), 1,46 (3H, с). Найдено: M 558 (после выдерживания 10 сут с 0,1 н. D_2SO_4 в D_2O — диоксане найдено M 559). $C_{36}H_{62}O_4$. Вычислено: M 558.

Восстановление гиперфорина $LiAlH_4$. К 100 мл 0,25 н. эфирного раст-

вора LiAlH_4 при 0° постепенно прибавили 540 мг гиперфорина в 15 мл эфира, смесь перемешивали 1 ч при 20° и избыток LiAlH_4 разложили этилацетатом. После обычной обработки получили масло, которое растерли с гексаном и кристаллизовали из смеси гексан — ацетон. Выход тетрагидрогиперфорина (IX) 410 мг (76%), т. пл. $151-152^\circ$; ИК (нуйол, ν , см^{-1}): 3510, 3250 (ш), 1720, 1590 (ш); УФ: $\lambda_{\text{макс}}^{\text{H}^+}$ 277 нм (ϵ 13 000), $\lambda_{\text{макс}}^{\text{HO}^-}$ 303 нм (ϵ 21 000); ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): 0,93 (3H, д, J 7 Гц), 1,05 (3H, д, J 7 Гц), 1,28 (3H, с), 1,5—1,75 (24H), 3,96 (1H, с), 4,56 (1H, с), 4,9—5,2 (4H, м), 10, 47 (1H, с). Найдено: M 540 (после обработки D_2O найдено M 543). $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{O}_4$. Вычислено: M 540.

Ацилирование тетрагидрогиперфорина. Раствор 220 мг тетрагидрогиперфорина (IX) в 2 мл уксусного ангидрида и 2 мл пиридина выдержали 16 ч при 20° . После обычной обработки и препаративной ТСХ (кремневая кислота, гексан — эфир, 4:1) получили 200 мг (85%) моноацетата тетрагидрогиперфорина (X), т. пл. $85-87^\circ$ (из ацетонитрила); ИК (CCl_4 , ν , см^{-1}): 3540, 3480, 1775, 1650; ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): 0,67 (3H, д, J 7 Гц), 1,07 (3H, д, J 7 Гц), 1,5—1,8 (24H), 2,25 (3H, с), 3,92 (1H, с), 4,2 (1H, шс), 4,9—5,2 (4H, м). Найдено: M 582 (после обработки D_2O найдено M 584). $\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_5$. Вычислено: M 582.

В раствор 50 мг моноацетата тетрагидрогиперфорина (X) в 3 мл бензола и 0,5 мл безводного пиридина при 0° пропускали в течение 2 мин фосген, а затем в течение 5 мин ток диметиламина. Реакционную смесь оставили на 2 ч при 20° , разбавили эфиром и промыли 2 н. HCl . После препаративной ТСХ (кремневая кислота, гексан — эфир, 4:1) получили 50 мг (95%) карбоната енолацетата тетрагидрогиперфорина (XI); ИК (CCl_4 , ν , см^{-1}): 1772, 1765, 1670, 1635; ЯМР (CCl_4 , δ , м. д.): 1,15—1,35 (9H), 1,5—1,8 (24H), 2,25 (3H, с), 4,17 (1H, с), 4,38 (1H, шс), 4,8—5,15 (4H, м). Найдено: M 608. $\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{O}_6$. Вычислено: M 608.

Окисление С-метилгиперфорина. К 1,1 г С-метилгиперфорина (V) в 80 мл трет-бутанола последовательно прибавили при перемешивании 1,5 г K_2CO_3 в 35 мл воды и в течение 1 ч раствор 236 мг KMnO_4 и 11 г $\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 48 мл 1 н. NaOH и 100 мл воды. Реакционную смесь перемешивали 16 ч, избыток окислителя разрушили 5 мл этиленгликоля, бутанол отогнали в вакууме, раствор подкислили 10% H_2SO_4 до pH 3 и экстрагировали эфиром. После обычной обработки экстракт хроматографировали на колонке с кремневой кислотой, элюируя смесями бензол — ацетон, 4:1, 3:1 и 2:1. Выход метилгиперфориновой кислоты (VI) 730 мг (72%), R_f 0,4 (кремневая кислота II акт., бензол — ацетон, 4:1); ЯМР ($\text{C}_6\text{H}_6 + \text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, δ , м. д.): 0,83 (3H, с), 0,98 (3H, д, J 7 Гц), 1,15 (3H, д, J 7 Гц), 1,3 (3H, с), 2,97 (2H, с), 2,65 и 2,92 (2H, дд, J 17 Гц), 1,97—2,7 (10H). Найдено: эквивалентный вес (титрованием 0,1 н. NaOH) 130. $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4 \cdot (\text{CO}_2\text{H})_4$. Вычислено: эквивалентный вес 127,5.

Тетраметилловый эфир (VII) получен из кислоты (VI) в эфирном растворе действием CH_3N_2 . Т. пл. $102-104^\circ$ (из метанола); ИК (КВг, ν , см^{-1}): 1740, 1705 (ш), 1695; УФ: $\lambda_{\text{макс}}$ 298 нм (ϵ 250); ЯМР (C_6H_6 , δ , м. д.): 0,81 (3H, д, J 7 Гц), 0,98 (3H, с), 1,02 (3H, д, J 7 Гц), 1,39 (3H, с), 2,81 (2H, с), 2,47 и 2,80 (2H, дд, J 17 Гц), 3,1—3,25 (12H); ЯМР (CCl_4 , δ , м. д.): 0,75 (3H, с), 0,87 (3H, д, J 7 Гц), 1,1 (3H, д, J 7 Гц), 1,42 (3H, с), 2,46 и 2,76 (2H, дд, J 17 Гц), 2,86 (2H, с), 3,16 (3H, с), 3,20 (3H, с), 3,23 (3H, с), 3,28 (3H, с).

ЛИТЕРАТУРА

1. Быстров Н. С., Добрынин В. Н., Колосов М. Н., Чернов Б. К., Червин И. И., Яковлев Г. И. (1976) Докл. АН СССР, 226, 338—341.
2. Гуревич А. И., Добрынин В. Н., Колосов М. Н., Поправко С. А., Рябова И. Д., Чернов Б. К., Дербенцева Н. А., Айзенман Б. Е., Гарагуля А. Д. (1971) Антибиотики, 510—512.
3. Bystrov N. S., Chernov B. K., Dobrynin V. N., Kolosov M. N. (1975) Tetrahedron Lett., 2791—2794.

4. Быстров Н. С., Г'упта Ш. Р., Добрынин В. Н., Колосов М. Н., Чернов Б. К., Червин И. И., Яковлев Г. И., Айзенман Б. Е., Дербянцева Н. А. (1976) Докл. АН СССР, 226, 88—90.

Поступила в редакцию
24.XI.1977

CHEMISTRY OF HYPERFORIN. VI. GENERAL CHEMICAL CHARACTERIZATION

BYSTROV N. S., DOBRYNIN V. N., KOLOSOV M. N.,
POPRAVKO S. A., CHERNOV B. K.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Several reactions of the antibiotic hyperforin and its derivatives were studied, namely: acylation, C- and O-alkylation, catalytic hydrogenation, reduction with lithium aluminium hydride, and permanganate-periodate oxidation. The study resulted in identification of hyperforin as a bicyclic enolic tetraketone with four side chains, each terminating in isobutenyl group.
