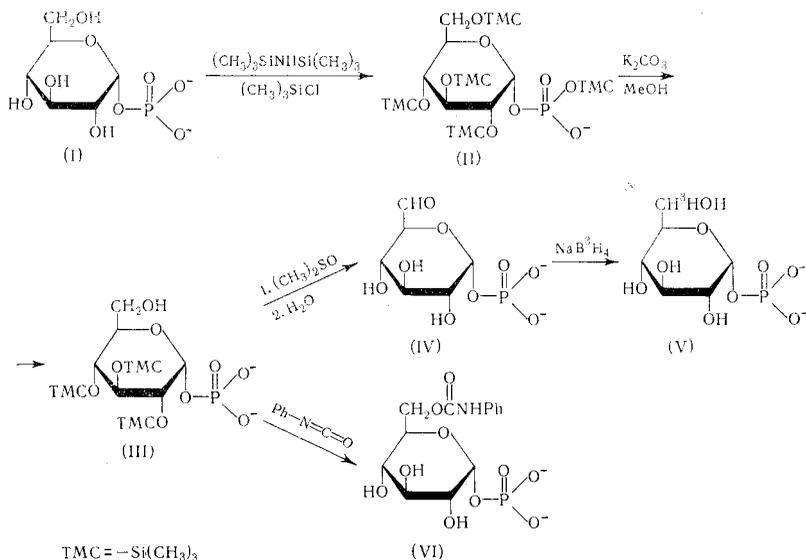


В. Н. ШИБАЕВ, Ю. Ю. КУСОВ,
член-корреспондент АН СССР Н. К. КОЧЕТКОВ

НОВЫЙ СИНТЕЗ α -D-ГЛЮКОПИРАНОЗИЛФОСФАТА-6-Н³

Содержащие радиоактивную метку производные гликозилфосфатов широко используются при изучении метаболизма углеводов и механизмов ферментативных реакций. Наряду с ферментативными методами (¹, ²) в настоящее время известны и некоторые химические подходы к синтезу меченых гликозилфосфатов, которые состоят в основном в фосфонилировании либо равномерно меченых производных моносахаридов, либо содержащих радиоактивную метку в определенном положении (³). Естественно, что подобный подход представляет существенные трудности не только с точки зрения многостадийности превращений, но и, особенно, из-за довольно ограниченного набора исходных меченых моносахаридов. В связи с этим поиски новых методов синтеза меченых гликозилфосфатов представляют существенный интерес.

Продолжая наши исследования по химической модификации α -D-глюкопиранозилфосфата (⁴), мы разработали удобный метод получения 6-триметилсилилированного производного этого соединения. В этом методе введение радиоактивной метки производится на последней стадии синтеза; в качестве единственного радиоактивного вещества используется тритийсодержащий боргидрид натрия — NaB³H₄. Синтез осуществлен по схеме, включающей получение производного III со свободной гидроксильной группой при С-6, окисление его по Пфитцнеру — Моффату до альдегида IV и восстановление последнего радиоактивным боргидридом натрия.



Исчерпывающее триметилсилилирование и последующее избирательное десилилирование с освобождением гидроксильной группы при С-6 было показано ранее на примере получения 2,3,4-три-0-триметилсилил- α -метил-D-глюкопиранозида исходя из α -метил-D-глюкопиранозида (⁵, ⁶). Нам

удалось распространить эту реакцию на α -D-глюкопиранозилфосфат. При этом оказалось, что триметилсилилирование в описанных в литературе условиях (⁵⁻⁸) сопровождается интенсивным отщеплением фосфатного остатка от молекул исходного гликозилфосфата. В спектре я.м.р. реакционной смеси наблюдается заметное ослабление квадруплета (δ 5,83 м.д., $J_{1,2} = 3,5$ гц, $J_{1,P} = 7,0$ гц), характерного для α -D-глюкопиранозилфосфата, и появление триплета с δ 5,35 м.д. Аналогичное «дефосфорилирование», но в значительно меньшей степени, имело место и в более мягких условиях триметилсилилирования (⁹) α -D-глюкопиранозилфосфата.

Силилирование триоктиламмониевой соли α -D-глюкопиранозилфосфата (I) удалось осуществить при действии гексаметилдисилазана и триметилхлорсилана в пиридине при комнатной температуре в течение 45 мин. Для избирательного отщепления триметилсилильной (ТМС) группы при С-6 использовалась обработка 2,3,4,6-тетра-О-триметилсил- α -D-глюкопиранозилфосфата (II) карбонатом калия в безводном метаноле (0°, 70 мин.); процесс контролировался при помощи спектроскопии я.м.р. Рассмотрение спектров я.м.р. триметилсилильных производных гликозилфосфатов II и III в области 0,1—0,5 м.д. позволяет предполагать наличие пяти ТМС-групп (45 протонов, 5 сигналов с δ 0,38, 0,31, 0,21, 0,18 и 0,15 м.д.) в соединении II и трех ТМС-групп (27 протонов, 2 сигнала с δ 0,20 и 0,15 м.д.) в соединении III. Наличие квадруплета с δ 5,83 м.д. и константами спин-спинового взаимодействия $J_{1,2} = 3,5$ гц, $J_{1,P} = 7,0$ гц подтверждает α -конфигурацию у гликозидного центра в обоих соединениях. Эти факты свидетельствуют о том, что при силилировании α -D-глюкопиранозилфосфата (I) образуется пента-О-триметилсилильное производное II (одна ТМС-группа, очевидно, этерифицирует фосфатный остаток), в то время как при избирательном десилилировании отщепляются две наиболее лабильные ТМС-группы.

Для более строгого доказательства строения 2,3,4-три-О-триметилсил- α -D-глюкопиранозилфосфата (III), полученного с выходом около 85—90%, считая на соединение I, было осуществлено его превращение в карбомильное производное (VI) действием фенилизоцианата (бензол, 80°, 1 час) с последующим десилилированием продукта реакции (смесь метанол — вода; 1 : 1; 48 час., 20°). Препаративной хроматографией на бумаге в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (5 : 2 : 3) с выходом около 50% было выделено вещество, индивидуальное по данным хроматографии ($R_f = 0,51$ в системе *n*-BuOH — AcOH — H₂O, 5 : 2 : 3) и электрофореза ($R_{F=1-\Phi} = 0,76$ в 0,05 M триэтиламмонийбикарбонатном буфере, pH 7,5) на бумаге. Данные у.-ф. спектроскопии подтверждали наличие только одной карбомильной группы (λ_{\max} 230 и 268 мμ, λ_{\min} 260 мμ, $\epsilon_{230} = 13\ 000$, $\epsilon_{260} = 891$, $\epsilon_{268} = 932,5$). Полученное соединение поглощает 2 мол. периодата на 1 моль вещества (22 часа, 20°), что характерно для 1,6-дизамещенных гексоз. Значение оптического вращения $[\alpha]_D^{20} = 65,8^\circ$ и характерная кривая дисперсии оптического вращения свидетельствовали об α -конфигурации у гликозидного центра. Совокупность этих данных позволяет приписать соединению VI структуру 6-карбомил- α -D-глюкопиранозилфосфата, что подтверждает строение исходного соединения III как 2,3,4-три-О-триметилсил- α -D-глюкопиранозилфосфата.

Окисление III было осуществлено действием диметилсульфоксида с дициклогексилкарбодимидом в присутствии пиридина и трифторуксусной кислоты (20°, 24 часа) (¹⁰). Препаративной хроматографией на бумаге (Ватман ЗММ, *n*-BuOH — AcOH — H₂O) было выделено производное гексодиальдозы (IV), строение которого установлено следующим образом. В результате кислотного гидролиза соединения IV (0,01 N HCl, 100°, 15 мин.) с последующим восстановлением избытком бордейтерида натрия (37°, 6 час.) и исчерпывающим ацелированием продукта реакции уксусным ангидридом в пиридине был получен ацетат полиола, время удерживания которого (Gas Chrom Q, 3% ECNSS-M, 182°) полностью совпадало

с ацетатом сорбита, но отличалось от соответствующих производных дульцита и маннита. В масс-спектре ацетата дейтерированного полиола (¹¹) наблюдался характерный сдвиг на 2 массовых единицы для серии VI (пики с m/e 377, 274, 172 и 154) и на одну массовую единицу для остальных серий (например, родоначальные ионы имели m/e 362, 290, 218, 146 и т. д.), что свидетельствовало о структурной симметрии молекулы и, следовательно, о включении атомов дейтерия в 1-е и 6-е положения. Вышеизложенные данные газожидкостной хроматографии и масс-спектрометрии позволили идентифицировать углеводный фрагмент соединения VI как глюко-гексодиальдозу. Присутствие альдегидной группы C₆ в соединении IV было подтверждено характерным для альдегидов окрашиванием с 2,4-динитрофенилгидразином (¹⁰), а также наличием восстанавливающей активности (¹²). Существенный прирост восстанавливающей активности после кислотного гидролиза, а также идентичность электрофоретического поведения соединения IV с α -D-глюкопиранозилфосфатом (0,05 M триэтил-аммонийбикарбонатный буфер, pH 7,5) свидетельствовали о наличии фосфатной группы при C-1. Таким образом, совокупность этих данных позволяет приписать соединению IV структуру α -D-глюкогексодиально-пиранозилфосфата.

Количественные определения соединения IV были выполнены ферментативным методом с использованием фосфоглюкомутазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (¹³, ¹⁴). Количество α -D-глюко-гексодиально-пиранозилфосфата (IV) вычислено по разности определяемого α -D-глюкопиранозилфосфата в полученном препарате и дополнительно образующемся после восстановления препарата. Препарат соединения IV восстанавливали избытком боргидрида натрия (37°, 6 час.), который разрушали добавлением 1 M уксусной кислоты до pH 6; после удаления ионов бората * 5-кратной отгонкой с метанолом смесь инкубировали с указанными выше ферментами. Было найдено, что в препарате соединения IV, помимо α -D-глюко-гексодиально-пиранозилфосфата (90%), содержится около 10% α -D-глюкопиранозилфосфата.

Дальнейшее превращение соединения IV в α -D-глюкопиранозилфосфат-6-Н³ (V) осуществлено действием тритийсодержащего боргидрида натрия (~250 μ С/μмол) в течение 6 час. при 37° в 0,01 M боратном буфере (pH 9,25) с последующим добавлением избытка боргидрида натрия (20°, 12 час.) для завершения реакции. Хроматографией на бумаге в системах этапол — 1 M ацетат аммония (5:2) было показано, что основная (~90%) радиоактивность на хроматограммах расположена в зоне α -D-глюкопиранозилфосфата. Удельная активность была найдена равной 44 μ С/μмол. Методом изотопного разбавления (1 μмол. препарата был разбавлен 500 μмол. α -D-глюкопиранозилфосфата и перекристаллизован 5-кратно в виде калиевой соли из смеси воды и метанола, 1:3) было подтверждено, что полученный препарат действительно является α -D-глюкопиранозилфосфатом-6-Н³.

Доказательство специфичности включения радиоактивной метки по C-6 основано на образовании димедонового комплекса с формальдегидом (¹⁵), образующимся из C-6 фрагмента после окисления иодной кислотой (20°, 2 часа) предварительно гидролизованного (0,1 N HCl, 100°, 30 мин.) препарата α -D-глюкопиранозилфосфата-6-Н³; было найдено, что в димедон-формальдегидном комплексе (т. пл. 190—192°, $\epsilon_{258} = 2,34 \cdot 10^4$) содержится не менее 85% радиоактивной метки, считая на исходный гликозилфосфат.

Разработанный метод получения меченных тритием по шестому углеродному атому гликозилфосфатов может быть, по-видимому, применен для

* Ионы бората мешают ферментативному определению α -D-глюкопиранозилфосфата.

введения радиоактивной метки в другие гликозилфосфаты. Доступность подобных меченых фосфатов сахаров была до настоящего времени довольно проблематичной.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР
Москва

Поступило
18 XI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. Hanabusa, H. W. Dougherty et al., *J. Biol. Chem.*, **241**, 3930 (1966).
² S. Kirkwood, G. L. Nelsestuen, *Anal. Biochem.*, **40**, 359 (1971). ³ R. D. Beville, E. A. Hill et al., *Canad. J. Chem.*, **43**, 1577 (1965). ⁴ Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский и др., *ДАН*, **189**, 324 (1969). ⁵ A. G. McInnes, *Canad. J. Chem.*, **43**, 1998 (1965). ⁶ D. T. Hurst, A. G. McInnes, *Canad. J. Chem.*, **43**, 2004 (1965). ⁷ T. Hashizume, Y. Sasaki, *Anal. Biochem.*, **15**, 346 (1966).
⁸ F. Eisenberg jr., A. H. Bolden, *Anal. Biochem.*, **29**, 284 (1969). ⁹ Ch. C. Sweely, W. W. Wells, R. Bentley, *Meth. Enzymol.*, **8**, N. Y.—London, 1966, p. 95. ¹⁰ K. E. Pfitzner, J. G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 5661 (1965).
¹¹ Л. С. Головкина, О. С. Чижов, Н. С. Вульфсон, *Изв. АН СССР, сер. хим.*, 1966, 1915. ¹² J. T. Park, J. J. Johnson, *J. Biol. Chem.*, **181**, 149 (1949). ¹³ H.-V. Bergmeyer, H. Klotzsch, *Methoden der Enzymatischen Analyse*, 1962, S. 131.
¹⁴ R. Silverstein, J. Voet et al., *J. Biol. Chem.*, **242**, 1338 (1967). ¹⁵ O. Gabriel, G. Ashwell, *J. Biol. Chem.*, **240**, 4123 (1965).