



УДК 547.458.07+543.422.23

СИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АНТИГЕННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ
И ИХ ФРАГМЕНТОВ

1/4*. ОБРАЗОВАНИЕ ТРИСАХАРИДА С β -L-РАМНОПИРАНОЗИДНОЙ СВЯЗЬЮ ПРИ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИИ 1, 2-O-ИЗОПРОПИЛИДЕН-4, 6-O-ЭТИЛИДЕН- α -D-ГАЛАКТОПИРАНОЗЫ ГЕКСА-O-АЦЕТИЛ- β -D-МАННОПИРАНОЗИЛ-(1 \rightarrow 4)- α -L-РАМНОПИРАНОЗИЛБРОМИДОМ

Николаев А. В., Шапков А. С., Дмитриев Б. А.,
Бочетков И. К.

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

При гликозилировании гекса-O-ацетил- β -D-маннопиранозил-(1 \rightarrow 4)- α -L-рамнопиранозилбромидом 1,2-O-изопропилиден-4,6-O-этилиден- α -D-галактопиранозы в ацетонитриле в присутствии $\text{Hg}(\text{CN})_2$ наряду с ожидаемым α -L-рамнопиранозидом в качестве минорного продукта выделен изомерный трисахарид с β -L-рамнопиранозидной связью. Полностью расшифрованы спектры ^{13}C -ЯМР изомерных O- β -D-маннопиранозил-(1 \rightarrow 4)-O- α - и β -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 3)-D-галактопираноз.

В ходе осуществления синтеза высших олигосахаридов, кратных повторяющемуся звену O-антигенного полисахарида *Salmonella newington*, нам необходимо было получить трисахарид (III) — исходное соединение для синтеза гликозилирующих и гликозилируемых блоков. Ранее [2], при гликозилировании сиропообразной 1,2-O-изопропилиден-4,6-O-этилиден- α -D-галактопиранозы (II) [3] гексаацетатом маннозилрамнозилбромида (I) в условиях Гельфериха, это соединение было выделено нами в аморфном состоянии. При повторении синтеза с использованием кристаллического соединения (II) трисахарид (III) удалось получить также в кристаллическом виде.

Недавно в нашей лаборатории было показано [4], что при осуществлении конденсации соединений (I) и (II) важную роль играет порядок прибавления реагентов. Выход трисахарид (III) возростал с 48% [2] до 75% [4] при проведении гликозилирования путем медленного прибавления раствора ацетогалогенозы (I) к смеси $\text{Hg}(\text{CN})_2$ и соединения (II) в ацетонитриле. Поскольку бромиды типа (I), растворенные в ацетонитриле или его смеси с нитрометаном, при 20° С достаточно лабильны, авторы [4] предварительно стабилизировали раствор ацетогалогенозы (I) добавлением небольшого количества 2,6-лутидина или 2,4,6-коллидина.

Повторив эту методику, мы получили достаточно чистую реакционную смесь, из которой колоночной хроматографией была выделена фракция, содержавшая продукт конденсации (III). Маточный раствор, оставшийся после его кристаллизации, содержал минорный продукт с несколько мень-

* Сообщение 13 см. [1].

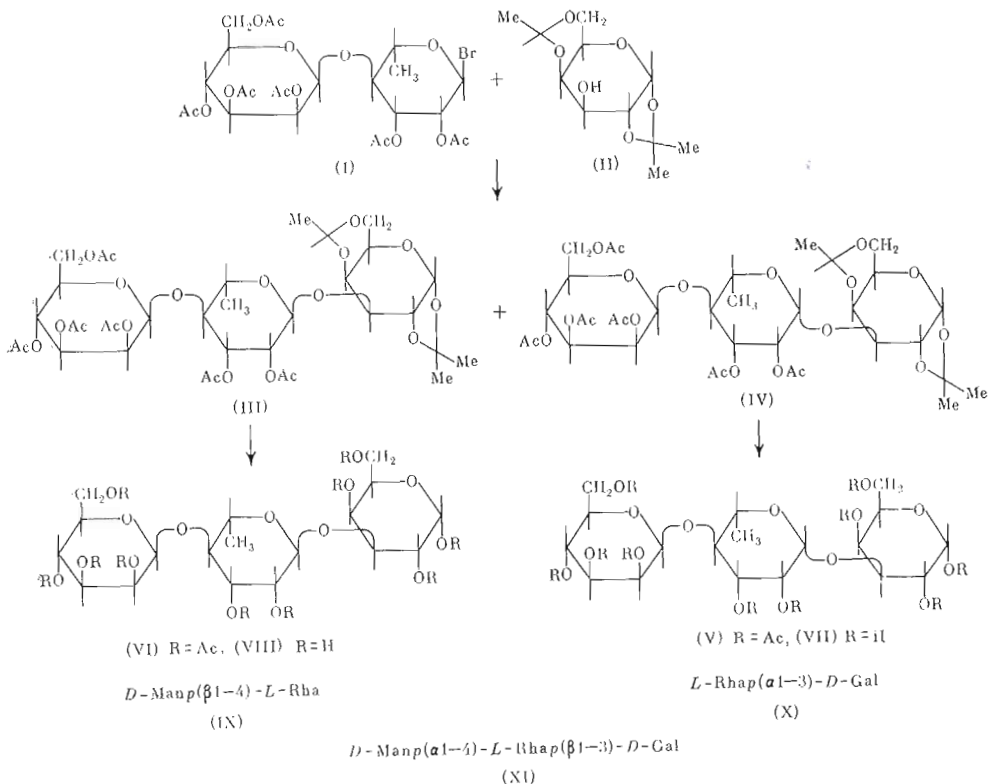
шей, чем у трисахарида (III), хроматографической подвижностью. Колоночной и препаративной тонкослойной хроматографией это вещество было выделено в чистом виде. На основании совпадения данных элементного анализа и спектра ^1H -ЯМР минорного продукта и трисахарида (III) было сделано предположение, что это вещество является структурным изомером (III). Поскольку изомерное соединение не являлось ортоэфиром, так как было устойчиво при гидролитической ортоэфирной пробе, ему была предположительно приписана структура трисахарида (IV) с β -рамнозидной связью. Выход изомеров (III) и (IV) составил 64 и 5,6% соответственно. Интересно, что при проведении реакции гликозилирования путем добавления по каплям раствора бромида (1) в отсутствие основания изомерный продукт (IV) был выделен с несколько меньшим выходом — 2,5% (выход основного продукта (III) составил 62%).

Для доказательства наличия β -рамнозидной связи в соединении (IV) мы предполагали использовать метод ^{13}C -ЯМР в применении к свободному трисахариду. Для получения последнего трисахарид (IV) первоначально превращали в полный ацетат (V) по методике [4], отработанной для получения ацетата (VI) из трисахарида (III) и заключающейся в последовательном мягком ацетоллизе, гидролизе и ацетилировании (см. «Экспериментальную часть»). Последующее омыление ацетата (V) каталитическим количеством MeONa в метаноле при 0°C [5] привело к пезащипенному трисахариду (VII), который выделяли методами препаративной хроматографии на бумаге и ионообменной хроматографии на анионите DA-X4 в боратном буфере [6]. Выделенное соединение было хроматографически однородно и существенно отличалось по данным анионообменной хроматографии от синтезированного нами ранее трисахарида (VIII) (см. «Экспериментальную часть»).

Доказательство строения трисахарида (VII) было проведено на основании анализа его моносахаридного состава (полный кислотный гидролиз привел к маннозе, рамнозе и галактозе в соотношении 0,9 : 1 : 0,9) и спектра ^{13}C -ЯМР. Предварительно мы изучили аналогичный спектр пезащипенного трисахарида (VIII), чтобы установить влияние конфигурации L -рамнопиранозидной связи на положения резонанса углеродных атомов в диастереомерах (VII) и (VIII). Спектр соединения (VIII) был необходим нам также в качестве модели при анализе методом ^{13}C -ЯМР высших олигосахаридов, олигомеров трисахарида (VIII), синтез которых осуществлен и скоро будет опубликован.

Полная интерпретация спектра трисахарида (VIII) была проведена с использованием данных ^{13}C -ЯМР дисахаридов (IX) [7] и (X) [8], моносахаридный состав которых и типы гликозидных связей удачным образом моделировали участки цепи исследуемого вещества (табл. 1).

При расшифровке спектра ^{13}C -ЯМР изомерного трисахарида (VII) наряду со спектрами олигосахаридов (VIII) и (IX) мы использовали данные спектра недавно синтезированного трисахарида (XI) [9], содержащего интересующий нас остаток β - L -рамнопиранозы. Первоначально были определены положения резонанса ^{13}C остатков маннозы с использованием аналогичных сигналов в спектре дисахарида (IX) и 3-О-замещенной галактозы на основании данных спектра трисахарида (XI). Оставшаяся серия сигналов с единичной интегральной интенсивностью могла принадлежать только остатку β - L -рамнопиранозы (но не α -аномера), что следовало из сопоставления их с сигналами остатков рамнозы в спектрах соединений (VIII), (IX) и (XI). Особенно характерны в этом плане сигналы C1, C3 и C5, для которых различие в химических сдвигах для α - и β -аномеров L -рамнопиранозы составляет несколько м.д. Положения сигналов C2, C3 и C4 остатка галактозы также существенно зависели от конфигурации 1 \rightarrow 3-рамнозилгалактозной связи (ср. спектры β -рамнозидов (VII), (XI) и α -рамнозидов (VIII), (X)). Здесь отчетливо видно влияние конфигурации гликозидной связи на химические сдвиги атома



углерода, участвующего в образовании гликозидной связи, и двух соседних к нему атомов гликозилированного остатка. Аналогичное явление можно заметить при сравнении положений сигналов C3 и C4 остатка β -рамнозы в спектрах β -маннозидов (VII) и (IX) с положениями этих же сигналов в спектре α -маннозида (XI).

Таким образом, наличие β -рамнозидной связи в соединении (VII) и его структура в целом не подлежали сомнению. Дополнительное подтверждение этого вывода следовало из сопоставления экспериментальных величин молекулярного оптического вращения соединений (VII) и (VIII) с теоретическими, рассчитанными с использованием правила Кляйна [10]. Результаты этого сравнения приведены в табл. 2.

Таким образом, в ходе настоящей работы было показано, что при гликозилировании маннозилрамнозилбромидом (I) галактозного производного (II) в условиях Гельфериха наряду с продуктом 1,2-*транс*-гликозилирования образуется небольшое количество изомера с 1,2-*цис*-гликозидной связью, что в принципе согласуется с современными представлениями о механизме реакции Гельфериха [11].

Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на блоке Кофлера (ГДР), оптическое вращение — на поляриметре «Perkin-Elmer-141» (США). Анализ свободных моно- и олигосахаридов проводили на автоматическом анализаторе углеводов, тип 71 100 (ЧССР), на колонке (0,6×11 см) с аннионитом «Durrum DA-X4» в 0,7 М боратном буфере (pH 7,9) при 70°С (скорость 20 мл/ч). Спектры ^1H -ЯМР снимали на спектрометрах «Varian DA-60-1L» (США) и «Tesla BS-497» (ЧССР) относительно тетраметилсилана в шкале δ , спектры ^{13}C -ЯМР — на приборе «Bruker WP-60» (ФРГ) с рабочей частотой по углероду 15,08 МГц (растворы в $^2\text{H}_2\text{O}$, температура 30°С, внутренний эталон — CH_3OH , хим. сдвиг относительно тетраметилсилана

Химические сдвиги ^{13}C в спектрах олигосахаридов

Соединение	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
(IX) [7]	Man β	101,75	71,8	74,25	67,95	77,5	62,2
	Rha α	95,05	72,2	71,2	80,8	68,2	18,3
	β	94,5	71,8	74,0	80,4	72,8	18,3
(X) [8]	Rha α	103,7	71,7	71,7	73,6	70,4	18,0
	Gal α	93,9	70,6	78,45	70,0	71,7*	62,4
	β	98,0	72,85*	81,85	69,25	76,4	62,2
(VIII)	Man β	101,9	71,9	74,4	68,1	77,5	62,3
	Rha α	103,5	71,45	72,1	80,9	69,15	18,2
	Gal α	93,6	70,4	78,7	69,8	71,9	62,3
(VII)	β	97,6	72,5	82,0	68,9	76,4	62,2
	Man β	101,9	71,95	74,4	68,05	77,5	62,3
	Rha β	98,1	71,65	74,0	80,6	72,25	18,2
(XI) [9]	Gal α	93,4	68,25	77,4	67,5	71,5	62,2
	β	97,6	72,55	80,6	67,0	76,1	62,2
	Man α	102,7	71,5	71,5	67,8	74,4	62,0
	Rha β	98,1	71,5	72,7	82,45	72,4	18,1
	Gal α	93,3	68,1	78,2	67,5	71,5	62,3
	β	97,6	72,6	80,45	66,9	76,1	62,1

* Отнесение сигналов атомов C2 остатка Gal β и C5 остатка Gala в дисахариде (X) в данной работе обратное по сравнению с [8]. Исправление сделано на основании спектра трисахарида (VIII), в котором содержание β -галактозы в ~ 2 раза больше, чем α -аномера, в отличие от эквимолярного соотношения аномеров в дисахариде (X).

Таблица 2

Сравнение величин молекулярного оптического вращения трисахаридов (VII) и (VIII) со значениями, вычисленными по правилу Кляйна [10]

Соединение	$[\text{M}]_D$
β -Метил- <i>D</i> -маннопиранозид [12] + β -метил- <i>L</i> -рамнопиранозид [13] + <i>D</i> -галактоза [14]	+181°
Трисахарид (VII)	+195°
β -Метил- <i>D</i> -маннопиранозид [12] + α -метил- <i>L</i> -рамнопиранозид [13] + <i>D</i> -галактоза [14]	-100°
Трисахарид (VIII)	-83°

50,15 м.д. был определен в специальном эксперименте). Условия съемки: импульс 5,5 мкс (45° C), объем памяти 8/4 К, масштаб 100 Гц/см, частота повторения импульсов 1,1 с.

Растворы упаривали в вакууме при $\leq 40^\circ\text{C}$. Аналитическую ТСХ выполняли в системе ацетон – хлороформ, 15 : 85 (А), на пластинках с незакрепленным слоем силикагеля ЛС 5/40 мкм (ЧССР) + 6% гипса с обнаружением веществ 25% H_2SO_4 , препаративную ТСХ (ПТСХ) – на закрепленном слое того же силикагеля с обнаружением водой. Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле Л 100/250 мкм (ЧССР), БХ – на бумаге FN 11 (ГДР) в системе растворителей *n*-бутанол – пиридин – вода, 4 : 6 : 3 (Б) при обнаружении веществ водно-бутанольным раствором кислого фталата анилина.

Для определения моносахаридного состава образец олигосахаридов гидролизуют 2 н. HCl (2 ч, 100° C), упаривали и остаток анализировали на углеводном анализаторе.

Цианид ртути – препарат фирмы «Baker's Analyzed» (США).

1,2-*O*-Изопропилиден-3-*O*-[4-*O*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -*D*-маннопиранозил)-2,3-ди-*O*-ацетил- α -*L*-рамнопиранозил]-4,6-*O*-этилиден- α -*D*-галактоза

лактопираноза (III) синтезирована по методике [2] с использованием кристаллической 1,2-О-изопропилиден-4,6-О-этилиден- α -D-галактопиранозы (II) [4]. Выход 48%. При упаривании эфирного раствора продукт кристаллизовался. После перекристаллизации из спирта т. пл. 221–222° С; $[\alpha]_D^{20} -28^\circ$ (с 1,22; хлороформ); R_f 0,53 (А). Спектр $^1\text{H-NMR}$ (CCl_4): 1,10–1,50 (12H, C–CH₃); 1,85–2,20 (18H, CIP₃COO); 5,70 д (1H, H-1 галактозы, $J_{1,2}$ 3,5 Гц). Найдено, %: С 52,10; Н 6,34. $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_{21}$. Вычислено, %: С 52,11; Н 6,25.

1,2-О-Изопропилиден-3-О-[4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-маннопиранозил)-2,3-ди-О-ацетил- β -L-рамнопиранозил]-4,6-О-этилиден- α -D-галактопираноза (IV). а) К раствору 980 мг (4 ммоль) кристаллического производного (II) и 1,14 г (4,52 ммоль) $\text{Hg}(\text{CN})_2$ в 10 мл абс. CH_3CN прибавляли в течение 1 ч при 25° С и перемешивании раствор 2,9 г (4,52 ммоль) галогенозы (I) [4] и 0,1 мл 2,4,6-коллидина в 10 мл абс. CH_3CN . Перемешивали еще 1 ч, упаривали CH_3CN , остаток разбавляли CHCl_3 и осадок отделяли. Фильтрат промывали 1 н. КВг, водой, высушивали и упаривали. Из остатка методом колоночной хроматографии, элюируя градиентом эфира в бензоле (0→100% эфира), выделяли трисахарид (III). Маточник, оставшийся после его кристаллизации (т. пл. 221–222° С), повторно хроматографировали на колонке, смешанные фракции рехроматографировали методом ИТСХ. Выделили 1,43 г кристаллического трисахарида (III) и 620 мг его аморфной формы (общий выход 64%; R_f 0,54 (А)) и 180 мг (5,6%) изомерного трисахарида (IV) – аморфный, $[\alpha]_D^{20} -13^\circ$ (с 0,82; хлороформ); R_f 0,47 (А). Спектр $^1\text{H-NMR}$ (C^2HCl_3): 1,24–1,54 (12 H, C–CH₃); 1,94–2,24 (18H, CH₃COO); 5,83 д (1H, H-1 галактозы, $J_{1,2}$ 4 Гц). Найдено, %: С 52,22; Н 6,46. $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_{21}$. Вычислено, %: С 52,11; Н 6,25.

б) К раствору 740 мг (3 ммоль) кристаллического производного (II) и 850 мг (3,36 ммоль) $\text{Hg}(\text{CN})_2$ в 8 мл абс. CH_3CN добавляли в течение 50 мин при перемешивании раствор 2,17 г (3,39 ммоль) галогенозы (I) [2] в 8 мл. абс. CH_3CN и выдерживали 16 ч при 20° С. После обработки и разделения реакционной смеси (см. опыт а) получили 1,05 г кристаллов (т. пл. 221–222° С) и 450 мг аморфной формы трисахарида (III) (общий выход 62%) и 60 мг (2,5%) изомерного соединения (IV); $[\alpha]_D^{20} -13^\circ$ (с 1; хлороформ); R_f 0,47 (А).

Гидролитическая ортоэфирная проба [15]. По данным ТСХ, трисахарид (IV) был стабилен при обработке 10% ацетоновым раствором 0,1 н. H_2SO_4 (30 мин, 20° С).

3-О-[4-О-(β -D-Маннопиранозил)- β -L-рамнопиранозил]-D-галактоза (VII). Раствор 100 мг трисахарида (IV) в 2 мл As_2O обрабатывали 16 ч при 20° С 0,5 мл раствора 0,1 мл H_2SO_4 в 25 мл ледяной AsOH . Затем добавляли 1 мл воды и нагревали 30 мин при 85° С. После упаривания AsOH с толуолом остаток обрабатывали 4 ч при 20° С 2 мл As_2O , раствор разбавляли CHCl_3 , промывали ледяной водой, раствором NaHCO_3 , снова водой, обесцвечивали активированным углем и упаривали. Остаток (90 мг, основной компонент с R_f 0,50 (А) – по-видимому, ацетат (V)) обрабатывали 16 ч при 0° С 9 мл 0,005 н. MeONa в MeOH , деионизовали амберилом IR-120 (H^+) и упаривали. Остаток хроматографировали методом препаративной ВХ и рехроматографировали на колонке с анионитом «Dungam DA-X4» (0,8×50 см), элюируя 0,7 М боратным буфером при 55° С (скорость 60 мл/ч). Фракции, выходявшие через 110–160 мин после нанесения образца, деионизовали катионитом КУ-2 (H^+), упаривали и снова упаривали с метанолом. Получили 28 мг хроматографически однородного трисахарида (VII) в виде стекловидного порошка. Выход 47%; $[\alpha]_D^{20} +40^\circ$ (с 1,1; вода); $R_{\text{свн}}$ 0,64 (Б). При анализе на углеводном анализаторе трисахариды (VII) и (VIII) имели времена выхода 43 и 60 мин соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Торгов В. И., Чекучииков В. И., Шибаев В. И., Кочетков Н. К. Синтез трисахарида — повторяющегося звена О-специфических полисахаридов *Salmonella anatum* и *Salmonella newington* с радиоактивной меткой в остатке галактозы. — Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 3, с. 401—405.
2. Кочетков Н. К., Дмитриев В. А., Николаев А. В. Улучшенный синтез β-D-маннопиранозил-(1→4)-α-L-рамнопиранозил-(1→3)-D-галактозы — повторяющегося звена специфического полисахарида *Salmonella newington*. — Изв. АН СССР. Сер. хим., 1977, № 11, с. 2578—2581.
3. Кочетков Н. К., Дмитриев В. А., Николаев А. В., Байрамова Н. Э. Использование 1,2-изопропилиден-4,6-0-этилиден-α-D-галактопиранозы для синтеза олигосахаридов с 3-0-замещенным остатком галактопиранозы. — Изв. АН СССР. Сер. хим., 1977, № 7, с. 1609—1613.
4. Betanelli V. I., Ovchinnikov M. V., Backinowsky I. V., Kochetkov N. K. Practical synthesis of 0-β-D-mannopyranosyl-, 0-α-D-mannopyranosyl- and 0-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-0-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-D-galactoses. — Carbohydr. Res., 1980, v. 84, № 2, p. 211—224.
5. Lawson C. J., Rees D. A. Reinvestigation of the acetolysis products of λ-carrageenan, revision of the structure of α-1,3-galactotriose and a further example of the reverse specificities of glycoside hydrolysis and acetolysis. — J. Chem. Soc. (C), 1968, № 10, p. 1301—1304.
6. Дерезицкая В. А., Арбатский И. П., Кочетков Н. К. Использование анионообменной хроматографии для разделения сложных смесей олигосахаридов. — Докл. АН СССР, 1975, т. 223, № 5, с. 1137—1139.
7. Kochetkov N. K., Torgov V. I., Malysheva N. N., Shashkov A. S. Synthesis of the pentasaccharide repeating unit of the O-specific polysaccharide from *Salmonella strasbourg*. — Tetrahedron, 1980, v. 36, №8, p. 1099—1105.
8. Кочетков Н. К., Дмитриев В. А., Николаев А. В., Байрамова Н. Э., Шашков А. С. Синтез гексасахарида — глюкозного аналога димера повторяющегося звена специфического полисахарида *Salmonella newington*. — Биоорганическая химия, 1979, т. 5, № 1, с. 64—75.
9. Торгов В. И., Шибаев В. И., Шашков А. С., Кочетков Н. К. Синтез и спектры ¹³C-ЯМР ди- и трисахаридных фрагментов 0-антигенов *Salmonella* серогрупп А, В и D₁. — Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1860—1874.
10. Klyne W. The configuration of the anomeric carbon atoms in some cardiac glucosides. — Biochem. J., 1950, v. 47, № 4, p. xli-xlii.
11. Wallace J. E., Schroeder E. R. Mechanistic study of mercury(II) cyanide promoted reactions of 2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methyl-α-D-glucopyranosyl bromide with cyclohexanol in benzen-nitromethan. — J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1977, p. 795—802.
12. Илиця Э., Аллинжер Н., Энжиа С., Моррисон Г. Конформационный анализ. М.: Мир, 1969, с. 460.
13. Толленс В., Эльснер К. Краткий справочник по химии углеводов. Л.— М.: ГОНТИ, 1938, с. 185.
14. Толленс В., Эльснер К. Краткий справочник по химии углеводов. Л.— М.: ГОНТИ, 1938, с. 368.
15. Кочетков Н. К., Бочков А. Ф. Проба на ортоэфир. — В кн.: Методы химии углеводов. М.: Мир, 1975, с. 366.

Поступила в редакцию
17.XI.1980

SYNTHESIS OF ANTIGENIC BACTERIAL POLYSACCHARIDES AND THEIR FRAGMENTS. 14. FORMATION OF TRISACCHARIDE WITH β-L-RHAMNOPYRANOSIDIC LINKAGE UPON GLYCOSYLATION OF 4,6-O-ETHYLIDENE-1, 2-O-ISOPROPYLIDENE-α-D-GALACTOPYRANOSE BY HEXA-O-ACETYL-β-D-MANNOPIRANOSYL-(1→4)-α- L-RHAMNOPYRANOSYL BROMIDE

NIKOLAEV A. V., SHASHKOV A. S., DMITRIEV B. A., KOCHETKOV N. K.

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

Upon glycosylation of 4,6-O-ethylidene-1,2-O-isopropylidene-α-D-galactopyranose by hexa-O-acetyl-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl bromide in acetonitrile in the presence of Hg(CN)₂, 4,6-O-ethylidene-3-O-[4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-mannopyranosyl)-2,3-di-O-acetyl-β-L-rhamnopyranosyl]-1,2-O-isopropylidene-α-D-galactopyranose was isolated as a minor product in addition to the expected trisaccharide with α-L-rhamnopyranosidic linkage. ¹³C NMR spectra of isomeric 0-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-0-α- and β-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-D-galactoses were completely assigned and interpreted.