



УДК 615.332 + 547.455.6.02

СТРОЕНИЕ УГЛЕВОДНОГО ФРАГМЕНТА АНТИБИОТИКА
ВИРЕНОМИЦИНА

Куллева В. В., Кудимова М. К., Потапова Н. П.,
Рубашева Л. М., Бражникова М. Г., Розынов В. В.*,
Беккер А. Р.**

Институт по изысканию новых антибиотиков
Академии медицинских наук СССР, Москва

Выделенный при метанолизе противоопухолевого антибиотика виреномицина левовращающий метилгликозид нового нейтрального сахара, названного виренозой, имеет строение и абсолютную конфигурацию метил-3-С-метил-6-дезоксид-β-D-гулопиранозид, что доказано с помощью методов периодатного окисления, ИК-, ПМР- и масс-спектрометрии, а также изучения оптических свойств в медно-аммиачных растворах Сурга А и Сурга В.

В процессе изучения противоопухолевого антибиотика виреномицина, продуцируемого культурой *Actinomyces virens* sp. nov. [1], установлено, что последний является гликозидом нового нейтрального сахара, названного виренозой.

Сахар образуется при метанолизе антибиотика в виде смеси аномерных метилгликозидов. Хроматографией на силикагеле метилвиренозиды получены в виде индивидуальных веществ, кристаллизующихся из хлороформа с гексаном. Метилгликозиды виренозы дают положительную реакцию Молиша и не обладают восстанавливающими свойствами.

Гликозидная связь в метилвиренозидах гидролизуеться 0,5 н. HCl в течение 30 мин, образуя восстанавливающие сахара, дающие положительную реакцию с кислым фталатом анилина.

На основании данных элементного анализа и определения молекулярного веса масс-спектрометрическим методом для метилвиренозида предложена формула $C_8H_{16}O_5$.

Для изучения строения сахара использовали левовращающий метилгликозид виренозы, образующийся в большем количестве при метанолизе антибиотика.

По данным функционального анализа и спектра ПМР, в молекуле метилвиренозида имеются две CH_3-C - и одна CH_3-O -группы. Наличие двух CH_3-C -групп указывает на разветвленный углеродный скелет сахара. Из спектра ПМР следует, что в сахаре содержится три OH-группы (уширенный сигнал при 2,31 м. д.).

Ацилирование метилвиренозида уксусным ангидридом в пиридине приводит к образованию диацетата. Наличие двух ацетильных групп в нем

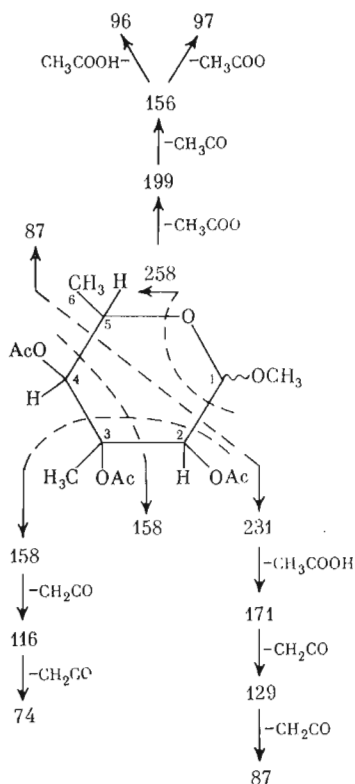
* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР.

** Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт.

доказано методами ПМР- и ИК-спектроскопии. В ПМР-спектре диацетата наблюдается шестипротонный синглет при 2,15 м. д. В его ИК-спектре имеется полоса поглощения $\nu_{C=O}$ 1750 см^{-1} , свидетельствующая о появлении сложноэфирной группы, отсутствующей в спектре исходного метилвиринозида. Однако в ИК-спектре диацетата остается полоса поглощения, соответствующая валентным колебаниям гидроксильных групп (3620 см^{-1}), а в ПМР-спектре имеется однопротонный сигнал ОН-группы, что говорит о присутствии в молекуле метилвиринозида трудноацелируемой третичной гидроксильной группы. Действительно, при доацелировании диацетата по методу Штеглиха с использованием в качестве катализатора 4-диметиламинопиридина [2] образуется триацетат состава $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_8$, в ПМР-спектре которого имеются сигналы трех ацетильных групп (δ 2,2; 2,25; 2,27 м. д.). В ИК-спектре триацетата сахара исчезает полоса, соответствующая валентным колебаниям гидроксильных групп.

Метилвиринозид (1 моль) восстанавливает 2 моль периодата, что указывает на соседнее расположение трех гидроксильных групп в пиранозном цикле сахара.

Исследование масс-спектра высокого разрешения триацетата метилвиринозида (см. табл. 1) позволило установить местоположение всех функциональных групп в молекуле сахара. Основные пути распада молекулы триацетата метилвиринозида показаны на схеме.



В масс-спектре имеется молекулярный ион с m/e 318. Ион с m/e 287 ($M - \text{OCH}_3$)⁺ указывает на расположение метоксильной группы у $\text{C}_{(1)}$. Наличие в масс-спектре ионов с m/e 231, 171, 129 и 87 определяет положение гидроксильных групп у $\text{C}_{(2)}$, $\text{C}_{(3)}$ и $\text{C}_{(4)}$ молекулы сахара и метильной группы при одном из этих атомов (в масс-спектрах ацетатов сахаров, не имеющих разветвления в молекуле, наблюдаются ионы с m/e 157, 115 и 73 [3]). Поскольку в спектре имеется ион с m/e 158 и отсутствует ион с

Массовые числа и элементный состав основных ионов в масс-спектре триацетата метилвиринозида

m/e	Элементный состав	$I, \% \text{ от макс.}$	m/e	Элементный состав	$I, \% \text{ от макс.}$	m/e	Элементный состав	$I, \% \text{ от макс.}$
318	$C_{14}H_{23}O_8$	1,9	171	$C_6H_{11}O_4$	100,0	114	$C_6H_{10}O_2$	49,0
287	$C_{13}H_{19}O_7$	9,6	158	$C_7H_{10}O_4$	23,0	103	$C_4H_7O_3$	21,0
259	$C_{12}H_9O_6$	4,8	156	$C_8H_{12}O_3$	27,0	97	C_6H_9O	85,5
258	$C_{12}H_{18}O_6$	3,8	141	$C_7H_9O_3$	6,7	96	C_6H_8O	68,0
231	$C_{10}H_{15}O_6$	8,6	139	$C_8H_{11}O_2$	10,6	87	$C_4H_7O_2$	13,5
215	$C_{10}H_{19}O_5$	10,6	129	$C_6H_9O_3$	27,0	85	C_5H_9O	43,0
208	$C_{11}H_{12}O_4$	6,7	127	$C_7H_{11}O_2$	15,4	74	$C_3H_6O_2$	19,2
199	$C_{10}H_{15}O_4$	71,0	116	$C_5H_8O_3$	86,5	43	CH_3CO	64,5

m/e 144, можно предположить, что метильная группа расположена у $C_{(3)}$. В дальнейшем это предположение было подтверждено анализом ПМР-спектра метилвиринозида.

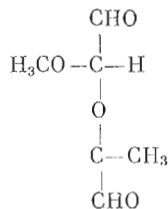
Отсутствие в масс-спектре иона ($M - 73$)⁺ с m/e 245, возникающего при разрыве $C_5 - C_6$ -связи в ацетатах сахаров, свидетельствует о наличии в молекуле сахара 6-дезоксизвена.

Таким образом, совокупность данных функционального анализа, периодатного окисления и масс-спектрометрического исследования позволила установить структуру метилвиринозида как метил-3-С-метил-6-дезоксигексопиранозида.

Следующим этапом наших исследований было установлено относительной и абсолютной конфигурации сахара. Детальный анализ спектра ПМР метилвиринозида (рисунок) позволил установить относительную конфигурацию некоторых асимметрических центров в его молекуле.

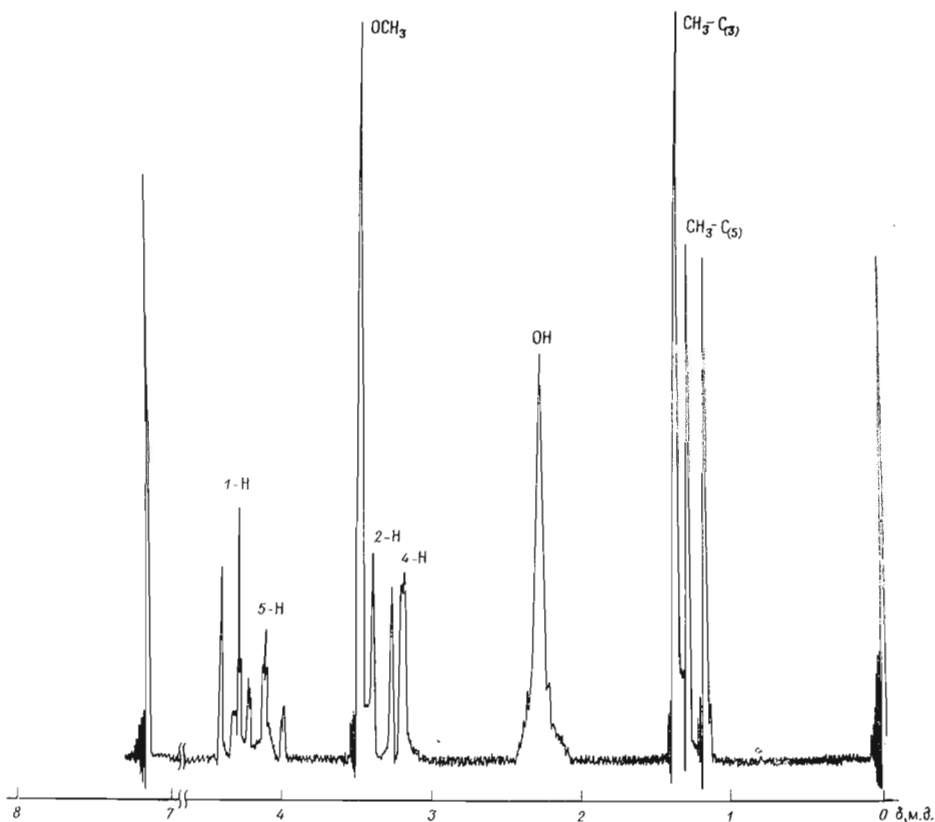
Самым слабопольным в спектре является сигнал аномерного протона с δ 4,31 м. д. ($J_{1,2}$ 7,5 Гц). Расщепление сигнала 1-Н в дублет свидетельствует о наличии лишь одного протона при $C_{(2)}$. Сигнал 2-Н представлен дублетом с δ 3,31 м. д. ($J_{1,2}$ 7,5 Гц). Величина константы взаимодействия протонов при $C_{(1)}$ и $C_{(2)}$ указывает на их *транс*-диаксиальную ориентацию в пиранозном цикле. Мультиплет с центром при 4,12 м. д. принадлежит 5-Н. Расщепление этого сигнала обусловлено взаимодействием 5-Н с протонами метильной группы (J_{5,CH_3} 6,0 Гц), дублетный сигнал которой с J 6,0 Гц находится при 1,24 м. д., и с протоном при $C_{(4)}$ ($J_{4,5}$ 1,2 Гц). Сигнал 4-Н расположен при 3,16 м. д. (д, $J_{4,5}$ 1,2 Гц). Величина константы взаимодействия 4-Н и 5-Н указывает на две возможные взаимные ориентации этих протонов в цикле: диэкваториальную или экваториально-аксиальную.

Установлению относительной ориентации 4-Н и 5-Н способствовало выделение из продуктов периодатного окисления нелетучего фрагмента, идентифицированного как (2*R*, 4*R*)-2-метил-3-окса-4-метоксипропандиаль



Образование этого продукта характерно для метил-6-дезоксигексопиранозидов *D*-ряда с β -конфигурацией гликозидного центра [4].

Известно, что гексопиранозиды с β -конфигурацией гликозидного центра имеют одинаковую ориентацию протонов при $C_{(1)}$ и $C_{(5)}$. Отсюда следует аксиальное расположение 5-Н, а значит, экваториальное 4-Н.

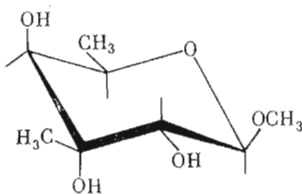


Спектр ПМР β -метилвирозида

Определение абсолютной конфигурации у $C_{(5)}$ позволяет сделать вывод о $C1$ -конформации пиранозного цикла.

Характер расщепления сигналов протонов 2-Н и 4-Н свидетельствует об отсутствии протона при $C_{(3)}$, а следовательно, о нахождении при $C_{(3)}$ третичной гидроксильной группы и CH_3 -группы, представленной в спектре трехпротонным синглетом с δ 1,39 м.д.

Вопрос о конфигурации асимметрического центра у $C_{(3)}$ решен на основании изучения оптических свойств метилвирозида в стандартных медно-аммиачных растворах Сирга А и Сирга В [5]. Изменение молекулярного вращения ($\Delta [M]_{436}$) метилвирозида в этих растворах, равное величине порядка $+1500^\circ$, позволяет сделать вывод о том, что проекционный валентный угол между связями $C_{(3)} - OH$ и $C_{(2)} - OH$ равен 60° . Следовательно, OH -группы при $C_{(2)}$ и $C_{(3)}$ имеют *cis*-ориентацию в цикле. Таким образом, метильная группа у $C_{(3)}$ расположена экваториально, а метилвирозид имеет строение и абсолютную конфигурацию метил-3-С-метил-6-дезоксид- β -D-гулопиранозида:



Насколько нам известно, 3-С-метил-6-дезоксид- D -гулоза (вироза) ранее не была обнаружена в антибиотиках.

Экспериментальная часть

ИК-спектры получены на спектрофотометре Pye Unicam SP-1100 (Англия), ПМР-спектры — на спектрометре Hitachi R-20A (Япония) с рабочей частотой 60 МГц в C^2HCl_3 с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта, масс-спектры — на приборе LKB-900 (Швеция) при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и температуре ионизационной камеры 230—240°, масс-спектры высокого разрешения — на приборе MS-902 с системой обработки данных DS-30 (Англия). Удельное вращение растворов измерено на поляриметре Perkin Elmer M-241 (Швеция).

Для очистки сахаров и их производных использовали силикагель марки «водная кремневая кислота» (размер частиц 0,1 мм). Контроль однородности веществ проводили с помощью ТСХ на пластинках Silufol[®] (Kavalier, ЧССР) в системах: хлороформ — метанол, 4 : 1 (А) и 20 : 1 (Б). Для обнаружения сахаров использовали методику Зиминского [6]. Виреномицин выделяли как описано в работе [1].

Метилвиринозид (I). Раствор 2 г виреномицина в 50 мл абс. метанола, насыщенного HCl (3% по весу), нагревали в запаянной ампуле при 70° в течение 3 сут. После охлаждения из темноокрашенной реакционной смеси удаляли растворитель в вакууме при 30°. Остаток в колбе растворяли в 200 мл дистиллированной воды. Нерастворимый осадок отделяли фильтрованием. Фильтрат экстрагировали хлороформом (3 × 5 мл) для удаления окрашенных примесей. Водную фракцию нейтрализовали дауэксом 1×2 (HCO_3^-) до pH 7,0. Воду удаляли упариванием в вакууме. Остаток в колбе высушивали над P_2O_5 . Полученное сиропообразное вещество (0,2 г) растворяли в минимальном объеме смеси хлороформ — метанол (20 : 1) и вносили в колонку (внутренний диаметр 2 см) с 50 г силикагеля. Элюцию метилгликозидов вели той же системой, фракции по 5 мл контролировали методом ТСХ в системе А. Хроматографически однородные фракции (R_f 0,65) объединяли, растворитель удаляли в вакууме. Получили 0,15 г бесцветного метилгликозида виренозы, кристаллизующегося из смеси хлороформа с гексаном. Кристаллический гликозид (I) имеет т. пл. 131°, $[\alpha]_D^{20} -39^\circ$ (с 0,35; $CHCl_3$). Найдено, %: С 50,53; Н 8,59; ОСН₃ 16,32; ССН₃ 14,78. $C_8H_{16}O_5$. Вычислено, %: С 50,0; Н 8,33; ОСН₃ 16,14; ССН₃ 15,62.

Диацетат (II). Раствор 0,1 г метилгликозида (I) в 4 мл смеси уксусного ангидрида с пиридином (1 : 1) выдерживали при комнатной температуре 18 ч. Растворитель удаляли в вакууме при 35°. Остаток в колбе высушивали (50°/1 мм рт. ст.). Бесцветное сухое вещество перекристаллизовывали из эфира с гексаном. Получили 0,1 г (70%) кристаллического ацетата (II) с т. пл. 140°, $[\alpha]_D^{20} -27^\circ$ (с 0,3; $CHCl_3$), R_f 0,42 (Б) (R_f (I) в системе Б = 0).

Триацетат (III). К раствору 0,1 г диацетата (II) в 1 мл смеси триэтиламина с уксусным ангидридом (1 : 1) добавляли 2 мг 4-диметиламинопиридина [2]. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 7 сут. Растворитель удаляли в вакууме. Темноокрашенный сиропообразный остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в системе бензол — ацетон (20 : 1). Фракции, содержащие триацетат (III) (R_f 0,78 (Б)), объединяли, растворитель удаляли в вакууме. Остаток в колбе высушивали (50°/1 мм рт. ст.). Полученное сухое вещество кремоватого цвета перекристаллизовывали из эфира с гексаном. Получили 0,03 г (26%) кристаллического ацетата (III), т. пл. 164°, $[\alpha]_D^{20} -15^\circ$ (с 0,1; $CHCl_3$). Найдено, %: СОСН₃ 40,14. $C_{14}H_{22}O_8$. Вычислено, %: СОСН₃ 40,56.

Периодатное окисление метилвиринозида (I). Для окисления использовали 0,01 М метапериодат натрия. Окисление вели в темноте при комнатной температуре. Содержание периодата определяли по известной методике [7]. Через 3 ч расход периодата составил 1,8 моль на моль соединения (I). Через 4 и 24 ч дальнейшего потребления периодата не наблюдается.

(2*R*,4*R*)-2-метил-3-окса-4-метоксипропандиаль. К раствору 0,2 г (~ 1 ммоль) виронозида (I) в 25 мл воды добавляли 0,85 г (~ 4 ммоль) метапериодата натрия. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре 4 ч, нейтрализовали дауэксом (HCO₃⁻) до pH 6,0—6,5 и растворитель удаляли в вакууме. Сухой остаток экстрагировали эфиром (2 × 10 мл). Эфир удаляли в вакууме. Бесцветное сухое вещество перекристаллизовывали из смеси эфира с гексаном. Выход 0,07 г, [α]_D²⁰ -89° (с 0,34; H₂O). При окислении α-метилвиронозида получен (2*R*,4*S*)-2-метил-3-окса-4-метоксипропандиаль, [α]_D²⁰ +140,9° (с 0,3; H₂O). Удельное вращение выделенных веществ соответствует литературным данным [4].

Таблица 2

Растворитель	c	α	[α]	Δ[M]
H ₂ O	0,3	-0,315	-105	
Супра А	0,3	+2,040	+680	+1507
Супра В	0,3	+2,115	+705	+1555

Изучение оптических свойств метилвиронозида (I) в растворах Супра А и Супра В. Медно-аммиачные растворы получены по методу Ривса [5]. К 1 мл растворов Супра А и Супра В добавляли 3 мг (0,015 ммоль) гликозида (I). Оптическую активность полученных растворов измеряли при 15° в кювете длиной 1 дм при длине волны 436 нм. Параллельно измеряли оптическое вращение (I) в воде в тех же условиях. Результаты измерений представлены в табл. 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бражникова М. Г., Кудинова М. К., Куляева В. В., Потапова Н. П., Пономаренко В. И. (1977) Антибиотики, 11, 967—997.
2. Steglich W., Höffe C. (1969) Angew. Chem., 23, 1001.
3. Biemann K., De Jongh D. C., Schnoes H. K. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 1763—1771.
4. Maclay W. D., Hann R. M., Hudson C. S. (1939) J. Amer. Chem. Soc., 61, 1660—1664.
5. Reeves R. E. (1951) Advances in Carbohydr. Chemistry, 6, 107—134.
6. Ziminski T., Borowski E. (1966) J. Chromatogr., 23, 480—482.
7. Методы химии углеводов (1967) с. 64—65, «Мир», М.

Поступила в редакцию
4.1.1978

После доработки
20.11.1978

THE STRUCTURE OF ANTIBIOTIC VIRENOMYCIN SUGAR MOIETY

KULYAEVA V. V., KUDINOVA M. K., POTAPOVA N. P.,
RUBASHEVA L. M., BRAZHNIKOVA M. G., ROSYNOV B. V., BEKKER A. R.

Institute of New Antibiotics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

After methanolysis of the antitumor antibiotic virenomycin, methylglycoside of a new neutral sugar (which was given the name virenoza) was isolated. Its structure was established as methyl-6-deoxy-3-C-methyl-β-D-gulopyranoside by periodate oxidation, IR-, PMR-, mass-spectra, as well as by measuring optical rotation in Cupra A and Cupra B solutions.