



УДК 547.458.7.02+582.273

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ 3,6-АНГИДРОГАЛАКТОЗЫ
В ВИДЕ N-ФЕНИЛОЗОТРИАЗОЛОВ

Усов А. И., Иванова Е. Г.

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

Получены и охарактеризованы N-фенилозотриазолы 4-O-β-D-галактопиранозил-3,6-ангидро-D-галактозы (каррабиозы), 4-O-β-D-галактопиранозил-3,6-ангидро-L-галактозы (агаробиозы) и 4-O-(6-O-метил-β-D-галактопиранозил)-3,6-ангидро-L-галактозы (6-O-метилагаробиозы); описаны условия их разделения при ТСХ и ГЖХ (в виде ТМС-производных), а также масс-спектры их полных ацетатов. Показано, что фенилозотриазолы удобны для идентификации олигосахаридов, содержащих на восстанавливаемом конце остаток 3,6-ангидрогалактозы, и могут найти применение в структурном анализе полисахаридов красных водорослей.

Оба оптических антипода 3,6-ангидрогалактозы входят в состав сульфатированных галактанов красных морских водорослей [1]; L-изомер найден в полисахаридах группы агара, а D-изомер — в полисахаридах группы каррагинана. Гликозидная связь остатков 3,6-ангидрогалактозы отличается повышенной чувствительностью к кислотам, в результате чего при разнообразных кислотных воздействиях из полисахаридов удается получить набор олигосахаридных фрагментов с 3,6-ангидрогалактозой на восстанавливаемом конце. Идентификация таких фрагментов является достаточно сложной задачей. Данная работа посвящена использованию для этой цели N-фенилозотриазолов. По аналогии с фенилозотриазолами других сахаров мы ожидали, что производные 3,6-ангидрогалактозы окажутся удобными для идентификации благодаря устойчивости и склонности к кристаллизации, что оптические свойства фенилозотриазолов позволят определять абсолютную конфигурацию остатка 3,6-ангидрогалактозы, а масс-спектры ацетилированных фенилозотриазолов удастся использовать для установления строения олигосахаридов (ср. [2]).

Исходными веществами для получения фенилозотриазолов послужили синтетический метил-3,6-ангидро-α-D-галактопиранозид [3] и диметилацеталы трех дисахаридов, 4-O-β-D-галактопиранозил-3,6-ангидро-D-галактозы (каррабиозы), 4-O-β-D-галактопиранозил-3,6-ангидро-L-галактозы (агаробиозы) и 4-O-(6-O-метил-β-D-галактопиранозил)-3,6-ангидро-L-галактозы (6-O-метилагаробиозы), выделенные из продуктов частичного метанолиза полисахаридов красных морских водорослей. Исходным веществом для получения диметилацетала каррабиозы был κ-полисахарид из *Tichocarpus crinitus* [4], для диметилацетала агаробиозы — полисахарид из *Rhodomela larix* [5], а для диметилацетала 6-O-метилагаробиозы — полисахарид из *Odonthalia corymbifera* [6]. Эти производные 3,6-ангидрогалактозы были переведены в фенилозозоны по обычным методикам, включаю-

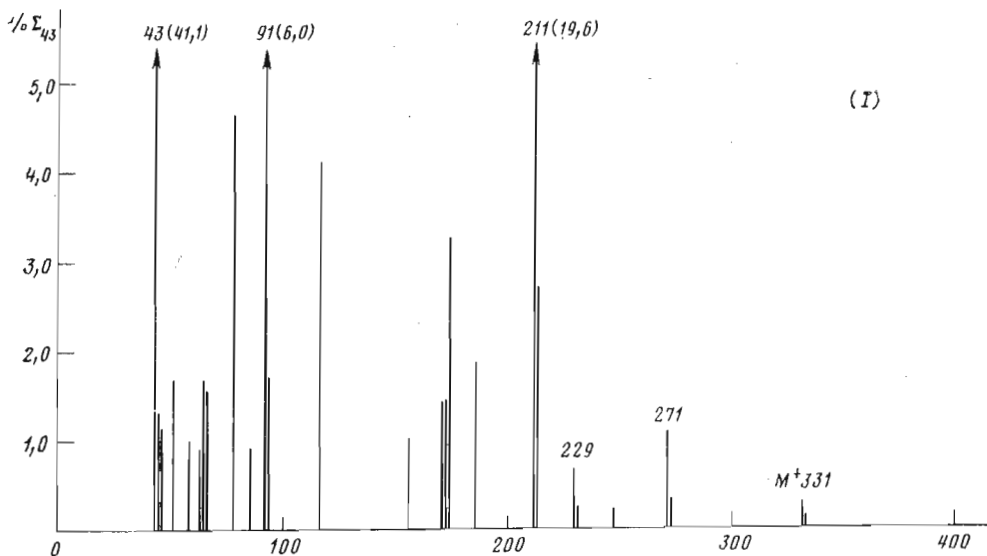
Характеристика фенилозазонов, фенилзотриазолов и их ацетатов, полученных из 3,6-ангидро-*D*-галактозы и трех дисахаридов

Родоначальный углевод	Фенилозазон	Фенилзотриазол	Ацетат фенилзотриазола
3,6-Ангидро- <i>D</i> -галактоза	Т. пл. 214–215° С, [α] _D ²⁰ +73,5° → +62,7° (24 ч, с 0,31, MeOH). Лит. [7]: т. пл. 215° С, [α] _D ²⁰ +71° (с 0,35, MeOH)	Т. пл. 100–101° С, [α] _D ²² –5,6° (с 0,18, пиридин). Лит. [10]: т. пл. 101–102° С, [α] _D ¹⁷ –6,0° (с 0,8, пиридин)	[α] _D ²⁰ +16,7° (с 0,2, MeOH)
Каррабиоза	Т. пл. 211–212° С, [α] _D ²⁰ +62,3 → +42,6° (48 ч, с 0,35, пиридин – MeOH, 2 : 3). Лит. [8]: т. пл. 214– 215° С, [α] _D ¹⁰ +68,2° → +45,0° (48 ч, с 0,6, пиридин – EtOH, 2 : 3)	Т. пл. 154–156° С, [α] _D ²⁰ +8,0° (с 0,5, MeOH)	[α] _D ²¹ +1,8° (с 0,44, MeOH)
Агаробиоза	Т. пл. 217–218° С, [α] _D ²⁰ –126,1° → –103,5° (48 ч, с 0,44, пиридин – MeOH, 2 : 3). Лит. [9]: т. пл. 220– 221° С, [α] _D –136,8° → –108,8° (24 ч, с 0,43; пиридин – MeOH, 2 : 3)	[α] _D ²² –35,8° (с 0,19, MeOH)	[α] _D ²¹ –32,3° (с 0,62, MeOH)
6-О-Метил-агаробиоза	Т. пл. 212–214° С, [α] _D ²⁵ –46,7° (с 0,18, пиридин – MeOH, 2 : 3)	[α] _D ²⁴ –34,7° (с 0,36, MeOH)	[α] _D ²² –20,0° (с 0,35, MeOH)

щим в себя мягкий кислотный гидролиз и обработку фенилгидразином [7–9]; константы известных соединений удовлетворительно совпали с литературными данными (табл. 1). Удобным методом контроля индивидуальности и чистоты полученных фенилозазонов оказалась ТСХ на пластинках «Silufol» с закрепленным слоем силикагеля. Вещества давали четкие желтые зоны, причем даже такие близкие по структуре соединения, как фенилозазоны каррабиозы и агаробиозы, различались по хроматографической подвижности (табл. 2).

Далее фенилозазоны обрабатывали в стандартных условиях сульфатом меди [10] и полученные фенилзотриазолы очищали хроматографией на силикагеле. Процесс разделения контролировали также с помощью ТСХ на пластинках «Silufol» (табл. 2). Зоны веществ на пластинках, а также наличие триазолов во фракциях обнаруживали по яркой флуоресценции в УФ-свете.

Из полученных фенилзотриазолов обычными методами были приготовлены ацетаты и триметилсилил (ТМС)-производные. При исследовании этих веществ методом ГЯХ было установлено, что ацетаты триазолов дисахаридов обладают низкой летучестью и менее удобны для хроматографирования, чем ТМС-производные, для которых найдены условия, позволяющие четко разделить и идентифицировать все полученные соединения (табл. 2).



Масс-спектры ацетилпровапных N-фенилозотриазолов 3,6-ангидро-D-галактозы (I), агаробиозы (III) и 6-O-метилагаробиозы (IV)

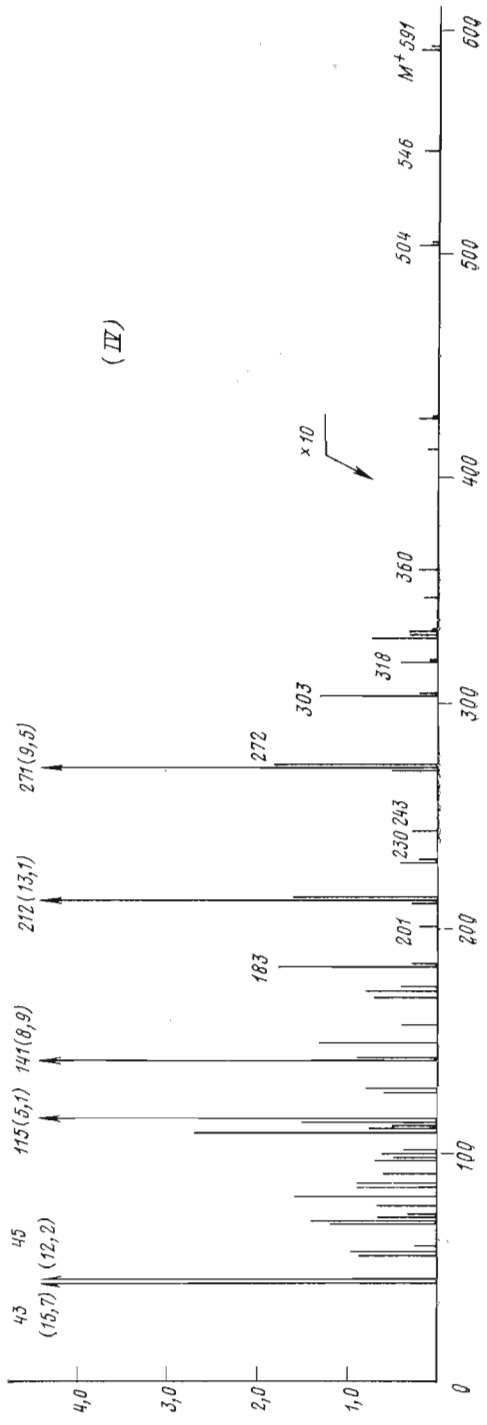
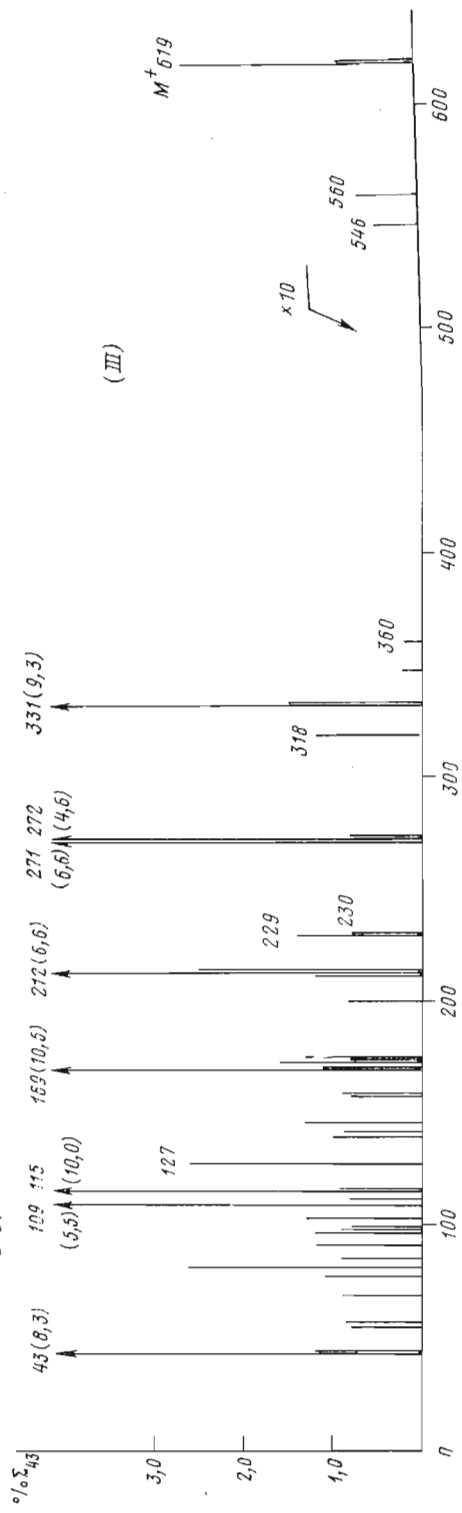
Как известно [11, 12], фенилозотриазолы сахаров обладают весьма характерной дисперсией оптического вращения (ДОВ). Это можно использовать в стереохимических исследованиях, хотя получение полных кривых может быть затруднено из-за сильного поглощения этих веществ в районе 275 нм. Мы ограничились измерением оптического вращения полученных триазолов и их ацетатов при четырех длинах волн вдали от области эффекта Коттона (табл. 3). Различия в величинах удельного вращения для производных 3,6-ангидро-D-галактозы и каррабиозы, с одной стороны, и агаробиозы и 6-O-метилагаробиозы — с другой, на наш взгляд, достаточно велики для надежного отнесения остатка 3,6-ангидрогалактозы к D- или L-ряду.

Характерные особенности масс-спектров ацетилированных фенилозотриазолов пентоз, гексоз, некоторых их производных и ряда олигосахаридов были подробно изучены ранее [2]. Что касается производных 3,6-ангидросахаров, то недавно был описан масс-спектр ацетата фенилозотриазола 3,6-ангидро-D-галактогептулозы-2 [13]. Имеющиеся в литературе

Таблица 2

Хроматографические свойства веществ (подвижности относительно соответствующих производных D-галактозы)

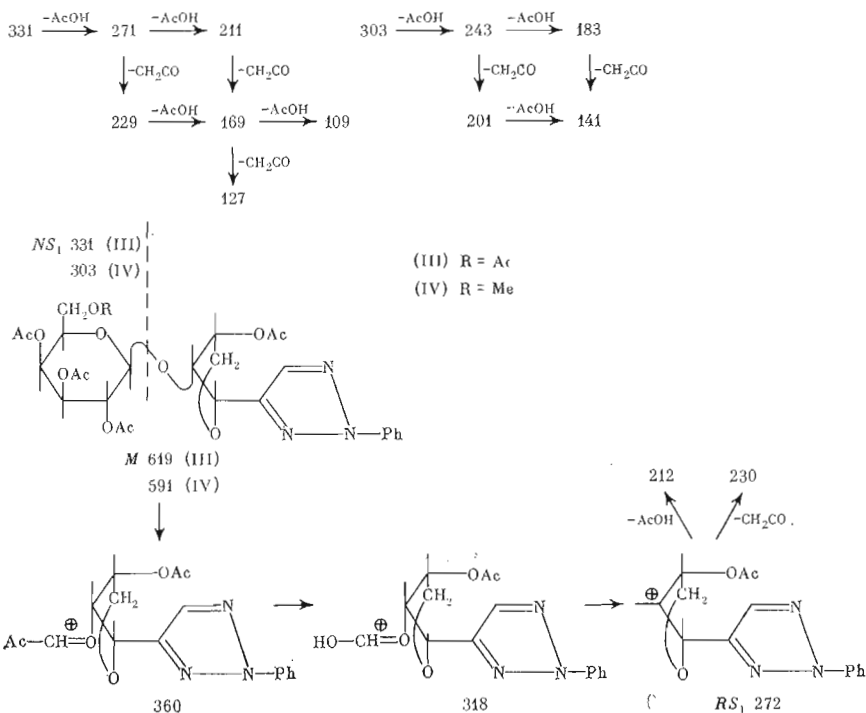
Родоначальный углевод	Фенилозазоны, ТСХ, система А	Фенилозотриазолы, ТСХ, система А	Ацетаты фенилозотриазолов, ТСХ, система Б	ТМС-производные фенилозотриазолов, ГЖХ	
				колонка а	колонка б
3,6-Ангидро-D-галактоза	1,20	1,50	1,16	0,85	1,17
D-Галактоза	1,00 (R_f 0,48)	1,00 (R_f 0,41)	1,00 (R_f 0,54)	1,00 (T 2,53 мин)	1,00 (T 1,75 мин)
Каррабиоза	0,64	0,52	0,61	5,70	8,71
Агаробиоза	0,45	0,36	0,48	6,10	9,85
6-O-Метилагаробиоза	0,60	0,80	0,42	6,10	11,90



Удельное вращение (град) фенилозотриазолов и их ацетатов (c 0,5)

Родоначальный углевод	Фенилозотриазолы в MeOH при λ , нм				Ацетаты фенилозотриазолов в CHCl ₃ при λ , нм			
	589	578	546	436	589	578	546	436
3,6-Ангидро- <i>D</i> -галактоза	+6,2	+6,3	+6,6	+2,0	+4,4	+7,8	+9,3	+10,3
Каррабиоза	+8,0	+8,6	+10,0	+4,8	-5,4	-5,9	-6,4	-13,2
Агаробиоза	-35,8	-36,8	-40,0	-65,2	-32,0	-35,0	-38,8	-68,9
6-О-Метилагаробиоза	-34,7	-35,0	-38,9	-74,4	-27,8	-27,2	-32,8	-57,8

сведения позволяют объяснить происхождение большинства основных пиков в масс-спектрах ацетилированных триазолов, исследованных в данной работе. Интересно, что введение 3,6-ангидроцикла приводит к существенному упрощению масс-спектра производного моносахарида. Так, в спектре ацетата фенилозотриазола 3,6-ангидро-*D*-галактозы (I) (рисунки) в области высоких масс наблюдаются лишь пик молекулярного иона с m/z 331 и пики ионов с m/z 271, 229 и 211, образующихся из молекулярного иона при отщеплении молекулы уксусной кислоты и далее кетена или второй молекулы уксусной кислоты.



Происхождение главных пиков в масс-спектрах ацетилированных фенилозотриазолов агаробиозы (III) и 6-О-метилагааробиозы (IV)

Масс-спектры ацетилированных триазолов каррабиозы (II) и агаробиозы (III) практически совпадают. В области высоких масс наблюдается достаточно интенсивный пик молекулярного иона с m/z 619 и пики фрагментов с m/z 560 и 546, образующихся из молекулярного иона за счет отщепления $AcO\cdot$ и $AcOCH_2\cdot$ (рисунок, схема). В масс-спектре ацетата

триазола 6-О-метилагаробиозы (IV) также имеется пик молекулярного иона с m/z 591 и пики фрагментов, образующихся за счет отщепления от молекулярного иона MeOCH_2^+ (m/z 546) и далее кетена (m/z 504). Структура невозстанавливающего концевой моносахаридного остатка в производных дисахаридов вытекает из пиков ионов NS_1 (обозначения ионов см. в работе [2]) с m/z 331 в случае (II) и (III) и 303 в случае (IV). Эти ионы являются родоначальниками соответствующих серий фрагментов (схема, ср. [2]). Строение модифицированного восстанавливающего конца производного дисахарида следует из наличия пика общего для производных (II)–(IV) фрагмента RS_1 (m/z 272) и пиков фрагментов, связанных с его образованием и дальнейшим распадом (схема). Как и в случае фенилозотриазола (I), наличие 3,6-ангидроцикла в производных (II)–(IV) препятствует осуществлению других путей фрагментации, отмеченных для ацетилированных фенилозотриазолов обычных дисахаридов [2].

Таким образом, получение фенилозотриазолов можно с успехом применять для идентификации олигосахаридов, содержащих на восстанавливаемом конце остаток 3,6-ангидрогалактозы. Оптические свойства триазолов позволяют определять абсолютную конфигурацию этого остатка, а масс-спектры их ацетилированных производных — устанавливать молекулярную массу олигосахаридов и природу входящих в их состав моносахаридов. Хроматографические свойства фенилозотриазолов дают возможность уверенно разделять смесь каррабиозы и агаробиозы. Хотя до настоящего времени не обнаружены индивидуальные полисахариды, при расщеплении которых получались бы оба эти дисахарида, задача разделения и определения каррабиозы и агаробиозы может возникнуть при анализе промышленных образцов агара, каррагинана и их аналогов, часто получаемых из смеси нескольких видов красных морских водорослей.

Экспериментальная часть

ТСХ выполняли на пластинках «Silufol UV₂₅₁» (ЧССР) в системах растворителей: хлороформ — этанол, 4 : 1 (система А), и хлороформ — ацетон, 19 : 1 (система Б). Зоны фенилозотриазолов и их ацетатов обнаруживали по флуоресценции в УФ-свете. ГЖХ проводили на хроматографе «Рхе 104» (Англия) с пламенно-ионизационным детектором (колонки с 3% SE-30 (колонка а) и с 30% OV-17 (колонка б) на диатомите С при 280°С, скорость N₂ 50 мл/мин). Масс-спектры снимали на масс-спектрометре «Varian MAT CN-6» (США) с прямым вводом образцов в ионный источник при 140–250°С. Оптическое вращение определяли на поляриметре «Perkin-Elmer 141» (США).

Диметилацетаты дисахаридов получали как описано в работах [4–6], очищали препаративной БХ на бумаге «Filtrak FN-18» (ГДР) в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3), гидролизовали, нагревая с 0,02 н. щавелевой кислотой 2 ч при 100°С, и переводили в фенилозаны, нагревая 2 ч при 90°С с солянокислым фенилгидразином и ацетатом натрия в токе азота (ср. [7]); выходы 30–50%. Фенилозаны переводили в триазолы кипячением в 1% водном растворе CuSO_4 в течение 2 ч [10]; выходы 50%. Фенилозозон 3,6-ангидро-*D*-галактозы получали по методу [7], фенилозотриазол *D*-галактозы — по методу [14]. ТМС-производные триазолов получали обработкой триметилхлорсиланом и гексаметилдисилазаном в пиридине [15], ацетаты триазолов — действием уксусного ангидрида в пиридине. Фенилозотриазолы и их ацетаты очищали хроматографией на колонках с силикагелем в системах А и Б соответственно. Константы и хроматографические свойства полученных соединений см. в табл. 1–3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Усов А. И. Сульфатированные полисахариды красных морских водорослей.— Успехи биол. химии, 1979, т. 20, с. 169–191.
2. Chizhov O. S., Kochetkov N. K., Malysheva N. N., Shiyonok A. I., Chashchin V. L. Oligosaccharide sequencing by means of mass spectrometry. I. N-Phenylosotriazole acetates.— Org. Mass Spectrometry, 1974, v. 5, № 10, p. 1145–1155.
3. Haworth W. N., Jackson J., Smith F. The properties of 3,6-anhydrogalactose.— J. Chem. Soc., 1940, № 5, p. 620–632.
4. Усов А. И., Рехтер М. А., Кочетков Н. К. Полисахариды водорослей. VI. Изучение κ -полисахарида из *Tichocarpus crinitus* (Gmel.) Rupr.— Ж. общ. химии, 1970, т. 40, № 12, с. 2732–2737.
5. Усов А. И., Иванови Е. Г. Полисахариды водорослей. XIX. Частичный метаноллиз сульфатированных полисахаридов красной водоросли *Rhodomela larix* (Turn.) C. Ag.— Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 5, с. 665–671.
6. Усов А. И., Козлова Е. Г. Полисахариды водорослей. XX. Изучение одонталана — сульфатированного полисахарида из красной водоросли *Odonthalia corymbifera* (Gmel.) J. Ag.— Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 7, с. 912–918.
7. Percival E. G. V. Studies on sugar osazones. Part VII. A comparison of the phenylosazones prepared from 3,6-anhydro-D-glucose and 3,6-anhydro-D-galactose with the anhydro-osazones prepared from D-galactosazone and D-glucosazone by the method of Diels and Meyer.— J. Chem. Soc., 1945, № 11, p. 783–786.
8. Hirase S., Araki C. The synthesis of carrabiose.— Bull. Chem. Soc. Japan, 1967, v. 40, № 11, p. 2627–2629.
9. Araki C., Hirase S. Studies on chemical constitution of agar-agar. XVII. Isolation of crystalline agarobiose dimethylacetal by partial methanolysis of agar-agar.— Bull. Chem. Soc. Japan, 1954, v. 27, № 2, p. 109–112.
10. Bayne S. The structure of Fischer's «anhydrolactosazone» and other anhydro-osazones.— J. Chem. Soc., 1952, № 12, p. 4993–4996.
11. Chilton W. S., Krahn R. C. Rotatory dispersion of sugar heterocycles.— J. Amer. Chem. Soc., 1967, v. 89, № 16, p. 4129–4132.
12. Lyle G. G., Piazza M. J. Rotatory dispersion studies. VI. Phenylosotriazole derivatives of the aldo sugar family.— J. Org. Chem., 1968, v. 33, № 6, p. 2478–2484.
13. Sallam M. A. E. Studies on anhydro-osazones. Structure and anomeric configuration of the 3,6-anhydro-osazone derivatives obtained from D-galacto-2-heptulose phenylosazone.— Carbohydr. Res., 1980, v. 85, № 1, p. 93–105.
14. Haskins W. T., Hann R. M., Hudson C. S. The action of copper sulfate on the phenyl osazones of the sugars. II. Some new osotriazoles.— J. Amer. Chem. Soc., 1945, v. 67, № 6, p. 939–941.
15. Sweeley C. C., Bentley R., Makita M., Wells W. W. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances.— J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 16, p. 2497–2507.

Поступила в редакцию
2.IV.1981

IDENTIFICATION OF 3,6-ANHYDROGALACTOSE DERIVATIVES AS N-PHENYLOSOTRIAZOLES

USOV A. I., IVANOVA E. G.

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

N-Phenylosotriazoles of 3,6-anhydro-4-O- β -D-galactopyranosyl-D-galactose (carrabiose), 3,6-anhydro-4-O- β -D-galactopyranosyl-L-galactose (agarobiose) and 3,6-anhydro-4-O-(6-O-methyl- β -D-galactopyranosyl)-L-galactose (6-O-methylagarobiose) were obtained and characterized by optical rotation, chromatographic behaviour on TLC or GLC (as TMS-ethers) and mass-spectra of their peracetates. N-Phenylosotriazoles were shown to be convenient derivatives for identification of oligosaccharides bearing the 3,6-anhydrogalactose residue on the reducing end, which may be useful in the structural analysis of the red algal polysaccharides.