



УДК 547.455.623'233.1'29.07

СИНТЕЗ 2,3-ДИАЦЕТАМИДО-2,3-ДИДЕЗОКСИ-
D-ГЛЮКУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ — НОВОГО КОМПОНЕНТА
БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Дмитриев В. А., Кочарова Н. А., Кочетков Н. К.

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

Описан синтез нового сахара — 2,3-диацетамидо-2,3-дидезокси-D-глюкуроновой кислоты, идентифицированной ранее в составе полисахарида *Pseudomonas aeruginosa* серотипа 0:6. Показано, что в условиях гидролиза 4 н. HCl кислота дает равновесную смесь 2,3-диамино-2,3-дидезокси-D-глюкуроновой кислоты и ее 3,6-лактама в соотношении 1:2. Строение всех полученных соединений изучено с помощью ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. Предложен метод обнаружения данной кислоты в гидролизате полисахарида.

Структурные исследования липополисахаридов *Pseudomonas aeruginosa* в значительной степени осложняются необычным составом их полисахаридных цепей, содержащих большое количество различных аминосахаров. Некоторые из них до сих пор не идентифицированы, так как их не удается обнаружить в гидролизатах полисахаридов. Недавно мы завершили установление строения специфического полисахарида из *P. aeruginosa* 0:6 [4], в состав которого наряду с N-ацетил-D-галактозаминном, N-ацетил-D-фукозаминном и N-ацетил-D-хинозозаминном входил новый, ранее не обнаруженный в природе моносахарид — 2,3-диацетамидо-2,3-дидезокси-D-глюкуроновая кислота (VI). В гидролизате полисахарида, исследованном с помощью ионообменной хроматографии на аммонийкислотном анализаторе, новый сахар обнаружен не был, а были идентифицированы только гексозамины. Идентификацию диацетамидоуроновой кислоты (VI) удалось осуществить в процессе установления строения дисахарида, полученного из полисахарида сольволизом жидким HF и содержащего в своем составе этот сахар [4].

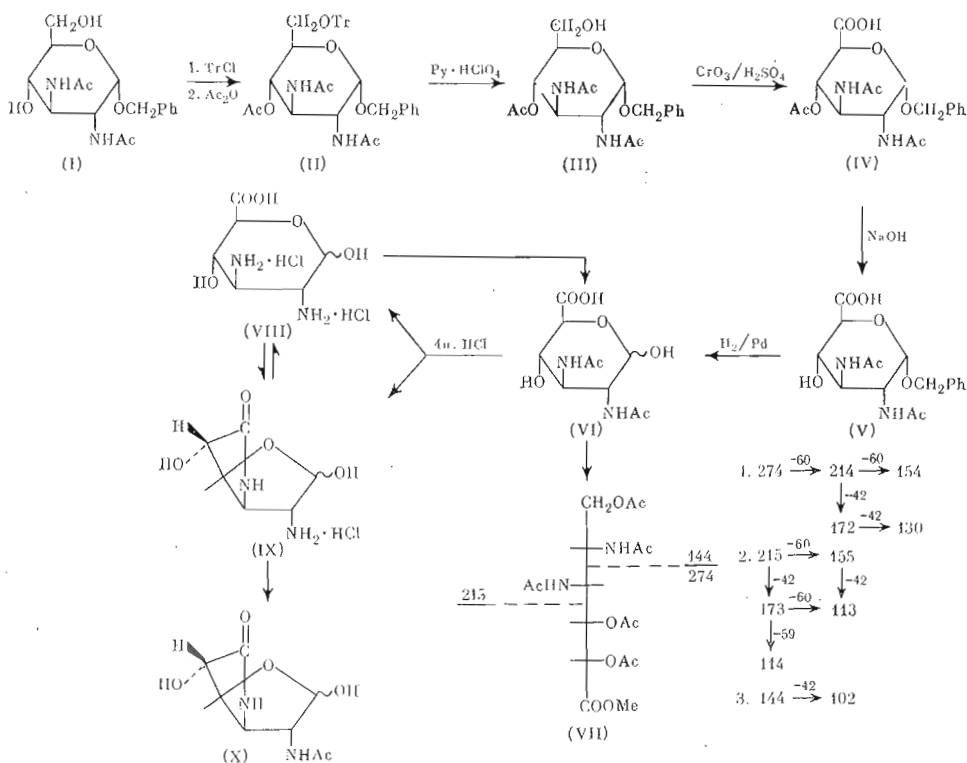
В связи с тем что диаминоуроновые кислоты присутствуют и в других специфических полисахаридах *P. aeruginosa* [2], встал вопрос о необходимости синтеза этих соединений и изучения их поведения в условиях кислотного гидролиза, применяемого для определения моносахаридного состава полисахаридов. Настоящая работа посвящена синтезу нового сахара (VI), изучению его химических свойств и физико-химических характеристик.

Исходным соединением в синтезе кислоты (VI) послужил известный бензил-2,3-диацетамидо-2,3-дидезокси- α -D-глюкопиранозид (I), получение которого с высоким выходом подробно описано [3, 4]. Поскольку ключевой стадией являлось окисление первичноспиртовой группы, диаминосахар (I) предстояло превратить в производное с защищенным гидроксилом при C4. Для этой цели диаминосахар (I) подвергли тритилированию с последующим ацетилированием и получили полностью защищенный гликозид (II) с общим выходом 95%. Попытка осуществить детритилирование гликозида (II) с помощью гидролиза 80% уксусной кислотой привела к смеси продуктов, что иногда происходит вследствие миграции ацетильной группы или O-ацетилирования. Поэтому снятие тритильной защиты проводили по специально разработанному в нашей лаборатории методу [5], включающему действие перхлората пиридиния в нитрометане в присутствии метанола, и с выходом 90% получили соединение (III) со сво-

Данные спектров ¹H-ЯМР синтезированных соединений

Соединение	1-Н	2-Н	3-Н	4-Н	5-Н	6-Н	6-Н'	СН ₂ Ph	СН ₃
(I)	4,91 д J _{1,2} 3,7 5,02	3,97 дд J _{2,3} 11,5 4,26	4,15 дд J _{3,4} 10,0 4,41	3,55 м	3,73-3,83 м	3,73-3,83 м	3,73-3,83 м	4,57 д J ₁₂ 4,79	1,90с, 1,98с
(II)	4,94 д J _{1,2} 3,6 4,94	4,19 дд J _{2,3} 11,8 4,19	4,45 дд J _{3,4} 10,4 4,45	5,06 дд J _{4,5} 10,4 5,04	3,99 дд J _{5,6} 2,0 3,83	3,23 дд J _{5,6} 4,5 3,50-3,75 м	3,05 дд J _{6,6'} 10,4 3,50-3,75 м	4,79 д J ₁₂ 4,73	1,73с, 1,89с, 1,95с 1,91(6H)с, 2,06(3H)с
(III)	4,97 д J _{1,2} 3,4 4,97	4,14 дд J _{2,3} 11,4 4,14	4,41 дд J _{3,4} 10,2 4,41	5,06 дд J _{4,5} 10,2 5,06	4,33 д	4,33 д	4,33 д	4,56 д J ₁₂ 4,82	1,90с, 1,91с, 2,04с
(IV)	4,89 д J _{1,2} 3,5 5,25	4,04 дд J _{2,3} 11,5 4,03	4,20 дд J _{3,4} 9,9 4,19	3,68 дд J _{4,5} 9,9 3,70	4,21 д	4,21 д	4,21 д	4,56 д J ₁₂ 4,79	1,89с, 1,95с
(V)	4,88 д J _{1,2} 3,4 4,88	3,77 дд J _{2,3} 11,5 3,77	4,01 дд J _{3,4} 9,6 4,01	3,70 дд J _{4,5} 9,6 3,70	4,41 д	4,41 д	4,41 д	4,56 д J ₁₂ 4,79	1,99с, 2,00с
(VIα)	5,48 д J _{1,2} 8,1 5,48	4,07 дд J _{2,3} 11,2 4,07	3,92 дд J _{3,4} 10,6 3,92	4,73 дд J _{4,5} 9,6 4,73	4,07 д	4,07 д	4,07 д	4,56 д J ₁₂ 4,79	1,99с, 2,00с
(VIβ)	4,88 д J _{1,2} 3,4 4,88	3,77 дд J _{2,3} 11,5 3,77	4,01 дд J _{3,4} 9,6 4,01	3,70 дд J _{4,5} 9,6 3,70	4,41 д	4,41 д	4,41 д	4,56 д J ₁₂ 4,79	1,99с, 2,00с
(Xα)	5,29 д J _{1,2} 4,8 5,29	4,05 дд J _{2,3} 2,0 3,96-4,05 м	4,05 дд J _{3,4} 4,9 3,96-4,05 м	4,78 дд J _{4,5} 6,0 4,78	4,29 д	4,29 д	4,29 д	4,56 д J ₁₂ 4,79	1,84с (или 1,89)
(Xβ)	4,88 д J _{1,2} <0,5	4,05 дд J _{2,3} 2,0 3,96-4,05 м	4,05 дд J _{3,4} 4,9 3,96-4,05 м	4,78 дд J _{4,5} 6,0 4,78	4,29 д	4,29 д	4,29 д	4,56 д J ₁₂ 4,79	1,89с (или 1,84)

* Приведены химические сдвиги в м.д., характер расщепления и константы спин-спинового взаимодействия в герцах. В спектрах соединений (I)-(V) присутствуют также сигналы протонизованного SnH_2 (δ 7,2-7,3 м.д., м), в спектрах (II) и (III) — протонов NH -группы (δ 6,18-6,97 м.д., д, $J \sim 9$ Гц). Спектры (I), (IV), (VI) и (X) сняты в растворе D_2O , (II) — в CDCl_3 , (V) — в CD_3OD и (III) — в смеси CDCl_3 - CD_3OD . с — синглет, д — дублет, м — мультиплет.



бодной первичноспиртовой группой. Окисление первичноспиртовой группы в соединении (III) до карбоксильной проводили при $\sim 20^\circ\text{C}$ под действием реактива Джонса [6] и после хроматографической очистки получили кислоту (IV) с выходом 65%. Омыление ацетильной группы в производном (IV) 10% раствором NaOH в спирте привело к гликозиду (V) с количественным выходом. Заключительной стадией синтеза был гидрогенолиз бензилгликозида (V) над Pd/C в спирте, который количественно привел к свободной кислоте (VI). Проведение гидрогенолиза соединения (V) в метиловом спирте сопровождалось частичной этерификацией карбоксильной группы. Кислота (VI) двигалась к аноду при электрофорезе на бумаге и обнаруживалась реагентами на восстанавливающие ацетамидосахара (щелочной раствор AgNO_3 , Cl_2 -бензидин).

Строение всех синтезированных соединений строго доказано данными элементного анализа и спектров ^1H -ЯМР (табл. 1) и ^{13}C -ЯМР (табл. 2).

Таблица 2

Химические сдвиги в спектрах ^{13}C -ЯМР соединений (I)–(VII), м. д.

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Растворитель
(I)	96,8	53,2 *	53,4 *	69,1	73,6	61,8	D_2O
(II)	96,2	52,8	51,2	69,1 *	69,6 *	62,0	CDCl_3
(III)	96,6	52,8	50,7	69,0	70,7	60,9	CDCl_3 – CD_3OD
(IV)	97,4	52,5	51,3	71,7 *	72,0 *		D_2O
(V)	97,6	53,4 *	53,5 *	71,4	73,5		CD_3OD
(VI) α	91,4	52,5 *	52,7 *	70,5	71,9		D_2O
(VI) β	96,0	55,5 *	55,8 *	70,3	76,7		
(X) α	97,9	59,9	61,7	76,6	70,8		
(X) β	103,4	62,1	61,1	79,0	71,2		D_2O

* Отнесение может быть обратным. Химические сдвиги CH_2CON 23,0–23,3 м. д., CH_3CON , CH_3COO и COOH 170–176 м. д., CH_2COO 20,4–21,3 м. д. В спектрах соединений (I)–(V) присутствуют сигналы углеродных атомов бензильной группы (CH_2 при 70–71 м. д., C_6H_5 128–130 и 137–138 м. д.), в спектре соединения (II) сигналы тритильной группы (C при 36,5 м. д., C_6H_5 при 127–129 и 143,8 м. д.).

Спектральным данным уделено особое внимание, поскольку они позволили определить не только строение, но и стереохимию соединений, которая в принципе могла быть нарушена при введении в молекулу COOH-группы за счет изомеризации по C5. Сохранение *глико*-конфигурации в кислоте (VI) однозначно следует из данных спектров ПМР, в которых для всех соединений независимо от претерпеваемых превращений сохраняются высокие значения константы спин-спинового взаимодействия (9–12 Гц), характерные для *транс*-аксальных атомов 2-Н, 3-Н, 4-Н и 5-Н пиранозного цикла.

Анализ первого порядка и последующая полная интерпретация спектров ^{13}C -ЯМР соединений (I)–(VI) однозначно указывали на наличие функциональных группировок ($\text{AcN}<$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{AcO}-$, PhCH_2- , $-\text{Tr}>$, CHNHAc , $>\text{CHOH}$, $-\text{COOH}$) в полном соответствии со структурой. Кроме того, проводимые химические превращения позволили осуществить отнесение в спектрах всех сигналов. Так, например, ацетилирование гидроксильной группы при C4 вызвало за счет β -эффекта [7] смещение в сильное поле сигналов атома C3, несущего ацетамидную группу, и C5, образующего пиранозное кольцо. Далее, образование производного урановой кислоты (IV) сопровождалось исчезновением в спектре сигнала первичноспиртовой группы, а также характерным для этого превращения сдвигом сигнала C4 на 2,7 м. д. в слабое поле [8].

Из спектральных данных, приведенных в табл. 1 и 2, следовало также, что новый сахар (VI) существует в растворе в виде равновесной смеси α - и β -аномеров. Для идентификации малых количеств кислоты (VI) нами предложен вариант ГЖХ и масс-спектрометрии, обычно применяемый в химии полисахаридов при определении моносахаридного состава в виде ацетилированных полиолов. Для этой цели сахар (VI) восстанавливали NaBH_4 и после обработки диазومتаном и Ac_2O в пиридине получили метиловый эфир 2,3,6-три-*O*-ацетил-4,5-диацетамидо-4,5-дидезокси-*L*-гулоновой кислоты* (VII), который был однороден по данным ГЖХ и давал характерный масс-спектр, доказывающий его строение. Фрагментация соединения (VII) под электронным ударом протекала по двум направлениям и приводила к трем первичным ионам, показанным на схеме, причем главный разрыв проходил между атомами C2–C3, несущими ацетамидные группы. Образовавшиеся первичные фрагменты подвергались последовательному отщеплению молекул уксусной кислоты (–60), кетена (–42) и ацетамида (–59), образуя характерные серии ионов. В области высоких масс присутствовали малоинтенсивные пики, соответствующие ионам с m/z 419 [$M+1$] $^+$ и 345 (фрагмент C2–C6). Таким образом, из данных масс-спектра следовало, что производное (VII) является *O,N*-ацетилированным метиловым эфиром диаминогексоновой кислоты, что доказывает строение сахара (VI).

Как уже упоминалось выше, в гидролизате специфического полисахарида *P. aeruginosa* 0:6 диаминоглюкуроновая кислота обнаружена не была. В связи с этим мы изучили поведение кислоты (VI) в условиях гидролиза 4 н. HCl (3 ч, 100°C). Гидролизат исследовали с помощью электрофореза, БХ, аминокислотного анализатора, ГЖХ, масс-спектрометрии и спектроскопии ^1H -ЯМР и ^{13}C . При хроматографии и электрофорезе (буфер, pH 4,5) на бумаге в гидролизате были обнаружены два нингидрин-положительных соединения, одно из которых, (VIII), обладающее меньшей подвижностью, окрашивалось в желто-коричневый цвет, а второе, (IX), – в голубой. Подвижность соединений (VIII) и (IX) при электрофорезе зависела от pH буфера; так, в щелочном буфере с pH 7,5 соединение (VIII) двигалось к аноду, т. е. вело себя как кислота, а сахар (IX) находился на старте, т. е. проявлял свойства амина. Оба соединения

* При восстановлении NaBH_4 абсолютная конфигурация атомов C2–C5 не меняется, но в соответствии с правилами номенклатуры углеводов отсчет заместителей и определение относительной конфигурации в случае альдозовых кислот проводится от атома C карбоксильной группы, а в случае урановых кислот – от полуацетальной. Поэтому *D*-*глико*(VI)-*L*-*гуло*(VII) и на схеме в целях удобства формула (VII) изображена в *глико*-конфигурации.

оказались неустойчивыми и быстро желтели на бумаге при попытке их разделения с помощью препаративного электрофореза. В чистом виде они были выделены с помощью ионообменной хроматографии на катионите Dowex 50×8 (H⁺-форма). При градиентной элюции растворами HCl от 0,5 до 2 н. вначале элюировался сахар (IX), а затем (VIII). Из этих данных следовало, что соединение (VIII) представляет собой диаминсахар, а соединение (IX) — моноаминосахар и они образовывались в соотношении 1:2. При повторном гидролизе каждого компонента в отдельности образовывалась первоначальная смесь (VIII) и (IX) в соотношении 1:2. На основании приведенных данных можно было предположить, что мы имеем дело с равновесной смесью диаминоуроновой кислоты (VIII) и ее лактама (IX). Это предположение было подтверждено данными ИК-спектров: так, в спектре кислоты (VIII) присутствовала полоса валентных колебаний карбоксильной группы (1725 см⁻¹), а в спектре (IX) — полоса валентных колебаний C=O-группы γ -лактам (1710 см⁻¹). Попытка изучить соединения (VIII) и (IX) методом спектроскопии ¹³C-ЯМР окончилась неудачно, так как они оказались лабильными и претерпели деструкцию в условиях съемки спектров, поэтому их строение было доказано следующим образом. Кислота (VIII) после N-ацетилирования превратилась в кислоту (VI), идентичную заведомому образцу по данным БХ и электрофореза. Кроме того, кислота (VIII) была идентифицирована в виде метилового эфира ацетата полиола методом ГЛХ и масс-спектрометрии. При этом масс-спектр полностью совпал со спектром метилового эфира полного O,N-ацетата 4,5-диацетамидо-4,5-дидезоксигулоновой кислоты (VII), полученного из заведомого соединения (VI). Лактам (IX) после N-ацетилирования дал устойчивый кристаллический продукт (X), в масс-спектре полного ацетата которого, как и ожидалось, присутствовал пик молекулярного иона и иона [M-1]⁺, а также вторичные фрагменты, образующиеся в результате отрыва аммиака, ацетоксила, кетена, уксусной кислоты и муравьиной кислоты. Из данных спектра ¹³C-ЯМР производного (X) следовало, что его полуацетальный цикл является пятичленным (табл. 2). Действительно, в аномерной области спектра (X) имелись два сигнала атомов C1 свободных α - и β -фуранозных форм при 97,9 и 103,4 м. д. На присутствие фуранозного цикла в производном (X) указывало также слабopольное положение сигналов атомов C2 и C3, связанных с азотом (область 60–62 м. д.), тогда как в производных пираноз эти атомы резонируют в значительно более сильном поле (50–56 м. д.). Дальше ПМР-спектра (X) также согласовывались с предложенной структурой. Более того, небольшая константа $J_{2,3}$ 2 Гц для α -аномера указывала на искажение цикла, вызванное образованием бициклического γ -лактам, так как известно, что величина $J_{2,3}$ в моноциклических α -фуранозных производных с экваториальными заместителями при C2 и C3 составляет ~6 Гц [9].

После того как было установлено строение соединений (VIII) и (IX), являющихся продуктами гидролиза кислоты (VI), мы предприняли попытку их обнаружения в гидролизате специфического полисахарида *P. aeruginosa* 0:6. Предварительно была проведена ионообменная хроматография соединений (VIII) и (IX) на аминокислотном анализаторе. При этом оказалось, что кислота (VIII) не обнаруживается, что объясняется низкой экстинкцией хромофора (желтое окрашивание при реакции с нингидрином) при рабочей длине волны прибора, а лактам (IX) по времени элюирования полностью совпадает с фукозамипом и, следовательно, маскируется этим аminosахаром. При БХ кислота (VIII) вследствие малой подвижности попадает в трудноидентифицируемую зону олигосахаридов, которые всегда присутствуют в гидролизатах гексозаминогликанов, а лактам (IX) совпадает по подвижности с алашином. Алашин является структурным компонентом ко́ра липополисахаридов *P. aeruginosa* и всегда присутствует в гидролизатах. Для того чтобы добиться обнаружения того или иного производного кислоты (VI) в гидролизате специфического полисахарида *P. aeruginosa* 0:6, мы применили двумерную технику — электрофорез-хроматографию. Этот подход оказался успешным и позволил обна-

ружить при проявлении нингидрином все аминсахарные компоненты гидролизата: три гексозамина (фиолетовая окраска), лактам (IX) (яркая голубая) и кислоту (VIII) (желтая).

Таким образом, нами было получено прямое доказательство присутствия 2,3-диацетамидо-2,3-дидезокси-D-глюкуроновой кислоты в составе этого полисахарида.

Экспериментальная часть

ИК-спектры сняты на приборе UR-10 в прессовке с KBr. Масс-спектры сняты на приборе «Varian CN-6». Спектры ПМР и ¹³C-ЯМР сняты на приборе «Bruker M-250». Химические сдвиги и условия съемки приведены в табл. 1 и 2. ГЖХ выполнена на приборе «Pye Unicam-104» на колонке (150×0,4 см) с 3%-ной OV-1 на диатомите CQ (100–120 меш).

БХ выполнена на бумаге FN-11 в системах: 1-бутанол – пиридин – H₂O, 6:4:3 (система А), этилацетат – пиридин – AcOH – H₂O, 5:5:1:3 (система Б), этилацетат – AcOH – HCOOH – H₂O, 18:3:1:4 (система В). Электрофорез на бумаге проведен в 0,025 М Ру-AcOH-буфере с рН 4,5 (буфер Г) при 28 В/см и в 0,05 М триэтиламмоний-бикарбонатном буфере с рН 7,5 (буфер Д) при 10 В/см. Двумерную электрофорез-хроматографию проводили в буфере Г и системе Б соответственно. Восстанавливающие сахара обнаруживали на бумаге щелочным AgNO₃, аминсахара – нингидрином и ацетамидопроизводные – бензидином после обработки хлором [10]. Аналитическая ТСХ выполнена на пластинках с незакрепленным слоем силикагеля ЛС 5/40 мкм (ЧССР) при проявлении 25%-ной H₂SO₄. Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле Л 100/250 мкм (ЧССР).

Анализ гексозаминов проводили на колонке (27×0,9 см) со смолой «Chromex UA-8» на аминокислотном анализаторе BC-200 (Biocal). Колонку элюировали 0,35 М натрий-цитратным буфером с рН 5,28 со скоростью 80 мл/ч.

Растворы упаривали в вакууме при 40° С. Температуры плавления определяли на блоке Кофлера, оптическое вращение – на поляриметре «Perkin-Elmer», модель 141.

Бензил-2,3-диацетамидо-2,3-дидезокси-α-D-глюкопиранозид (I) синтезирован по методу [3], т. пл. 266–268° С, $[\alpha]_D^{20} +130^\circ$ (с 1, ДМСО); ср. [3].

Бензил - 2,3 - диацетамидо-4-О-ацетил-2,3-дидезокси-β-D-трифенилметил-α-D-глюкопиранозид (II). Раствор 1,05 г соединения (I) и 1,25 г трифенилхлорметана в 10 мл сухого пиридина выдерживали 28 ч при ~20° С. Раствор охлаждали, добавляли 8 мл Ac₂O и через 16 ч смесь выливали в ледяную воду, экстрагировали хлороформом (5×20 мл), экстракт промывали насыщ. раствором NaHCO₃, водой, высушивали и упаривали. Остаток перекристаллизовывали из спирта, получали 1,01 г производного (II). Маточный раствор упаривали и хроматографировали на колонке с силикагелем в системе хлороформ – метанол с возрастающей концентрацией метанола до 5%. Соответствующие фракции объединяли, упаривали, кристаллизовали из спирта, получали еще 0,8 г соединения (II). Общий выход 95%, т. пл. 144–146° С, $[\alpha]_D^{20} +107,2$ (с 1, метанол). Найдено, %: С 71,33; Н 6,19; N 4,43. C₃₃H₄₆N₂O₇. Вычислено, %: С 71,67; Н 6,34; N 4,39.

Бензил - 2,3 - диацетамидо-4-О-ацетил-2,3-дидезокси-α-D-глюкопиранозид (III). 1,03 г тритильного производного (II), 0,8 г перхлората пиридиния [5], 3 мл MeNO₂ и 12 мл метанола нагревали 1,5 ч при 60° С. По данным ТСХ, обнаружено образование единственного продукта с R_f 0,4 (метанол – хлороформ, 1:9), который отделяли от перхлората пиридиния колоночной хроматографией на силикагеле в системе хлороформ – метанол с возрастающей концентрацией метанола до 7%. Получили 0,61 г (95%) аморфного продукта (III), т. пл. 226–228° С, $[\alpha]_D^{20} +121,4$ (с 1, метанол). Найдено, %: С 57,59; Н 6,63; N 7,13. C₁₉H₂₆N₂O₇. Вычислено, %: С 57,85; Н 6,64; N 7,10.

Бензил - 2,3 - диацетамидо-4-О-ацетил-2,3-дидезокси- α -D-глюкопиранозидуроновая кислота (IV). К суспензии 0,4 г гликозида (III) в 12 мл ацетона прикапывали 1,25 мл реагента Джонса (1,03 г CrO_3 , 3 мл H_2O и 0,87 мл конц. H_2SO_4) и перемешивали 5 ч при 20° С, избыток окислителя разлагали добавлением спирта и нейтрализовали смесь насыщ. раствором NaHCO_3 . Выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат пропускали через колонку с КУ-2 (H^+), промывали катионит спиртом. Объединенный элюат упаривали и экстрагировали хлороформом. Нерастворимый материал отфильтровывали, фильтрат упаривали и полученный аморфный осадок (0,38 г) помещали на колошку с силикагелем. Хроматографию проводили в системе хлороформ — метанол с возрастающей концентрацией метанола до 30%. Нужное соединение выходило с колонки, начиная с 18—20% метанола в хлороформе. Соответствующие объединенные фракции упаривали, получали 0,26 г (64%) искомого (IV) с R_f 0,37 (хлороформ — метанол, 8 : 2). Вещество имело характерную желтую окраску на зеленом фоне при опрыскивании хроматограммы 0,05% раствором бромкрезолового зеленого в спирте (индикатор на вещества, содержащие карбоксильную группу). После перекристаллизации из воды кислота (IV) имела т. пл. 284—285° С (с разл.), $[\alpha]_D^{20} +132,2$ (с 1, метанол). Найдено, %: С 55,90; Н 6,06; N 7,04. $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_8$. Вычислено, %: С 55,87; Н 5,97; N 6,86.

Бензил - 2,3 - диацетамидо-2,3-дидезокси- α -D-глюкопиранозидуроновая кислота (V). 0,2 г кислоты (IV) обрабатывали 3 ч 4 мл 10% раствора NaOH в 90% спирте при 20° С, депонизовали катионитом КУ-2 (H^+) и упаривали. Получали 0,16 г (90%) хроматографически однородного соединения (V). После перекристаллизации из спирта: т. пл. 213—215° С (с разл.), $[\alpha]_D^{20} +100,1$ (с 1, метанол), R_f 0,31 (хлороформ — метанол, 85 : 15). Гидроксамовая проба отрицательная. Найдено, %: С 55,38; Н 6,08; N 7,77. $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$. Вычислено, %: С 55,73; Н 6,05; N 7,65.

2,3-Диацетамидо-2,3-дидезокси-D-глюкуроновая кислота (VI). Раствор 160 мг гликозида (V) в 10 мл спирта гидрировали 10 ч над 10%-ным Pd/C . Смесь фильтровали, вносили свежую порцию катализатора и гидрировали еще 10 ч, после чего катализатор отфильтровывали и промывали спиртом. Объединенные фильтраты упаривали досуха. Получали 120 мг (~100%) белого аморфного вещества. В процессе упаривания водного раствора кислоты (VI) образуется густой сироп, который при стоянии кристаллизуется. Кристаллы промывали два раза холодным спиртом и высушивали. Т. пл. 185—187° С (с разл.), $[\alpha]_D^{20} +1,2 \rightarrow -11,5$ (с 1, вода), R_f 0,2 (А), 0,29 (Б), 0,26 (В), $E_{\text{GICUA}} 0,73$ (буфер Г). Найдено, %: С 43,31; Н 5,71; N 10,02. $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_7$. Вычислено, %: С 43,48; Н 5,84; N 10,14.

Метилловый эфир 4,5-диацетамидо-2,3,6-три-О-ацетил-4,5-дидезокси-L-гулоновой кислоты (VII). 2 мг кислоты (VI) восстанавливали 3 ч NaBH_4 при ~20° С, обрабатывали катионитом КУ-2 (H^+), смолу отфильтровывали, фильтрат упаривали с метанолом. Остаток растворяли в 1 мл метанола и обрабатывали SiH_2N_2 до устойчивой желтой окраски. Через 20 мин раствор упаривали, сушили и ацетилировали Ac_2O в пиридине 16 ч при 20° С. Смесь упаривали и получали эфир (VII), однородный по данным ГЖХ. Данные масс-спектра, m/z (интенсивность, %): 71(67), 72(47), 83(90), 85(70), 102(57), 113(40), 114(56), 128(30), 130(100), 141(20), 142(17), 144(35), 149(26), 154(85), 155(25), 172(50), 173(45), 183(12), 186(10), 214(14), 215(17), 228(6), 246(10), 274(25), 285(0,3), 288(0,33), 299(0,15), 327(0,25), 345(0,1), 358(0,11), 387(0,02), 449(0,02).

Дихлоргидрат 2,3-диамино-2,3-дидезокси-D-глюкуроновой кислоты (VIII) и хлоргидрат 6,3-лактама 2,3-диамино-2,3-дидезокси-D-глюкуронофуранозы (IX). 97 мг кислоты (VI) гидролизвали 4 н. HCl (3 ч, 100° С), гидролизат упаривали, растворяли в 0,1 н. HCl (2 мл) и наносили на колонку (6×1,5 см) с дауэксом 50×8 (H^+), уравновешенным 0,5 н. HCl . Колонку промывали последовательно водой (30 мл), 0,5 н. HCl (150 мл), 1 н. HCl (100 мл) и 2 н. HCl (100 мл). Компонент (IX) (49 мг) содержался во фракциях с 0,5 н. HCl , R_f 0,17 (А), 0,2 (Б), $R_{\text{GAIN}} 0,85$ (Б), $E_{\text{GAIN}} 1$

(буфер Г). Компонент (VIII) (28 мг) элюировался 2 н. HCl, R_{GAIN} 0,43 (Б), E_{GAIN} 0,54 (буфер Г), E_{GAINA} 0,77 (буфер Д). При анализе на аминокислотном анализаторе компонент (IX) совпадает по времени удерживания с фукозамином, а компонент (VIII) не обнаруживается вообще.

3 - Амино - 2 - ацетамидо-2,3-дидезокси-D-глюкофурануроно-6,3-лактам (X). 45 мг хлоргидрата (IX) N-ацетилировали по методике [11] и получили 41 мг (90%) лактама (X), R_f 0,44 (А). Для приготовления аналитического образца продукт промывали дважды горячим метанолом, т.пл. 224–225°C (с разл.), $[\alpha]_D^{20} +11,5$ (с 1, вода). Найдено, %: С 44,56; Н 5,67. $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено, %: С 44,45; Н 5,59. Данные масс-спектра полного ацетата (X), m/z (интенсивность, %): 60(60), 72(40), 83(100), 85(65), 99(80), 101(70), 111(30), 127(25), 143(40), 169(25), 170(20), 180(18), 181(25), 199(8), 211(20), 212(12), 223(5), 240(17), 241(10), 257(5), 258(5), 282(12), 283(7), 299(8), 300(8).

Идентификация кислоты (VIII). 6 мг компонента (VIII) N-ацетилировали в водном метаноле с дауэксом 1×8 (CO_3^{2-}) [11]. Смола отфильтровывали, промывали водой, 10% уксусной кислотой элюировали с нее 2,3-диацетамидо-2,3-дидезокси-D-глюкуроновую кислоту, которая по подвижности при ВХ и электрофорезе совпадала с синтезированной кислотой (VI), и превращали в метиловый эфир (VII), идентичный по данным ГЖХ и масс-спектра с аналогичным производным, полученным из заводского соединения (VI).

Авторы благодарны А. С. Шашкову за съемку и интерпретацию ЯМР-спектров и Ю. А. Книрелю за участие в обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Knirel Yu. A., Kocharova N. A., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1981, v. 93, № 1, C12–C13.
2. Книрель Ю. А., Кочарова Н. А., Виноградов Е. В., Шашков А. С., Дмитриев Б. А. Тезисы I Братиславского симпозиума по углеводам. Братислава, 1981, с. 100–101.
3. Meyer zu Reckendorf W. Chem. Ber., 1969, v. 102, № 12, p. 4207–4208.
4. Baer H. H., Neilson T. J. Org. Chem., 1967, v. 32, № 4, p. 1068–1072.
5. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Байрамова Н. Э., Николаев А. В. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1978, с. 652–656.
6. Bowden K., Heilbron I. M., Jones E. R. H., Weedon B. C. L. J. Chem. Soc., 1946, p. 39.
7. Gagnaire D., Maucier D., Vincendon M. Org. Mag. Res., 1978, v. 11, p. 344–349.
8. Шашков А. С., Чушков О. С. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 4, с. 437–497.
9. Кат В. Л., Barascul J.-L., Imbach J.-L. Carbohydr. Res., 1979, v. 69, p. 135–142.
10. Хроматография на бумаге / Ред. Хайс И. М., Мацек К. М.: Изд-во иностр. лит., 1962, с. 721.
11. Roseman S., Ludowieg J. J. Amer. Chem. Soc., 1954, v. 76, p. 301–302.

Поступила в редакцию
22.II.1982

SYNTHESIS OF 2,3-DIACETAMIDO-2,3-DIDEOXY-D-GLUCURONIC ACID — A NOVEL CONSTITUENT OF THE BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

DMITRIEV B. A., KOCHAROVA N. A., KOCHETKOV N. K.

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

2,3-Diacetamido-2,3-dideoxy-D-glucuronic acid, a new sugar from *Pseudomonas aeruginosa* 0:6 lipopolysaccharide, was synthesized. In conditions of hydrolysis in 4N HCl adopted for depolymerization of hexosaminoglycans, the new diaminosugar is converted into an equilibrium mixture of 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucuronic acid and its 3,6-lactam in the ratio of 1:2. The ^{13}C and ^1H NMR spectra of all synthesized compounds were studied. A method is suggested for identification of the new sugar in the polysaccharide hydrolysate.