



УДК 547.952.07

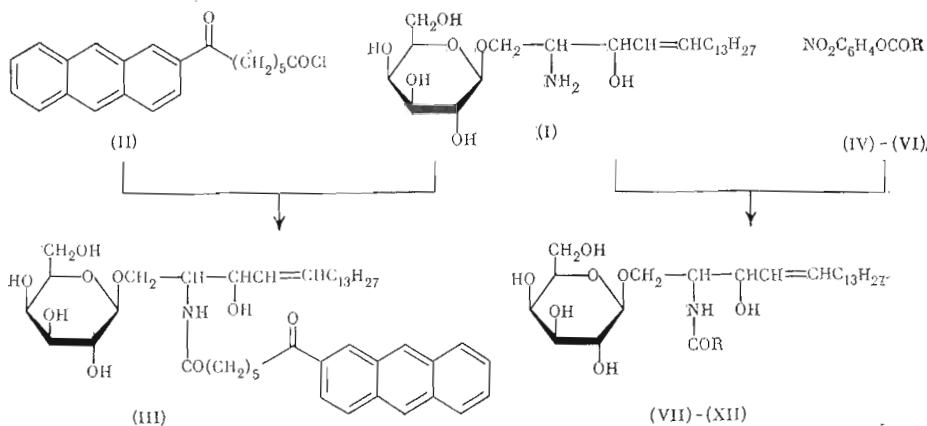
## ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ЦЕРЕБРОЗИДОВ

Доколина Е. В., Бушнев А. С., Звонкова Е. Н.,  
Люттик А. И., Капурн А. П., Швец В. И.,  
Евстигнева Р. П.

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

Цереброзиды, содержащие *rac*-, *D*- и *L*- $\alpha$ -гидроксипальмитиновые кислоты и 6-(2-антроил)гексановую кислоту, были синтезированы на основе психозина, полученного из природных цереброзидов. Ацилирование психозина флуоресцентно-меченой кислотой проводили хлорангидридным способом.  $\alpha$ -Гидроксикислоты вводили в молекулу психозина действием *n*-нитрофениловых эфиров ацетоксикислот в присутствии эквивалентного количества гидроксибензотриазола с последующим снятием ацетильной защиты мягким щелочным гидролизом.

Цереброзиды являются простейшими представителями нейтральных гликоэффинголипидов — важных компонентов мембран растительных и животных клеток [1–3]. Данная работа посвящена разработке эффективных методов получения цереброзидов с различными ацильными остатками. Нами на основе психозина (I) природного происхождения были синтезированы цереброзиды с остатками *rac*-, *D*- и *L*- $\alpha$ -гидроксипальмитиновых кислот, а также флуоресцентно-меченой кислоты.



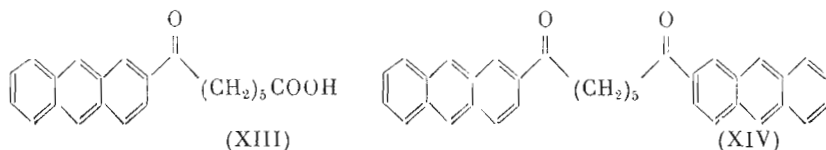
Соединение	R
(IV), (VII)	$\text{CH}(\text{OCOCH}_3)\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ DL
(V), (VIII)	$\text{CH}(\text{OCOCH}_3)\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ D
(VI), (IX)	$\text{CH}(\text{OCOCH}_3)\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ L
(X)	$\text{CH}(\text{OH})\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ DL
(XI)	$\text{CH}(\text{OH})\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ D
(XII)	$\text{CH}(\text{OH})\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ L

Из цереброзидов мозга крупного рогатого скота щелочным омылением по методу [4] получали психозин (I), который очищали на колонке с флуоризилом. Оптически деятельные  $\alpha$ -гидроксикислоты получали из их метиловых эфиров [5] щелочным омылением. Характеристики кислот хорошо согласовывались с константами, приведенными в литературе [6].

**Влияние растворителя на положение максимума и  
полуширину полосы спектра флуоресценции  
1-О-β-галактозил-2-N-[6-(2-антроил)гексаноил]-4-сфингенина  
(III) при длине волны возбуждения 360 нм**

Растворитель	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\Delta\lambda$ , нм
Бензол	463	73
Хлороформ	468	78
Этанол	480	84
Этиленгликоль	497	91

Флуоресцентно-меченую кислоту (XIII)



синтезировали ацилированием антрацена продуктом конденсации пимелиновой кислоты с четыреххлористым кремнием в нитробензоле в присутствии хлористого алюминия [7]. С целью уменьшения образования побочного продукта (XIV), который получается в условиях данной реакции наряду с целевым соединением (XIII), снизили количество четыреххлористого кремния и скорость его прибавления.

Ключевой стадией синтеза цереброзидов было ацилирование психозина (I). Ранее были описаны различные методы ацилирования аминогруппы в ряду сфинголипидов [8–13]. При выборе способа ацилирования мы учитывали строение ацилирующего агента. Остаток флуоресцентно-меченой кислоты вводили с помощью хлорангидрида (II) в ацетатном буфере [10], причем был получен цереброзид (III) с выходом 56%, в то время как при получении аналогичных соединений в присутствии дициклогексилкарбодимида выход не превышал 30% [13].

Для оптически активных  $\alpha$ -гидроксикислот традиционный хлорангидридный способ был исключен из-за возможной рацемизации по  $\alpha$ -углеродному атому. В этом случае ацилирование было осуществлено с помощью *n*-нитрофениловых эфиров кислот (IV)–(VI), предварительно защищенных ацетильной группой по  $\alpha$ -гидроксилу. *n*-Нитрофениловый эфир кислоты (XIII) выделить и очистить не удалось. Существенно повысить выход реакции (с 20 до 80%) позволило использование эквимольного количества гидроксibenзотриазола; этот прием заимствован нами из пептидной химии [14]. Ацетильную защиту удаляли мягким щелочным гидролизом. В результате были получены цереброзиды с *rac*- $\alpha$ -гидроксипальмитиновой кислотой (X), природного строения с *D*- $\alpha$ -гидроксипальмитиновой кислотой (XI) и с ее *L*-антиподом (XII).

Строение конечных соединений было подтверждено данными ИК- и УФ-спектроскопии, элементным анализом. Промежуточные и конечные соединения были охарактеризованы температурой плавления, спектральными данными и в случае оптически деятельных образцов данными по дисперсии оптического вращения или углом вращения. Полученные характеристики сравнимы с характеристиками аналогичных соединений, описанных в литературе [9].

Для цереброзидов (III) были сняты спектры флуоресценции, характеристики которых приведены в таблице. Из данных, полученных в разных растворителях, следует, что параметры флуоресценции потенциального зонда (III) зависят от свойств микроокружения. Цереброзид (III) может быть использован не только как флуоресцентный зонд, но и в качестве флуоресцентно-меченого субстрата  $\beta$ -галактозидаз.

## Экспериментальная часть

ИК-спектры синтезированных соединений снимали в вазелиновом масле на спектрометре Perkin-Elmer-257 (Англия). УФ-спектры получены на приборе Hitachi EPS-3T (Япония). Спектры флуоресценции снимали на флуориметре Aminco SPF-1000 (США) при длине волны возбуждения 360 нм, температуре 20° С и концентрации 10 мкг/мл. ТСХ осуществляли на силуфоле UV-254 и на силикагеле L5/40 мкм (Сhemapol, ЧССР) в системах растворителей: петролейный эфир — эфир, 2:1 (А), 1:1 (Б); хлороформ — метанол — ацетон, 10:0,5:0,5 (В), 6:1:1 (Г); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 50:50:1 (Д); эфир — гексан, 3:1 (Е). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40/100 мкм (Сhemapol, ЧССР) и флоризиле (60—100 меш, Merck, ФРГ). Обнаружение пятен при ТСХ проводили обугливанием с серной кислотой, веществ со свободной аминогруппой — нингидрином, галактозидов — антроновым реагентом, поглощающих или флуоресцирующих веществ — в УФ-свете.

*D-α-Гидроксипальмитиновую кислоту* получали щелочным омылением ранее синтезированного нами метилового эфира [5] в условиях [7], вещество осаждали гексаном из хлороформа. Выход 56%;  $R_f$  0,35 (А); т.пл. 93—94° С;  $[\alpha]_D^{20}$  -2,9° (с 1,98, хлороформ). Литературные данные [6]: т.пл. 93,3—93,6° С.

*L-α-Гидроксипальмитиновую кислоту* получали аналогично из ее метилового эфира, выход 61%;  $R_f$  0,35 (А); т.пл. 93,5—94,5° С;  $[\alpha]_D^{20}$  +2,8° (с 1,98, хлороформ). Литературные данные [6]: т.пл. 93,3—93,6° С;  $[\alpha]_D^{20}$  +2,7° (с 1,98, хлороформ).

*D-α-Ацетоксипальмитиновую кислоту* получали из *D-α-гидроксипальмитиновой кислоты* обработкой уксусным ангидридом в пиридине в течение 12 ч при 20° С. Вещество выделяли на колонке с силикагелем, элюируя смесью петролейный эфир — эфир, 2:1. Выход 79%;  $R_f$  0,58 (В); т.пл. 53—55° С (из гексана). ДОВ  $[\alpha]$  (с 0,8, хлороформ), град (λ, нм): +12,5 (589), +12,5 (579), +13,1 (546), +21,3 (435), +22,5 (407), +28,2 (366), +31,3 (334).

*L-α-Ацетоксипальмитиновую кислоту* получали аналогично из *L-α-гидроксипальмитиновой кислоты*. Выход 85%;  $R_f$  0,58 (В); т.пл. 56—57,5° С. ДОВ  $[\alpha]$  (с 0,8, хлороформ), град (λ, нм): -12,5 (589), -13,1 (579), -15,0 (546), -20,0 (435), -23,8 (407).

*6-(2-Антроил)гексановая кислота (XIII)*. К раствору 1,61 г пимелиновой кислоты в 30 мл нитробензола при 70° С прибавляли за 1 ч раствор 0,75 мл четыреххлористого кремния в 8 мл нитробензола, перемешивали 1,5 ч при 70° С и 8 ч при 90° С. При 0° С добавляли порциями 1,7 г хлористого алюминия, а затем 1,60 г антрацена при 20° С. После 1,5 ч перемешивания при этой температуре к реакционной массе прибавляли 10 мл воды и 5 мл 6 н. HCl. Желтый осадок отфильтровывали, промывали 25 мл бензола, затем экстрагировали 100 мл ацетона. Экстракт упаривали и хроматографировали на колонке с силикагелем. Вещество элюировали хлороформом. Выход 64%;  $R_f$  0,21 (Е); т.пл. 157—158° С [8]. УФ-спектр в этаноле  $\lambda_{max}$ , нм (ε): 265 (32 000), 328 (2000), 345 (2400), 362 (2400), 386 (2300), 404 (2200) [8].

*1-β-D-Галактозил-4-сфингенин (психозин) (I)* получали из 336 мг цереброзидов мозга крупного рогатого скота по методике [4]. Продукт реакции подвергали очистке на колонке с флоризилом (3,7 г). Вещество вымывали смесью эфир — метанол, 4:1. Выход 93 мг;  $R_f$  0,33 (Д); т.пл. 159—160° С (деформируется при 110° С);  $[\alpha]_D^{20}$  -9,5° (с 1, метанол). Литературные данные [5]: т.спек. 108—110° С;  $[\alpha]_D$  -8,0° (с 1, метанол).

*1-O-β-Галактозил-2-N-[6-(2-антроил)гексаноил]-4-сфингенин (III)*. К суспензии 42 мг кислоты (XIII) в 2,5 мл гексана прибавляли по каплям 2 мл тионилхлорида при 0° С. Через 12 ч растворитель и избыток тионилхлорида удаляли в вакууме. Остаток растворяли в 5 мл тетрагидрофурана и прибавляли одновременно с 1,24 мл насыщенного водного раствора ацетата натрия к раствору 57 мг психозина (I) в 7 мл тетра-

гидрофурана и 0,37 мл 1 н. уксусной кислоты, перемешивали 4 ч при 20° С. Реакционную массу упаривали, остаток растворяли в смеси хлороформ — метанол, 4 : 1. Вещество выделяли с помощью препаративной ТСХ на силикагеле в системе Г. Выход 50%;  $R_f$  0,34 (Г); т.пл. 140–142° С. ДОВ  $[\alpha]$  ( $c$  5, хлороформ — метанол, 4 : 1), град ( $\lambda$ , нм): -1,6 (589), -1,6 (588), -2,2 (579), -2,2 (576), -2,4 (546). ИК-спектр ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 3400, 3300, 1690, 1650, 1550, 1160, 1140, 1130, 1080, 1050, 1020, 960, 930, 920, 890, 880, 740, 720. УФ-спектр в смеси хлороформ — метанол, 4 : 1,  $\lambda_{\text{макс}}$ , нм ( $\epsilon$ ): 271 (53 650), 327 (2730), 342 (4300), 360 (4010), 390 (3630), 402 (3630). Найдено, %: С 70,88; Н 8,66.  $\text{C}_{45}\text{H}_{65}\text{NO}_9$ . Вычислено, %: С 70,74; Н 8,59.

*n*-Нитрофениловый эфир *гас*- $\alpha$ -ацетоксипальмитиновой кислоты (IV). К 314 мг *гас*- $\alpha$ -ацетоксипальмитиновой кислоты в 10 мл тетрагидрофурана прибавляли 167 мг *n*-нитрофенола, раствор охлаждали до 0° С и добавляли 206 мг дициклогексилкарбодиимида. Перемешивали при этой температуре 0,5 ч, затем выдерживали 1 ч при 20° С. Выпавший осадок отделяли, промывали тетрагидрофураном. Фильтрат упаривали, остаток наносили на колонку с силикагелем, вещество элюировали смесью петролейный эфир — эфир, 4 : 1. Выход 53%;  $R_f$  0,60 (Б); т.пл. 38–39° С. ИК-спектр ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 1790, 1630, 1600, 1540, 1500, 1475, 1250, 1220, 1170, 1130, 1050, 1020, 870, 770. УФ-спектр в этилацетате,  $\lambda_{\text{макс}}$ , нм ( $\epsilon$ ): 263 (9900).

*n*-Нитрофениловый эфир *D*- $\alpha$ -ацетоксипальмитиновой кислоты (V) получали из 91 мг *D*- $\alpha$ -ацетоксипальмитиновой кислоты в условиях получения соединения (IV). Выход 68%;  $R_f$  0,60 (Б); т.пл. 31–32,5° С.  $[\alpha]_D^{20}$  +17,5° ( $c$  1, хлороформ). ИК- и УФ-спектры повторяют спектры эфира (IV).

*n*-Нитрофениловый эфир *L*- $\alpha$ -ацетоксипальмитиновой кислоты (VI) получали из 98 мг *L*- $\alpha$ -ацетоксипальмитиновой кислоты в условиях получения соединения (IV). Выход 56%;  $R_f$  0,60 (Б); т.пл. 31,5–33,0° С.  $[\alpha]_D^{20}$  -19,0° ( $c$  1, хлороформ). ИК- и УФ-спектры повторяют спектры эфира (IV).

*I*-*O*- $\beta$ -Галактозил-2-*N*-(*гас*- $\alpha$ -ацетоксипальмитоил)-4-сфингенин (VII). 154 мг *n*-нитрофенилового эфира *гас*- $\alpha$ -ацетоксипальмитиновой кислоты (IV) в 10 мл тетрагидрофурана кипятили 6 ч со 124 мг психозина (I). Реакционную массу упаривали, остаток наносили на колонку с силикагелем, промывали хлороформом. Вещество элюировали смесью хлороформ — метанол, 9 : 1. Выход 24%;  $R_f$  0,31 и 0,35 (Г) (смесь диастереомеров); т.пл. 131–133° С. ИК-спектр ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 3330, 1730, 1650, 1530, 1230, 1130, 1080, 980, 900, 730.

*I*-*O*- $\beta$ -Галактозил-2-*N*-(*D*- $\alpha$ -ацетоксипальмитоил)-4-сфингенин (VIII). 106 мг *n*-нитрофенилового эфира (V) в 10 мл тетрагидрофурана кипятили 6 ч со 104 мг психозина (I) и 35 мг гидроксibenзотриазола. Реакционную массу выдерживали 4 ч при 20° С и упаривали. Остаток наносили на колонку с 4 г силикагеля, элюировали эфиром, смесью эфир — метанол, 95 : 5. Выход 81%,  $R_f$  0,31 (Г); т.пл. 149–150° С. ДОВ  $[\alpha]$  ( $c$  1, хлороформ — метанол, 6 : 1), град ( $\lambda$ , нм): +7,0 (589), +9,0 (579), +13,5 (435), +14,0 (407), +17,0 (366), +21,0 (334), +25,0 (312), +27,0 (302). ИК-спектр повторяет спектр цереброзида (VII).

*I*-*O*- $\beta$ -Галактозил-2-*N*-(*L*- $\alpha$ -ацетоксипальмитоил)-4-сфингенин (IX) был получен в условиях синтеза соединения (VIII) из 72 мг психозина (I) и 72 мг *n*-нитрофенилового эфира (VI). Выход 76%;  $R_f$  0,35 (Г); т.пл. 148–149° С. ДОВ  $[\alpha]$  ( $c$  1, хлороформ — метанол, 6 : 1), град ( $\lambda$ , нм): -4,0 (589), -6,5 (579), -6,5 (546), -7,0 (435), -16,0 (407), -26,0 (366). ИК-спектр повторяет спектр цереброзида (VII).

*I*-*O*- $\beta$ -Галактозил-2-*N*-(*гас*- $\alpha$ -гидроксипальмитоил)-4-сфингенин (X). 106 мг цереброзида (VII) растворяли в 15 мл 0,1 н. КОН в 90% метаноле и выдерживали 2 ч при 20° С. Реакционную массу нейтрализовали 0,63% соляной кислотой. Добавляли хлороформ до соотношения хлороформ — метанол — вода 8 : 4 : 3. Органический слой отделяли, сушили сернокислым натрием, упаривали. Остаток наносили на колонку с 4 г сили-

кагеля. Вещество элюировали смесью хлороформ — метанол, 15 : 1. Выход 74%;  $R_f$  0,29 и 0,33 (Г) (смесь диастереомеров); т. пл. 155—157° С. ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3460, 1625, 1545, 1330, 1250, 1170, 1120, 1080, 1050, 1030, 970, 900, 780.

*1-O-β-Галактозил-2-N-(D-α-гидроксипальмитоил)-4-сфингенин (XI)* получали из цереброзида (VIII) в условиях синтеза соединения (X). Выход 81%;  $R_f$  0,29 (Г); т. пл. 201—202° С (деформируется при 150° С). ДОВ  $[\alpha]$  (с 1, хлороформ — метанол, 6 : 1), град (λ, нм): +14,5 (589), +14,5 (579), +15,0 (546), +28,0 (435), +30,0 (407), +36,0 (366), +37,5 (334), +43,0 (312), +45,5 (302). ИК-спектр повторяет спектр цереброзида (X). Найдено, %: С 66,63; Н 11,10. С<sub>10</sub>Н<sub>77</sub>NO<sub>9</sub>. Вычислено, %: С 67,07; Н 10,86.

*1-O-β-Галактозил-2-N-(L-α-гидроксипальмитоил)-4-сфингенин (XII)* получали из цереброзида (IX) в условиях синтеза соединения (X). Выход 77%;  $R_f$  0,33 (Г); т. пл. 151—153° С. ДОВ  $[\alpha]$  (с 1, хлороформ — метанол, 6 : 1), град (λ, нм): -8,0 (589), -8,0 (579), -8,5 (546), -13,5 (435), -20,0 (407), -26,0 (366). ИК-спектр повторяет спектр цереброзида (X).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Sakakibara K., Momori T., Uchiba T., Nagai Y. Nature, 1981, v. 293, № 5827, p. 76—79.
2. Sakakibara K., Iwamori M., Uchiba T., Nagai Y. Experientia, 1981, v. 37, № 7, p. 712—714.
3. Богдановская Т. А., Арасимович В. В. Углеводсодержащие соединения сочных плодов и их обмен. Кишинев: Штиинца, 1978, с. 22—28.
4. Radin N.-S. Lipids, 1974, v. 9, № 5, p. 358—360.
5. Доколина Е. В., Бушнев А. С., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 277—279.
6. Horn D. H. S., Pretorius Y. Y. J. Chem. Soc. Chem. Commun, 1954, p. 1460—1464.
7. Каплун А. П., Башарули В. А., Щукина Л. Г., Швец В. П. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1826—1830.
8. Sharom F. J., Grant C. W. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun, 1975, v. 67, № 4, p. 1501—1506.
9. Pascher I. Chem. Phys. Lipids, 1974, v. 12, № 4, p. 303—315.
10. Звонкова Е. Н., Мицнер Б. П., Бушнев А. С., Эллер К. И., Солдатова С. А., Евстигнеева Р. П. Химия природн. соедин., 1974, № 5, с. 553—558.
11. Huang R. T. C. Z. Naturforsch., 1976, B. 31c, № 11—12, S. 737—740.
12. Huang R. T. C. FEBS Lett., 1982, v. 145, № 1, p. 103—108.
13. Мологковский Ю. Г., Имбс Л. Д., Бергельсон Л. Д. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 1, с. 112—114.
14. König W., Geiger R. Chem. Ber., 1970, B. 103, № 3, S. 788—798.
15. Taketomi T., Yamakawa T. J. Biochem., 1963, v. 54, № 5, p. 444—451.

Поступила в редакцию  
10.I.1983  
После доработки  
23.III.1983

#### SEMISYNTHETIC CEREBROSIDES

DOKOLINA E. V., BUSHNEV A. S., ZVONKOVA E. N., LJUTIK A. I.,  
KAPLUN A. P., SHVETS V. I., EVSTIGNEEVA R. P.

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow*

Psychosine prepared from bovine brain cerebroside was used for synthesis of galactosphingolipids with *DL*-, *D*-, or *L*-2-hydroxyhexadecanoic acids and 6-(2'-anthroyl)hexanoic acid. Psychosine was *N*-acylated with *p*-nitrophenyl 2-acetoxylhexadecanoates in the presence of hydroxybenzotriazole to give cerebroside. The 6-(2'-anthroyl)hexanoic acid reaction with psychosine was effected via its acyl chloride.