



УДК 547.455.6'118.057

© 1991 г.

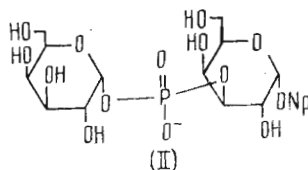
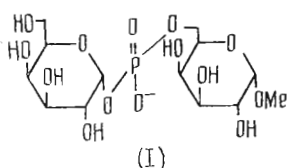
Н. С. Уткина, А. В. Пиколаев, В. Н. Шубаев

ФРАГМЕНТЫ БИОПОЛИМЕРОВ, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТКИ
ГЛИКОЗИЛФОСФАТОВ6*. СИНТЕЗ ФОСФОДИЭФИРОВ α -D-ГАЛАКТОПИРАНОЗЫ —
ФРАГМЕНТОВ ДРОЖЖЕВЫХ ФОСФОГАЛАКТАНОВ
SPOROBOLOMYCES И КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА
ESCHERICHIA COLI K 52

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

Синтезированы метил-6- α -D-галактопиранозилфосфо- и *n*-нитрофенил-3- α -D-галактопиранозилфосфо- α -D-галактопиранозиды, фрагменты дрожжевых и бактериального фосфогалактанов. Конденсация 2,3,4,6-тетра-О-бензоил- α -D-галактопиранозил-водородфосфоната с соответствующими частично ацилированными галактопиранозидами в присутствии триметилацетилхлорида с последующим окислением приводила к защищенным гликозилфосфосахарам, которые превращали в целевые соединения О-дебензоилированием. Приведены данные спектров ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР синтезированных диэфиров фосфорной кислоты.

В предыдущих сообщениях [1—5] мы показали, что гликозилфосфосахара, содержащие различные типы фосфодиэфирных связей и построенные из остатков различных гексопираноз, могут быть эффективно синтезированы гликозилводородфосфонатным методом. Этот подход, основанный на первоначальном образовании диэфиров водородфосфоновой кислоты и их последующем окислении, был успешно использован в синтезе α -D-маннопиранозилфосфо-, α -D-глюкопиранозилфосфо- и α -D-N-ацетилглюкозаминилфосфогексоз. В настоящей публикации мы сообщаем о распространении водородфосфонатного метода на синтез гликозилфосфосахаров, содержащих α -D-галактопиранозилфосфатные звенья. Исследование выполняли на примере синтеза 1→6- и 1→3-связанных галактозилфосфогалактозидов (I) и (II).



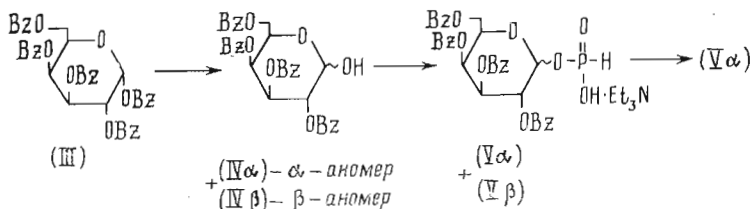
Соединение (I) является терминальным фрагментом внеклеточных фосфорилированных галактанов дрожжей *Sporobolomyces* NRRLY-6493 и NRRLY-6502 [6]. Фосфодиэфир (II) представляет собой фрагмент основной цепи капсульного антигена *E. coli* K 52 [7]. В литературе имеется единственный пример синтеза галактозилфосфогексозы [8], который был выполнен с использованием фосфодиэфирного метода.

Синтез фосфодиэфиров (I) и (II) осуществляли путем конденсации О-бензоилированного галактозилводородфосфоната (Va) и соответствующим образом защищенных производных α -D-галактопиранозидов с последующим окислением и удалением защитных групп.

* Сообщение 5 см. [1].

Фосфонат (V α) являлся ключевым соединением, донором α -D-галактопиранозилфосфатных фрагментов. Исходным для его синтеза служил пентабензоат галактозы (III) [9], который селективно 1-О-дебензоилировали (схема 1) действием *трет*-бутиламина в тетрагидрофуране с MeOH [4]. В результате с выходом 83% был получен 2,3,4,6-тетрабензоат (IV), который, по данным спектра ^1H -ЯМР (см. ниже), представлял собой смесь α - и β -аномеров в соотношении 4 : 1. Попытки разделить эту смесь методами кристаллизации или хроматографии не привели к получению чистого α -аномера (IV α), необходимого для синтеза фосфоната (V α). Наилучшие результаты были получены при хроматографии на обращенной фазе RP-8 в водном метаноле. Таким образом удалось выделить фракцию, содержащую 90% α -аномера (IV α) (α : β = 9 : 1).

Схема 1



Обработка аномерной смеси тетрабензоатов (IV) (α : β = 4 : 1) триимидазолидофосфитом в CH_3CN с последующим гидролизом имидазолидных групп [1, 2] привела к производному галактозилводородфосфоната (V), с выходом, близким к количественному. По данным спектроскопии ^1H -ЯМР, этот продукт также являлся смесью α - и β -аномеров (V α) и (V β) в соотношении 4 : 1. Нам удалось подобрать условия, обеспечивающие эффективное получение α -водородфосфоната за счет аномеризации или предпочтительного расщепления β -аномера (V β). Обработка полученной смеси фосфонатов (V) (α : β = 4 : 1) большим избытком H_3PO_3 в CH_3CN приводила к чистому α -аномеру (V α), выделенному хроматографией на си-

Таблица 1

Химические сдвиги ^1H -ЯМР (δ , CDCl_3) и КССВ (Гц) первого порядка соединений (IV α), (IV β), (V α) и (V β)

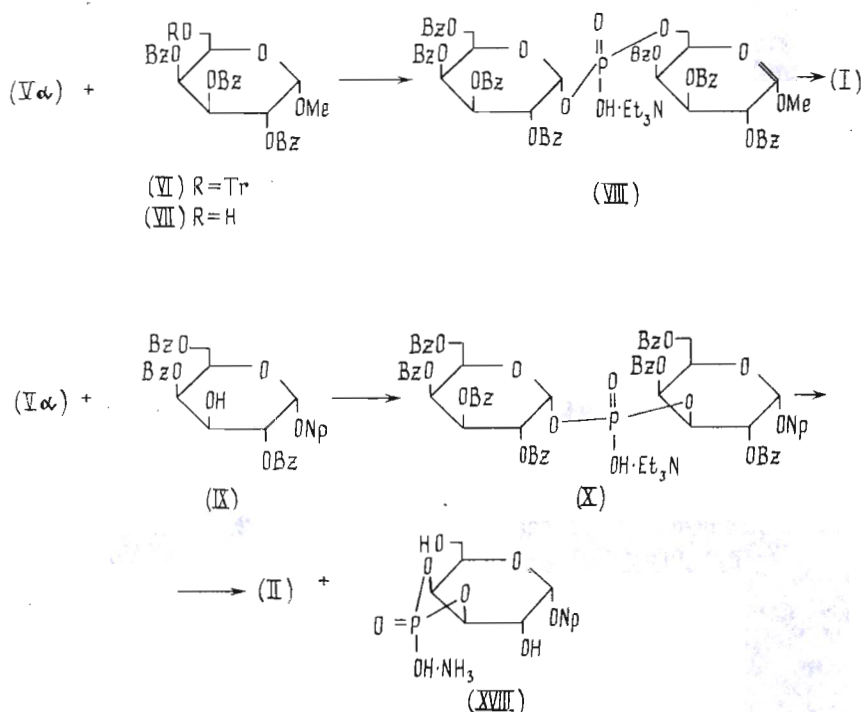
Атом	(IV α)	(IV β)	(V α)	(V β)
H1	5,87 т $J_{1,2} = J_{1,\text{OH}} = 3,4$	5,07 т $J_{1,2} = J_{1,\text{OH}} = 7,6$	6,19 дд, $J_{1,\text{P}} 8,5$ $J_{1,2} 3,3$	5,70 дд, $J_{1,\text{P}} 9,0$ $J_{1,2} 8,0$
H2	5,72 дд $J_{2,3} 11,7$	5,63 дд $J_{2,3} 10,4$	5,77 дд, $J_{2,\text{P}} 1,3$ $J_{2,3} 9,8$	5,87 дд $J_{2,3} 10,0$
H3	6,09 дд $J_{3,4} 3,4$	5,74 дд $J_{3,4} 3,4$	6,12 дд $J_{3,4} 3,1$	5,59 дд $J_{3,4} 3,1$
H4	6,08 дд $J_{4,5} 1,6$	6,02 дд $J_{4,5} 1,0$	6,08 дд $J_{4,5} 1,4$	6,02 дд $J_{4,5} 1,0$
H5	4,89 дт $J_{5,\text{a}} = J_{5,\text{b}} = 6,5$	4,38 дт $J_{5,\text{a}} = J_{5,\text{b}} = 6,3$	4,95 дт $J_{5,\text{a}} = J_{5,\text{b}} = 6,3$	4,35—4,47 м
H6a	4,40 дд $J_{6\text{a},6\text{b}} 11,2$	4,45 дд $J_{6\text{a},6\text{b}} 10,7$	4,38 дд $J_{6\text{a},6\text{b}} 11,0$	4,35—4,47 м
H6b	4,63 дд	4,69 дд	4,60 дд	~4,68 м
HO	3,25 уш.	3,25 уш.	—	—
HP	—	—	7,07 д $J_{\text{H,P}} 637,5$	7,02 д $J_{\text{H,P}} 645,0$
C $_6$ H $_5$	7,20—8,15 м	—	7,20—8,13 м	—
C $_2$ H $_5$	—	—	1,22 т 2,93 ж	—

ликагеле с выходом 70%. При аналогичной обработке продукта (V) с соотношением α - и β -аномеров 9 : 1, полученного из соответствующей смеси тетрабензоатов (IV) (см. выше), выход α -водородфосфоната составил 80%.

Строение аномерных смесей производных (IV) и (V) и выделенного α -фосфоната ($V\alpha$) надежно подтверждалось данными спектров ^1H -ЯМР (табл. 1). Сигналы почти всех протонов имели отличающиеся для α - и β -аномеров химсдвиги, причем наиболее характеристичными являлись сигналы H1, H3 и H5. Конфигурация при C1 следовала из характерных для производных α - и β -галактозы значений КССВ $J_{1,2}$. В спектрах водородфосфонатов ($V\alpha$) и ($V\beta$) наблюдалось дополнительное расщепление сигнала H1 (а в случае α -аномера — также H2) за счет спин-спиновой взаимодвижения с атомом фосфора. Следует отметить также различие положений резонанса фосфонатного протона HP , которое было использовано при определении соотношения аномеров в смеси (V).

Для α -аномера ($V\alpha$) структура дополнительно подтверждена данными спектра ^{13}C -ЯМР (см. «Экспериментальную часть»), в котором имело место характерное расщепление сигналов C1 и C2 на атоме фосфора. Спектр ^{31}P -ЯМР (δ_{P} 1,74, $^1J_{\text{P,H}}$ 637,5 Гц) был типичным для гликозилводородфосфонатов аналогичной структуры [1—3, 5].

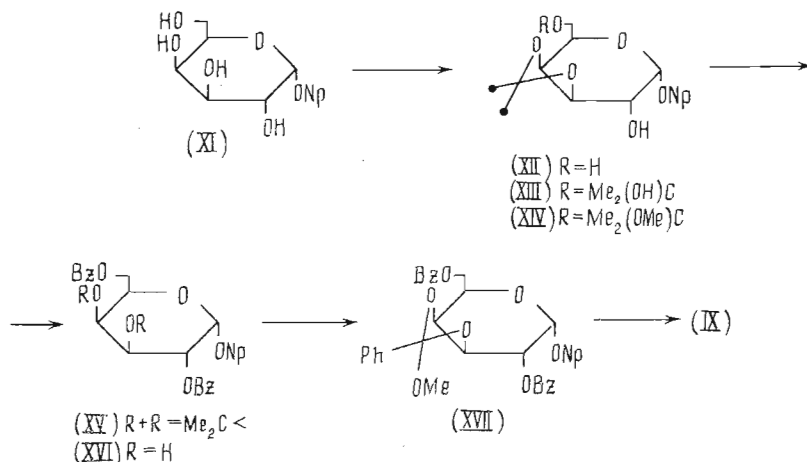
Схема 2



При синтезе 1 → 6-связанного галактозилфосфогалактозида (I) спиртовым компонентом являлось 6-ОН-производное (VII) (схема 2). Его получали из метил- α -D-галактопиранозида традиционным путем через три-тиловый эфир (VI) с общим выходом 63%.

Конденсацию соединений ($V\alpha$) и (VII) (в соотношении 1 : 1) проводили в пиридине с использованием в качестве конденсирующего реагента три-метилацетилхлорида. Образующиеся продукты без выделения окисляли действием раствора иода в водном пиридине. В результате бензоилированный фосфодиэфир (VIII) был выделен хроматографией на SiO_2 с выходом 80%. На заключительной стадии синтеза соединение (VIII) дебензоилировали 0,1 М раствором MeONa в метаноле с диоксаном при комнатной температуре. Продукт деблокирования, целевой гликозилфосфосахар (I), выделяли гель-хроматографией на фрактогеле TSK HW-40 (S) с выходом 80%. Строение фосфодиэфиров (I) и (VIII) подтверждалось путем детального анализа спектров ЯМР (см. ниже).

Схема 3



При получении 1 → 3-связанного галактозилфосфогалактозида (II) в качестве гидроксильного компонента использовали 3-ОН-производное (IX). Его синтезировали из *n*-нитрофенил- α -D-галактопиранозида (XI) [10], как указано на схеме 3. Ацетонирование гликозида (XI) 2,2-диметоксипропаном в присутствии TsOH·H₂O приводило к образованию 3,4-ацетонида (XII) и минорного продукта с большей хроматографической подвижностью, имевшего, по-видимому, структуру (XIII) или (XIV) * и самопроизвольно превращавшегося в производное (XII) в растворе CHCl₃. Суммарный выход соединения (XII) составил 65%. Последующее бензоилирование и кислотный гидролиз гладко приводили к дибензоату (XVI). Для получения трибензоата (IX) диол действием триметилортобензоата в присутствии TsOH превращали в 3,4-ортоэфир (XVII), который далее без выделения гидролизовали 80% AcOH. По данным [13], ортоэфиры такого типа расщепляются кислотой с освобождением экваториального гидроксила. Образовавшееся производное (IX) выделяли с выходом 81%. Строение полученных соединений (IX), (XII) и (XV)–(XVII) подтверждено данными спектров ¹H-ЯМР (см. «Экспериментальную часть»).

Конденсацию соединений (Va) и (IX) и последующее окисление выполняли в условиях, описанных для синтеза фосфодиэфира (VIII) (см. выше). При использовании небольшого избытка спиртового компонента (IX) (1,12 экв.) выход продукта реакции (X) составил 62% (см. схему 2). Применение 1,3-кратного избытка гликозилводородфосфоната (Va) позволило поднять выход защищенного производного (X) до 91%. Целевой фосфодиэфир (II) получали дебензоилированием соединения (X) в мягких условиях (0,05 М MeONa/MeOH-диоксан, 0° С), контролируя ход реакции методом ТСХ. Основным продуктом реакции являлся 1 → 3-связанный галактозилфосфогалактозид (II), выделенный анионообменной хроматографией на фрактогеле TSK/DEAE-650 (S) (HCO₃⁻) с выходом 68%. Кроме него было выделено заметное количество 3,4-циклофосфата (XVIII) (выход 22%), образующегося, очевидно, в результате расщепления гликозилфосфатной связи в присутствии основания за счет соучастия вицинальной ОН-группы (ср. [3]).

Анализ строения синтезированных гликозилфосфосахаров (I) и (II), а также их бензоилированных предшественников (VIII) и (X) был проведен путем сравнительного изучения данных спектроскопии ЯМР (см. табл. 2 и 3). Сигналы в спектрах ³¹P-ЯМР лежали в области, характерной для положений резонанса диэфиров фосфорной кислоты данной природы [1–5, 8]. Наличие фосфодиэфирных связей между атомами С1' и С6 и С1' и С3 в галактозилфосфогалактозидах (I) и (II) подтверждалось в спектрах ¹³C-ЯМР смещением положений резонанса этих и соседних атомов (С2' для (I)

* В работах [11, 12] описано образование аналогичных производных при ацетонировании *n*-нитрофенил- β -D-галактопиранозида и метил-1-гидро- β -D-галактопиранозида.

Химические сдвиги ^{31}P - и ^{13}C -ЯМР (δ) и некоторые КССВ (Гц) гликозилфосфосахаров (I), (II), (VIII) и (X)

АТОМ	(I) *	(II) **	(VIII) **	(X) **
P	-0,36	-1,05	-1,99	-2,11
C1	100,8	99,6	97,45	95,0
C2	69,5	69,7	69,2	70,75
C3 ($^2J_{\text{C,P}}$)	70,4	76,4 д (6,1)	68,8	69,9 д (6,1)
C4 ($^3J_{\text{C,P}}$)	70,2	68,7 д (6,1)	69,5	70,1 д (7,3)
C5 ($^3J_{\text{C,P}}$)	70,8 д (7,3)	73,8	68,8 д	69,5
C6 ($^2J_{\text{C,P}}$)	66,0 д (4,7)	62,45	67,7 д	63,55
C1' ($^2J_{\text{C,P}}$)	96,9 д (6,7)	97,2 д (6,1)	92,7 д	92,95 д (4,9)
C2' ($^3J_{\text{C,P}}$)	69,5 д (8,3)	70,25 д (6,2)	69,0 д	70,0 д (7,3)
C3'	70,5	71,1	68,3	68,35
C4'	70,7	71,1	67,7	67,6
C5'	73,3	73,7	69,2	69,6
C6'	62,4	63,05	62,3	61,7
CH ₃ O	56,5	—	55,8	—
NO ₂ C ₆ H ₄ O	—	118,2, 126,5, 143,9, 163,8	—	117,0, 125,5, 142,8, 160,9

* В D₂O. Присутствовали также сигналы Et₃NH⁺ (9,6, 48,1).** В CD₃OD.*** В CDCl₃. Присутствовали также сигналы Et₃NH⁺ (8,2—8,4, 45,2—45,4), C₆H₅-групп (128,2—130,4, 133,0—133,4) и CO-групп (165,3—166,3).

Таблица 3

Химические сдвиги ^1H -ЯМР (δ) и КССВ (Гц) первого порядка гликозилфосфосахаров (I), (II), (VIII) и (X)

АТОМ	(I) *	(II) **	(VIII) **	(X) **
H1	4,82 м	5,65 д, $J_{1,2}$ 3,5	5,16 д, $J_{1,2}$ 3,5	6,13 д, $J_{1,2}$ 3,5
H2	3,81 м	4,10 дд, $J_{2,3}$ 10,0	5,58 дд, $J_{2,3}$ 10,7	5,69 дд, $J_{2,3}$ 10,5
H3	3,81 м	4,57 ддд, $J_{3,4}$ 8,0	5,83 дд, $J_{3,4}$ 3,3	5,33 дт, $J_{3,4}$ 10,5
H4	4,00—4,08 м	4,24 д, $J_{3,4}$ 3,0	5,96 дд, $J_{4,5}$ 1,1	6,39 д, $J_{3,4}$ 3,0
H5	4,00—4,08 м	3,81 т, $J_{5,6}$ 5,9	4,48 дт, $J_{5,6}$ 8,0	4,43—4,57 м
H6a	4,00—4,08 м	3,63 д	4,03 ддд, $J_{6a,p}$ 8,0 $J_{6a,6b}$ 10,3	4,43—4,57 м
H6b	4,00—4,08 м	3,63 д	4,21 ддд, $J_{6b,p}$ 5,8	4,43—4,57 м
H1'	5,52 дд, $J_{1',2'}$ 3,0	5,62 уш. д, $J_{1',2'} \sim 2$	6,01 дд, $J_{1',2'}$ 3,3	6,25 дд, $J_{1',2'}$ 3,0
H2'	$J_{1',p}$ 7,0 3,85 ддд, $J_{2',3'}$ 6,7	$J_{1',p}$ 7,0 3,78 м	$J_{1',p}$ 8,0 5,67 ддд, $J_{2',3'}$ 10,5	$J_{1',p}$ 7,0 5,73 дт, $J_{2',3'}$ 10,0
H3'	$J_{2',p}$ 1,0 3,92 дд, $J_{3',4'}$ 3,0	$J_{2',p}$ 1,0 3,78 м	$J_{2',p}$ 1,6 6,09 дд, $J_{3',4'}$ 3,3	$J_{2',p}$ 3,0 6,41 дд, $J_{3',4'}$ 3,0
H4'	4,04 дд, $J_{4',5'}$ 1,2	3,87 уш. с $J_{4',5'} < 1$	6,02 дд, $J_{4',5'}$ 1,0	6,15 д
H5'	4,09 дт, $J_{5',6a'}$ 6,0	4,08 дд, $J_{5',6a'}$ 5,1	4,93 дт, $J_{5',6a'}$ 6,0	5,03 дд, $J_{5',6a'}$ 8,6
H6a'	3,71 дд, $J_{6a',6b'}$ 11,5	3,63 дд, $J_{6a',6b'}$ 11,3	4,22 дд, $J_{6a',6b'}$ 11,2	4,27 дд, $J_{6a',6b'}$ 11,0
H6b'	3,75 дд, $J_{5',6b'}$ 6,0	3,74 дд, $J_{5',6b'}$ 7,0	4,34 дд, $J_{5',6b'}$ 6,0	4,60 дд, $J_{5',6b'}$ 5,0
CH ₃ O	3,40 с	—	3,43 с	—

* В D₂O. Na⁺-соль.** В CD₃OD. В спектре присутствовали также сигналы ароматических протонов (7,30 д, 8,16 д).*** В CDCl₃. В спектре присутствовали также сигналы Et₃NH⁺ (0,90—1,15 т, 2,64—2,84 к) и ароматических протонов (7,00—8,25 м).

и (II), C5 для (I), C4 для (II)) вследствие α - и β -эффектов фосфорилирования, а также присутствием КССВ $^2J_{\text{C,P}}$ и $^3J_{\text{C,P}}$, связанных с расщеплением этих сигналов на атоме фосфора. Аналогичное расщепление сигналов H1', H2' и H3 наблюдалось в спектрах ^1H -ЯМР соединений (I) и (II). α -Конфигурация галактозилфосфатных связей следовала из величин $J_{\text{H,H}}$ и значений химсдвигов атомов C1', C2', C3' и C5', характерных для α -D-галактопиранозилфосфата [14].

Аналогичный анализ спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР защищенных фосфодиэфиров, проведенный с учетом влияния на химические сдвиги O -бензоильных защитных групп, подтверждает структуру производных (VIII) и (X).

Строение 3,4-циклофосфата (XVIII) подтверждено его электрофоретическими и спектральными характеристиками. Так, подвижность при электрофорезе была близка к подвижности 1,2-циклофосфатов сахаров [15]. В спектре ^{31}P -ЯМР присутствовал единственный сигнал δ_{P} 16,8, близкий к сигналам других пятичленных циклофосфатов, например уридин-2',3'-циклофосфата (δ_{P} 17,6 [16]) и ацетониндиолциклофосфата (δ_{P} 15,5 [17]). В спектре ^1H -ЯМР наблюдался заметный слабopольный сдвиг положений резонанса H3 и H4, которые проявлялись в виде мультиплета (δ 4,76) со сложным характером расщепления. В спектре ^{13}C -ЯМР сигналы атомов C3 и C4 также были сильно смещены в слабое поле по сравнению с сигналами *n*-нитрофенил- α -D-галактопиранозиды (XI) благодаря α -эффектам фосфорилирования (+7,9 и +5,8 соответственно). В то же время для сигналов C2 и C5 наблюдались отрицательные β -эффекты замещения (−1,6 и −3,5 соответственно).

Таким образом, в ходе проведенного исследования показано, что водородфосфонатный метод может быть использован для эффективного синтеза гликозилфосфосахаров, построенных из остатков α -D-галактопиранозы. Выходы продуктов конденсации были одинаково высоки при гликозил-Н-фосфонилировании как первичноспиртового (VII), так и вторичноспиртового (IX) акцепторов. Описанное в работе получение α -галактозилводородфосфоната из смеси α , β -аномеров при обработке фосфористой кислотой, вероятно, может быть использовано и в случае других гексопираноз.

Экспериментальная часть

Физико-химические и хроматографические методы описаны в работе [1]. Системы для ТСХ: бензол — этилацетат, 10 : 1 (А), 3 : 1 (Б); хлороформ — метанол, 8 : 2 (В), 10 : 1 (Г); изопропиловый спирт — вода, 5 : 1 (Д). Электрофорез выполняли на приборе ПВЭФ-1 при градиенте напряжения 10 В/см в 0,05 М ТЕАВ (рН 7,5) на бумаге Filtrak FN-16, обнаруживая фосфаты реагентом [18]. Пиридин готовили как описано в работе [2].

2,3,4,6-Тетра-*O*-бензоил- α , β -D-галактопираноза (IV). К раствору 350 мг (0,5 ммоль) пентабензоата (III) [9] в 9 мл тетрагидрофурана добавляли 3,8 мл MeOH и 1 мл (9,5 ммоль) трет-бутиламина. Раствор выдерживали 60 ч при 20° С и упаривали. Из остатка методом колоночной хроматографии на SiO_2 (KX) в бензоле с этилацетатом (97 : 3) выделили 248 мг соединения (IV) (83%, аморфный, α : β = 4 : 1), $[\alpha]_D^{27} +127^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0,55 (А). Соотношение аномеров определяли из спектра ^1H -ЯМР (см. табл. 1). 25 мг полученного тетрабензоата (IV) разделяли на колонке (1,1 $\times$ 24 см) Li Chroprep RP-8 (40—63 мкм, Merck) в метаноле с водой (4 : 1), скорость элюирования 1 мл/мин. Выделили фракцию, обогащенную β -аномером (IV β) (8 мг, время выхода 40 мин, при стоянии в растворе мутировала до α : β = 4 : 1), и фракцию (16 мг, время выхода 72 мин), содержащую смесь (IV α) и (IV β) в соотношении 9 : 1.

2,3,4,6-Тетра-*O*-бензоил- α -D-галактопиранозилводородфосфонат, триэтиламмониевая соль (Va). К раствору 107 мг (1,57 ммоль) имидазола в 2,5 мл CH_3CN при перемешивании и охлаждении ледяной водой прибавляли 0,042 мл (0,47 ммоль) PCl_3 и 0,23 мл (1,66 ммоль) Et_3N ; через 15 мин прибавляли по каплям раствор 66 мг (0,11 ммоль) тетрабензоата (IV) (α : β = 4 : 1) в 2,5 мл ацетонитрила в течение 30 мин. Охлаждение прекращали, к смеси через 5 мин при 20° С прибавляли 0,75 мл 1 М ТЕАВ (рН 8). Раствор перемешивали 15 мин, упаривали, полученный сироп упаривали со смесью пиридин — триэтиламин (4 : 1). Остаток растворяли в CHCl_3 (70 мл), промывали ледяной водой (2 $\times$ 30 мл), охлажденным 1 М ТЕАВ (2 $\times$ 30 мл), высушивали и упаривали. Полученный хроматографически однородный продукт высушивали в вакууме (0,5—1 мм Hg) над P_2O_5 . Выход α , β -водородфосфоната (V) 84 мг (100%, сироп, α : β = 4 : 1).

$[\alpha]_D^{26} + 95^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0 (А), 0,45 (В). Соотношение аномеров определяли из спектра ^1H -ЯМР (см. табл. 1).

К раствору 67 мг (0,09 ммоль) полученного фосфоната (V) в 5 мл CH_3CN прибавляли 190 мг (2,3 ммоль) H_3PO_3 (Fluka). Раствор выдерживали 60 ч при 20°C , разбавляли хлороформом (30 мл), промывали насыщ. раствором NaHCO_3 (2×10 мл), водой (10 мл), 0,5 М TEAB (2×10 мл), высушивали и упаривали. Из остатка методом КХ в CHCl_3 с метанолом ($0 \rightarrow 10\%$ MeOH) выделили 47 мг α -фосфоната (V α) (70%, сироп), $[\alpha]_D^{25} + 106^\circ$ (с 1, хлороформ). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 7,0 (CH_2CH_2), 44,0 (CH_2CH_2), 62,35 (C6), 67,9 (C4), 68,3 (C3), 69,15 (д, C2, $^3J_{C,P}$ 5,6), 69,2 (C5), 92,3 (д, C1, $^2J_{C,P}$ 3,7), 126,7—127,1, 128,2—128,5, 131,7—132,3 (C_6H_5), 165,3, 165,4, 166,1, (CO). Спектр ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): 1,74 ($^1J_{P,H}$ 637,5).

Метил-2,3,4-три-О-бензоил- α -D-галактопиранозид (VII). Раствор 1,4 г (7,2 ммоль) метил- α -D-галактопиранозида и 2,8 г (10 ммоль) трифенилхлорметана в 15 мл пиридина выдерживали 5 ч при 50°C и 18 ч при 20°C . При охлаждении прибавляли 4 мл (34,5 ммоль) бензоилхлорида. Смесь перемешивали 20 ч при 20°C , выливали на лед, экстрагировали CHCl_3 , промывали насыщ. раствором NaHCO_3 , водой, высушивали и упаривали. Кристаллизацией остатка из спирта выделили 3,67 г (68%) соединения (VI), R_f 0,8 (А), спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 3,31—3,42 (м, 2H, H6a, H6b), 3,53 (с, 3H, OCH₃), 4,37 (уш. т, 1H, H5, $J_{5,6}$ 6,5), 5,32 (д, 1H, H1, $J_{1,2}$ 3,5), 5,64 (дд, 1H, H2, $J_{2,3}$ 10,3), 6,06 (дд, 1H, H3, $J_{3,4}$ 3,4), 6,11 (дд, 1H, H4, $J_{4,5}$ 1,0), 7,10—8,10 (м, 3OH, C_6H_5). К раствору 1,041 г тритилового эфира (VI) и 1,044 г перхлората пиридиния [19] в 44 мл нитрометана прибавляли 15 мл метанола. Смесь нагревали 2 ч при 50°C , разбавляли пиридином (0,3 мл), упаривали; продукт экстрагировали CHCl_3 , раствор фильтровали и упаривали. Из остатка методом КХ в бензоле с этилацетатом ($0 \rightarrow 50\%$ EtOAc) выделили 0,655 г трибензоата (VII) (93%, аморфный), $[\alpha]_D^{25} + 254^\circ$ (с 2,5, хлороформ), R_f 0,6 (Б). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 2,66 (т, 1H, OH, $J_{CH,6}$ 6,7), 3,49 (с, 3H, OCH₃), 3,66 (дт, 1H, H6a, $J_{5,6a}$ 6,7, $J_{6a,6b}$ 11,5), 3,81 (дт, 1H, H6b, $J_{5,6b}$ 6,7), 4,35 (дт, 1H, H5, $J_{4,5}$ 1,0), 5,30 (д, 1H, H1, $J_{1,2}$ 3,5), 5,74 (дд, 1H, H2, $J_{2,3}$ 10,5), 5,89 (дд, 1H, H4, $J_{3,4}$ 3,4), 6,01 (дд, 1H, H3), 7,20—8,20 (м, 15H, C_6H_5). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 55,7 (OCH₃), 60,9 (C6), 68,5 (C3), 69,3 (C5), 69,6 (C2), 70,1 (C4), 97,6 (C1), 128,3—130,1, 133,2—133,8 (C_6H_5), 165,5, 166,2, 166,8 (CO).

n-Нитрофенил- α -D-галактопиранозид (XI) получали по методике [10]. Спектр ^{13}C -ЯМР (CD_3OD): 62,7 (C6), 69,9 (C4), 70,9 (C3), 71,5 (C2), 74,1 (C5), 99,8 (C1), 118,3, 126,8, 144,0, 163,95 (C_6H_4).

n-Нитрофенил-3,4-О-изопропилиден- α -D-галактопиранозид (XII). Раствор 500 мг галактозида (XI) и 45 мг $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ в 5 мл 2,2-диметоксипропана перемешивали 1,5 ч при 20°C , нейтрализовали триэтиламином (1мл) и упаривали. Из остатка методом КХ в бензоле с этилацетатом ($0 \rightarrow 75\%$ EtOAc) выделили 277 мг ацетонида (XII) (R_f 0,42 (Г)) и 99 мг минорного продукта (R_f 0,50 (Г)). Последний превращался в соединение (XII) при выдерживании в растворе CHCl_3 (16 ч, 20°C). Общий выход продукта (XII) 368 мг (65%), т. пл. $172\text{--}173^\circ\text{C}$ (гексан — ацетон), $[\alpha]_D^{29} + 197^\circ$ (с 1, хлороформ). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1,40 (с, 3H, CCH₃), 1,56 (с, 3H, CCH₃), 3,82 (дд, 1H, H6a, $J_{5,6a}$ 4,5, $J_{6a,6b}$ 12,0), 3,93 (дд, 1H, H6b), $J_{5,6b}$ 5,6), 4,07 (дд, 1H, H2, $J_{1,2}$ 3,5), 4,17 (ддд, 1H, H5, $J_{4,5}$ 2,3), 4,37 (дд, 1H, H4) 4,48 (т, 1H, H3, $J_{2,3} = J_{3,4} = 6,2$), 5,69 (д, 1H, H1), 7,20 и 8,22 (2д, 4H, C_6H_4). Найдено, %: C 52,72, H 5,31, N 4,01. $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_8$. Вычислено, %: C 52,79, H 5,57, N 4,10.

n-Нитрофенил-2,6-ди-О-бензоил-3,4-О-изопропилиден- α -D-галактопиранозид (XV). К раствору 240 мг (0,7 ммоль) ацетонида (XII) в 3 мл пиридина при охлаждении и перемешивании прибавляли 0,242 мл (2,1 ммоль) бензоилхлорида. Смесь выдерживали 24 ч при 20°C , фильтровали и упаривали. Методом КХ в бензоле с этилацетатом ($0 \rightarrow 10\%$ EtOAc) выделили 378 мг дибензоата (XV) (99%, аморфный), $[\alpha]_D^{27} + 137^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0,70 (А). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1,43 (с, 3H, CCH₃), 1,63 (с, 3H, CCH₃), 4,30 (дд, 1H, H5, $J_{4,5}$ 2,3), 4,35 (дд, 1H, H4, $J_{3,4}$ 5,3),

4,53 (д, 2Н, Н6, $J_{5,6}$ 5,7), 4,66 (дд, 1Н, Н3, $J_{2,3}$ 7,8), 5,29 (дд, 1Н, Н2, $J_{1,2}$ 3,5), 5,82 (д, 1Н, Н1), 7,10—8,15 (м, 14Н, C_6H_4 , C_6H_5).

n-Нитрофенил-2,6-ди-*O*-бензоил- α -*D*-галактопиранозид (XVI). Суспензию 300 мг соединения (XV) в смеси 12 мл $AsOH$ и 6 мл воды нагревали 1 ч при 100° С. Раствор упаривали, от остатка отгоняли толуол. Методом КХ в бензоле с этилацетатом (0 $\rightarrow$ 50% $EtOAc$) выделили 261 мг (94%) диола (XVI) (аморфный), $[\alpha]_D^{26} +166^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0,10 (А). Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 3,20 (уш. с, 1Н, ОН), 3,30 (уш. с, 1Н, ОН), 4,21—4,29 (м, 2Н, Н4, Н5), 4,46 (дд, 1Н, Н3, $J_{3,4}$ 3,3), 4,56 (дд, 1Н, Н6а, $J_{5,6a}$ 7,5, $J_{6a,6b}$ 11,7), 4,66 (дд, 1Н, Н6б, $J_{5,6b}$ 4,8), 5,52 (дд, 1Н, Н2, $J_{2,3}$ 10,2), 5,99 (дд, 1Н, Н1, $J_{1,2}$ 3,6), 7,10—8,10 (м, 14Н, C_6H_4 , C_6H_5).

n-Нитрофенил-2,4,6-три-*O*-бензоил- α -*D*-галактопиранозид (IX). К раствору 240 мг (0,47 ммоль) дибензоата (XVI) в 1,2 мл CH_3CN прибавляли молекулярные сита 3 Å (10 мг), 0,102 мл (0,59 ммоль) триметилортобензоата и каталитическое количество безводной $TsOH$. Смесь перемешивали 24 ч при 20° С (ТСХ-контроль в системе А) и упаривали. Образовавшийся ортоэфир (XVII) (R_f 0,70 и 0,80 (А)) выдерживали в 0,5 мл $AsOH$ 20 ч при 20° С, растворитель упаривали. Из остатка методом КХ в бензоле с этилацетатом (0 $\rightarrow$ 10% $EtOAc$) выделили 237 мг (81%) трибензоата (IX) (аморфный), $[\alpha]_D^{28} +128^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0,25 (А), 0,71 (Б). Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 2,77 (уш. с, 1Н, ОН), 4,42—4,56 (м, 3Н, Н5, Н6), 4,75 (дд, 1Н, Н3, $J_{2,3}$ 10,5), 5,60 (дд, 1Н, Н2, $J_{1,2}$ 3,6), 5,88 (д, 1Н, Н4, $J_{3,4}$ 3,5), 6,11 (д, 1Н, Н1), 7,10—8,20 (м, 19Н, C_6H_4 , C_6H_5). Спектр ^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$): 63,0 (С6), 67,4 (С3), 68,9 (С5), 71,1 (С4), 71,2 (С2), 95,0 (С1), 118,75, 125,6 (C_6H_4), 128,4—130,15, 133,6—133,9 (C_6H_5), 148,7, 160,9 (C_6H_4), 166,0, 166,5 (СО).

Метил-2,3,4-три-*O*-бензоил-6-(2,3,4,6-тетра-*O*-бензоил- α -*D*-галактопиранозилфосфо)- α -*D*-галактопиранозид, триэтиламмониевая соль (VIII). Смесь 67 мг (0,09 ммоль) водородфосфоната (Va) и 45 мг (0,09 ммоль) соединения (VII) высушивали лиофилизацией из бензола (2 $\times$ 2 мл). К раствору остатка в 0,5 мл пиридина при перемешивании прибавляли 0,03 мл (0,24 ммоль) триметилацетилхлорида и через 10 мин при 20° С раствор 50 мг (0,2 ммоль) нода в 1 мл смеси пиридин — H_2O (95 : 5). ТСХ-контроль проводили в системах Б и Г. Через 10 мин смесь разбавляли хлороформом (30 мл), промывали 1 М $Na_2S_2O_3$ (2 $\times$ 10 мл), 0,5 М ТЕАВ (2 $\times$ 10 мл), высушивали и упаривали. Методом КХ в хлороформе с метанолом (0 $\rightarrow$ 10% $MeOH$) выделили 89 мг (80%) фосфодиэфира (VIII) (аморфный), R_f 0,60 (Г). Спектры ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР — см. табл. 2. Спектр 1H -ЯМР — см. табл. 3.

n-Нитрофенил-2,4,6-три-*O*-бензоил-3-(2,3,4,6-тетра-*O*-бензоил- α -*D*-галактопиранозилфосфо)- α -*D*-галактопиранозид, триэтиламмониевая соль (X), был получен из 80 мг (0,105 ммоль) *N*-фосфоната (Va) и 50 мг (0,08 ммоль) соединения (IX) по методике синтеза фосфодиэфира (VIII). Выход соединения (X) 102 мг (91%, аморфный), $[\alpha]_D^{30} +96^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0,64 (Г). Спектры ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР — см. табл. 2. Спектр 1H -ЯМР — см. табл. 3.

Метил-6- α -*D*-галактопиранозилфосфо- α -*D*-галактопиранозид, триэтиламмониевая соль (I). К раствору 89 мг соединения (VIII) в 2 мл 1,4-диоксана прибавляли 2 мл 0,2 М $MeONa$ в метаноле. Смесь выдерживали 1 ч при 20° С (ТСХ-контроль в системе Д), обрабатывали катионитом Dowex 50 (H^+), фильтровали, фильтрат немедленно нейтрализовали триэтиламином (2 мл) и упаривали досуха. От остатка отгоняли метанол. Фосфодиэфир (I) выделяли гель-хроматографией на колонке (1,5 $\times$ 74 см, V_0 = 40 мл) с фрактогелем TSK HW-40 (S) (Merck) в деионизованной воде (скорость элюирования 1 мл/мин). Выход 30 мг (80%, аморфный), $[\alpha]_D^{28} +110^\circ$ (с 1, 2, вода), R_f 0,30 (Д). Спектры ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР — см. табл. 2. Спектр 1H -ЯМР — см. табл. 3.

n-Нитрофенил-3- α -*D*-галактопиранозилфосфо- α -*D*-галактопиранозид, аммониевая соль (II) и *n*-нитрофенил- α -*D*-галактопиранозид-3,4-циклофосфат, аммониевая соль (XVIII). Соединение (X) (50 мг) дебензоилирова-

ли в 4 мл 0,05 М раствора MeONa в метаноле с 1,4-диоксаном (1 : 1) в течение 1 ч при 0° С (ТСХ-контроль в системе Д). Дальнейшая обработка проводилась, как описано в синтезе соединения (I). Продукты реакции разделяли ионообменной хроматографией на колонке (1 × 18 см) с фрактогелем TSK DEAE-650 (S) (HCO₃⁻) (Мегск) в линейном градиенте бикарбоната аммония от 0 до 0,25 М (скорость элюирования 1 мл/мин).

Выделили 14 мг (68%) фосфодиэфира (II) (аморфный), $[\alpha]_D^{25} + 168^\circ$ (с 1, 1, метанол), R_f 0,47 (Д), $E_{\text{пикрат}}$ 0,80, $E_{\text{ГЛСР}}$ 0,50 (спектры ¹³С- и ³¹Р-ЯМР — см. табл. 2, спектры ¹Н-ЯМР — см. табл. 3), и 3 мг (22%) циклофосфата (XVIII) (аморфный), $[\alpha]_D^{25} + 101^\circ$ (с 0,8, вода), R_f 0,72 (Д), $E_{\text{пикрат}}$ 0,85, $E_{\text{ГЛСР}}$ 0,53; спектр ¹Н-ЯМР (D₂O): 3,80 (м, 2Н, Н_{6а}, Н_{6б}, $J_{6а,6б}$ 12,0), 4,11 (ддд, 1Н, Н₅, $J_{4,5}$ 2,0, $J_{5,6а}$ 4,5, $J_{5,6б}$ 9,5), 4,23 (дд, 1Н, Н₂, $J_{2,3}$ 8,5), 4,76 (м, 2Н, Н₃, Н₄), 5,87 (д, 1Н, Н₁, $J_{1,2}$ 3,5), 7,33 и 8,30 (2д, 4Н, C₆H₄); спектр ¹³С-ЯМР (CD₃OD): 61,85 (С₆), 69,9 (С₂), 70,6 (С₅), 75,65 (С₄), 78,8 (С₃), 97,55 (С₁), 118,1, 127,5, 144,2, 163,9 (С₆H₄); спектр ³¹Р-ЯМР (D₂O): 16,81.

Авторы благодарят А. С. Шашкова за съемку и помощь в интерпретации спектров ¹Н- и ¹³С-ЯМР и А. В. Игнатенко — за съемку спектров ³¹Р-ЯМР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Николаев А. В., Иванова И. А., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. № 8. С. 1105—1117.
2. Николаев А. В., Рябцев Е. В., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 12. С. 1649—1659.
3. Николаев А. В., Иванова И. А., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. № 5. С. 674—684.
4. Елисеева Г. И., Николаев А. В., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 8. С. 1140—1143.
5. Николаев А. В., Иванова И. А., Шибает В. Н. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. № 12. С. 1693—1695.
6. Slodki M. E. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 11. P. 2700—2706.
7. Hofmann P., Jann B., Jann K. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 147. P. 601—609.
8. Srivastava O. P., Hindsgaul O. // Carbohydr. Res. 1985. V. 143. № 1. P. 77—84.
9. Defferari J. O., Deulofeu V. // J. Org. Chem. 1952. V. 17. № 8. P. 1097—1101.
10. Helferich B., Jung M. // Liebigs Ann. Chem. 1954. V. 589. № 1. P. 77—81.
11. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я. // Биооргани. химия. 1977. Т. 3. № 6. С. 752—758.
12. Barili P. L., Berti G., Catelani G., Colonna F., Marra A. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 20. P. 2307—2310.
13. Lemieux P. U., Driguez H. // J. Amer. Chem. Soc. 1975. V. 97. № 14. P. 4069—4075.
14. O'Conner J. V., Nunez H. A., Barker R. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 3. P. 500—507.
15. Данилов Л. Л., Мальцев С. Д., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. // Биооргани. химия. 1982. Т. 8. № 1. С. 109—113.
16. Зарытова В. Ф., Раит В. К., Черникова Т. С. // Биооргани. химия. 1977. Т. 3. № 12. С. 1626—1632.
17. Нифантьев Э. Е., Васянина Л. К. Спектроскопия ЯМР ³¹Р (методическая разработка для студентов). М.: МГПИ им. В. И. Ленина, 1986. С. 62.
18. Hanes C. S., Isherwood F. A. // Nature. 1949. V. 164. № 4183. P. 1107—1109.
19. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Байрамова Н. Э., Николаев А. В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1978. № 3. С. 652—656.

Поступила в редакцию
4.VII.1990

N. S. UTKINA, A. V. NIKOLAEV, V. N. SHIBAEV

FRAGMENTS OF BIOPOLYMERS CONTAINING GLYCOSYL PHOSPHATE RESIDUES. 6. SYNTHESIS OF α -D-GALACTOSE PHOSPHODIESTERS, I FRAGMENTS OF THE PHOSPHOGALACTANS FROM *SPOROBOLOMYCES* YEASTS AND OF THE CAPSULAR ANTIGEN OF *ESCHERICHIA* [COLI K52

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow

Syntheses of methyl 6-(α -D-galactopyranosyl phosphate)- and *p*-nitrophenyl 3-(α -D-galactopyranosyl phosphate)- α -D-galactopyranosides were performed through coupling of 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-galactopyranosyl hydrogenphosphonate with the partially acylated galactopyranosides, in the presence of trimethylacetyl chloride, followed by oxidation and debenzoylation. The data of ¹H, ¹³C, and ³¹P NMR spectra of the synthesized phosphate diesters are reported.