

УДК 547.963.3

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ СИНТЕЗА 2-ДЕЗОКСИАДЕНОЗИНА-8-<sup>13</sup>C

В. Д. БЛИННИКОВА, В. И. ПИЧУЖКИН, З. П. АПОЛЛОНОВА,  
Н. Ф. МЯСОЕДОВ

(Кафедра неорганической и аналитической химии)

В современных биологических, генетических и медицинских исследованиях все шире используют препараты, меченные стабильным изотопом углерода <sup>13</sup>C, что позволяет изучать метаболизм различных лекарств, взаимодействие и структуру генетических элементов клетки.

Целью исследований было изучение различных методов синтеза 2-дезоксиаденозина-8-<sup>13</sup>C и выбор схемы, обеспечивающей оптимальные условия его получения. Описанные в литературе [5, 6, 8, 10, 11] методы получения 2-дезоксиаденозина не позволяют выявить оптимальный вариант.

### Синтез 2-дезоксиаденозина методом прямой конденсации аденина с 2-дезокси-Д-рибозой в присутствии фенилполифосфатного эфира как катализатора

Фенилполифосфатный эфир получен методом сплавления P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> с трифенилфосфатом при температуре 300° [7].

2-дезоксиаденозин синтезирован по методике, предложенной Шраммом [8, 9] (схема 1). Синтез проводился в аналогичных условиях, но выводы Шрамма не подтвер-

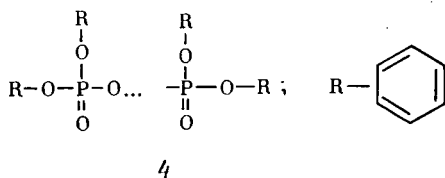
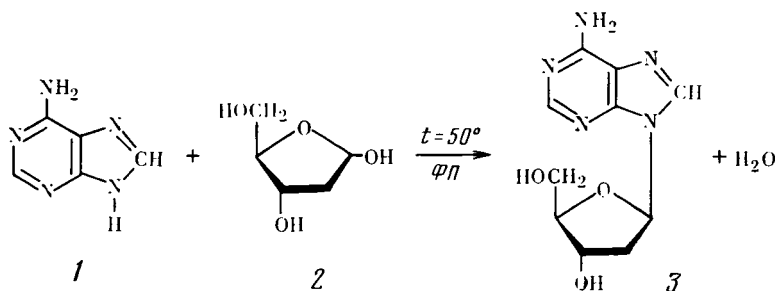


Схема 1. (1 — аденин; 2 — 2-дезоксид-Д-рибоза; 3 —  $\alpha$ -dA,  $\beta$ dA; 4 — ФП-катализатор фенилполифосфат).

дильсь. Результаты наших экспериментов согласуются с данными Карбона [3].

Полученную нуклеозидную фракцию отделяли хроматографически на Дауэксе  $1 \times 10$  (200—400 меш) в формиатной форме. Длина колонки 30 см, диаметр 3 см при pH 9,6. Фракции объемом 25 мл отбирали и анализировали на спектрофотометре СФ-4А. Снята выходная кривая при  $\lambda_{\max} = 258$  нм, нуклеозиды содержались во 2—12 фракциях, но они представляли собой смесь изомеров, имеющих спектр поглощения с  $\lambda_{\max} = 258$  нм.

Для элементного анализа проведена перекристаллизация из метанола.

Найдено, %: С 47,78; Н 5,32; N 27,99.  $C_{10}H_{13}N_5O_3$ .

Вычислено, %: С 47,81; Н 5,18; N 27,89.

Проводили вторичное хроматографическое разделение  $\alpha$ -,  $\beta$ -изомеров на Дауэксе  $1 \times 2$  (ОН<sup>-</sup>) и элюирование 30 % раствором метанола. При спектрофотометрическом анализе получена выходная кривая ( $\lambda_{\max} = 258$  нм) из отдельных пиков разной интенсивности. Однако вещество, давшее основной пик, не являлось ни  $\alpha$ -, ни  $\beta$ -аномером 2-дезоксиденозина. Это было доказано его аномальной реакцией на кислоты и щелочи. Выделенное соединение полностью подвергалось щелочному гидролизу, при этом абсорбционный ультрафиолетовый спектр с  $\lambda_{\max} = 260$  нм в 0,1 н. NaOH

сдвигался в длинноволновую область до  $\lambda_{\max} = 269$  нм в течение нескольких дней при комнатной температуре и в течение нескольких часов при нагревании, а в кислоте соединение было устойчивым, что прямо противоположно поведению 2-дезоксиденозина. В работе [3] такое вещество было идентифицировано как 2,3-дидезоксиденозин, в то время как нами выделен  $\alpha$ - и  $\beta$ -2-дезоксиденозин (до 10 %).

#### Методы сплавления

В начале 60-х годов для синтеза дезокси-нуклеозидов был рекомендован метод сплавления [10, 11]. По предложенной методике [6] сплавления 6-бензоиладенин с 1, 3, 5-три-0-ацетил-2-дезоксид-Д-рибозой при 160° (схема 2).

6-бензоиладенин (т. пл. 242—244°) [2] и 1, 3, 5-три-0-ацетил-2-дезоксид-Д-рибоза (т. пл. 98—99°) [6] синтезированы в лаборатории нашей кафедры.

После проведения собственно сплавления следовал ряд операций по очистке и выделению продукта и снятию защиты путем обработки аммиачным раствором абсолютного этилового спирта. Выделенный продукт был проанализирован методом ТСХ, подвижная система: н-бутанол, насыщенный аммиаком. Проявление хроматограммы солянокислым раствором цистеина показало

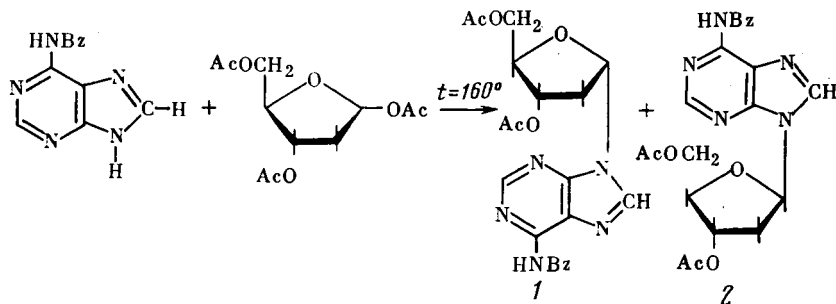


Схема 2. Защищенный 2-дезоксиденозин. (1 —  $\alpha$ -аномер; 2 —  $\beta$ -аномер).

наличие 2-дезоксиаденозина, т. пл. = 208—210° указывала на преимущественное образование  $\alpha$ -аномера. Это подтверждается и литературными данными [6]. Общий выход продукта 0,03 г (15 %). Более подробно метод сплавления был исследован путем использования различных вариантов защиты аденина и 2-дезоксид-рибозы.

1-й вариант. Сплавление 6-ацетидампурин с 1, 3, 5-три-0-ацетил-2-дезоксид-рибозой. 0,09 г (0,51 ммоль) 6-ацетидампурин сплавлялось с 0,266 г (1,023 ммоль) 1, 3, 5-три-0-ацетил-2-дезоксид-рибозы. Температура сплавления 160—165°. В качестве катализатора добавляли 2,5 мг хлоруксусной кислоты. Условия сплавления те же [6].

В результате синтеза в течение 2 нед при температуре  $-10^\circ$  из метанольного раствора выпали кристаллы, которые были идентифицированы по УФ-спектрам, элементному анализу и бумажной хроматографии. Выделено 10 мг смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров 2-дезоксиаденозина (10 %).

2-й вариант. Сплавление 6-бензоиладенина с 1-метил-3,5-ди-0-п-нитробензоил-2-дезоксид-рибозой. 1-метил-3,5-ди-0-п-нитробензоил-2-дезоксид-рибоза синтезирована в лаборатории нашей кафедры, т. пл. 143—144° [4]. Проведена этанол-этилацетатная перекристаллизация (2:1).

Результаты элементного анализа: найдено, %: С 53,79; Н 4,15; N 6,44  
 $C_{20}H_{18}N_2O_{10}$ ;

вычислено, %: С 53,83; Н 4,03; N 6,28.

0,5 г (1,75 ммоль) 6-бензоиладенина и 1,57 г (3,5 ммоль) кристаллической 1-метил-3,5-ди-0-п-нитробензоил-2-дезоксид-рибозы сплавлялись при 165—170° под вакуумом в течение 15 мин. Этилацетатный фильтр после отделения от непрореагировавшего бензоиладенина промывали раствором карбоната натрия и холодной водой до рН 7. Защищенный продукт очищали на колонке с силикагелем типа Л 100/160  $\mu$ ; высота колонки — 24,5 см, диаметр — 2,5 см.

Элюирование проводилось толуолом (500 мл), затем смесью этилацетата-толуола (2:8). Фракции объемом 25 мл анализировали методом ТСХ, фракции 24—35, содержащие защищенный 2-дезоксиаденозин. — после упаривания и очистки путем перекристаллизации из этилацетата-этанола (1:2).

Результаты элементного анализа: найдено, %: С 54,76; Н 4,01; N 14,17.  
 $C_{31}H_{23}N_7O_{10}$ ;

вычислено, %: С 56,98; Н 3,52; N 15,00.

Защищенный dA подвергали аммонолизу [12], идентифицировали с эталоном 2-дезоксиаденозина методом ТСХ. После перекристаллизации из аммиачной воды был выделен в виде кристаллов 2-дезоксиаденозин (смесь  $\alpha$ ,  $\beta$ ), выход — около 10 %.

3-й вариант. Сплавление силилированного бензоиладенина с 1-метил-3,5-ди-0-п-нитробензоил-2-дезоксид-рибозой. Силилирование бензоиладенина проводилось в сухом бензоле с триметилхлорсиланом в присутствии триэтиламина, а также с гексаметилдисилазаном в присутствии триметилхлорсилана в качестве катализатора [1]. Выход силилированного бензоиладенина в обоих случаях примерно одинаковый (70 %).

Далее сплавление силилированного бензоиладенина 0,575 г (1,5 ммоль) проводилось с 0,608 г (1,36 ммоль) кристаллической защищенной 1-метил-3,5-ди-0-п-нитробензоил-2-дезоксид-рибозы при температуре 162° в вакууме в течение 15 мин в присутствии монохлоруксусной кислоты. Содержимое, охлажденное до 100°, растворяли в этилацетате и отфильтровывали от нерастворившегося остатка силилированного бензоиладенина. При анализе этилацетатного раствора, помимо защищенного dA (с его аномерами), методом ТСХ обнаружено до 6 неизвестных соединений (дающих пятно по всей высоте пластины). Проводили первоначальную очистку продукта на силикагелевом слое высотой 9 см от защищенной 2-дезоксид-рибозы.

Дальнейшее выделение защищенного dA из смеси не проводилось, так как в этом случае потребовалось бы неоднократное хроматографическое разделение на колонке, что повлекло бы за собой сокращение выхода с 18 % для неочищенного продукта до пределов, которые получаются при первых вариантах сплавления.

#### Синтез 2-дезоксиаденозина методом прямой конденсации 6-бензоиладенина с 3,5-ди-0-п-нитробензоил-2-дезоксид-рибозил хлоридом в присутствии молекулярных сит [5].

В суспензию 1,5 г (6,28 ммоль) 6-бензоиладенина и 3,1 г активированных молекулярных сит 5 Å в 15 мл осушенного дихлорметана вносили 1,59 г (3,48 ммоль) свежеприготовленного кристаллического гликозилхлорида (3,5-ди-0-п-нитробензоил-2-дезоксид-рибозил хлорид), синтез т. пл. 105—107°. Молекулярные сита 5 Å по сравнению с ситами 4 Å по методике более эффективны для удаления хлористого водорода.

Общую массу непрерывно перемешивали в течение трех суток при комнатной температуре. За это время проходит реакция конденсации и образования защищенного dA ( $\alpha$ ,  $\beta$ -аномеров), схема 3. Все последующие операции связаны с выделением продукта из реакционной смеси и его дальнейшей очисткой.

При последовательном промывании остатка непрореагировавшего 6-бензоиладенина и молекулярных сит на фильтре Шотта дихлорметаном, этилацетатом, хлороформом и метилцелозольвом увеличивается извлечение защищенного продукта из смеси.

Получен больший эффект при очистке способом двукратного разделения на хроматографической колонке с силикагелем 100/400 (Сhemarol) высотой слоя 70 см.

В качестве элюирующей смеси применяли смесь этилацетат-толуол в соотношении 1:4 в начале элюирования и 3:2 при разделении  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров.

Анализ фракций методом ТСХ в системе этилацетат-толуол (3:2) позволил установить наличие  $\beta$ -аномера (0,27 г) в 30—92 фракциях,  $\alpha$ -аномера защищенного dA (0,12 г) в 96—99 фракциях. Выход  $\beta$ -аномера — 33 %,  $\alpha$ -аномера — 15 %, при этом соотношение  $\beta$ : $\alpha$  сохраняется равным 2.

Завершающая стадия заключается в снятии защиты блокирующих п-нитробензоиль-

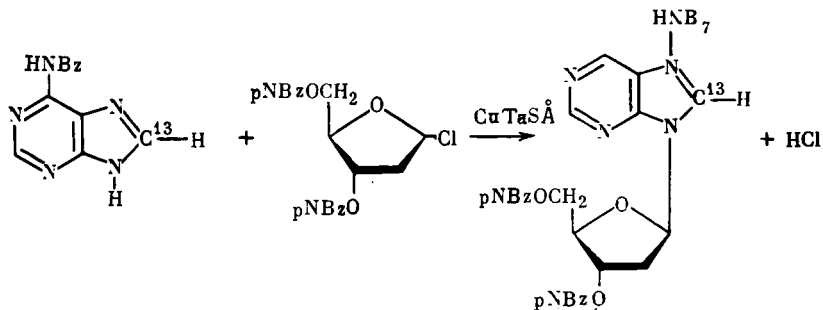


Схема 3.  $\alpha$ - и  $\beta$ -защищенный dA (pNBz — п-нитробензоил).

ных групп. В отличие от обработки 0,1 М метанольным раствором метилата бария по методике мы использовали метод аммонолиза [12]. После снятия защиты выход 2-дезоксаденозина (т. пл. 187—189°) составил 26 %, его  $\alpha$ -аномера (т. пл. 209—211°) — 12 %.

### Обсуждение результатов

Исследование показало, что методику Шрамма не следует использовать для синтеза меченых соединений, так как выход основного продукта в этом случае составляет меньше 10 %, а сам продукт представляет собой смесь различных изомеров.

Метод сплавления при синтезе 2-дезоксаденозина-8- $^{13}\text{C}$  также малоэффективен. Использование различных вариантов защиты исходных компонентов не привели к положительным результатам. В случае, когда выход несколько повышался (до 20 % при сплавлении силилированного бензоиладени-

на), выделение защищенного 2-дезоксаденозина и разделение  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров осложнялось увеличением ряда побочных продуктов. К тому же при сплавлении  $\alpha$ -аномера получается больше, чем  $\beta$ -аномера.

Для синтеза меченого  $^{13}\text{C}$  2-дезоксаденозина можно рекомендовать метод конденсации 6-бензоиладенина с 3,5-ди-о-п-нитробензоил-2-деокси-Д-рибозил хлоридом в присутствии молекулярных сит 5 Å. Синтез осуществляется в мягких условиях, воспроизводим, доступен, дает наиболее чистые продукты и с большим выходом. Избыток 6-бензоиладенина, добавленный по методике, легко извлекается путем последовательной обработки молекулярных сит дихлорметаном, этилацетатом, хлороформом и метилцеллозольвом. В результате регенерации 6-бензоиладенина выход защищенного 2-дезоксаденозина может увеличиваться до 50—60 %; соотношение  $\beta$ : $\alpha$  аномеров равно 2 и благоприятно для получения 2-дезоксаденозина ( $\beta$ -аномера).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Лукевиц Э. Я., Заболоцкая А. Е., Соломенникова И. И. — Успехи химии, 1974, т. 45, № 2, с. 370.
2. Bullock M., Hand J., Stokstad E. — J. Org. Chem., 1957, vol. 22, p. 568.
3. Carbon I. — J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, p. 720.
4. Ness R. K., McDonald D. L., Fletcher H. G. — J. Org. Chem., 1961, vol. 22, p. 2895.
5. Ness R. K., Zorbach W. W., Tipson R. S. — Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry, 1968, vol. 1, p. 183.
6. Robins M., Robins R. — J. Amer. Chem. Soc., 1965, vol. 87, p. 4934.
7. Schramm G., Berger H. — Z. Naturforsch., 1967, vol. 22, p. 587.
8. Schramm G., Groetsch H., Pollman W. — Angew. Chem., 1961, vol. 73, p. 619.
9. Schramm G., Lünzmann G., Bechmann F. — Biochim. Biophys. Acta, 1967, vol. 145, p. 221.
10. Shimadate T. — Chem. Abstr., 1962, vol. 56, p. 11692.
11. Shimadate T. — Chem. Abstr., 1962, vol. 57, p. 16726.
12. Vorbrüggen H. — In: Chemistry and Biology of Nucleosides and Nucleotides. New-York, Academic Press, 1978.

Статья поступила 3 июля 1985 г.

### SUMMARY

The purpose of the work was an investigation of different methods of synthesis of 2-deoxyadenosine-8- $^{13}\text{C}$  to find more optimal method.

Syntheses were carried out by method of melting using 6-benzoyladenine and trimethylsilyl adenine's derivatives with 1,3,5-three-O-acetyl-2-deoxy-D-ribose, 1-methyl-3,5-di-O-p-nitrobenzoyl-2-deoxy-D-ribose, by method of direct condensation of 6-benzoyladenine with 3,5-di-O-p-nitrobenzoyl-2-deoxyribosil chloride in the presence of molecular sieves of 5 Å, by method of simple condensation of adenine and 2-deoxy-D-ribose with phenylpoliphosphate in DMF.

It was shown that synthesis of 2-deoxyadenosine-8- $^{13}\text{C}$  by method of direct condensation of 6-benzoyladenine and 3,5-di-O-p-nitrobenzoyl-2-deoxyribosil chloride in the presence of molecular sieves of 5 Å was the best.