



УДК 547.455.623'233.1:543.422.23

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ^{13}C - И ^{31}P -ЯМР ФОСФАТОВ 2-АЦЕТАМИДО-2-ДЕЗОКСИ-*D*-ГЛЮКОЗЫ

*Горбач В. И., Исаков В. В., Кулеш Ю. Г.,
Лукьянов П. А., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С.*

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ
Академии наук СССР, Владивосток*

Синтезированы 1-, 3-, 4- и 6-фосфаты 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы. Для синтеза 4-фосфата предложен более простой метод по сравнению с описанным в литературе. Изучены спектры ^{13}C -ЯМР полученных соединений, определено влияние положения фосфатной группы на химические сдвиги сигналов углеродных атомов глюкозамина. Найдена зависимость химического сдвига сигнала фосфора в спектрах ^{31}P -ЯМР от положения фосфатной группы в молекуле глюкозамина и pH раствора.

Фосфаты 2-ацетиамидо-2-дезоксигексоз входят в состав многих биополимеров, таких, как полисахариды менингококков [1], липополисахариды грамотрицательных бактерий [2], тейхоевые кислоты [3] и т. д. Для структурных исследований подобных соединений в настоящее время широко применяется метод спектроскопии ЯМР. Работы по расшифровке спектров ^{13}C -ЯМР 1- и 4-фосфатов 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы [4, 5], полимеров, содержащих остатки ацетиамидогексоз, связанных 1→6- и 1→4-фосфодиэфирными связями [5], спектров ^{31}P -ЯМР липополисахарида и липида А из *Salmonella* [6, 7] показывают большие возмож-

Таблица 1

Химические сдвиги ^{13}C -ЯМР 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы и ее фосфорилированных производных

Соединение	Аномер	C1	C2	C3	C4	C5	C6	$\Delta\delta$ *
GlcNAc	α	92,1	55,3	72,0	71,4	72,8	61,9	
	β	96,2	58,0	75,0	71,2	77,2	62,0	
1-Фосфат GlcNAc	α	93,9	55,3	72,6	71,2	73,6	61,9	1,8
	β	96,7	57,7	75,3	71,2	77,4	62,3	0,5
3-Фосфат GlcNAc	α	91,8	54,6	76,1	70,9	72,5	61,8	4,1
	β	95,8	56,6	78,9	70,9	76,1	61,8	3,9
4-Фосфат GlcNAc	α	91,9	55,4	71,9	75,1	71,9	62,0	3,7
	β	96,3	57,8	74,1	74,3	76,8	62,0	3,1
6-Фосфат GlcNAc	α	92,1	55,4	71,6	70,8	71,5	64,6	2,7
	β	96,2	58,0	74,7	70,8	76,4	64,6	2,6

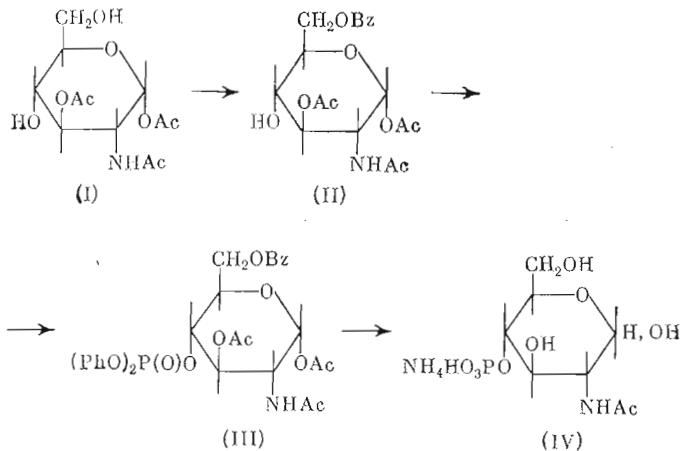
* Изменение химического сдвига α -атома углерода при фосфорилировании гидроксильной группы.

Химические сдвиги сигналов ^{31}P фосфатов 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы при различных значениях pH

Соединение		pH 3	pH 8	Соединение		pH 3	pH 8
1-Фосфат GlcNAc	α -аномер	1,50	-1,98	4-Фосфат GlcNAc	-0,25	-4,20	
	β -аномер	1,50	-2,29	6-Фосфат GlcNAc	-0,38	-4,75	
3-Фосфат GlcNAc		-0,55	-4,49	6-Фосфат 1,3,4-три- <i>O</i> -ацетат GlcNAc	0,0	-3,50	

ности этого метода при изучении фосфорсодержащих углеводов. Широкое применение метода ЯМР требует предварительного изучения спектров соответствующих моносахаридов. В данной работе нами проведены синтез и изучение спектров ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР фосфатов 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы.

Образцы 1-, 3- и 6-фосфатов 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы получены по известным методикам. Синтез 4-фосфата, описанный ранее [8], был нами модифицирован и осуществлялся по приводимой схеме.



Избирательно бензонлировали 2-ацетиамидо-1,3-ди-*O*-ацетил-2-дезоксид- α -*D*-глюкопиранозу (I). Последующее фосфорилирование бензоата (II) дифенилхлорфосфатом в пиридине привело к 2-ацетиамидо-1,3-ди-*O*-ацетил-4-*O*-дифенилфосфорил-6-*O*-бензоил-2-дезоксид- α -*D*-глюкопиранозе (III). Гидрированием удаляли защитные группы фосфата и омылением ацильных остатков получали 4-фосфат 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы (IV) с выходом 8,5%, считая на исходное соединение (I). Структура и индивидуальность полученных соединений подтверждалась ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР-спектроскопией. В спектрах ^{13}C -ЯМР всех полученных фосфатов присутствовали сигналы двух аномерных форм. Данные спектров ^{13}C -ЯМР приведены в табл. 1.

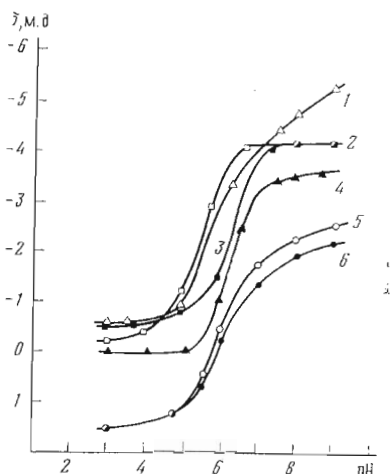
Спектры 1- и 4-фосфатов глюкозамина хорошо согласуются с приведенными в литературе [4, 5]. Отнесение сигналов в спектрах 3- и 6-фосфатов сделано с учетом влияния фосфатной группы на величину химического сдвига соседнего атома углерода, различного соотношения аномеров фосфатов в растворе и спин-спинового взаимодействия ^{13}C - ^{31}P . Из табл. 1 видно, что появление в молекуле фосфатной группы сдвигает сигнал α -атома углерода на 1–4 м.д. в слабое поле. Этот эффект для 3- и 4-фосфатов ($\Delta\delta$ 3–4 м.д.) выражен заметнее, чем для 6- ($\Delta\delta$ 2,6–2,7 м.д.)

и 1-фосфатов ($\Delta\delta$ 0,5–1,8 м.д.) Сигналы β -атомов углерода сдвигаются в сильное поле на 0,1–1,4 м.д.

Полученные данные могут быть полезны для определения положения фосфатных групп в соединениях, содержащих фосфорилированные ацетамидогексозы методом ^{13}C -ЯМР.

Все полученные соединения были изучены также методом спектроскопии ^{31}P -ЯМР. Сравнение спектров показало различие в химических сдвигах сигналов фосфора в зависимости от положения фосфатной группы в молекуле глюкозамина как для моноаниона (рН 3), так и для дианиона фосфата (рН 8). Данные спектров ^{31}P -ЯМР приведены в табл. 2. Зависимость величины химического сдвига ^{31}P от рН раствора является харак-

Зависимость химических сдвигов сигналов ^{31}P фосфатов 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы от рН: 1 – 6-фосфат; 2 – 4-фосфат; 3 – 3-фосфат; 4 – 6-фосфат 1,3,4-три-О-ацетата; 5 – β -аномер 1-фосфата; 6 – α -аномер 1-фосфата



терной особенностью моноэфиров фосфорной кислоты. Для сравнения полученных фосфатов в широкой области значений рН было проведено титрование образцов и построены диаграммы титрования (рисунок).

Как видно из рисунка, в области моноаниона (рН 3–5) наблюдается значительное различие в химических сдвигах сигнала ^{31}P для 1-фосфата по сравнению с 3-, 4- и 6-фосфатами 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы. При рН 7, 5–9 сигналы для 3- и 4-фосфатов близки, а сигналы 1- и 6-фосфатов имеют характеристичные значения (для 6-фосфата сигнал значительно уширен по сравнению с остальными соединениями и продолжает зависеть от рН). Для 1-фосфата в этой области происходит расщепление сигналов α - и β -аномеров, отнесение которых было сделано после снятия спектра чистого β -аномера 1-фосфата. В случае 1-фосфата *D*-глюкозы в щелочной области β -аномер дает сигнал в более сильном поле по сравнению с α -аномером [9]. Для 1-фосфата 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы, наоборот, сигнал β -аномера лежит в более слабом поле по сравнению с α -аномером, что, видимо, связано с влиянием соседней ацетамидной группы. Сильное влияние окружения фосфатной группы на величину химического сдвига ^{31}P подтверждается также при изучении спектров 6-фосфата 2-ацетамидо-1,3,4-три-О-ацетил-2-дезоксид-глюкозы, сигнал которого сдвинут на 1–2 м.д. в сильное поле по сравнению с *N*-ацетильным аналогом во всей изученной области рН. В области второй константы ионизации фосфатной группы (рН 5–7) спектры всех соединений характеристичны, причем диаграмма титрования для 3-фосфата значительно отличается от 4- и 6-фосфатов.

Таким образом, изучение спектров ^{31}P -ЯМР при различных значениях рН раствора и построение диаграмм титрования позволяет идентифицировать положение фосфатной группы в молекуле 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы.

Экспериментальная часть

Общий фосфор определяли по методу [10]. ИК-спектры снимали на спектрофотометре UR-20 (ГДР). Температуры плавления определяли на столике Бойетуса, удельное вращение — на поляриметре Perkin-Elmer 141 (США). Спектры ЯМР снимали на спектрометре НХ-90Е (Bruker, ФРГ) — рабочая частота 22,6 МГц для ^{13}C и 36,4 МГц для ^{31}P в D_2O — при 30°C с использованием тетраметилсилана и 85% H_3PO_4 в качестве внешних стандартов. Химические сдвиги сигнала фосфора даны в м.д. с положительным сдвигом к низким частотам. Все образцы фосфатов перед снятием спектров ЯМР переводились в натриевые соли пропусканием раствора вещества в воде через колонку с ионообменной смолой амберлит CG-120(Na^+). Анализ на натрий, выполненный на атомно-адсорбционном спектрофотометре Shimadzu AA-610 S (Япония) хорошо соответствовал динатриевой соли фосфатов. Растворы образцов титровали 0,4 н. NaOH и 0,4 н. HCl в микроячейке на рН-метре-милливольтметре рН 121. Величина рН определялась до и после снятия спектра ЯМР.

6-Фосфат 2-ацетиамидо-1,3,4-три-О-ацетил-2-дезоксид-β-D-глюкопирапозы (найдено Р 6,84%, вычислено Р 7,25%) и моноаммониевая соль 6-фосфата 2-ацетиамидо-2-дезоксид-D-глюкозы (т. пл. $142\text{--}142,5^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{24} +36,3^\circ$ (с 1,0; H_2O): найдено Р 8,68%, вычислено Р 9,74%) получены по методу [11]. Лит. т. пл. $146,5\text{--}147,5^\circ\text{C}$.

Динатриевая соль 1-фосфата 2-ацетиамидо-2-дезоксид-α,β-D-глюкозы ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} +17,3^\circ$ (с 0,5; H_2O)) получена по методу О'Брайна [12] и содержала ~75% β-аномера. После разделения по методу [13] была выделена чистая динатриевая соль 1-фосфата 2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-глюкозы; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -0,5^\circ$ (с 1,0; H_2O). Найдено Р 8,50%. Вычислено Р 8,98%. Лит. [12] $[\alpha]_{\text{D}} -4,7^\circ$ (H_2O).

Динатриевая соль 3-фосфата 2-ацетиамидо-2-дезоксид-D-глюкозы. К раствору 50 мг 3-фосфата 2-амино-2-дезоксид-D-глюкозы (получен по методу [14], т. пл. $152\text{--}154^\circ\text{C}$) в 0,2 мл воды добавляли раствор NaHCO_3 до рН 9, затем добавляли 0,05 мл уксусного ангидрида и смесь оставляли на 12 ч при 4°C . Раствор упаривали, остаток растворяли в воде, депонизировали с ионообменной смолой амберлит CG-120(H^+), переводили в натриевую соль, упаривали до 0,1 мл и осаждали добавлением 2 мл абс. этанола. Выход 30 мг (45,4%). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +12,9^\circ$ (с 0,3; H_2O) → $+26,8^\circ$ (равн.). ИК-спектр: 1652 см^{-1} (амид). Найдено Р 8,12%. Вычислено Р 8,98%.

2-Ацетиамидо-1,3-ди-О-ацетил-6-О-бензоил-2-дезоксид-α-D-глюкопираноза (II). К раствору 0,4 г (1,31 ммоль) 2-ацетиамидо-1,3-ди-О-ацетил-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозы (I) [15] в 4 мл сухого пиридина при 0°C добавляли 0,155 мл (1,34 ммоль) хлористого бензоила. Смесь выдерживали 12 ч при 4°C , разбавляли водой и через 30 мин упаривали досуха. Остаток растворяли в хлороформе, промывали раствором NaHCO_3 и водой, сушили Na_2SO_4 , упаривали. Сироп кристаллизовали из этанола — гексана. Получали 0,5 г (95%) соединения (II). Т. пл. $188\text{--}189^\circ\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +79,4^\circ$ (с 1,7; метанол).

2-Ацетиамидо-1,3-ди-О-ацетил-4-О-дифенилфосфорил-6-О-бензоил-2-дезоксид-α-D-глюкопираноза (III). К раствору 0,145 г соединения (II) в 1,5 мл сухого пиридина добавляли 0,076 мл дифенилхлорфосфата и смесь оставляли на 24 ч при 20°C , затем добавляли еще 0,152 мл реагента. Через 48 ч при 20°C смесь выливали в лед, экстрагировали хлороформом, экстракт промывали раствором NaHCO_3 , водой, сушили Na_2SO_4 , упаривали. Остаток хроматографировали на колонке (2,5×25 см) с силикагелем (Л 40/100 мкм, Сетарол, ЧССР), элюировали смесью хлороформ — метанол, 96 : 4. Получали 0,083 г (37,4%) соединения (III) в виде сиропа, кристаллизующегося при стоянии. Т. пл. $151\text{--}152,5^\circ\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +33,7^\circ$ (с 0,4; метанол).

Моноаммониевая соль 4-фосфата 2-ацетиамидо-2-дезоксид-D-глюкозы (IV).

Раствор 80 мг соединения (III) в 1 мл AcOH гидрировали над 8 мг PtO₂ (катализатор Адамса) 48 ч при 20°С. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток растворяли в 2 мл сухого метанола, насыщенного аммиаком при 0°С, оставляли на ночь при 4°С и затем на 2 ч при 20°С, быстро упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 2 мл сухого метанола, добавляли 2 мл сухого эфира и осадок отделяли центрифугированием. Осаждение повторяли 2 раза. Получали 9,5 мг (24%) соединения (IV). Т. пл. 141,5—142°С. $[\alpha]_D^{20} +18,2^\circ$ (с 0,2; H₂O) $\rightarrow +46,7^\circ$ (равн.). Найдено P 8,49%. Вычислено P 9,74%. Лит. [8] $[\alpha]_D +42^\circ$ (H₂O).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bundle D. R., Jennings H. J., Kenny C. P. (1973) *Carbohydr. Res.*, **26**, 268—270.
2. Nowotny A. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 501—509.
3. Coley J., Archibald A. R., Baddiley J. (1977) *FEBS Lett.*, **80**, 385—389.
4. Bundle D. R., Jennings H. J., Smith I. C. P. (1973) *Can. J. Chem.*, **51**, 3812—3819.
5. Bundle D. R., Smith I. C. P., Jennings H. J. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 2275—2281.
6. Rick P. D., Fung L. W.-M., Ho C., Osborn M. J. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 4904—4912.
7. Mühlradt P. F., Wray V., Lehmann V. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **81**, 193—203.
8. Bundle D. R., Jennings H. J. (1974) *Can. J. Biochem.*, **52**, 723—725.
9. Costello A. J., Glonek T., Slodkij M. E., Seymour F. R. (1975) *Carbohydr. Res.*, **42**, 23—37.
10. Chen P. S., Toribara T. V., Warner M. (1956) *Anal. Chem.*, **28**, 1756—1759.
11. Maley F., Lardy H. A. (1956) *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 1393—1397.
12. O'Brien P. J. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **86**, 628—634.
13. Шибяев В. Н., Русов Ю. Ю., Кучар Ш., Кочетков Н. К. (1973) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 430—434.
14. Lambert R., Zilliken F. (1963) *Chem. Ber.*, **96**, 2350—2355.
15. Hasegawa A., Fletcher H. G. (1973) *Carbohydr. Res.*, **29**, 209—222.

Поступила в редакцию
27.III.1979

После доработки
25.VI.1979

SYNTHESIS AND ¹³C AND ³¹P NMR STUDIES OF 2-ACETAMIDO-2-DEOXY-D-GLUCOSE PHOSPHATES

GORBACH V. I., ISAKOV V. V., KULESH Yu. G., LUKYANOV P. A.,
SOLOV'EV A. T. F., OVODOV Yu. S.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Scientific
Center of the Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

The synthesis of 1-, 3-, 4- and 6-phosphates of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose has been performed. For preparing the 4-phosphate, a method was proposed which is simpler than those described in literature. The ¹³C NMR spectra of the compounds obtained were recorded and the effect of the phosphate group position on the chemical shifts of the glucosamine carbon atoms was delineated. A dependence of the ³¹P chemical shift on the phosphate position in glucosamine and on the pH of the solution was found.