

BARBARA GRZESZCZYK

MONOFOSFORANY
L-GLICERO-D-MANNO-HEPTOPIRANOZY
SYNTEZY I MIGRACJE

A-21-6
K-C-132
K-C-130

Praca przedstawiona Radzie Naukowej
Instytutu Chemii Organicznej
Polskiej Akademii Nauk
celem uzyskania stopnia
doktora nauk chemicznych

Promotor:
Prof. dr hab. Aleksander Zamojski

Warszawa 1997

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.217/97



8000000090984



B Orig. 217/97

*Panu Profesorowi Aleksandrowi Zamojskiemu-
mojemu Promotorowi- składam serdeczne
podziękowania za wskazanie tematu, cenne rady i
wszechstronną opiekę w trakcie wykonywania pracy.*

*Panu doktorowi Otto Holstowi z Centrum
Badawczego w Borstel (RFN) bardzo dziękuję za
umożliwienie mi wykonania badań migracji.*

*Pani Profesor Annie Banaszek uprzejmie dziękuję za
życzliwe zainteresowanie moimi badaniami i cenne
wskazówki.*

*Wszystkim Koleżankom i Kolegom z zespołu XX
dziękuję za stworzenie milej atmosfery pracy.*

Część materiału przedstawionego w niniejszej pracy ukazała się (lub niebawem ukaze) w następujących publikacjach:

1. Grzeszczyk B., Zamojski A.: "Benzyl 7-O-allyl-2,3-O-isopropylidene-4-O-p-methoxybenzyl-L-glycero- α -D-manno-heptopyranoside, a versatile LD-manHepp derivative" *Carbohydr. Res.*, 262 (1994) 49-57.
2. Grzeszczyk B., Holst O., Zamojski A.: „The synthesis of five L-glycero-D-manno-heptose monophosphates” *Carbohydr. Res.*, 290 (1996) 1-15.
3. Grzeszczyk B., Holst O., Müller -Loennies S., Zamojski A: „Five monophosphates of methyl L-glycero- α -D-manno-heptopyranoside: synthesis, hydrolysis and migrations” *Carbohydr. Res.*, w druku.

Wykaz stosowanych w pracy skrótów:

All	allil
Bn	benzyl
Bz	benzoil
CAN	azotan amonowo-cerowy
DABCO	1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinon
DIBAL	wodorek diizobutyloglinowy
DMABDP	dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepan
DMAP	4-N,N-dimetyloaminopirydyna
GPC	chromatografia permeacyjna
MCPBA	kw. m-chloronadbenzoesowy
NMMO	N-tlenek-N-metylomorfoliny
PMB	p-metoksybenzyl
PPTS	p-toluenosulfonian pirydyny
Py	pirydyna
TBDMSiCl	tertbutylodimetylochlorosilan
TMSOTf	tryflan trimetylosililowy

SPIS TREŚCI

<i>I.</i>	WPROWADZENIE.....	1
<i>II.</i>	CZĘŚĆ LITERATUROWA	
	1. Heptozy w rdzeniu wewnętrznym lipopolisacharydów.....	5
	1.1. Jedna jednostka heptozy w rdzeniu wewnętrznym lipopolisacharydów.....	6
	1.2. Rdzeń wewnętrzny zawierający dwie jednostki heptozy.....	7
	1.2.1. Podstawienie fosforanami.....	11
	1.3. Rdzeń wewnętrzny zawierający trzy jednostki heptozy.....	12
	1.3.1. Podstawienie fosforanami.....	17
	1.4. Rdzeń wewnętrzny zawierający cztery jednostki heptozy.....	18
	1.5. Rdzeń wewnętrzny zawierający pięć jednostek heptozy.....	19
	2. Metody syntezy mannoheptopiranoz.....	23
	2.1. Metody syntezy L- <i>glicero</i> -D- <i>manno</i> -heptopiranozy.....	23
	2.2. Metody syntezy D- <i>glicero</i> -D- <i>manno</i> -heptopiranozy.....	33
	2.3. Synteza oligosacharydów heptozowych.....	37
<i>III.</i>	BADANIA WŁASNE	
	1. Synteza.....	50
	1.1. Synteza uniwersalnej pochodnej L- <i>glicero</i> -D- <i>manno</i> -heptopiranozy.....	50
	1.2. Synteza i charakterystyka monofosforanów L- <i>glicero</i> -D- <i>manno</i> -heptopiranozy	54
	1.3. Synteza i charakterystyka monofosforanów metylo L- <i>glicero</i> - α -D- <i>manno</i> - <i>heptopiranozydu</i> metylowego.....	62
	2. Migracje reszt fosforanowych.....	69
	2.1 Wprowadzenie.....	69
	2.2 Migracje reszt fosforanowych w układzie metylo L- <i>glicero</i> - α -D- <i>manno</i> - <i>heptopiranozydu</i>	73
<i>IV.</i>	PODSUMOWANIE.....	82
<i>V.</i>	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	84
<i>VI.</i>	LITERATURA.....	142

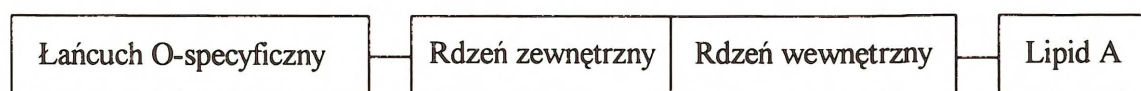
I. WPROWADZENIE

Bakterie Gram-ujemne już od wielu lat interesują badaczy z wielu dziedzin: medycyny, biologii i chemii. Spowodowane jest to głównie tym, że bakterie te powodują wiele groźnych chorób jak np. zakażenia przewodu pokarmowego, zakażenie jelit czyli czerwonkę bakteryjną (*Shigella*), zatrucia pokarmowe (*Salmonella*, *Escherichia coli*), zakażenia dróg moczowych, zakażenia dróg oddechowych, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (*Neisseria meningitidis*) i inne. Ponadto są odpowiedzialne za powstawanie ropni skórnych, oraz ropni narządów wewnętrznych, często wywołują wstrząs septyczny, gorączkę i leukocytozę.

Od ok. 100 lat wiadomo, że za biologiczną aktywność bakterii powodującą większość objawów klinicznych odpowiedzialne są endotoksyny, występujące w ścianie komórkowej tych bakterii¹. Bardzo dokładne, szczegółowe badania mikrobiologiczne pozwoliły ustalić, jaka część mikroorganizmu jest odpowiedzialna za wywołanie choroby.

Ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych składa się z błony plazmatycznej wewnętrznej zawierającej białka i fosfolipidy otaczającej cytoplazmę wraz z nukleoidem (DNA i rybosomami), cienkiej warstwy peptydoglikanu i zewnętrznej błony komórkowej zbudowanej z lipoprotein i lipopolisacharydów (LPS).

Lipopolisacharydy wszystkich bakterii Gram-ujemnych mają podobny schemat budowy². Głównymi składnikami LPS są cukry połączone wiązaniami glikozydowymi. Biorąc pod uwagę właściwości genetyczne, strukturę chemiczną i cechy biologiczne polisacharyd ten można podzielić na trzy części. Pierwsza, składająca się z powtarzających jednostek cukrowych stanowi tzw. łańcuch O-specyficzny. Druga, to heterooligosacharyd zawierający nie więcej niż 15 jednostek cukrowych, zwana częścią rdzeniową. Trzecia to lipid A.



Rys 1.

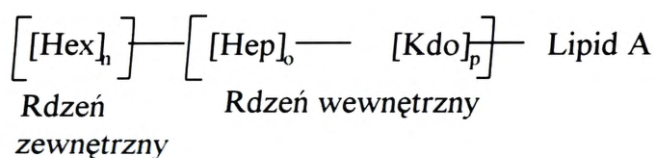
Budowa łańcucha O-specyficznego zmienia się w szerokim zakresie w zależności od rodzaju bakterii z jaką mamy do czynienia. Łańcuch ten zbudowany jest z kilku, kilkunastu lub nawet kilkudziesięciu jednostek oligosacharydowych i jest odpowiedzialny za O-antygenowe właściwości LPS. Wykazuje on ogromną strukturalną zmienność w różnych bakteriach. Ustalono

dotąd strukturę ok. 250 różnych jednostek powtarzających się³ składających się przeważnie z heksoz połączonych wiązaniami glikozydowymi. Największą z nich jest dekasacharyd⁴. Gatunki bakterii posiadające łańcuch O-specyficzny zostały nazwane gładkimi (S) [od ang. *smooth*] cechuje je duża patogenność. Mutant pozbawiony łańcucha O-specyficznego nazywany jest mutantem szorstkim (R) [ang. *rough*], jego patogenność jest zmniejszona. W lipopolisacharydach wielu nieenterobakteryjnych patogenów jak *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Bacteroides fragilis*, *Acinetobacter calcoateticus* i *Chlamydiaceae* O-specyficzny łańcuch jest nieobecny⁵. Oznacza to, że ta część lipopolisacharydu nie jest jedynym czynnikiem patogennym.

Oligosacharyd rdzeniowy z lipidem A są składnikami strukturalnymi, które są obecne we wszystkich bakteriach Gram-ujemnych zbadanych do tej pory. Jest to fragment lipopolisacharydu wykazujący ograniczoną zmienność międzybakteryjną^{6,7}.

Oligosacharyd rdzeniowy może być umownie podzielony na dwa regiony, a mianowicie rdzeń wewnętrzny i rdzeń zewnętrzny. Rdzeń zewnętrzny zawiera takie neutralne cukry jak D-galaktozę (Galp), D-glukozę (Glc), 2-acetamido-2-deoksy-D-glukozę (GlcNAc), 2-acetamido-2-deoksy-D-galaktozę (GalpNAc) i dlatego jest nazywany regionem heksozowym.

Rdzeń wewnętrzny składa się najczęściej z kilku heptoz, które są połączone wiązaniami glikozydowymi, i występują przeważnie w konfiguracji L-*glicero-α-D-manno* (LD-*manHepp*) oraz z oligosacharydu złożonego z kilku jednostek kwasu 2-keto-3-deoksy-D-manno-oktonowego (Kdo). Te dwa obszary rdzenia wewnętrznego są często nazywane regionem heptozowym i regionem Kdo.



Rys 2.

Rejon heptozowy jest połączony z rdzeniem zewnętrznym i z regionem Kdo, który jest z kolei połączony z lipidem A.

Lipid A składa się z dwóch jednostek 2-amino-2-deoksyglukopiranozy połączonych wiązaniem β (1-6) glikozydowym i podstawionych kwasami tłuszczowymi oraz grupami fosforanowymi⁸.

W ciągu ostatnich lat zbadano molekularną strukturę LPS różnych bakterii i porównano z ich aktywnością biologiczną a w szczególności, z ich właściwościami immunologicznymi. Włożono wiele wysiłku w poznanie budowy i składu chemicznego LPS. Stwierdzono, że za chorobotwórcze właściwości bakterii odpowiedzialny jest lipopolisacharyd⁹, natomiast za właściwości endotoksyczne odpowiedzialny jest jeden składnik: lipid A¹⁰. Podawanie jako szczepionek lipopolisacharydów pozbawionych lipidu A drogą chemiczną lub biologiczną prowadziło do otrzymania nietoksycznych szczepionek, lecz o małej skuteczności.

Badania nad otrzymaniem szczepionek skutecznych w leczeniu wielu chorób wywołanych przez spokrewnione szczepy bakterii zostały skierowane w kierunku części rdzeniowej LPS, która jest podobna u wielu bakterii, a nie ma właściwości toksycznych.

Znaczenie immunologiczne części rdzeniowej nie jest do tej pory dokładnie zbadane. Badania immunologiczne wskazują, że określniki odpowiedzialne za immunospecyficzność i krzyżową reaktywność są ulokowane w rejonie rdzenia wewnętrznego^{11,12}. Brade i Galanos¹³ obserwowali antygenową specyficzność w rdzeniu wewnętrznym LPS, która być może była związana z obecnością *L-glicero-D-mannoheptozy*. Stwierdzono¹⁴, że wydzielanie interleukin przez ludzkie monocyty może być indukowane przez disacharyd złożony z *L-glicero-D-mannoheptozy* i Kdo połączony wiązaniem α (1-5) glikozydowym, bardzo często występującym w regionie rdzenia wewnętrznego.

Lipopolisacharydy często zawierają ugrupowania fosforanowe. Liczba i pozycje tych ugrupowań w strukturach rdzeniowych nie są dobrze ustalone. Stwierdzono, że nie występują w części O-specyficznej, lecz lokują się w wewnętrznej części oligosacharydu rdzeniowego i w lipidzie A.

Najłatwiej można było określić pozycje grup fosforanowych w lipidzie A. Zbadano, że zawiera on dwie reszty fosforanowe. Jedna znajduje się przy węglu C-4' 2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozy, natomiast druga znajduje się w położeniu anomerycznym 2-amino-2-deoksy-D-glukozy "redukującej".

Najczęściej fosforany występują w rejonie heptozowym rdzenia wewnętrznego, dużo rzadziej są odnajdywane w Kdo. W tym rejonie heptozy są często podstawione nie tylko resztą kwasu fosforowego, ale również resztami kwasu pirofosforowego, β -aminoetylofosforowego lub β -aminoetylopirofosforowego. Grupy fosforanowe mogą znajdować się przy różnych grupach hydroksylowych *L-glicero-D-manno-heptozy*. Ścisłe stwierdzenie lokalizacji reszt fosforanowych

w tym oligosacharydzie nie jest łatwe. Zastosowanie tradycyjnych metod analizy lipopolisacharydów opartych o metylowanie, hydrolizę i widma NMR nie daje często jednoznacznych odpowiedzi na pytanie o miejsce podstawienia fosforanami. W warunkach reakcji hydrolizy grupa fosforanowa może migrować lub ulec odszczepieniu. W konsekwencji określenie pozycji reszt fosforanowych w natywnym oligosacharydzie nie jest na ogół jednoznaczne. Tego typu ustalenia strukturalne nie mogą uchodzić za wiarygodne. A trzeba podkreślić, że do tej pory brak jest badań dotyczących migracji grup fosforanowych w heptozach.

Rola biologiczna fosforanów jest nadal mało określona. Zsyntetyzowano wiele oligosacharydów rdzeniowych zawierających heptozy¹⁵, jednak żaden z nich nie był dobrym inhibitorem dla wzajemnego oddziaływania pomiędzy przeciwciałem i lipopolisacharydem z różnych mutantów bakterii. Jedną z przyczyn takiego zachowania mógł być brak fosforanów w syntetycznych oligosacharydach. Inną przyczyną mógł być z kolei rozmiar antygeny lub pewna heterogenność naturalnego materiału nieobecna w syntetycznych antygenach. Obecność fosforanów w naturalnych LPS ma istotne znaczenie w oddziaływaniu antygenowym¹⁶. Dążąc do otrzymania syntetycznych antygenów należy zsyntetyzować związki zbliżone budową do naturalnych, czyli zawierających fosforany.

II. CZĘŚĆ LITERATUROWA

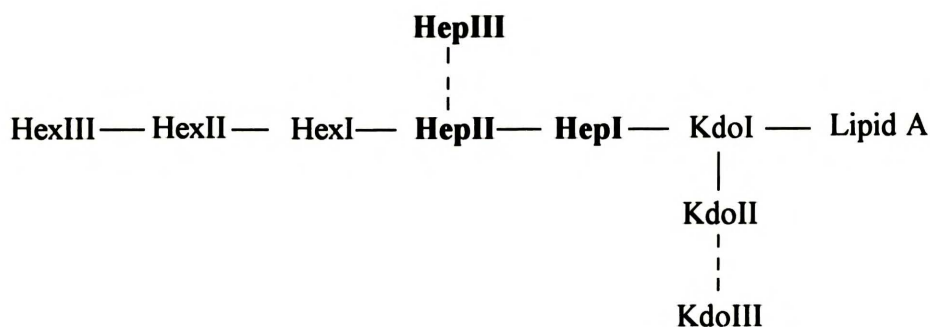
II. 1. Heptozy w rdzeniu wewnętrznym lipopolisacharydów.

Struktura rdzenia wewnętrznego od dawna wzbudzała duże zainteresowanie badaczy, ze względu na to, że jak wspomniano, ulega ona niewielkim zmianom w wielu różnych LPS.⁶ Prowadząc badania strukturalne odnajdywano początkowo pojedyncze jednostki cukrowe, potem sekwencje i pozycje podstawienia. Badania były przeważnie przeprowadzane za pomocą metylowania, utleniania nadjodanem, degradacji Schmidta lub badań enzymatycznych. Stosując te metody nie zawsze można było otrzymać jednoznaczne wyniki. Wiele pytań pozostawało bez odpowiedzi. Otrzymywano niepełne struktury lub struktury, w których miejsca podstawienia nie były dokładnie określone. Dopiero uzupełnienie badań nowoczesnymi technikami analitycznymi NMR pozwoliło na lepszą identyfikację jednostek cukrowych (COSY, TOCSY, NOESY)¹⁷ oraz pozycji podstawienia¹⁸

Do tej pory został zebrany obszerny materiał dotyczący badania części rdzeniowej lipopolisacharydów, jej struktury i funkcji^{6,7,19}. Stwierdzono, że istnieje wiele różnych typów rdzeni bakteryjnych. Heptozy występujące w lipopolisacharydach znajdują się przeważnie w rdzeniu wewnętrznym. Znacznie rzadziej można je odnaleźć w rdzeniu zewnętrznym.^{20,21,22} Na przykład w lipopolisacharydach bakterii *Aeromonas hydrophila* pasożytującej na człowieku stwierdzono obecność disacharydu złożonego z dwóch jednostek heptozy o konfiguracji D-*glicero-D-manno*, który znajdował się w rdzeniu zewnętrznym²⁰. Podobnie w rdzeniu zewnętrznym LPS bakterii *Proteus mirabilis* wykazano obecność heptozy o tej samej konfiguracji.²¹ Znane są tylko trzy przykłady, kiedy jednostki heptozowe występują w części O-specyficznej. W lipopolisacharydach bakterii *Pseudomonas cepacia* - LDmanHepp²³, i w dwóch szczepach 0:21 i 0:3 bakterii *Vibrio cholerae* - DDmanHepp^{24,25}. W niektórych rdzeniach heptozy są zastąpione przez D-mannozę²⁶, w innych są nieobecne²⁷. W części rdzeniowej lipopolisacharydów heptozy występują w konfiguracji L-*glicero-D-manno* i wyjątkowo, D-*glicero-D-manno*. W rdzeniu wewnętrznym może znajdować się od jednej do pięciu jednostek heptozy, które występują w formie piranozowej i są połączone między sobą wiązaniami glikozydowymi, przeważnie o konfiguracji α . Heptozy są podstawione, przeważnie D-glukopiranozą (D-Glcp), D-galaktopiranozą (D-Galp), 2-amino-2-deoksy-D-galaktozą, N-acetylo-D-galaktozaminą, 2-amino-2-deoksy-D-glukozą, N-acetylo-D-glukozaminą względnie

kwasem D-galakturonowym. Grupy hydroksylowe w heptozach mogą być także podstawione resztami kwasu fosforowego, β -aminoetylofosforowego lub β -aminoetylopirofosforowego.

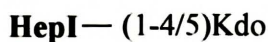
Aby ułatwić przegląd struktur regionu heptozowego ponumerowałam jednostki heksozy, heptozy i Kdo tak jak jest to pokazane na schemacie 1A.



Schemat 1A

II. 1. 1. Jedna jednostka heptozy w rdzeniu wewnętrznym lipopolisacharydów.

Początkowo sądzono, że nawet jedna jednostka *L-glicero-D-manno*-heptozy stanowi rdzeń bakteryjny, okazało się jednak w dokładniejszych badaniach, że jest to rdzeń niepełny. W rdzeniu wewnętrznym lipopolisacharydów wyizolowanych z bakterii *Pseudomonas aeruginosa* PAC 1R²⁸ odnaleziono jednak tylko jedną heptozę. Nie wiadomo, czy ma ona konfigurację *L-glicero-D-manno* czy *D-glicero-D-manno*. Heptoza ta jest połączona wiązaniem glikozydowym z grupą hydroksylową znajdującą się przy atomie węgla C-4 lub C-5 w Kdo. Kdo występuje tu w formie furanozowej (Rys 3).



Rys 3

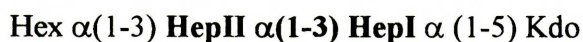
W mutantach PAC 556, 557 i PAC1R do grupy hydroksylowej znajdującej się przy atomie węgla C-7 jest dołączona D-glukopiranoza. Pozycja podstawienia rdzenia zewnętrznego nie została ustalona.

Podobnie w lipopolisacharydach bakterii *Vibrio cholerae* 05R²⁹ stwierdzono obecność tylko jednej heptozy połączonej z regionem Kdo wiązaniem 1-5 glikozydowym o konfiguracji α . Dokładna struktura regionu rdzeniowego niektórych lipopolisacharydów wyizolowanych z bakterii *Hafnia alvei*^{30,31} nie została do tej pory określona. Zidentyfikowano natomiast fragment nietypowego

rdzenia w którym L-*glicero-D-manno*-heptoza jest połączona z Kdo wiązaniem $\alpha(1-4)$ glikozydowym, a nie najczęściej spotykanym wiązaniem $\alpha(1-5)$.

II. 1. 2. Rdzeń wewnętrzny zawierający dwie jednostki heptozy.

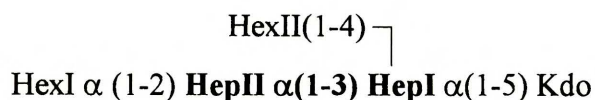
Jednym z bardziej rozpowszechnionych rdzeni bakteryjnych jest rdzeń zbudowany z dwóch jednostek L-*glicero-D-manno*-heptozy połączonych wiązaniem $\alpha(1-3)$ glikozydowym. Można odnaleźć kilka schematów, według których heptozy znajdujące się w rdzeniu wewnętrznym są połączone z heksozami. Disacharyd heptozowy jest w przeważającej liczbie przypadków połączony wiązaniem glikozydowym o konfiguracji α z grupą hydroksylową znajdującą się przy atomie węgla C-5 kwasu 2-keto-3-deoksyoktonowego. Najprostszym rdzeniem zawierającym dwie jednostki L-*glicero-D-manno*-heptozy połączone wiązaniem $\alpha(1-3)$ glikozydowym jest rdzeń (Rys.4), w którym do grupy hydroksylowej znajdujące się przy atomie węgla C-3' przyłączona jest jedna reszta heksozy. Heptoza I jest połączona z regionem Kdo wiązaniem $\alpha(1-5)$.



Rys. 4

Taki typ połączeń w rdzeniu wewnętrznym występuje w lipopolisacharydach wyizolowanych ze szczepu ATCC 49271 bakterii *Pseudomonas fluorescens*³², z serotypu 06 bakterii *Pseudomonas aeruginosa*³³ oraz z bakterii *Pseudomonas aeruginosa* AK 1401³⁴

W bardziej rozgałęzionym rdzeniu (Rys. 5) znajdują się dwa miejsca podstawienia resztami heksozowymi. Pozycja C-4 w heptozie I jest podstawiona heksozą (przeważnie jest to D-glukopiranoza połączona wiązaniem glikozydowym o konfiguracji β). Grupa hydroksylowa znajdujące się przy atomie węgla C-2' w heptozie II jest również połączona z heksozą.

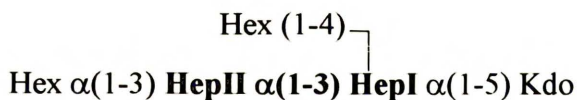


Rys 5.

Taki schemat połączeń jest dość rozpowszechniony i występuje w bakteriach *Neisseria meningitidis* chemotypy L-1, L-3, L-4, L-6, L-7^{35,36,37,38,39,40} *Neisseria meningitidis* 608 B serotyp L3, L9, L7, L4⁴¹, *Neisseria meningitidis* B szczep 6275⁴² *Neisseria gonorrhoeae* szczep MS 11mk⁴³, *Campylobacter jejuni* serotyp 0:23 i 0:36⁴⁴.

W lipopolisacharydach wyizolowanych z bakterii *Neisseria* do grupy hydroksylowej znajdującej się przy atomie węgla C-2' wiązaniem glikozydowym o konfiguracji α jest przyłączona N-acetyloglukozamina. Rdzeń zewnętrzny składający się z heksoz, w których wiązanie glikozydowe w większości przypadków ma konfigurację β , jest takim samym wiązaniem przyłączony do grupy hydroksylowej znajdującej się przy atomie węgla C-4. Natomiast w lipopolisacharydach wyizolowanych z serotypów 0:23 i 0:36 bakterii *Campylobacter jejuni*⁴⁴ jest odwrotnie: rdzeń zewnętrzny jest związany z grupą hydroksylową znajdującą się w położeniu 2' L-glicero-D-manno-heptozy II. W położeniu 4 heptozy I znajduje się D-glukopiranoza.

Inny schemat połączeń występujących w rdzeniu wewnętrznym LPS jest przedstawiony na rys 6.



Rys. 6.

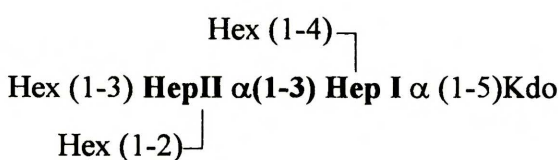
Disacharyd złożony z dwóch heptoz o konfiguracji L-glicero-D-manno jest połączony tak jak w poprzednich przypadkach wiązaniem α (1-5) glikozydowym z regionem Kdo. Reszta heksozy (przeważnie β DGlc_p) jest połączona wiązaniem glikozydowym z grupą hydroksylową znajdującą się przy atomie węgla C-4 w heptozie I. Resztą heksozy jest również podstawiona grupa hydroksylowa znajdującą się przy atomie węgla C-3' w heptozie II. Połączenia takie występują w lipopolisacharydach wyizolowanych z serotypu 0:19 bakterii *Campylobacter jejuni*⁴⁵. Rdzeń zewnętrzny jest połączony wiązaniem glikozydowym o konfiguracji β z grupą hydroksylową znajdującą się przy atomie węgla C-3' w heptozie II.

Wyodrębnienie z rdzenia wewnętrznego oligosacharydu wspólnego dla wszystkich immunotypów występujących w lipopolisacharydach bakterii *Neisseria meningitidis* nasunęło koncepcję⁴⁶ otrzymania szczepionek. Przygotowano i użyto jako sztuczną szczepionkę konjugat typu sacharyd-peptyd złożony z disacharydu heptozowego o wiązaniu $\alpha(1-3)$ występującego w tych bakteriach podstawionego w położeniu C-4 heptozy I czyli w miejscu przyłączenia rdzenia

zewnątrznego glukopiranozą. Przy heptozie II w położeniu C-3' znajdował się β -aminoetylofosforan i w położeniu C-2' N-acetyloglukozamina.

W kolejnym typie rdzenia wewnętrznego (Rys.7), oprócz połączenia disacharydu heptozowego $\alpha(1-5)$ z Kdo, znajdują się trzy miejsca połączenia grup heksozowych: w położeniu C-4 heptozy I i w położeniach C-3' i C-2' heptozy II.

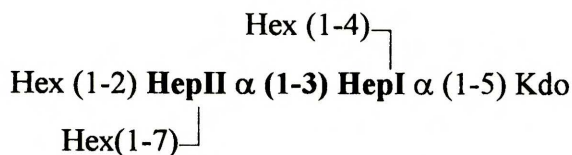
Połączenia takie występują w lipopolisacharydach wyizolowanych z chemotypu L-5^{35, 47, 48} oraz L-2³⁷ bakterii *Neisseria meningitidis*, wyizolowanych z lipopolisacharydów bakterii *Neisseria meningitidis* B LOS⁴⁹ i z serotypów 0:1, 0:2, 0:4 bakterii *Campylobacter jejuni*.⁴⁴



Rys 7.

W LPS wyizolowanych z bakterii *Neisseria meningitidis* rdzeń zewnętrzny jest przyłączony do grupy hydroksylowej znajdującej się przy atomie węgla C-4 w heptozie I. W położeniu C-3' heptozy II znajduje się D-glukopiranoza, a w położeniu C-2' α DGlcPNAc. Natomiast w lipopolisacharydach wyizolowanych z serotypów 0:1, 0:2, 0:4 bakterii *Campylobacter jejuni* rdzeń zewnętrzny jest połączony z grupą hydroksylową znajdującą się przy atomie węgla C-3' w L-glicero-D-manno-heptozie II, a w położeniu C-4 znajduje się β DGlcP.

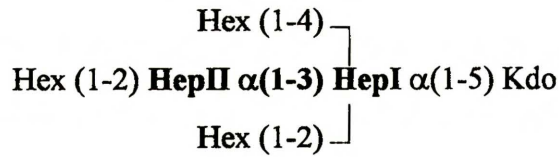
Dalszy schemat połączeń w rdzeniu wewnętrznym (Rys. 8) występuje tylko w lipopolisacharydach bakterii *Bordetella pertussis* 1414⁵⁰.



Rys 8.

Grupa hydroksylowa znajdującą się w położeniu 4 heptozy I jest połączona z heksozą. W drugiej jednostce L-glicero-D-manno-heptozy II są podstawione dwie reszty heksozy: jedna w położeniu C-2' i druga w położeniu C-7'.

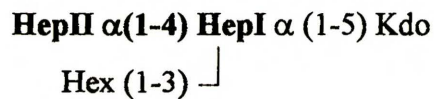
Szesty typ połączeń jest przedstawiony na rysunku 9. Disacharyd złożony z dwóch jednostek L-glicero-D-manno-heptozy jest połączony z Kdo typowym wiązaniem $\alpha(1-5)$



Rys.9.

W tym przypadku reszty heksozowe znajdują się w pozycjach 4 i 2 heptozy I. Obecność trzeciej grupy heksozowej stwierdzono w położeniu C-2' w heptozie II. Ten typ podstawienia został odnaleziony w lipopolisacharydach wyizolowanych z serotypu 0:12 bakterii *Vibrio parahaemolyticus*⁵¹.

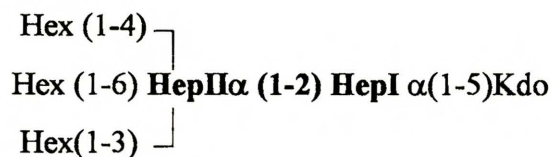
W rdzeniu wewnętrznym wykazano obecność jeszcze innego połączenia dwóch heptoz, a mianowicie dwie jednostki L-glicero- α -D-manno-heptopiranozy były połączone wiązaniem (1-4) (Rys 10).



Rys 10.

Reszta heksozy jest tu połączona z grupą hydroksylową znajdującą się przy atomie węgla C-3 heptozy I. Heptoza ta jest połączona typowym wiązaniem α (1-5) z regionem Kdo. Takie połączenie dwóch heptoz zostało udowodnione dla lipopolisacharydów szczepu R4/028 bakterii *Proteus mirabilis*⁵²

W rdzeniu wewnętrznym lipopolisacharydów stwierdzono także obecność disacharydu złożonego z dwóch jednostek heptozy połączonych wiązaniem α (1-2) (Rys. 11).



Rys 11.

W tym przypadku wszystkie trzy podstawniki heksozowe znajdują się przy L-glicero-D-manno-heptozie II, w położeniach C-6', C-4', C-3'. Obecność takiego połączenia dwóch heptoz została jak do tej pory stwierdzona tylko w rdzeniu wewnętrznym lipopolisacharydów wyizolowanych z chemotypu III bakterii *Aeromonas hydrophila*⁵³.

Ciekawej obserwacji dokonali badacze japońscy analizując łańcuch cukrowy wyizolowany z serotypu 02 bakterii *Vibrio parahaemolyticus*.⁵⁴ W rdzeniu wewnętrznym oprócz heptozy o konfiguracji L-glicero-D-manno znajdowała się druga o konfiguracji D-glicero-D-manno. Obie heptozy były połączone wiązaniem glikozydowym $\alpha(1-3)$. Heptoza o konfiguracji D-glicero-D-manno została odnaleziona dotąd tylko w jednym serotypie 02 bakterii *Vibrio parahaemolyticus*. D-glicero-D-manno-heptoza jest biosyntetycznym prekursorem L-glicero-D-manno-heptozy. Obecność tej heptozy w rdzeniu bakteryjnym jest spowodowana najprawdopodobniej zahamowaniem enzymatycznej epimeryzacji na atomie węgla C-6, wówczas cukier ten zostaje włączony do lipopolisacharydu i dalsze przyłączanie cukrów do części rdzeniowej zostaje zahamowane. Wykazano, że odwrócenie konfiguracji na atomie węgla C-6 następuje przy udziale ADP-D-glicero-D-manno epimerazy.

II. 1. 2. 1. Podstawienie fosforanami.

W diheptozowym regionie rdzenia wewnętrznego LPS oprócz reszt heksozowych znajdują się związane estrowo reszty fosforanowe. Znalezione cały szereg rdzeni bakteryjnych, w których występują fosforany. Grupy te znajdują się w rejonie heptozowym i w rejonie Kdo.

W rdzeniu o typie podstawienia resztami heksozowymi przedstawionym na rys 4 grupy hydroksylowe znajdujące się przy atomach węgla C-2 i C-4 w heptozie I są podstawione resztami fosforanowymi. Takie położenie grup fosforanowych zostało stwierdzone w lipopolisacharydach bakterii *Pseudomonas aeruginosa* AK 1401³⁴.

W rdzeniu wewnętrznym, w którym podstawniki heksozowe znajdują się w położeniach 4 heptozy I i 2' heptozy II, grupy fosforanowe są związane wyłącznie z heptozą II. Zostało to zaobserwowane w lipopolisacharydach różnych chemotypów bakterii *Neisseria meningitidis*. Reszta β -aminoetylofosforanowa znajduje się w części heptozowej LPS wyizolowanych z chemotypu L-3³⁸, L-1^{36, 37} i L-7³⁹ w położeniu C-3'. W położeniu C-6' grupa ta została znaleziona w chemotypie L-4³⁹ oraz w położeniu C-7' chemotypu L-6³⁶ bakterii *Neisseria meningitidis*. W takim samym schemacie podstawienia resztami heksozowymi (Rys.5) grupa fosforanowa może

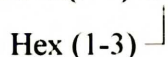
znajdować się przy heptozie I połączonej z regionem Kdo w położeniu C-6. Takie podstawienie zaobserwowano w lipopolisacharydach wyizolowanych z serotypów 0:23 i 0:36 bakterii *Campylobacter jejuni*⁴⁴. W położeniu 6 znajduje się grupa β -aminoetylofosforanowa. W takim samym położeniu lecz w innym serotypie 0:19⁴⁵ tej bakterii znajduje się reszta β -aminoetylofosforanowa (trzeci typ podstawienia reszt heksozowych, rys 6). W OH 4382 β -aminoetylofosforan znajduje się w ilościach niestechiometrycznych. Nie udowodniono jednak dokładnego położenia tej grupy. W niektórych oligosacharydach znajdowała się ona w położeniu C-6, a w innych oligosacharydach tej samej bakterii w położeniu C-7. Tak samo w lipopolisacharydach bakterii *Campylobacter jejuni* O:19 OH 4384 stwierdzono obecność grupy fosforanowej⁴⁵. Nie udowodniono również dokładnego położenia tej grupy, która występuje w ilościach niestechiometrycznych. Zasugerowano, że może się ona znajdować przy C-6 lub przy C-7.

W innym schemacie podstawienia heptoz przez reszty heksozowe (Rys 7) reszta fosforanowa znajduje się w położeniu 6 *L-glicero-D-manno*-heptozy I. W lipopolisacharydach bakterii *Campylobacter jejuni* serotyp 0:1, 0:2, 0:4^{44,55} grupa hydroksylowa znajdująca się przy atomie węgla C-6 w heptozie I jest zestryfikowana β -aminoetylofosforanem. W tym typie podstawienia resztami heksozowymi obecność grupy fosforanowej występującej w ilościach niestechiometrycznych została stwierdzona w niektórych oligosacharydach przy OH-6', a w innych oligosacharydach wyizolowanych z tego samego szczepu bakterii - przy OH-7'. Taki sposób podstawienia zaobserwowano badając lipopolisacharydy wyizolowane z serotypu L-2 bakterii *Neisseria meningitidis*³⁷. W heptozie II grupa hydroksylowa znajdująca się przy atomie węgla C-7 może być zestryfikowana β -aminoetylofosforanem⁴⁰. Badając lipopolisacharydy wyizolowane z bakterii *Proteus mirabilis* R4/028 stwierdzono, że reszta kwasu β -aminoetylofosforowego była podstawiona przy grupie hydroksylowej OH-7' w heptozie II^{56,52}.

II. 1. 3. Rdzeń wewnętrzny zawierający trzy jednostki heptozy

Spośród rdzeni bakteryjnych zawierających 3 heptozy należy wyróżnić dużą grupę, w której trzy jednostki *L-glicero- α -D-manno*-heptopiranozy są połączone wiązaniami $\alpha(1-7)$ i $\alpha(1-3)$ glikozydowymi. Taki układ heptoz występuje w całej rodzinie bakterii *Enterobacteriaceae*.

HepIII $\alpha(1-7)$ HepII $\alpha(1-3)$ HepI $\alpha(1-5)$ Kdo



Rys 12.

W większości rdzeni tego typu trisacharyd heptozowy jest połączony wiązaniem $\alpha(1-5)$ z kwasem 2-keto-3-deoksyoktonowym.

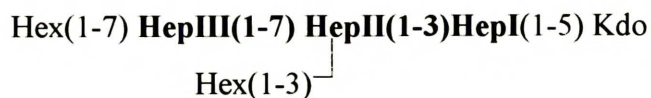
Najprostszym schematem podstawienia reszt heksozowych jest układ (Rys.12), w którym oprócz połączenia z Kdo występuje tylko jedna reszta heksozowa. Reszta ta jest dołączona do grupy hydroksylowej OH-3 w heptozie II.

Ten schemat połączeń można znaleźć oligosacharydzie rdzeniowym wyizolowanym z bakterii *Salmonella typhimurium*^{57,58,59,60} *Salmonella minnesota*⁶¹ *Salmonella godesberg*⁶² *Salmonella landau*⁶³ *Escherichia coli*^{64,65}, *Erwinia carotovora*⁶⁶, *Erwinia chrysantemi* B 374⁶⁴, *Citrobacter* PCM 1487⁶⁷ *Hafnia alvei*⁶⁸.

Fragmentaryczne struktury regionu rdzeniowego lipopolisacharydów wyizolowanych z szorstkich mutantów bakterii *Salmonella* były ustalone już wcześniej^{63,69,70,71}. Budowa trisacharydu heptozowego występującego w lipopolisacharydach bakterii *Salmonella minnesota* została potwierdzona analizą metylacyjną i przez porównanie metylowanego trisacharydu ze standardem syntetycznym⁷².

Dokładne badania lipopolisacharydów wyizolowanych z bakterii *Escherichia coli* K12 pozwoliły zweryfikować wcześniejsze doniesienia^{73,74,75} dotyczące budowy rdzenia zewnętrznego. Z rdzenia tej bakterii wyizolowano 4 jednostki L-glicero-D-manno-heptozy²². Analiza produktu degradacji Schmidta prowadziła do struktury regionu heptozowego, która była taka sama jak w całej rodzinie *Enterobacteriaceae* i składała się z trisacharydu heptozowego połączonego wiązaniami glikozydowymi $\alpha(1-7)$ i $\alpha(1-3)$. Rdzeń zewnętrzny był połączony z grupą hydroksylową znajdującą się przy atomie węgla C-3 w heptozie II. Czwarta jednostka L-glicero-D-manno-heptozy znajdowała się w rdzeniu zewnętrznym i była połączona z grupą hydroksylową OH-6 w glukopiranozie wiązaniem glikozydowym o konfiguracji α . Struktura tego rdzenia została potwierdzona przez porównanie wyizolowanego z chemotypu K12 lipopolisacharydów bakterii *Escherichia coli* disacharydu LDmanHepp $\alpha(1-6)$ D-Glcp z disacharydem otrzymanym syntetycznie.⁷⁶ Jest to jeden z niewielu poznanych do tej pory przykładów występowania L-glicero-D-manno-heptozy w rdzeniu zewnętrznym.

Drugi schemat podstawienia rdzenia wewnętrznego resztami heksozowymi przedstawia Rys.13.

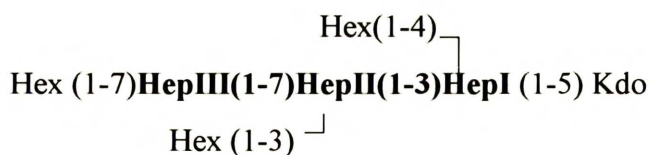


Rys 13.

Grupa hydroksylowa znajdująca się przy atomie węgla C-7'' w heptozie III oraz grupa hydroksylowa usytuowana przy atomie węgla C-3' w heptozie II są podstawione resztami heksozowymi.

Taki schemat podstawienia resztami heksozowymi udowodniono dla rdzeni wewnętrznych lipopolisacharydów wyizolowanych z bakterii *Shigella flexneri*⁷⁷, *Shigella sonnei*⁷⁸, *Citrobacter* O23, *Escherichia coli*^{79,80}. W lipopolisacharydach wyizolowanych z bakterii *Shigella*⁷⁸ rdzeń zewnętrzny jest połączony z grupą hydroksylową OH-3' w LDmanHepp II, a do grupy hydroksylowej znajdującej się przy atomie węgla C-7'' LDmanHepp III jest przyłączona 2-amino-2-deoksy-D-glukoza.

W trzecim schemacie (rys 14) stwierdzono obecność trzech miejsc podstawienia resztami heksozowymi. Reszty heksozowe związane są z atomami węgla C-4 heptozy I, C-3' heptozy II i C-7'' heptozy III.



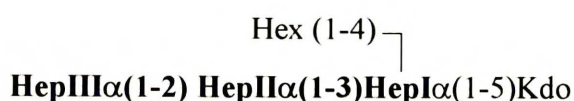
Rys 14

Ten typ podstawienia zauważono tylko w lipopolisacharydach wyizolowanych z bakterii *Proteus mirabilis* szczep R 110/1959²¹. Trisacharyd heptozowy jest zbudowany podobnie jak u innych przedstawicieli z rodziny *Enterobacteriaceae* z tą tylko różnicą, że wiązanie (1-7) glikozydowe ma konfigurację β , a nie α tak jak w większości przypadków. W rdzeniu zewnętrznym, który jest połączony wiązaniem glikozydowym o konfiguracji α z grupą hydroksylową OH-3' w heptozie II znajduje się D-glicero-D-manno-heptoza.

W rdzeniu wewnętrznym wyizolowanym z lipopolisacharydów bakterii *Yersinia enterocolitica*⁸¹ stwierdzono obecność takiego samego trisacharydu heptozowego jak w innych

bakteriach z rodziny *Enterobacteriaceae*. Rdzeń zewnętrzny jest przyłączony do grupy hydroksylowej znajdującej się w położeniu C-3' heptozy II. W położeniu C-4 znajduje się α -D-Glcp, a w położeniu C-2' α -D-Glcp w ilościach niestechiometrycznych. W regionie heptozowym znajduje się jeszcze jedna heptoza lecz o konfiguracji *D-glicero-D-manno*. Heptoza ta jest połączona z grupą hydroksylową znajdującą się w położeniu C-7'' heptozy III. Takie połączenie jest niezwykle rzadko spotykane w enterobakteryjnym rdzeniu wewnętrznym.

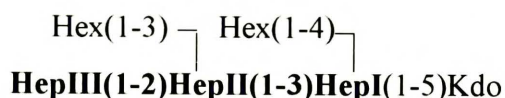
Rdzeń wewnętrzny może być zbudowany z trzech jednostek *L-glicero-D-manno*-heptozy, połączonych również w inny sposób. Heptoza I jest połączona z heptozą II wiązaniem (1-3). Do heptozy II jest przyłączona heptoza III wiązaniem (1-2). Wszystkie wiązania glikozydowe mają konfigurację α . W rdzeniu tym (rys 15) reszty heksozowe znajdują się przy C-4 w heptozie II.



Rys.15.

Ten typ rdzenia występuje w lipopolisacharydach wyizolowanych z bakterii *Haemophilus influenzae*⁸². Rdzeń zewnętrzny jest połączony wiązaniem $\beta(1-4)$ glikozydowym z heptozą II. Podobnie w LPS wyizolowanym ze szczepu 3500 bakterii *Haemophilus ducreyi*⁸³ rdzeń zewnętrzny jest przyłączony do grupy hydroksylowej OH-4 w heptozie I. W rdzeniu tym stwierdzono obecność disacharydu *L(D)glicero- α -D-manHepp-(1-6) β -D-Glcp*. Konfiguracja przy atomie węgla C-6 w heptozach nie została ustalona.

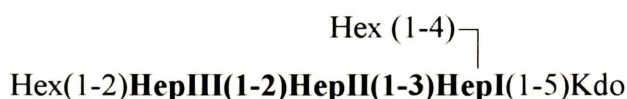
W innym schemacie podstawienia (Rys 16) reszty heksozowe są połączone z heptozą I w położeniu C-4 i z heptozą II w położeniu C-3'. Heptoza I jest zawsze w pozycji anomerycznej połączona z Kdo.



Rys.16.

Taki typ podstawienia znajduje się w LPS wyizolowanych z bakterii *Haemophilus influenzae* typ b szczep A2⁸² i szczep RM 7004⁸⁴.

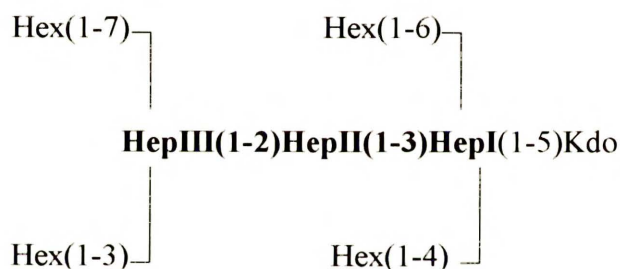
Kolejny schemat podstawienia trisacharydu heptozowego układami heksozowymi (Rys. 17) został stwierdzony w rdzeniu wewnętrznym lipopolisacharydów wyizolowanych ze szczepu AH 1-3 bakterii *Haemophilus influenzae* typ b.⁸⁵



Rys.17.

W położeniu C-4 znajduje się tu β -D-glukopiranoza, a w położeniu C-2'' β -D-galaktopiranoza.

W dalszym typie podstawienia tego rdzenia resztami heksozowymi stwierdzono obecność czterech miejsc, gdzie te podstawniki występują, mianowicie w położeniach C-4 i C-6 heptozy I oraz w położeniu C-3'' i C-7'' heptozy III (Rys. 18).



Rys.18

Taki układ podstawników występuje w lipopolisacharydach wyizolowanych z bakterii *Vibrio cholerae* szczep H11⁸⁶.

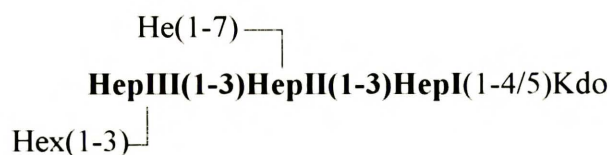
Z LPS bakterii *Aeromonas salmonicida*⁸⁷ wyizolowano oligosacharyd złożony z trzech jednostek L-glicero-D-manno-heptozy połączonych wiązaniami (1-2) i (1-3) glikozydowymi. Region heptozowy jest w tym rdzeniu połączony z atomem węgla C-6 w Kdo.

Rdzeń wewnętrzny o podobnej budowie występuje w lipopolisacharydach wyizolowanych z bakterii *Pasteurella multocida*⁸⁸, ale kolejność wiązań glikozydowych może być również odwrócona (Rys. 19).



Rys.19.

Kolejny przykład rdzenia wewnętrznego złożonego z trzech jednostek L-glicero-D-manno-heptozy jest przedstawiony na rys.20. Rdzeń ten jest podstawiony w dwóch miejscach resztą heksozową i resztą heptozową.



Rys.20.

Taki rdzeń zaobserwowano w LPS bakterii *Phenylbacterium immobile* szczep K2⁸⁹. W położeniu C-7' znajduje się 2-deoksyheptopiranoza, natomiast w położeniu C-3" D-glukopiranoza.

II. 1. 3. 1 Podstawienie fosforanami

Także i w trójheptozowym regionie oprócz reszt heksozowych znajdują się połączone estrowo reszty fosforanowe. W pierwszym typie podstawienia rdzenia wewnętrznego grupami heksozowymi (Rys 12) reszty fosforanowe znajdują się w położeniu C-4 heptozy I (przeważnie jest to reszta kwasu β-aminoetylopirofosforowego) oraz w różnych położeniach w heptozie II. W rdzeniu wewnętrznym wyizolowanym z lipopolisacharydów bakterii *Hafnia alvei* ATCC 13337⁶⁸ reszta fosforanowa znajduje się przy OH-4', a reszta β-aminoetylopirofosforanowa w położeniu 4. W innym szczepie tej samej bakterii *Hafnia alvei* 1211⁶⁸ stwierdzono resztę β-aminoetylofosforanową w położeniu C-6' w heptozie II i resztę β-aminoetylopirofosforanową znajdującą się w położeniu C-4 heptozy I. W lipopolisacharydach wyizolowanych z bakterii *Salmonella typhimurium*^{57,58} tak, jak w poprzednich przykładach reszta β-aminoetylopirofosforanowa znajduje się w położeniu C-4 heptozy I, natomiast pozycja grupy fosforanowej, która znajduje się przy heptozie II nie została ustalona. W bakterii *Citrobacter* PCM 1487⁹⁰ odnaleziono dwie reszty β-aminoetylopirofosforanowe, które znajdują się w położeniu C-4 heptozy I i C-7" heptozy II.

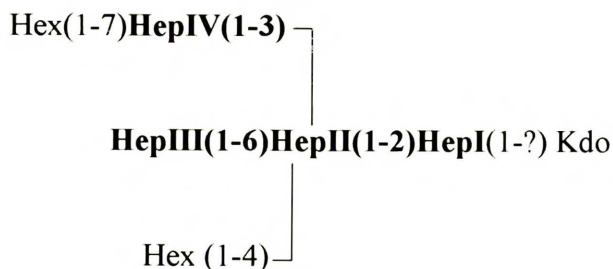
W innym schemacie podstawienia resztami heksozowymi (Rys.13) grupy fosforanowe znajdują się przy heptozie I w położeniu C-4 lub w tym samym położeniu heptozy II. Występują też w obydwu pozycjach jednocześnie. W lipopolisacharydach bakterii *Shigella flexneri* serotyp 6⁷⁷ występowanie reszty β-aminoetylopirofosforanowej nie jest stechiometryczne. W niektórych

oligosacharydach znajduje się ona w położeniu C-4 heptozy I. W innych oligosacharydach tej samej bakterii została odnaleziona w C-4' heptozy II. W chemotypie R1 bakterii *Escherichia coli*⁹¹ grupa hydroksylowa OH-4 L-glicero-D-manno-heptozy I związanej z Kdo jest podstawiona β-aminoetylopirofosforanem, a ta sama grupa hydroksylowa OH-4 w następnej jednostce LDmanHepp II jest podstawiona resztą fosforanową. W lipopolisacharydach bakterii *Shigella sonnei* 9773⁷⁸ znajdują się dwie reszty β-aminoetylopirofosforanowe obie w położeniu C-4 z tym, że jedna związana jest z heptozą I, a druga z heptozą II. Z lipopolisacharydów bakterii *Citrobacter* 023⁹² wyizolowano rdzeń wewnętrzny, w którym heptoza I jest podstawiona w położeniu 4 β-aminoetylopirofosforanem.

W rdzeniu wewnętrznym zawierającym trzy jednostki L-glicero-D-manno-heptozy połączone wiązaniami (1-2) i (1-3) glikozydowymi grupy fosforanowe znajdują się przeważnie przy heptozie II. W lipopolisacharydach bakterii *Haemophilus influenzae* mutant GalEgalK⁸⁴ (Rys.16) stwierdzono obecność reszty β-aminoetylofosforanowej w położeniu C-6' heptozy II. W szczepie AH 1-3 (lic 3+) tej bakterii⁸⁵ układ β-aminoetylofosforanu znajduje się również w położeniu C-6'. W lipopolisacharydach bakterii *Haemophilus ducreyi* 35000 odnaleziono grupę β-aminoetylopirofosforanową, lecz jej położenie przy LDmanHepp II nie zostało do tej pory ustalone.

II. 1. 4. Rdzeń wewnętrzny zawierający cztery jednostki heptozy

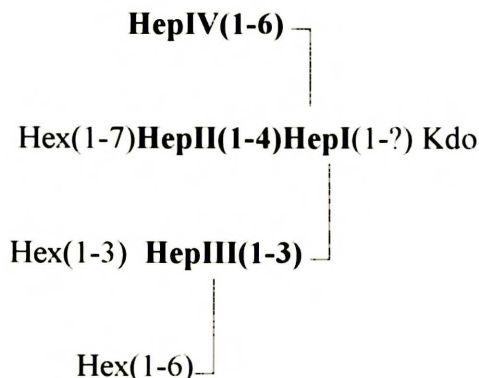
W lipopolisacharydach niektórych bakterii udowodniono występowanie rdzenia wewnętrznego złożonego z czterech jednostek L-glicero-D-manno-heptozy. Rdzeń taki występuje w LPS bakterii *Aeromonas hydrophila* A6⁹³ i w szczepie NCM B 86 tej samej bakterii⁹⁴ (Rys. 21). Reszty heksozowe znajdują się w położeniu C-7 heptozy IV, oraz w położeniu C-4' heptozy II.



Rys. 21.

W rdzeniu zewnętrznym wyizolowanym z LPS tych bakterii znajdują się dodatkowo dwie reszty heptozy o konfiguracji *D-glicero-D-manno*.

Inny typ połączeń czterech jednostek *L-glicero-D-manno*heptozy został wykryty w lipopolisacharydach wyizolowanych z bakterii *Vibrio ordalii*⁹⁵ (Rys.22).



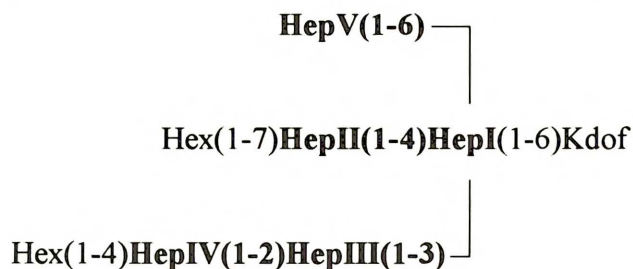
Rys 22.

Heptoza połączona z regionem Kdo jest podstawiona w położeniach C-6, C-3 i C-4 resztami *LDmanHepp*. Do grupy hydroksylowej znajdującej się w położeniu C-7 heptozy II jest przyłączona β -D-glukopiranozyloamina, a w położeniach C-3'' i C-6'' *L-glicero-D-manno*-heptopiranozy III znajdują się reszty α -D-glukopiranozy.

II. 1. 5. Rdzenie wewnętrzne zawierające pięć jednostek heptozy.

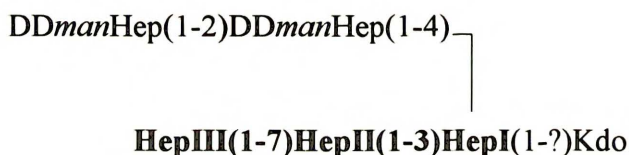
Z lipopolisacharydów bakterii *Aeromonas salmonicida ssp salmonicida*⁹⁶ wyizolowano rdzeń wewnętrzny w którym stwierdzono obecność aż pięciu jednostek *LDmanHepp* (Rys 23.)

Do heptozy połączonej z Kdo w położeniach C-6 i C-4 są przyłączone następne heptozy, a w położeniu C-3 disacharyd złożony z dwóch *LDmanHepp* połączonych wiązaniem $\alpha(1-2)$. Wiązanie glikozydowe w heptozie II ma konfigurację β . Rejon heptozowy jest przyłączony do grupy hydroksylowej znajdującej się przy atomie węgla C-6 w Kdo. Rdzeń zewnętrzny jest połączony z grupą hydroksylową w położeniu C-4 heptozy IV. Grupy heksozowe znajdują się w położeniu C-7 heptozy II i w położeniu C-4 heptozy IV.



Rys.23.

W lipopolisacharydach szczepu 3661 bakterii *Rhodospirillum tenue*⁹⁷ znajduje się pięć heptoz przy czym trzy mają konfigurację *L-glicero-D-manno*, a dwie konfigurację *D-glicero-D-manno* (Rys 24.)



Rys 24.

W szczepie 2761 tej bakterii, z pięciu jednostek heptozy obecnych w rdzeniu wewnętrznym cztery mają konfigurację *L-glicero-D-manno*, a jedna *D-glicero-D-manno*. W rdzeniu tym stwierdzono obecność grupy fosforanowej, która znajdowała się przy heptozie II w niestechiometrycznej ilości.

Jednym z aktualnych problemów w badaniach biochemicznych jest antygenowe oddziaływanie cukrów znajdujących się w błonie komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Bardzo ważna jest struktura znajdujących się tam oligosacharydów, gdyż nawet zmiany w odpowiednim ułożeniu składników zewnętrznej błony komórkowej uniemożliwiają jej prawidłowe funkcjonowanie. Jak zostało już wcześniej pokazane budowa regionu heptozowego rdzenia wewnętrznego zmienia się w ograniczonym zakresie. Znajdujące się tu oligosacharydy heptozowe mogą być podstawione tylko resztami heksozowymi lub resztami fosforanowymi.

Reszty heksozowe znajdują się w różnych położeniach w rdzeniu wewnętrznym. W rdzeniach bakteryjnych zawierających dwie jednostki heptozy Hep(1-3)Hep reszty heksozowe

mogą znajdować się w położeniu C-4 lub C-4 i C-2 heptozy I. Natomiast przy heptozie II znajdują się przeważnie w 2' bądź w 3' oraz dodatkowo w 4', 6', 7' czyli we wszystkich możliwych położeniach. Rdzeń zewnętrzny może być połączony z grupą hydroksylową znajdującą się przy C-4 w heptozie I, lub w C-3' w heptozie II, lub C-2' w heptozie II.

W rdzeniach zawierających trzy jednostki heptozy połączone wiązaniami (1-7) i (1-3) reszty heksozowe są podstawione w położeniu C-3' heptozy II, jest to miejsce przyłączenia rdzenia zewnętrznego. W innych oligosacharydach stwierdzono obecność reszt heksozowych w położeniach C-3' heptozy II i C-7'' heptozy III. W rdzeniu wewnętrznym, w którym występuje trisacharyd Hep(1-2)Hep(1-3)Hep stwierdzono obecność ugrupowań heksozowych w położeniach C-4 heptozy I i C-3' heptozy II lub C-2'' heptozy III. W innym rdzeniu reszty heksozowe są podstawione w C-4 i C-6 heptozy I oraz w C-7' i C-3'' heptozy III. Dalszy rdzeń zawiera dwie reszty heksozy jedna w położeniu C-7 heptozy II i druga w położeniu C-3'' heptozy III. W rdzeniach bakteryjnych zbudowanych z czterech lub pięciu jednostek heptozy nie można podać uogólnień.

Ustalenie pozycji fosforanów znajdujących się w rdzeniu wewnętrznym LPS jest, jak już wcześniej zostało powiedziane, bardzo trudne. Często odnajdywane są tam grupy fosforanowe jednak ich dokładne położenie nie zostaje ustalone. Fosforany występują niekiedy w ilościach niestechiometrycznych, co jeszcze bardziej utrudnia analizę. W rdzeniu wewnętrznym zawierającym disacharyd heptozowy połączony wiązaniem $\alpha(1-3)$ grupy fosforanowe, a w zasadzie najczęściej β -aminoetylofosforany znajdują się w położeniach 3', 6' lub 7' heptozy II i w 6 lub 6\7 heptozy I. Tylko w lipopolisacharydach bakterii *Pseudomonas aeruginosa* AK 1401 stwierdzono obecność reszt fosforanowych w położeniu C-2 i C-4 heptozy I. W rdzeniu wewnętrznym, w którym dwie heptozy są połączone wiązaniem $\alpha(1-4)$ wykazano obecność jednej reszty β -aminoetylofosforanowej w położeniu C-7'.

W rdzeniach wewnętrznych zbudowanych z trzech jednostek heptozy połączonych wiązaniami $\alpha(1-7)$ i $\alpha(1-3)$ grupy fosforanowe znajdują się przy atomie C-4 heptozy I (przeważnie są to β -aminoetylopirofosforany) i w położeniu C-4' lub C-6' heptozy II, lub w położeniu C-7'' heptozy III. Czasem znajdują się tylko w położeniu C-6' heptozy II. W rdzeniach wewnętrznych, gdzie trzy jednostki heptozy są połączone wiązaniami $\alpha(1-2)$ i $\alpha(1-3)$ reszty fosforanowe zostały odnalezione tylko w położeniu C-6' heptozy II. W rdzeniach bakteryjnych zawierających więcej reszt heptozowych, jak do tej pory stwierdzono obecność tylko jednej grupy

fosforanowej przy heptozie II w pentasacharydzie heptozowym występującym w LPS szczepu 3661 bakterii *Rhodospirillum tenue*.

W nie wymienionych tutaj rdzeniach bakteryjnych też mogą znajdować się reszty fosforanowe. Dla ułatwienia badań strukturalnych często pracuje się na materiale zdefosforylowanym, gdyż grupy fosforanowe komplikują separację i oczyszczanie LPS. W rezultacie struktura oligosacharydów rdzeniowych nie jest wyjaśniona do końca. Precyzyjne badania schematu podstawienia fosforanami pozwolą zrozumieć ich rolę biologiczną. Aby to było możliwe trzeba zbadać, jak reszty fosforanowe zachowują się w warunkach degradacji stosowanych przy ustalaniu struktury.

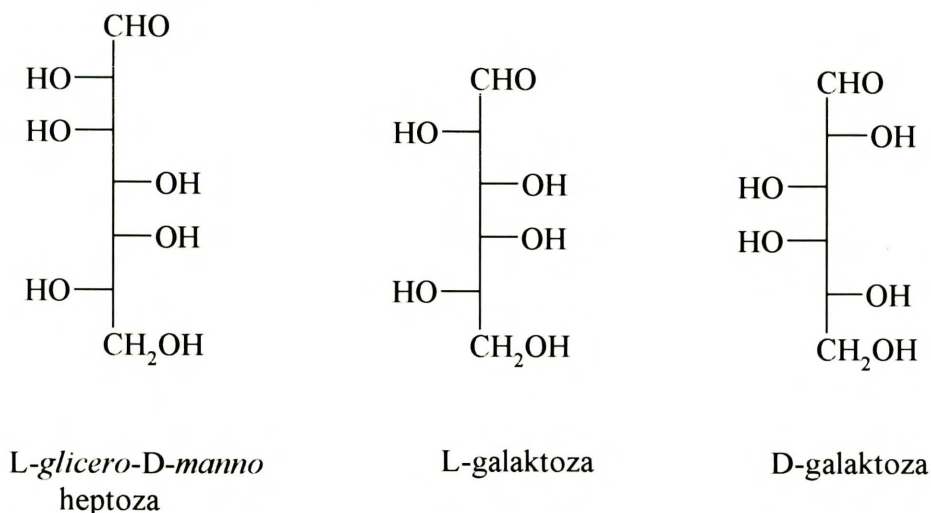
II. Metody syntezy mmanoheptopiranoz

II. 2. 1. Metody syntezy L-glicero-D-manno-heptopiranozy

L-Glicero-D-manno-heptozą jest cukrem rzadko występującym w przyrodzie. Praktycznie znajduje się tylko w błonie komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Wyizolowanie jej jest możliwe za pomocą specyficznej enzymatycznej degradacji LPS. Jest to proces żmudny i mało wydajny. Otrzymuje się wtedy niewielkie ilości czystego materiału potrzebnego do badań biologicznych. W tej sytuacji jedyną metodą otrzymania wystarczającej ilości czystej L-glicero-D-manno-heptozy jest synteza organiczna. Planując syntezę trzeba uwzględnić następujące warunki:

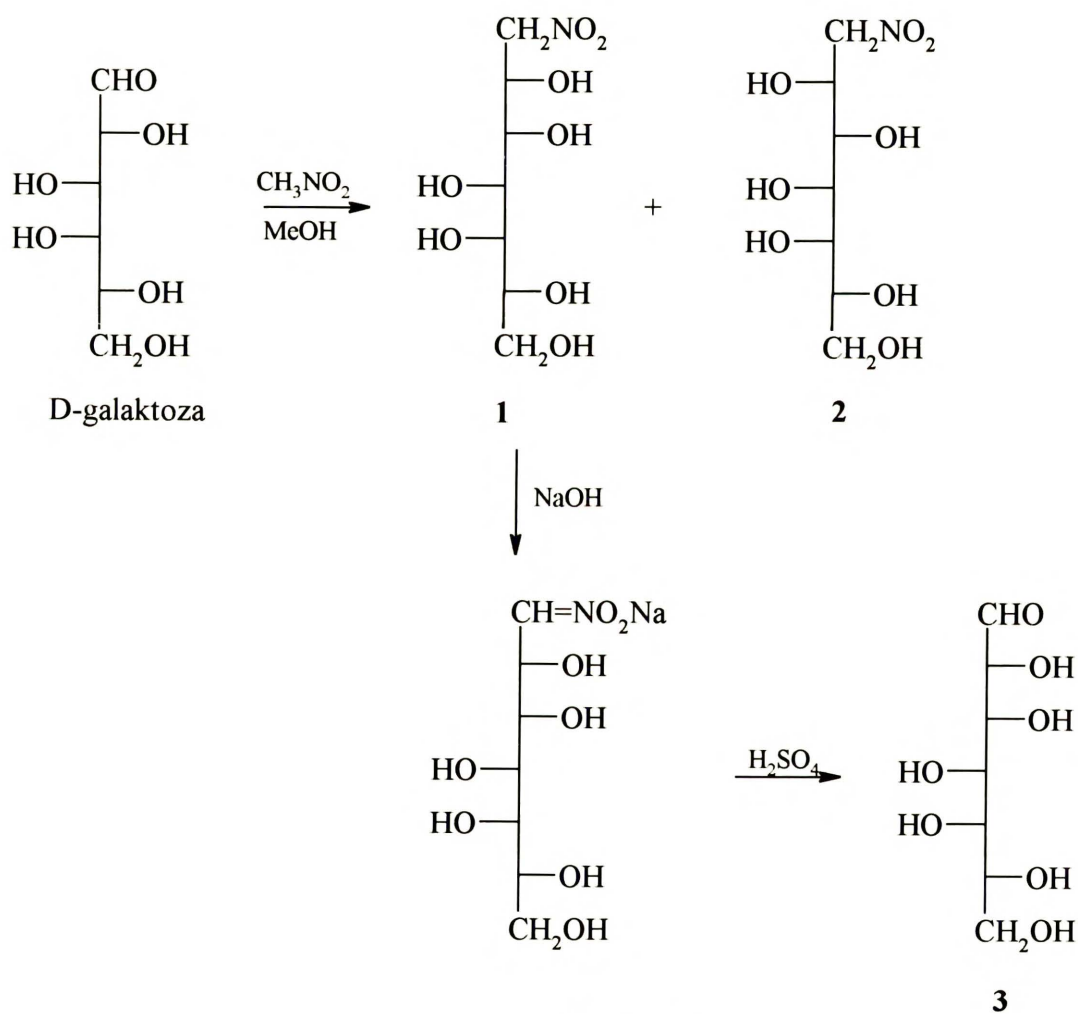
- wprowadzenie nowego centrum chiralności powinno przebiegać wysoce selektywnie,
- wyjściowy materiał powinien być łatwo dostępny,
- LDmanHepp powinna być od razu przygotowana do następnych przekształceń w syntezie oligosacharydów

Najprostszą metodą otrzymywania heptoz jest przeprowadzenie homologowania heksoz o jeden atom węgla. Do syntezy najlepiej jest wybrać taką heksozę, która miała by taką samą konfigurację większości atomów węgla w cząsteczce jaką posiada L-glicero-D-manno-heptozą. Konfiguracja atomów węgla od 3-6 L-glicero-D-manno-heptozy jest identyczna z konfiguracją odpowiednich atomów węgla 2-5 L-galaktozy.



Jest to więc dobry substrat do syntezy wykorzystującej przedłużanie łańcucha od strony atomu węgla C-1. Niestety, L-galaktoza nie jest łatwo dostępna, gdyż nie występuje w przyrodzie, natomiast jej enancjomer, D-galaktoza jest cukrem dostępnym bez trudności. Została

ona wykorzystana w syntezie enancjomeru *mannoheptozy*. Do syntezy zastosowano⁹⁸ kondensację D-galaktozy z nitrometanem (reakcja Sowdena) (Schemat 1), która prowadzi do mieszaniny dwóch związków, a mianowicie 1-deoksy-1-nitro-D-*glicero*-L-*manno*-heptitolu (**1**) i 1-deoksy-1-nitro-D-*glicero*-L-*gluko*-heptitolu (**2**). Związki te rozdzielono przez frakcjonowaną krystalizację i otrzymano **1** z wydajnością 18.4%, a **2** z wydajnością 24.8%. Grupę nitrową w **1** przekształcono do aldehydu w reakcji Nefa otrzymując D-*glicero*-L-*manno*-heptozę (**3**).

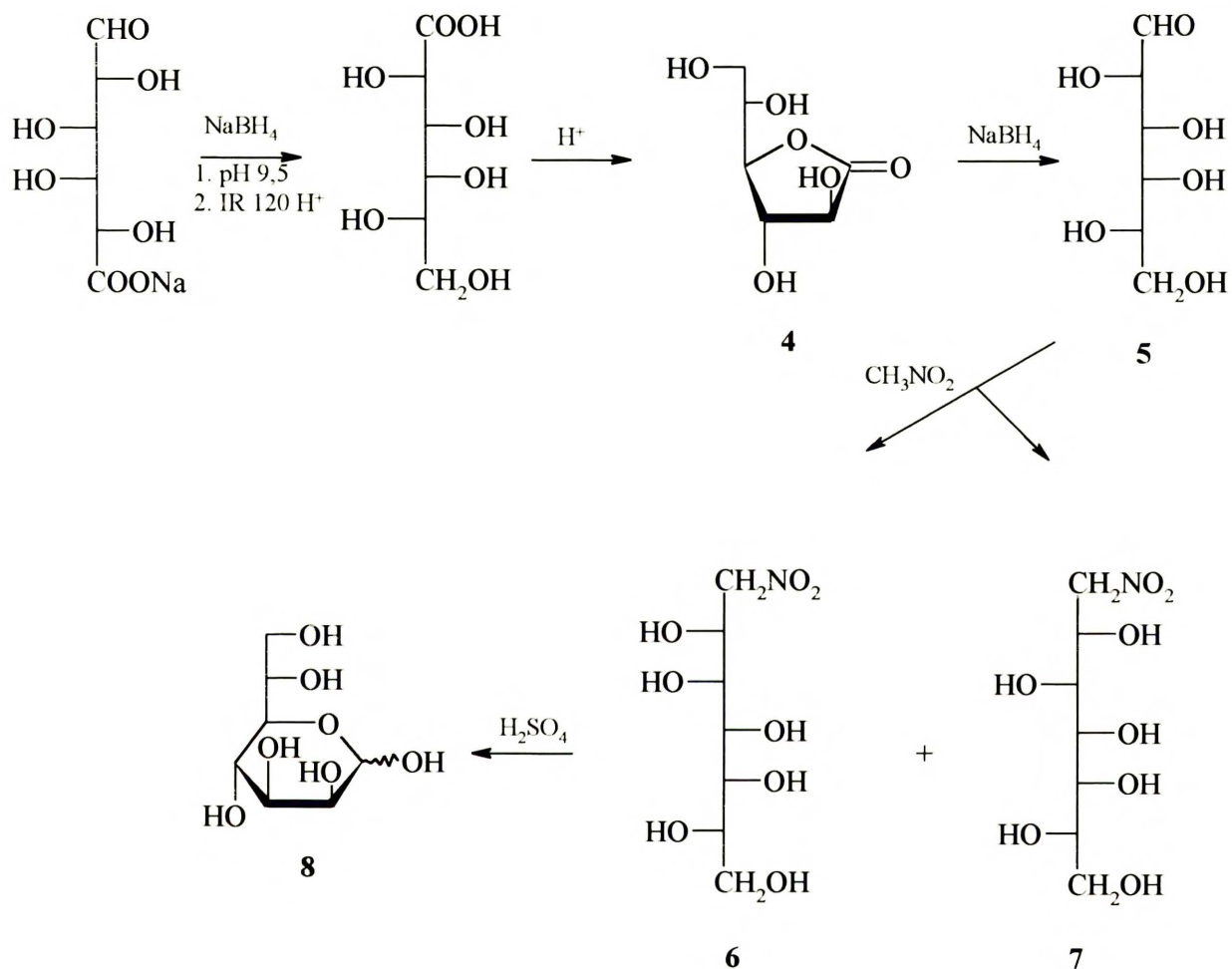


Schemat 1

L-*Glicero*-D-*manno*-heptozą została po raz pierwszy otrzymana w 1968 roku przez Teubera, Bevilla i Osborna⁹⁹ metodą Sowdena. L-Galaktozę (**5**) (Schemat 2) otrzymano z kwasu D-galakturonowego, który po przekształceniu do L-galaktono-1,4-laktonu (**4**) zredukowano borowodorkiem sodowym. Następnie **5** poddano reakcji z nitrometanem otrzymując dwa związki różniące się konfiguracją na jednym atomie węgla, 1-deoksy-1-nitro-L-*glicero*-D-*gluko*-heptitol

(7) i 1-deoksy-1-nitro-L-glicero-D-manno-heptitol (6). Związki te rozdzielono przez wielokrotną krystalizację. Reakcja Nefa heptitolu 6 prowadziła do właściwej L-glicero-D-manno-heptozy (8).

Główną trudnością w tej syntezie jest otrzymanie L-galaktozy co jest procesem żmudnym i mało wydajnym.

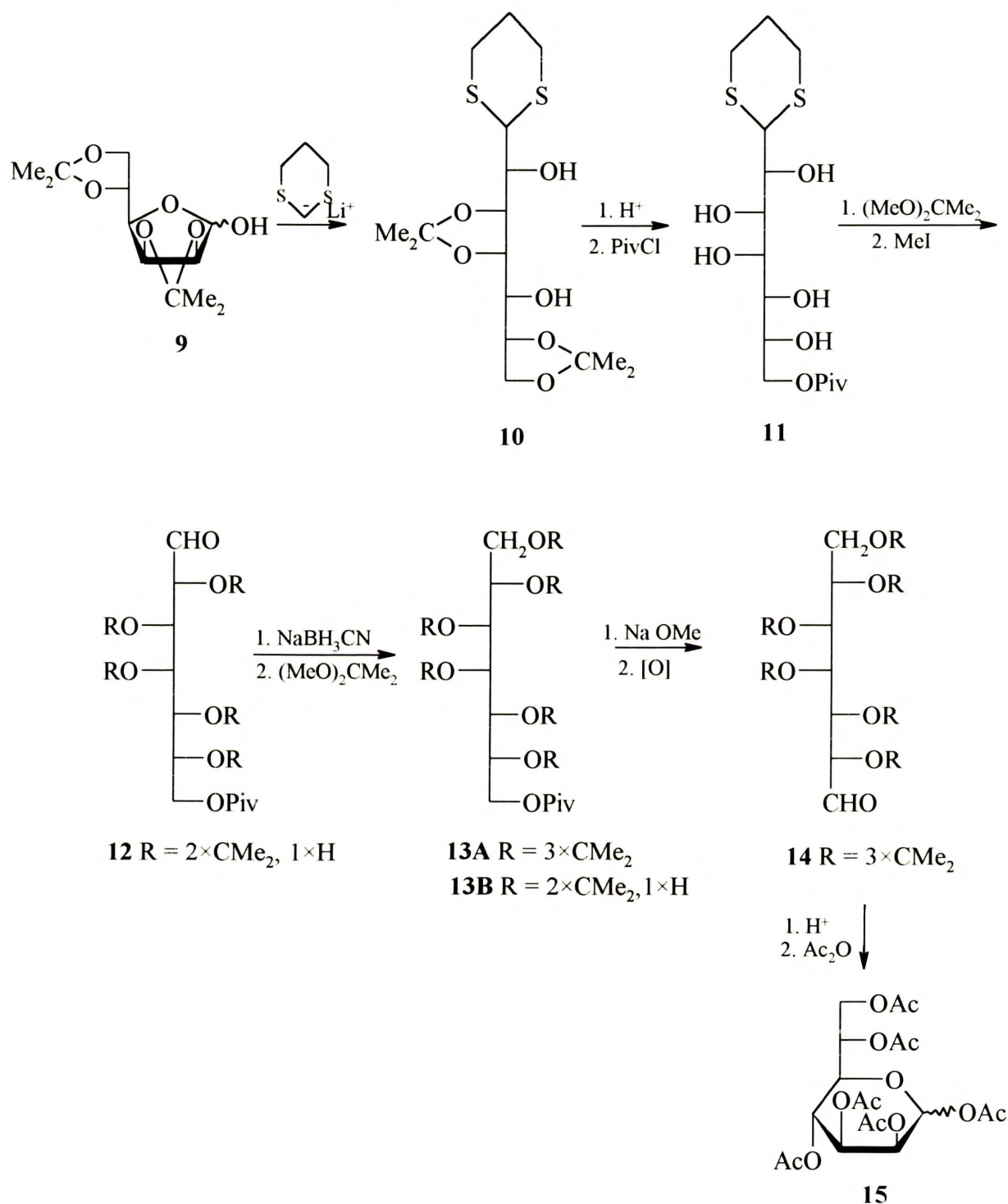


Reakcja wydłużania łańcucha w metodzie nitrometanowej Sowdena nie przebiega stereoselektywnie. Badania nad stereoselektywną i wysokowydajną metodą otrzymywania heptoz były więc kontynuowane.

Metodę syntezy wykorzystującą również homologowanie łańcucha cukrowego od strony węgla C-1 zaproponował Paulsen¹⁰⁰ (Schemat 3). Substratem w tej syntezie jest łatwo dostępna 2,3:5,6-di-O-izopropylidenomannofuranoza (9) do której stereoselektywnie została dołączona litowa pochodna ditianu.

W reakcji otrzymano pochodną heptozy o konfiguracji D-glicero-D-galakto 10. W celu otrzymania związku o pożądanej konfiguracji L-glicero-D-manno należało całkowicie „odwrócić”

konfigurację cukru poprzez zamianę redukującego i nie redukującego końca. Hydroliza grup



Schemat 3

izopropylidenowych w związku 10, a następnie zabezpieczenie pierwszorzędowej grupy hydroksylowej resztą piwaloilową dało pochodną 11. Ponowne zablokowanie drugorzędowych grup hydroksylowych resztami izopropylidenowymi, następnie usunięcie maskującego ditianu za pomocą jodku metylu wobec 2,4,6-trimetylopirydyny prowadziło do aldehydu 12. Redukcja

aldehydu cyjanoborowodorkiem sodowym i zabezpieczenie otrzymanego heptitolu resztami izopropylidenowymi dały mieszaninę pochodnych izopropylidenowych **13**, które musiały być rozdzielone przez chromatografię. Odblokowanie I-rzędowej grupy hydroksylowej zabezpieczonej resztą piwaloilową w związku **13A**, a następnie jej utlenienie prowadziło do aldehydu **14**, w którym grupa aldehydowa znajduje się na przeciwnym końcu cząsteczki niż w związku **12**. Hydroliza grup izopropylidenowych, a następnie acetylowanie dały oba anomery 1,2,3,4,6,7-heksa-O-acetylo-L-*glicero*-D-*manno*-heptozy (**15**).

Użyteczność tej metody jest ograniczona koniecznością przeprowadzenia wielokrotnej zmiany zabezpieczeń. Synteza jest wieloetapowa, a na niektórych etapach otrzymuje się ponadto mieszaninę produktów.

Syntezy *manno*heptoz przedstawione do tej pory są kłopotliwe i wymagają trudno dostępnych substratów. Większość z nich wykorzystuje homologowanie łańcucha od strony atomu węgla C-1.

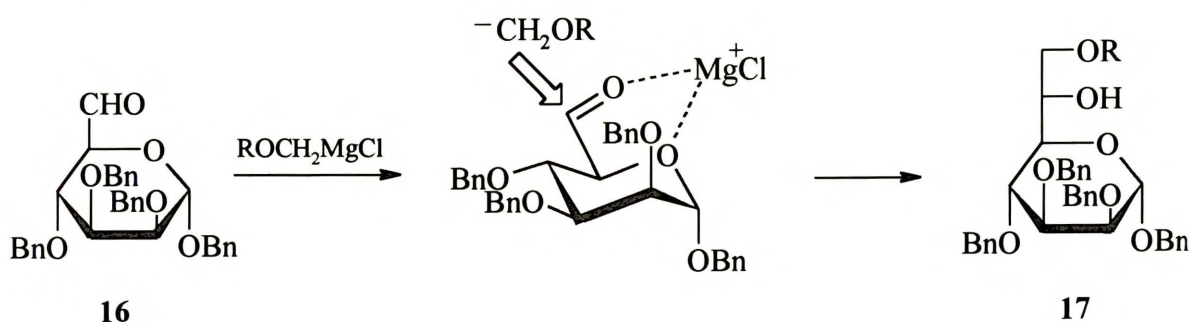
Przez prawie 20 lat nie został uczyniony żaden znaczący postęp w syntezie heptoz. Opracowano niewiele bardzo pracochłonnych metod, a w niektórych z nich posługiwano się trudno dostępnymi substratami.

Przełomem w syntezie heptoz było całkiem nowe podejście opracowane w 1986 roku w naszym laboratorium. Nowa metoda polegała na przedłużeniu łańcucha od strony atomu węgla C-6 w D-mannopiranozie^{101, 102}. D-mannoza została wybrana jako dobry substrat do elongacji, gdyż zawiera cztery atomy węgla mające identyczną konfigurację jak L-*glicero*-D-*manno*-heptoza (**8**). Metoda homologowania polegała na wykorzystaniu w syntezie węglowodanów reakcji Grignarda chlorków alkoksymetylomagnezowych¹⁰³ z aldehydami i ketonami.

Jako substrat została wybrana pochodna D-mannozy z grupą aldehydową w położeniu 6 (**16**).

Przeprowadzono reakcję benzylo 2,3,4-tri-O-benzylo- α -D-*manno*-heksodialdo-1,5-piranozydu (**16**) z chlorkiem alkoksymetylomagnezowym (Schemat 4) która prowadziła w przewadze do pochodnej L-*glicero*-D-*manno*-heptozy (**17**). W reakcji tej w mniejszej ilości powstawał również drugi diastereoizomer: heptoza o konfiguracji D-*glicero*-D-*manno*. Stereoselektywność reakcji Grignarda była wysoka, gdyż przebiegała ona najprawdopodobniej według cyklicznego modelu Crama dla indukcji asymetrycznej. Atak nukleofila następował od

mniej zatłoczonej strony (Schemat 4) co prowadziło w przewodzie do związku o konfiguracji L-glicero-D-manno.



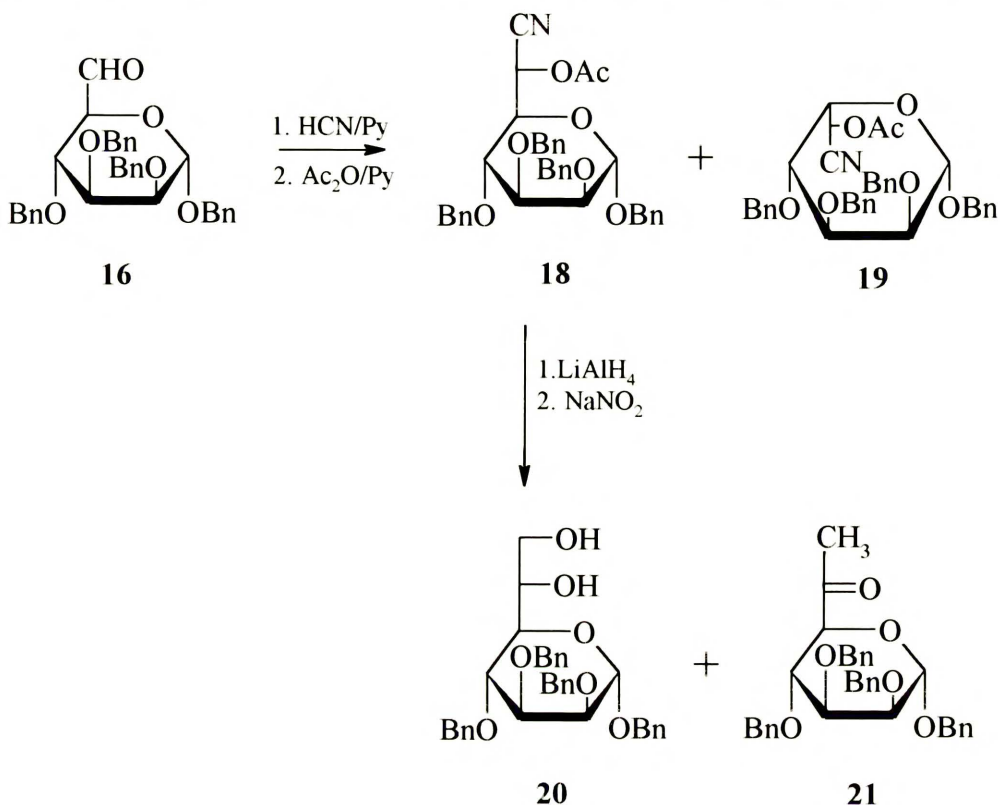
Schemat 4

Proporcja diastereoizomerów LD-*man*Hepp do DD-*man*Hepp w reakcji aldehydu **16** z chlorkiem alliloksymetylomagnezowym wynosiła 3 : 1. Wyższą stereoselektywność, 28 : 1 otrzymano, gdy do reakcji z chlorkiem benzyloksymetomagnezowym użyto aldehyd, który był zabezpieczony w położeniu C-3 grupą allilową, a pozostałe grupy hydroksylowe miały zablokowane resztami benzyłowymi. Po rozdzieleniu diastereoizomerów i uwolnieniu grup hydroksylowych otrzymano z wysokimi wydajnościami obie heptozy. Wykorzystanie do reakcji homologowania chlorku alliloksymetylomagnezowego lub benzyloksymetylomagnezowego pozwalało na omięcie etapu blokowania grupy hydroksylowej na C-7, gdyż grupa zabezpieczająca była od razu wprowadzona w czasie reakcji przedłużania łańcucha. Inne grupy zabezpieczające potrzebne w syntezie oligosacharydów mogą być w tej metodzie wprowadzone do D-mannozy przed reakcją homologowania.

Jest to bardzo wygodna, prosta i wysokowydajna metoda otrzymywania heptoz. Spełnia ona wszystkie trzy warunki przedstawione dla metody dogodnej preparatywnie.

W tej samej pracy¹⁰¹, do reakcji homolowania atomu węgla C-6 zastosowano metodę cyjanohydrynową Kilianiego i Fischera. Reakcja ta była już używana do przedłużania łańcucha węglowego cukrów od atomu węgla C-1. Reakcja benzylo 2,3,4-tri-O-benzylo- α -D-mannoheksodialdo-1,5-piranozydu (**16**) z cyjanowodorem w pirydynie (Schemat 5) prowadziła do stereoisomerycznych cyjanohydryn z wydajnością 54%. Powstały one w proporcjach 1.8 : 1, a po rozdzieleniu chromatograficznym zostały scharakteryzowane w postaci octanów. W oparciu o

widma NMR ustalono, że związek **18** miał konfigurację *L-glicero-D-manno*, natomiast związek, który powstał w mniejszej ilości **19** miał zmienioną konfigurację na atomie węgla C-5.

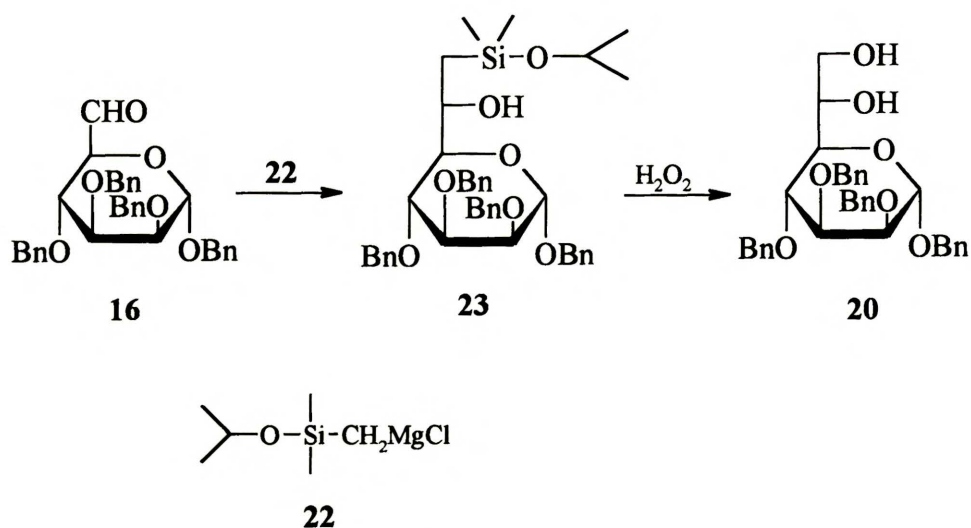


Schemat 5

Cyjanohydryna **18** została zredukowana za pomocą LiAlH_4 , a następnie przeprowadzono reakcję deaminowania wobec azotynu sodowego, otrzymano dwa związki **20** (36%) i **21** (18%). Związek **20** poddano reakcji hydrogenolizy otrzymując *L-glicero-D-manno*-heptozę (**8**). Jednak wydajność reakcji była niska i nie przekroczyła 6%.

W oparciu o metodę przedłużania łańcucha węglowego od strony atomu węgla C-6 w *D*-mannozie przy wykorzystaniu reakcji Grignarda opracowano dwie dalsze metody otrzymywania *L-glicero-D-manno*-heptozy. Pierwsza, wykorzystująca chlorek izopropoksydimetylo-sililometylomagnezowy¹⁰⁴, druga wykorzystująca bromek winylomagnezowy¹⁰⁵.

Taka sama pochodna *L-glicero-D-manno*-heptozy **20** jak w metodzie cyjanohydrynowej była otrzymana¹⁰⁴ w dwuetapowej metodzie polegającej na reakcji Grignarda aldehydu mannozowego **16** z chlorkiem izopropoksydimetylo-sililometylomagnezowym (**22**) (Schemat 6), a następnie utlenieniu przejściowego silanu **23** nadtlaniem wodoru. W syntezie tej została wykorzystana metoda Tamao¹⁰⁶ nukleofilowego hydroksymetylowania aldehydów i ketonów.

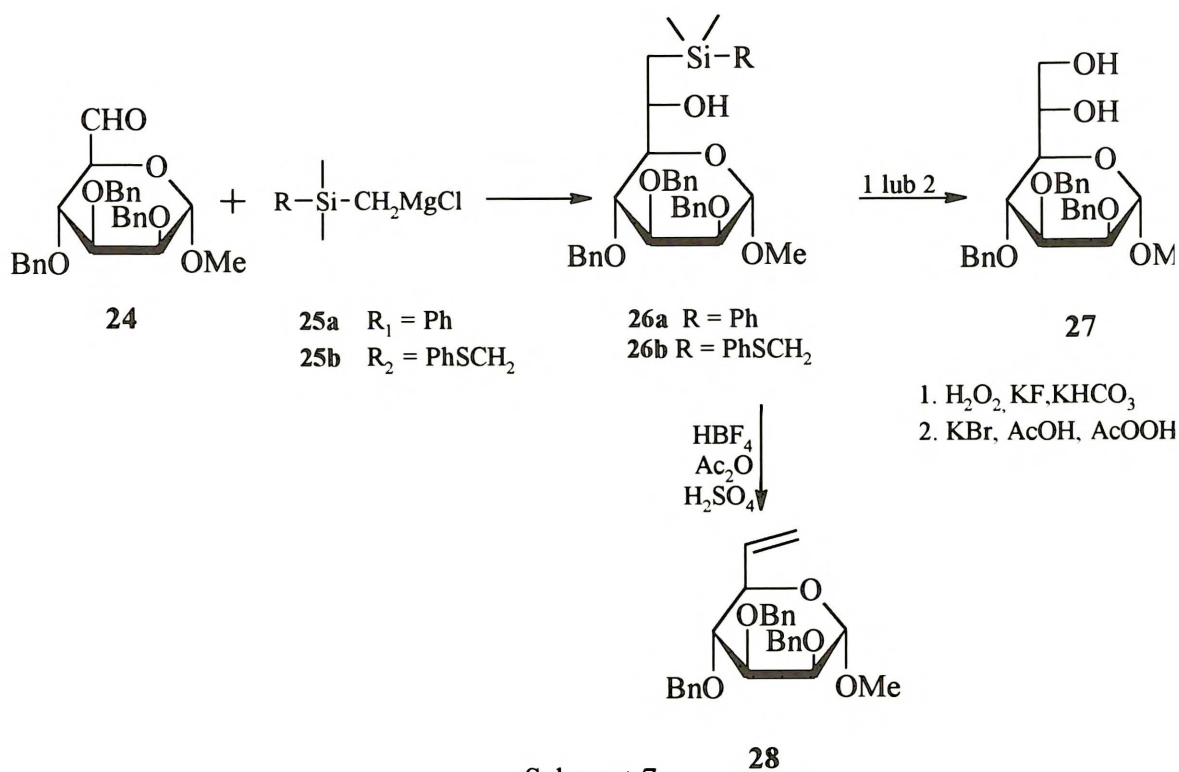


Schemat 6

Po utlenieniu otrzymano oba diastereoizomery *L-glicero-D-manno*-heptozę i *D-glicero-D-manno*-heptozę w proporcjach 20 : 1. Konfiguracja głównego produktu została potwierdzona przez otrzymanie ditioacetalu dietylowego. Zmiana glikozydu benzyłowego na metylowy¹⁰⁷ w *D-manno*zie spowodowała zwiększenie stereoselektywności i diastereoizomer o konfiguracji *D-glicero-D-manno* w ogóle nie powstał. Wydajność reakcji elongacji wynosiła 60%.

Badanie wpływu innych grup zabezpieczających na stereoselektywność reakcji elongacji przeprowadzono na metylo 2,3-O-izopropylideno-4-O-(4-metoksybenzyl)- α -*D-manno*-heksodialdo-1,5-piranozydzie. Po reakcji Grignarda i utlenieniu otrzymano mieszaninę diastereoizomerów (*L* α *DmanHepp* i *D* α *DmanHepp*) w proporcjach 5 : 1, jednak wydajność tej reakcji była o połowę niższa niż w poprzednich przypadkach (31%).

Zastosowanie bardziej stabilnej grupy fenyldimetylosililowej¹⁰⁸ w reakcji Grignarda (Schemat 7) spowodowało zwiększenie stereoselektywności i trwałości związku **26a**, który mógł być wyodrębniony i poddany dalszym przemianom. W reakcji otrzymano tylko jeden właściwy diastereoizomer z wydajnością 70%. Przekształcenie grupy sililowej do hydroksymetylowej metodą Fleminga¹⁰⁹ (kwas nadoctowy w obecności KBr) prowadziło do pochodnej *L-glicero-D-manno*-heptozy **27**. Acydoliza **26a** kwasem tetrafluoroborowym w chlorku metylenu prowadziła do ilościowego otrzymania produktu eliminacji Petersona¹¹⁰ **28**. Elektrofilowe warunki Fleminga¹¹¹ używane do przekształcania grupy fenylosililowej do hydroksymetylowej nie mogą być zastosowane w obecności grup bogatych w elektrony np. podwójne wiązanie lub grupy aminowe.

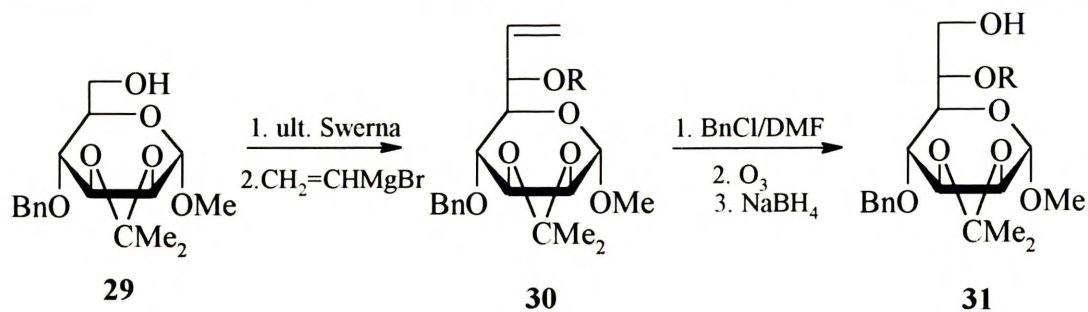


Schemat 7

Chcąc ominąć te niedogodności do reakcji Grignarda zastosowano jeszcze jeden reagent, a mianowicie (chlorometylo)dimetylo(fenylotiometylo)silan¹¹² (**25b**). Reagent ten dawał (Schemat 7) w reakcji z aldehydem **24** stabilny addukt **26b**. Utlenienie adduktu metodą Tamao¹⁰⁶ dało podobnie jak w innych przypadkach pochodną *L-glicero-D-manno-heptozy* **27**.

Ta metoda otrzymywania *LDmanHepp* jest metodą dwuetapową (elongacja i utlenienie) wymaga ponadto dodatkowego wprowadzania zabezpieczeń na grupy hydroksylowe znajdujące się w położeniach C-6 i C-7. W czasie niektórych reakcji obserwuje się powstawanie ubocznego produktu eliminacji Petersona.

Jeszcze jedną metodę syntezy *L-glicero-D-manno-heptozy* przedstawili badacze francuscy¹⁰⁵. Metoda ta polegała, podobnie jak w opisanych syntezach, na przedłużeniu łańcucha cukrowego od strony atomu węgla C-6 w *D-mannopiranozie*. Aldehyd otrzymany metodą Swerna z pochodnej *D-mannozy* **29** poddano reakcji Grignarda z dostępnym handlowo bromkiem winylomagnezowym (Schemat 8). Reakcja była wykonana wg. metody Irleanda¹¹³ dla wrażliwych związków karbonylowych. Otrzymano pojedynczy alkohol allilowy **30** z wydajnością 83%. Następnie grupa hydroksylowa w położeniu C-6 została zabezpieczona resztą benzylową.

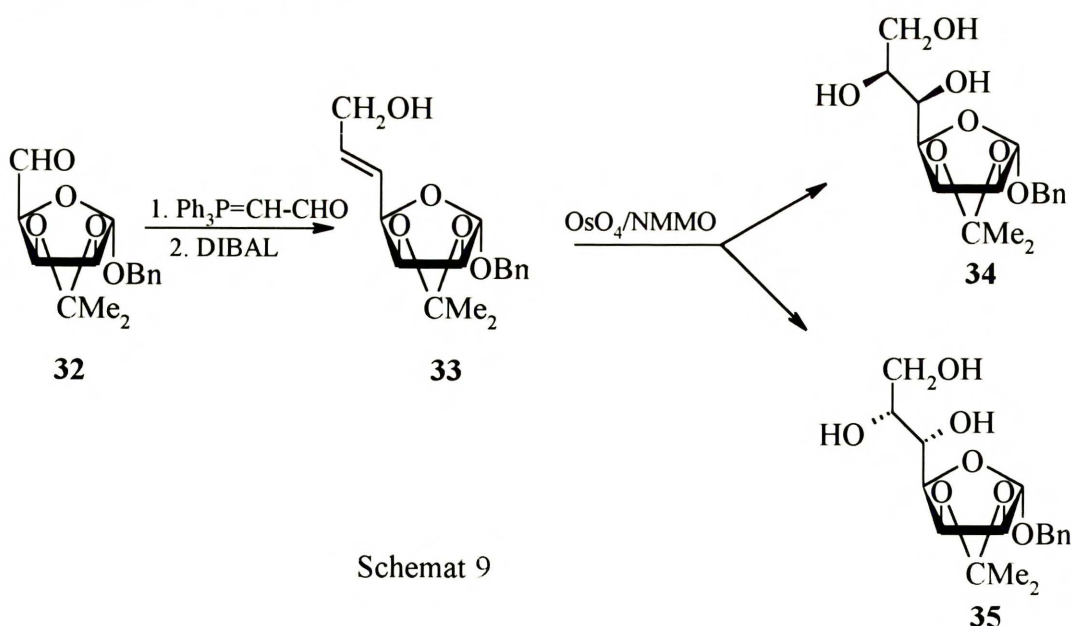


Schemat 8

Podwójne wiązanie poddano ozonolizie lub reakcji z nadjodanem sodowym w obecności tetratenu osmu, a otrzymany aldehyd bez wyodrębniania zredukowano borowodorkiem sodowym. Pochodną *L-glicero-α-D-manno-heptozy* **31** odbezpieczono. Sumaryczna wydajność procesu wynosiła 38%.

Przekształcenie olefiny do grupy hydroksymetylowej wymaga ostrych warunków, które mogą powodować usunięcie innych grup zabezpieczających.

Bimacombe i Kabir¹¹⁴ zaproponowali syntezę *LDmanHepp*, która polegała również na przedłużaniu cukru od strony końcowego atomu węgla. Substratem w tej syntezie była pochodna pięciowęglowego cukru *D-liksozy*, a elongacja łańcucha polegała na jednoczesnym dołączeniu dwóch atomów węgla (Schemat 9).



Schemat 9

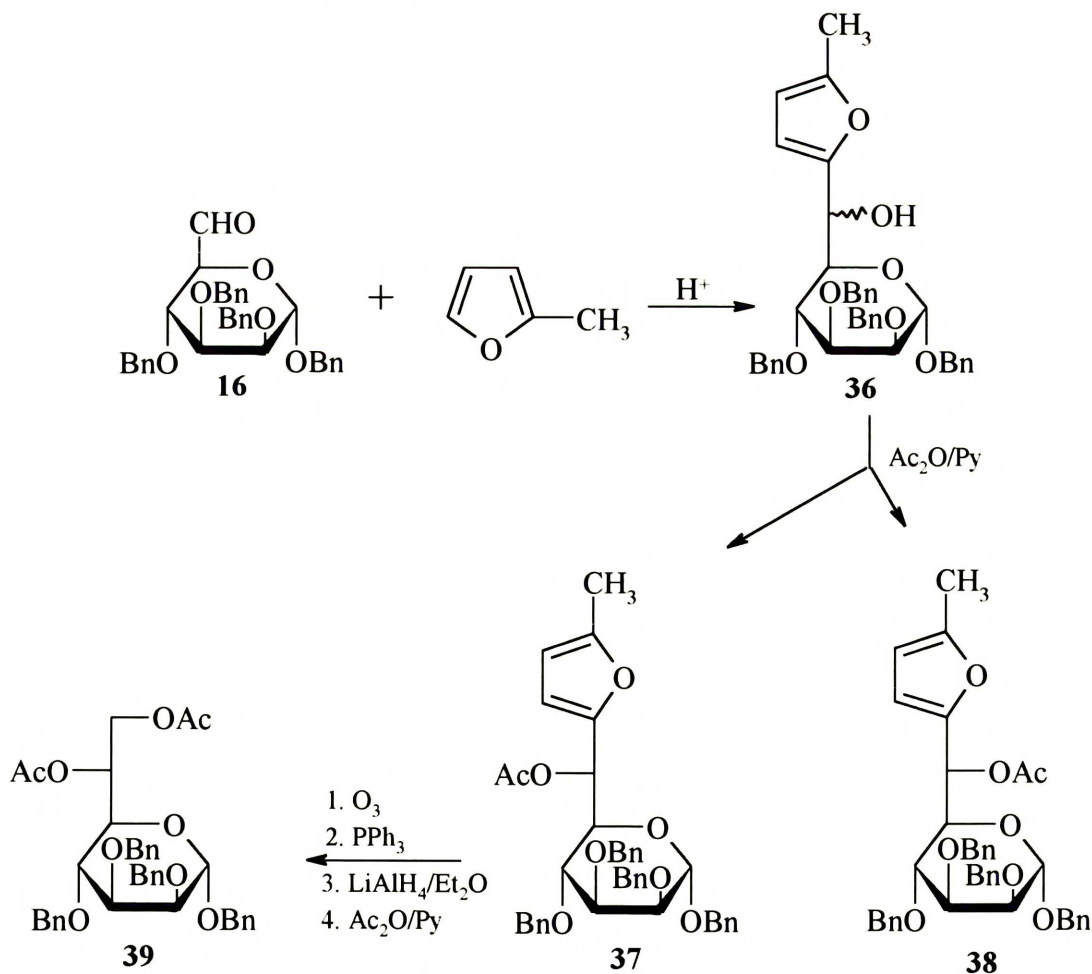
Reakcja Wittiga aldehydu liksozowego **32** z formylometylidenotrifenylofosforanem prowadziła do olefiny o konfiguracji *E*.

W wyniku redukcji otrzymano E-allilowy alkohol **33**, który poddano reakcji *cis*-hydroksylacji katalizowanej tetratlenkiem osmu i zgodnie z regułami Kishi'ego¹¹⁵ otrzymano stereoizomeryczne triole o konfiguracji *L-glicero-D-manno* **34** i *D-glicero-L-gulo* **35** w proporcji 7:1. Heptofuranozyd **34** dał się łatwo oddzielić od towarzyszącego izomeru **35** przez utworzenie krystalicznego trioctanu. Katalityczne debenzylowanie i hydroliza kwaśna związku **34** prowadziła do *L-glicero-D-manno*-heptozy (**8**).

Substratem w tej syntezie jest furanoza i aby heptoza była użyteczna w syntezie oligosacharydów trzeba ją przekształcić w wieloetapowej syntezie do formy piranozowej.

II. 2. 2. Metody syntezy *D-glicero-D-manno*-heptozy

Drugi stereoizomer, heptoza o konfiguracji *D-glicero-D-manno* był otrzymany wcześniej z *D*-altrozy metodą Kilianiego i Fishera¹¹⁶ oraz metodą Sowdena¹¹⁷.



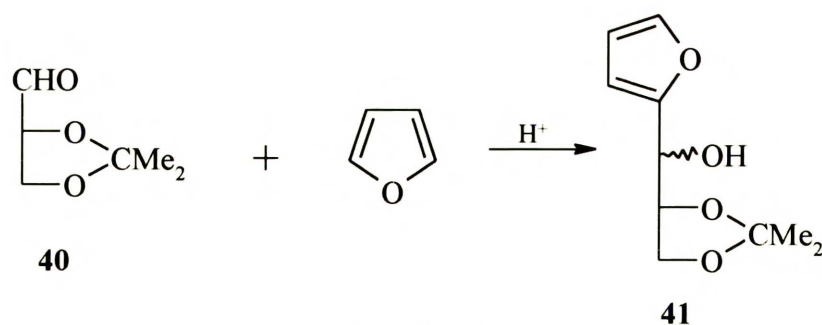
Schemat 10

Wspomniana wcześniej reakcja chlorków alkoksymetylomagnezowych z aldehydami prowadziła również do niewielkich ilości tej heptozy.

Inną metodą otrzymywania *D-glicero-D-manno*-heptozy wykorzystującą homologowanie od strony atomu węgla C-6 była reakcja aldehydu **16** z 2-metylofuranem¹⁰¹ (Schemat 10).

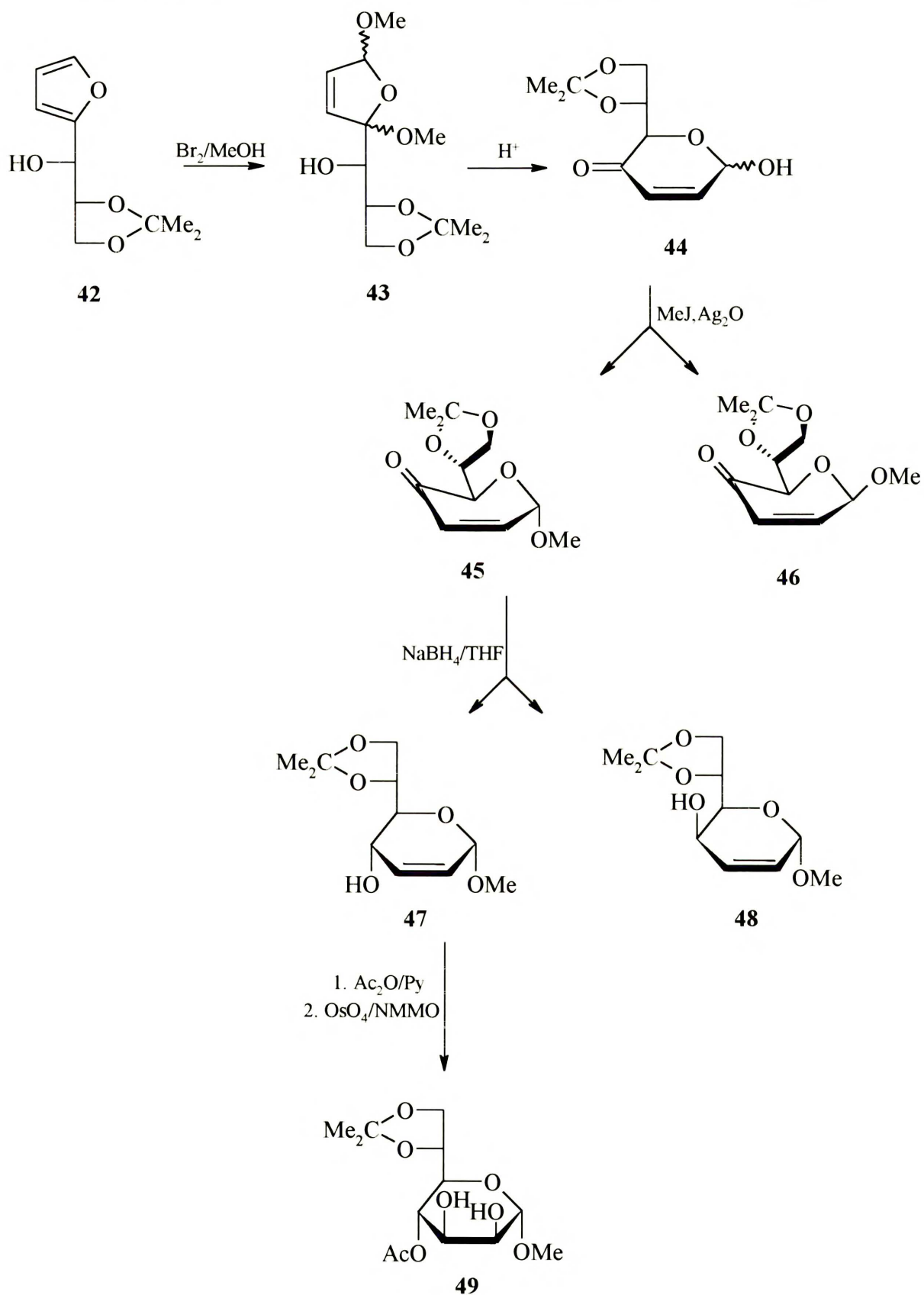
Reakcja ta prowadziła do mieszaniny diastereoizomerów **36** w proporcjach 3 : 1. Po zabezpieczeniu wolnej grupy hydroksylowej resztą acetylową produkty te zostały rozdzielone. Związek **37** poddano ozonolizie i po rozłożeniu ozonku za pomocą tifynylofosfiny otrzymany aldehyd bez wyodrębniania zredukowano do alkoholu i acetylowano otrzymując pochodną *D-glicero-D-manno*-heptozy **39**. Niska wydajność produktu **38** nie pozwalała na jego przekształcenie do *L-glicero-D-manno*-heptozy. Metoda ta nie była zbyt użyteczna ze względu na niskie wydajności reakcji kondensacji aldehydu mannozowego z 2-metylofuranem, jak również reakcji ozonolizy.

Ciekawą metodą otrzymywania *D-glicero-D-manno*-heptozy była metoda wykorzystująca substraty niecukrowe¹¹⁸. Kondensacja furanu z izopropylidenową pochodną aldehydu *D-glicerynowego* **40** prowadziła do dwóch diastereoizomerów **41** w proporcjach 85 : 15. Katalizatorem w tej reakcji był kwas chlorooctowy (Schemat 11).



Schemat 11

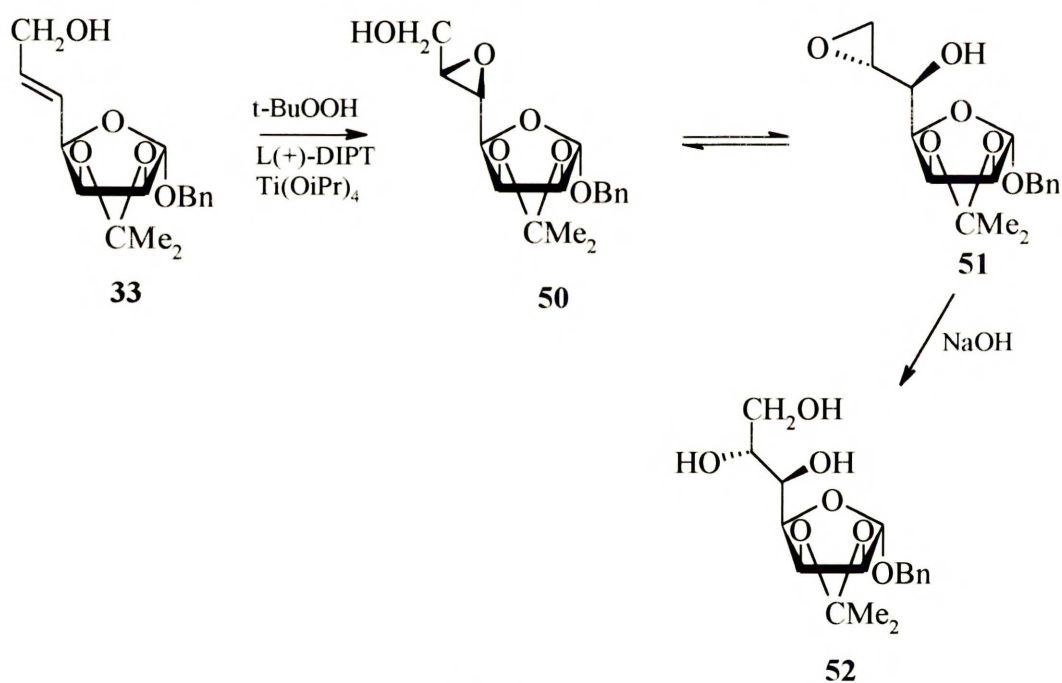
Konfiguracja absolutna R nowego centrum chiralności na atomie węgla C-1 w izomerze *erythro* została ustalona za pomocą reakcji degradacji do znanego¹¹⁹ 2-(*D-glicero*-1,2-dihydroksyetylo)furanu. Związek **42** został przekształcony za pomocą bromu w metanolu (Schemat 12) do 1-C-(2,5-dihydro-2,5-dimetoksy-2-furylo)-2,3-O-izopropylideno-*D-glicerolu* (**43**). Kwasowa hydroliza tego produktu prowadziła do ułożu **44**, która po reakcji metylowania jodkiem metylu wobec tlenku srebra dała mieszaninę dwóch anomerów **45** i **46**.



Schemat 12

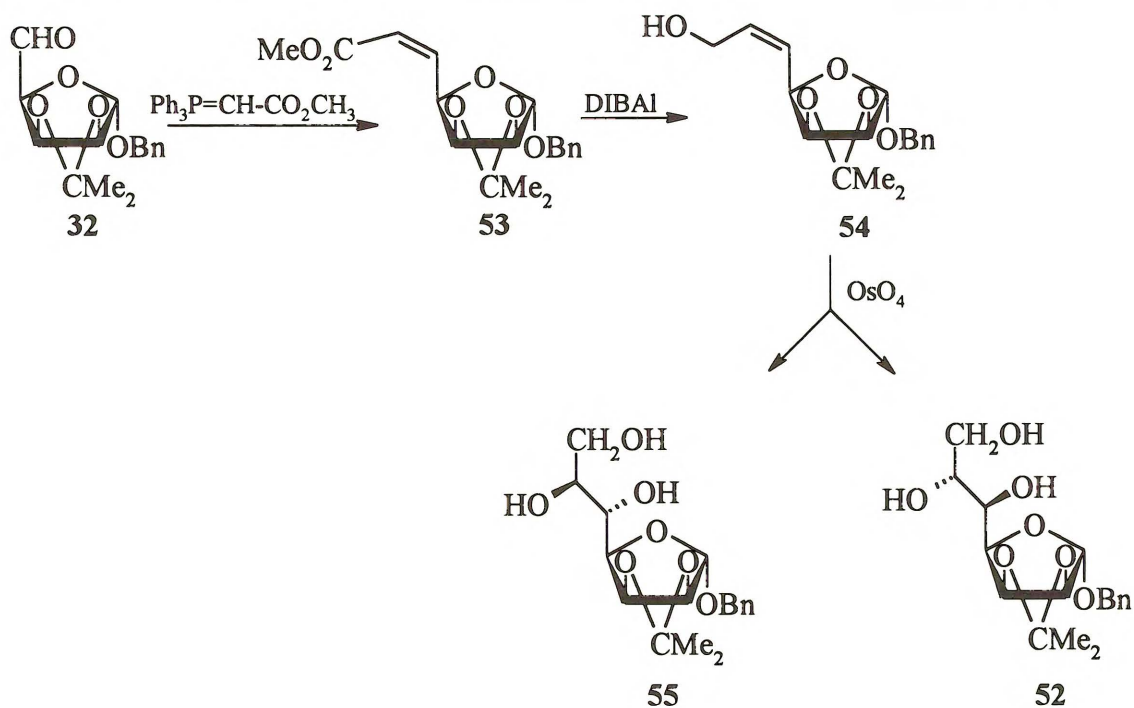
Związek **45** zredukowano borowodorkiem sodowym w tetrahydrofuranie otrzymując mieszaninę metylo 2,3-dideoksy-6,7-O-isopropylideno- α -D-rybo (**47**) i -arabino-hept-2-enopiranozydu (**48**) w proporcji 5 : 1. Związek **47** po acetylowaniu poddano reakcji *cis* hydroksylacji tetratlenkiem osmu wobec katalitycznych ilości N-tlenku-N-metylomorfoliny otrzymując metylo 4-O-acetylo-6,7-O-izopropylideno- α -D-glicero-D-manno-heptopiranozyd (**49**). Po hydrolizie grup zabezpieczających otrzymano heptozę o konfiguracji D-glicero-D-manno.

Metodą Brimacombe¹¹⁴ można również otrzymać heptozę o konfiguracji D-glicero-D-manno przy zastosowaniu innej metody funkcjonalizacji podwójnego wiązania w E-olefinie **33**. Reakcja epoksydowania Sharplessa tego związku (Schemat 13) [t-BuOOH-L(+)-winian dizopropylowy Ti(OiPr)₄], a następnie hydroliza otrzymanego epoksydu za pomocą wodorotlenku sodowego prowadziła do heptozy o konfiguracji D-glicero-D-manno **52**.



Schemat 13

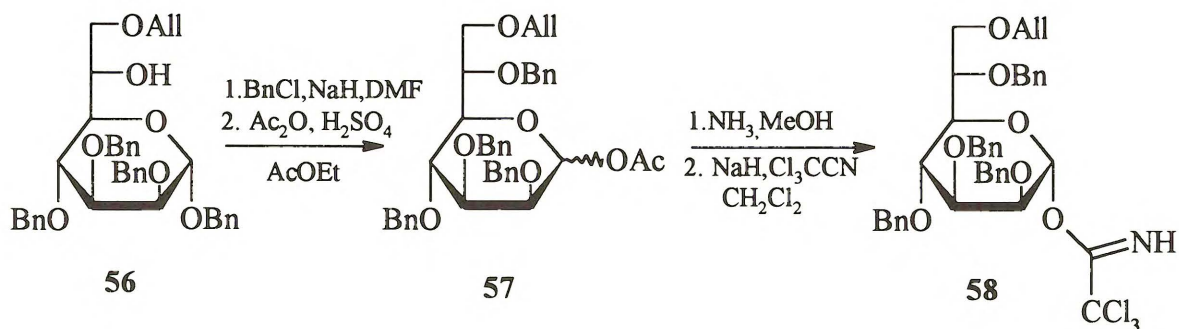
Zastosowanie [(metkocykarbonylometylideno)trifenylfosforanu], innego odczynnika Wittiga (Schemat 14) do reakcji z aldehydem liksozowym **32**¹²⁰ prowadziło do olefiny Z **53**. Redukcja wodorkiem diizobutyloglinowym dała benzylo (Z) 5,6-dideoksy-2,3-O-izopropylideno- α -D-likso-hept-5-enofuranozyd **54**. Katalityczna *cis*-hydroksylacja tetratlenkiem osmu dała mieszaninę heptofuranozydów o konfiguracji D-glicero-D-manno **52** i L-glicero-L-gulo **55** w proporcjach 6 : 1.



Schemat 14

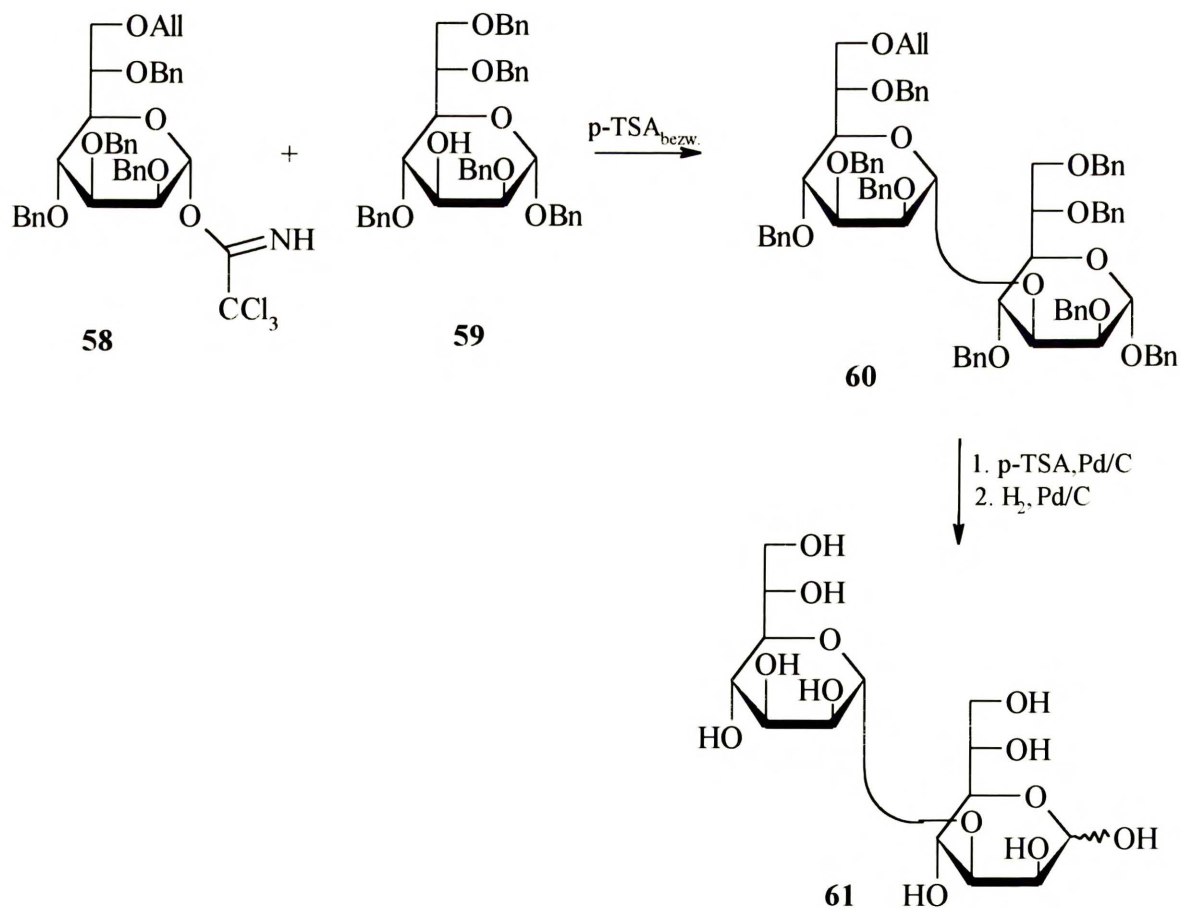
II. 2. 3. Synteza oligosacharydów heptozowych

Po opracowaniu dogodnych metod syntezy *L-glicero-D-manno*-heptozy rozpoczęły się badania nad syntezą fragmentów rdzenia wewnętrzznego lipopolisacharydów, w którym jak już wcześniej wspomniano, głównymi składnikami są oligosacharydy *L-glicero-D-manno*-heptozy. Jednym z najczęściej występujących połączeń w lipopolisacharydach bakterii Gram-ujemnych jest disacharyd złożony z dwóch jednostek *L-glicero-D-manno*-heptozy połączonych wiązaniem α(1-3).



Schemat 15

Przeprowadzono¹⁰² syntezę tego disacharydu specyficznego dla regionu rdzeniowego bakterii *Neisseria meningitidis*. Preferencyjne tworzenie wiązania glikozydowego o konfiguracji α w metodzie trichloroacetiminowej Schmidta¹²¹, jak również stabilność trichloroacetimin glikozydowych miały decydujący wpływ na wybór tej metody kondensacji. Czynniki glikozylujący były otrzymane w następujący sposób (Schemat 15). Pochodną L-glicero-D-manno-heptozy **56**, otrzymaną w reakcji Grignarda-Sommeleta z aldehydu **16** i chlorku alliloksymetylomagnezowego, poddano benzylowaniu, a następnie przeprowadzono reakcję acetolizy otrzymując 1-O-acetylową pochodną **57**. Łagodna hydroliza grupy 1-OAc amoniakiem w metanolu, a następnie reakcja z trichloroacetonitrylem prowadziły do trichloroacetiminoeteru **58** z wydajnością 90%. Kondensacja **58** wobec bezwodnego kwasu p-toluenosulfonowego (p-TSA) z wcześniej przygotowaną pochodną heptozy **59** mającą wolną grupę hydroksylową w położeniu C-3 prowadziła do disacharydu **60** (50%) (Schemat 16).

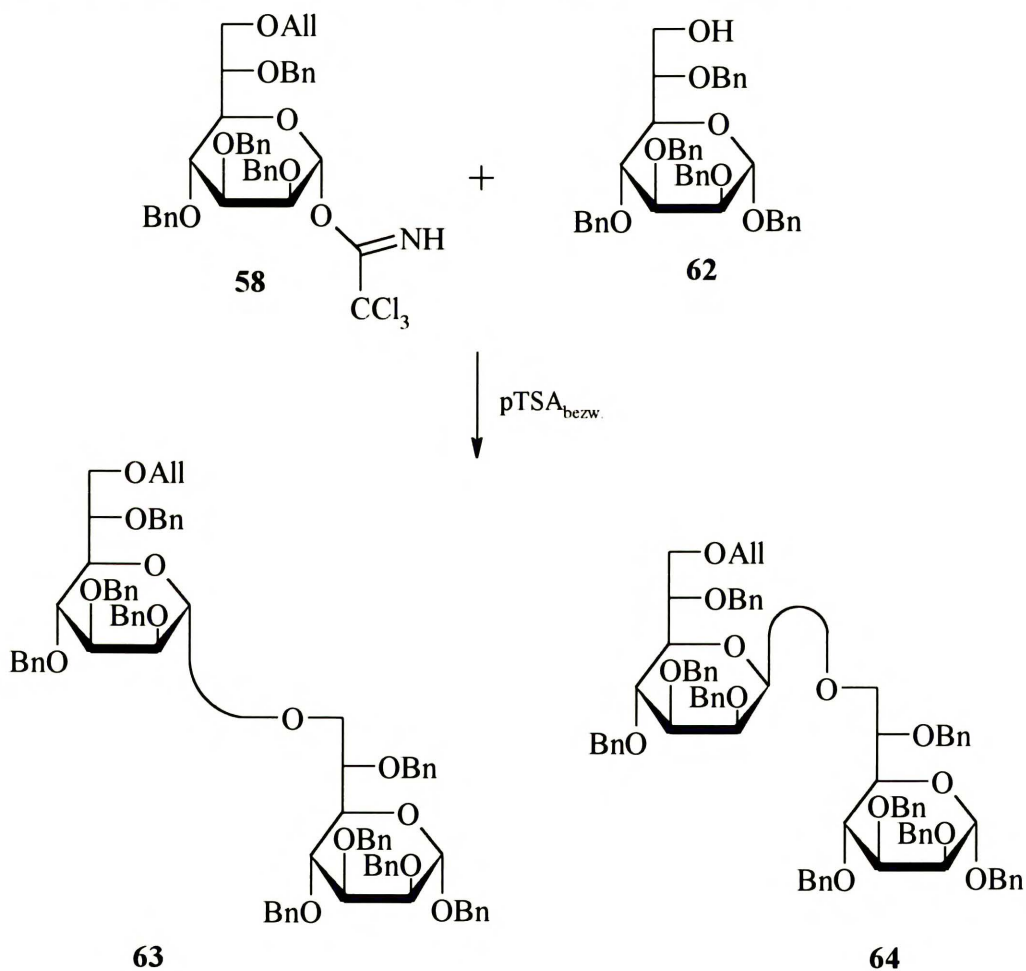


Schemat 16

W reakcji tej powstaje tylko anomer α . Usunięcie grup zabezpieczających tzn. deallilowanie, a następnie uwodorowanie dały właściwy disacharyd **61**.

Następnym disacharydem, który został zsyntetyzowany tą samą metodą był disacharyd złożony z dwóch jednostek *L-glicero-D-manno*-heptozy połączonych wiązaniem $\alpha(1-7)$.

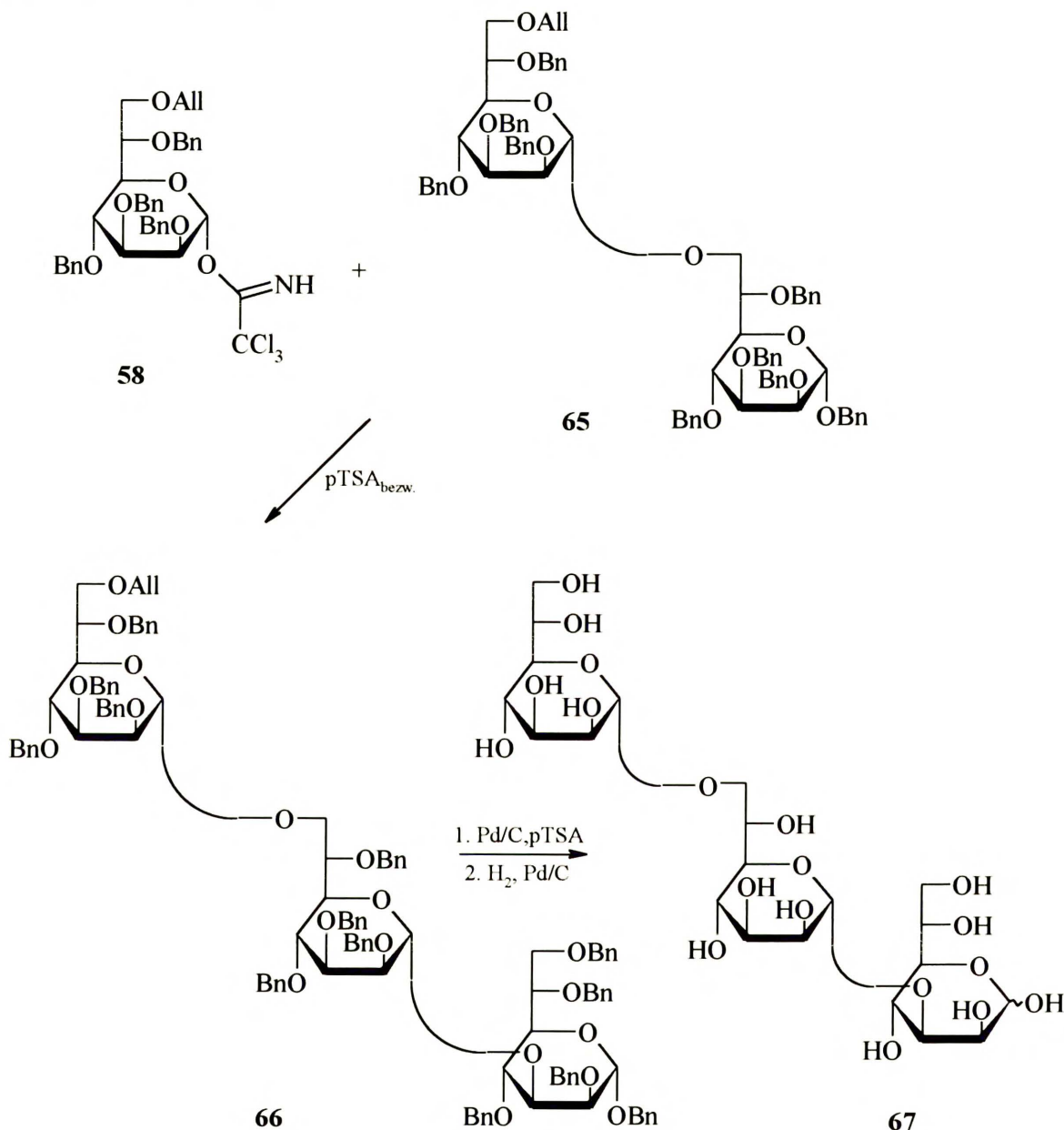
Heptozą mającą wolną grupę hydroksylową w położeniu C-7 **62** została skondensowana z trichloroacetiminoeterem **58** wobec bezwodnego kwasu p-toluenosulfonowego (Schemat 17). W tej samej reakcji otrzymano dwa disacharydy **63** i **64** różniące się konfiguracją wiązania glikozydowego w proporcji 3.5 : 1. Wydajność reakcji kondensacji wynosiła 98%.



Schemat 17

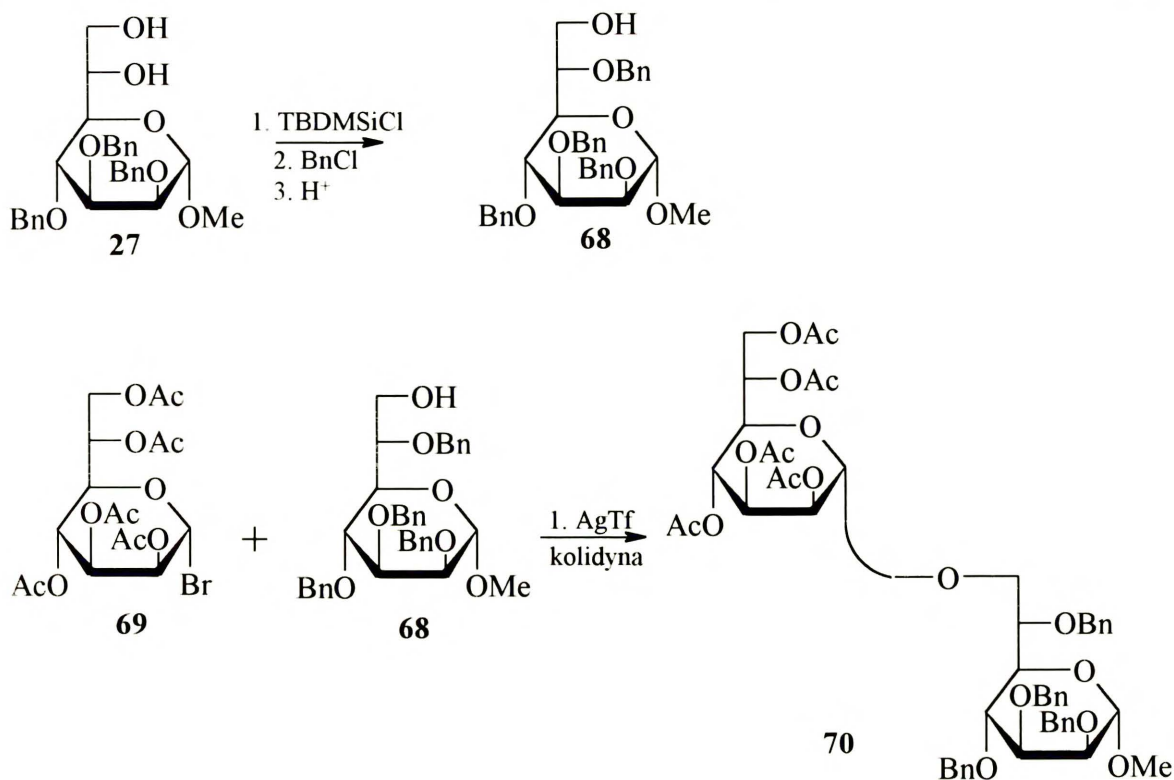
Metoda trichloroacetiminowa była wykorzystana również do syntezy¹⁰² najbardziej rozpowszechnionego trisacharydu złożonego z trzech jednostek *L-glicero-D-manno*-heptozy i połączonego wiązaniami $\alpha(1-7)$ i $\alpha(1-3)$ (Schemat 18). Kondensacja trichloroacetiminoeteru **58** z disacharydem **65** mającym wolną grupę hydroksylową w położeniu C-7 prowadziła do tylko jednego trisacharydu **66** (52%), który po deallilowaniu i hydrogenolizie dał trisacharyd **67**

występujący w rdzeniu wewnętrznym lipopolisacharydów wyizolowanych z całej rodziny bakterii *Enterobacteriaceae*.



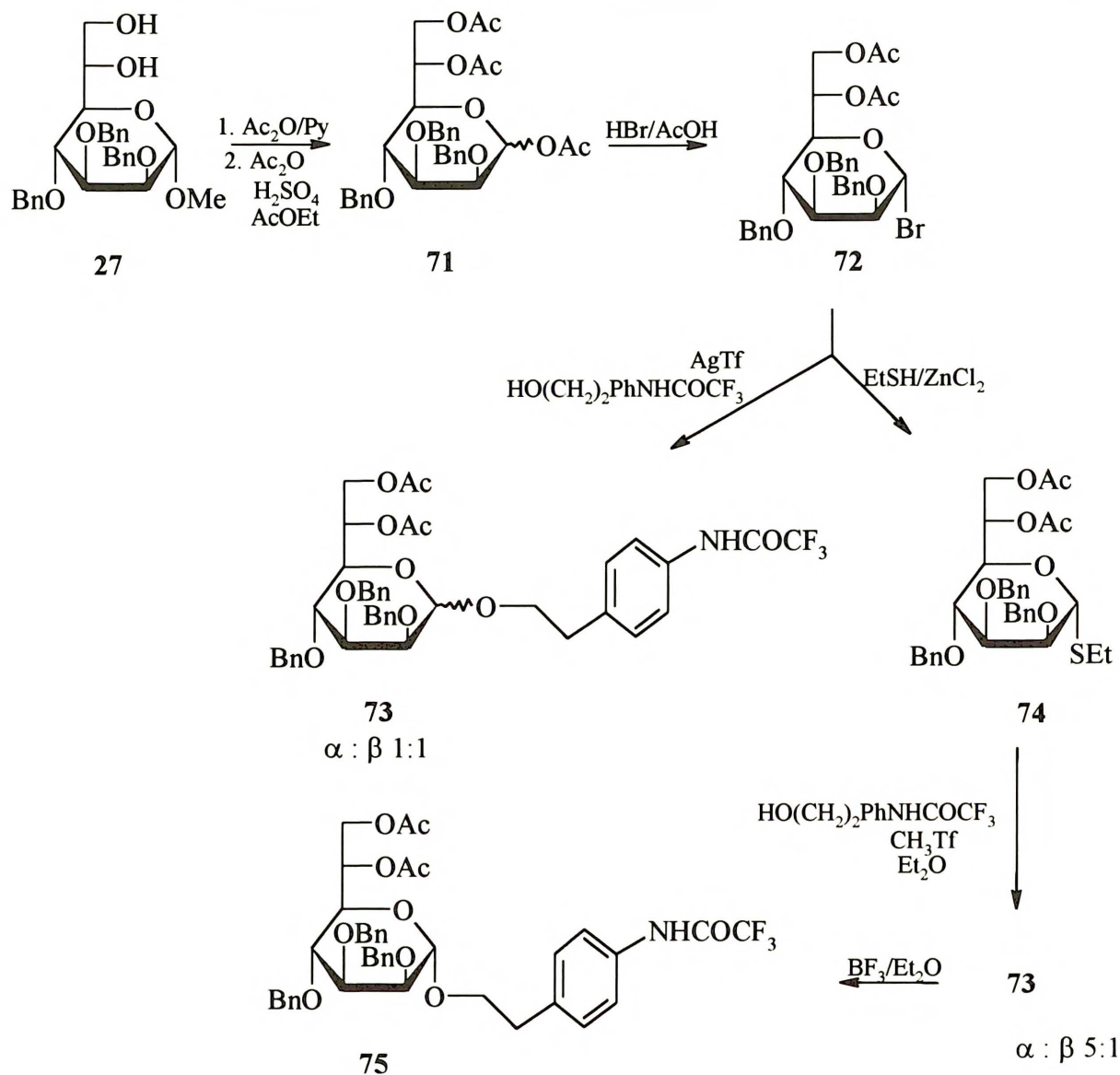
Schemat 18

Disacharyd połączony wiązaniem $\alpha(1-7)$ został zsyntetyzowany również inną metodą¹²². Kondensacja bromku peracetylowanej heptozy 69 z drugą jednostką heptozy mającą wolną grupę hydroksylową w położeniu C-7 68 wobec tryfluoroborohydrydu i kolidyny prowadziła do disacharydu $\alpha(1-7)$ 70. W zależności od ilości zastosowanej kolidyny głównym produktem był ortoester, lub otrzymywano mieszaninę produktów (Schemat 19).



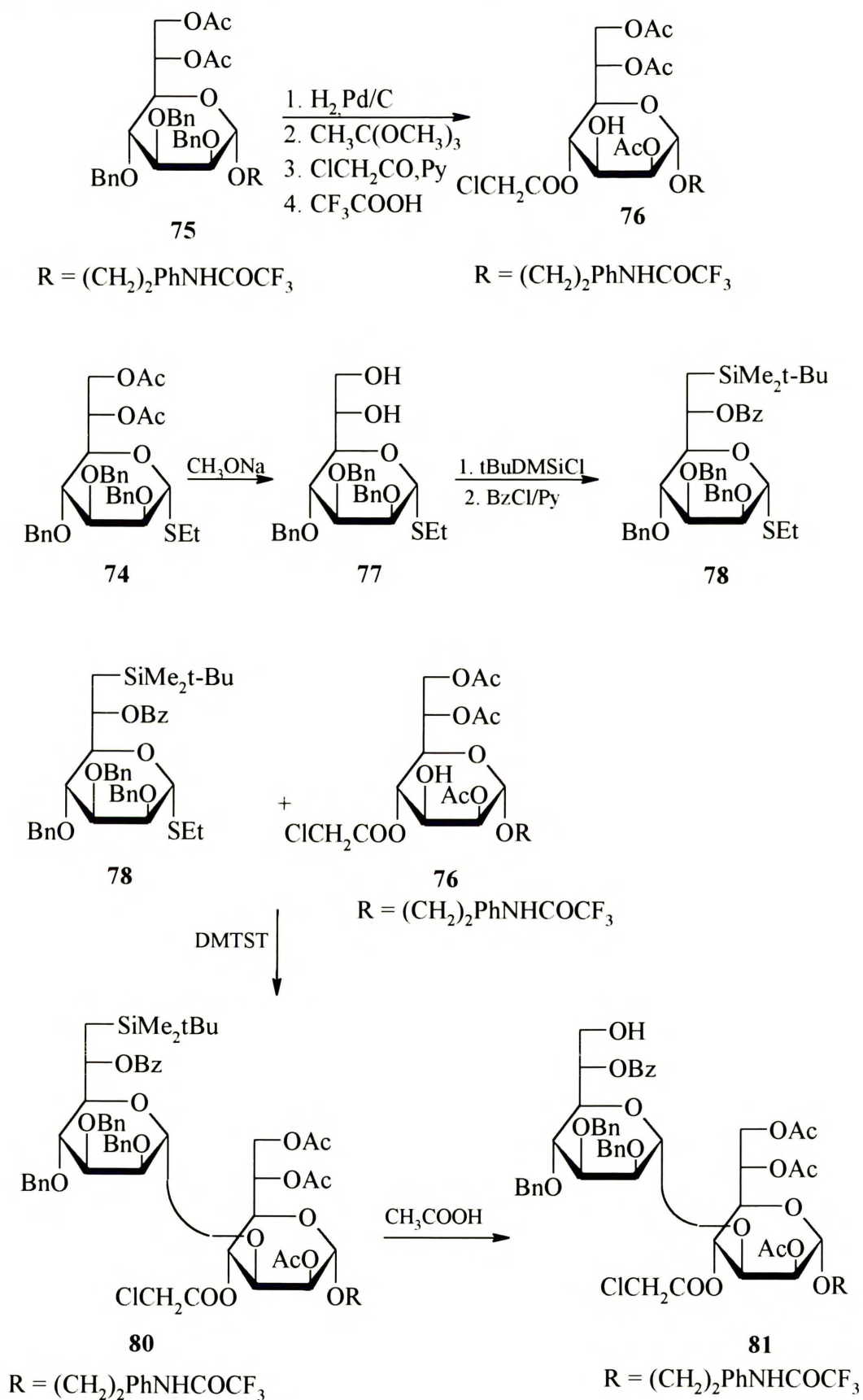
Schemat 19

Najczęściej występujący w rdzeniu bakteryjnym trisacharyd złożony z trzech jednostek *L-glicero-D-manno*-heptozy został zsyntetyzowany również inną drogą¹²³. Pochodna heptozy 27 po acetylowaniu została poddana łagodnej acetolizie dając 71. Reakcja z bromowodorem w kwasie octowym prowadziła do bromku 72. Następnie dołączono *spacer*, którym był 2-(4-trifluoroacetamidofenyl)etanol otrzymując związek 73 (Schemat 20). Reakcja była szybka i wysokowydajna, lecz jej stereoselektywność była niska, otrzymano dwa anomery w proporcjach $\alpha:\beta$ 1:1. Zmieniono więc metodę syntezy związku 75. Z bromku 72 otrzymano tioglikozyd 74, który kondensowano z 2-(4-trifluoroacetamidofenyl)etanolem w obecności tryflanu metylu¹²⁴. Uzyskano wyższą stereoselektywność reakcji $\alpha : \beta$ 5 : 1, a wydajność pożądanego glikozydu wynosiła 55%.



Schemat 20

Zmieniając promotor na reakcji na N-jodosucinimid(NIS)/tryflan srebra otrzymano lepszą wydajność lecz niższą stereoselektywność. Najlepszą wydajność α -glikozydu **75** (70% otrzymano działając na mieszaninę anomerów α,β eteratem trifluorku boru w acetonitrylu, aby zmienić konfigurację na węglu anomerycznym w związku β . Katalityczna hydrogenoliza **75** da 2,3,4-triol (Schemat 21), który poddano reakcji z ortoocetanem trimetylowym wobec pTS otrzymując 2,3-ortoester. Grupę hydroksylową w położeniu C-4 zabezpieczono resz chloroacetylową, a następnie potraktowano ortoester¹²⁵ wodnym roztworem kwasu trifluoroctowego otrzymując pochodną **76** z wolną grupą hydroksylową w położeniu C-3.

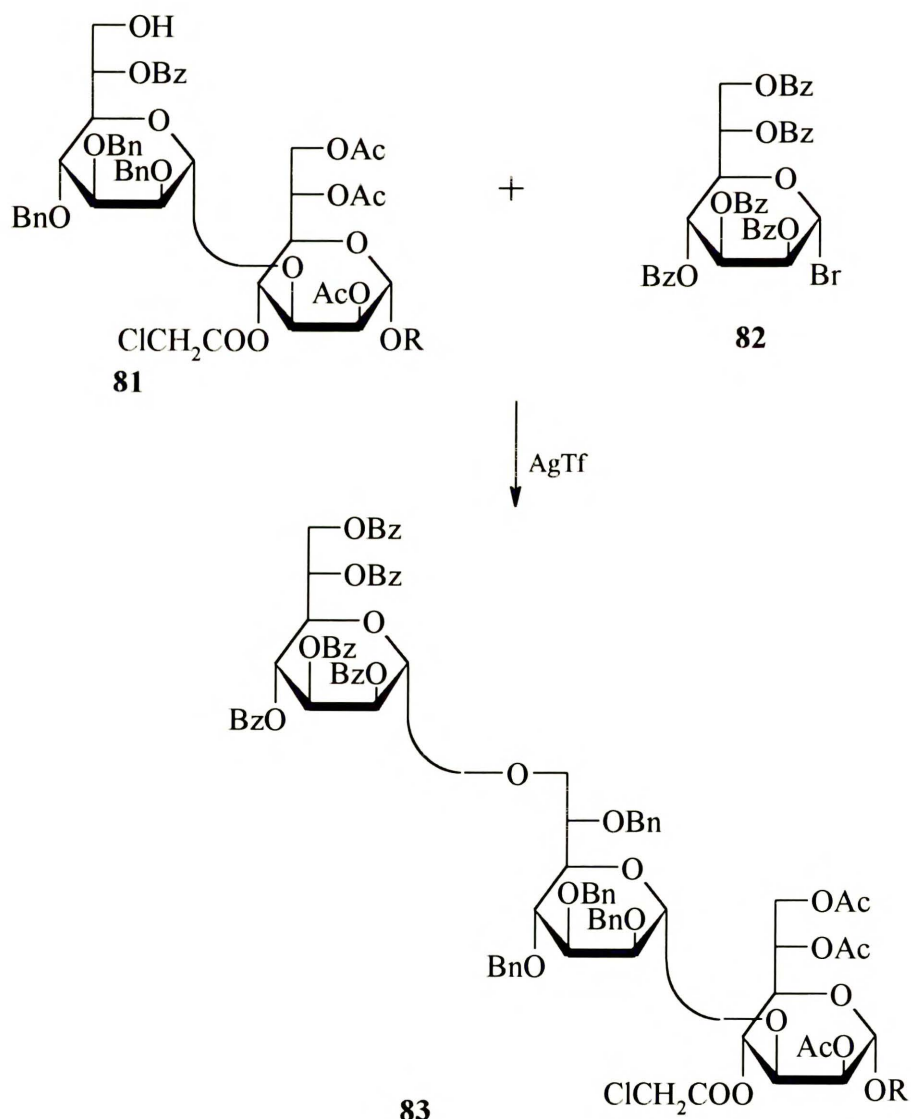


Schemat 21

Hydroliza grup acetylowych w tioglikozydzie **74** dała 6,7-diol **77** (Schemat 21). Następnie I-rzędową grupę hydroksylową zabezpieczono selektywnie resztą tert-butyldimetylosilylową, a po benzoilowaniu otrzymano donor glikozytowy **78**.

Reakcja glikozydowania wobec tryfanu dimetylo(metylotio)sulfonowego (DMTST) dała disacharyd **80** (73%) (Schemat 21). W tej reakcji otrzymano wyłącznie anomer α . Grupa silylowa została usunięta wodnym roztworem kwasu octowego i otrzymano związek **81** z wolną grupą hydroksylową w położeniu C-7.

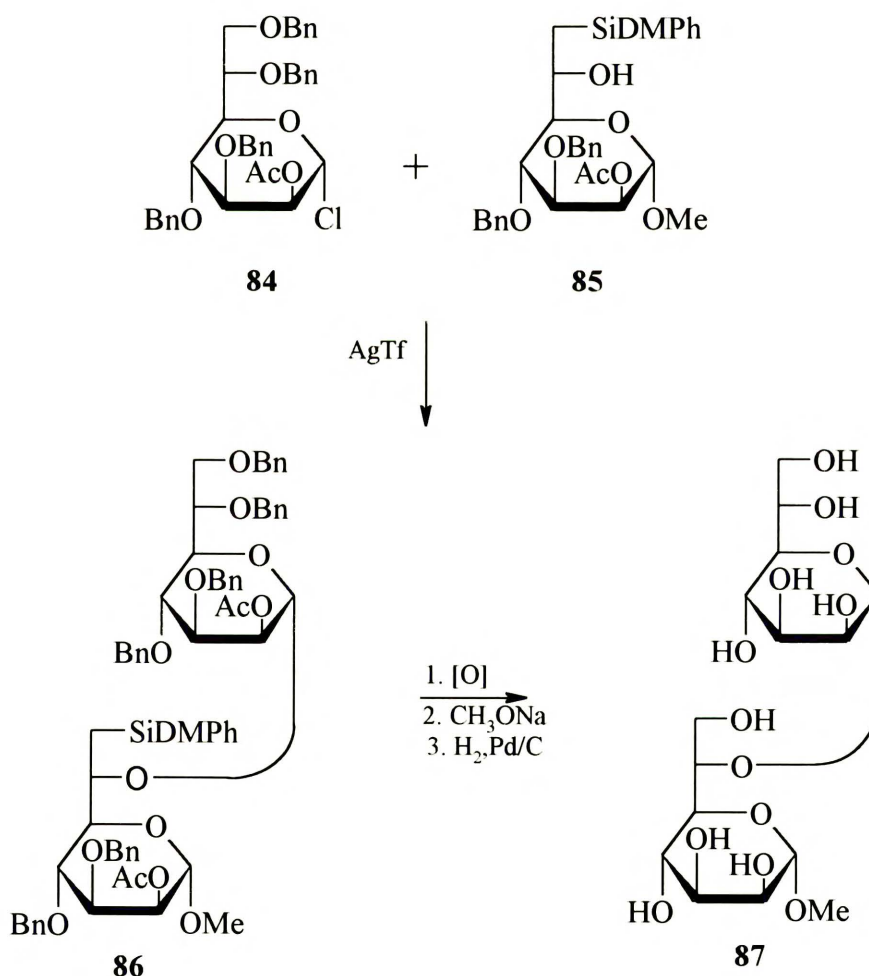
Kondensacja **81** z bromkiem 2,3,4,6,7 penta-O-acetylo-L-glicero- α -D-mannoheptopiranozyowym¹²⁶ (**69**) wobec tryfanu srebra dała skomplikowaną mieszaninę produktów.



Schemat 22

Zastosowanie do tej reakcji zamiast bromku glikozyłowego acetylowanego tioglikozydu prowadziło głównie do ortoestrów. Dopiero zamiana grup acetylowych na grupy benzoilowe w donorze glikozydowym doprowadziła do trisacharydu **83** (Schemat 22), a hydrogenoliza i odblokowanie grup estrowych dała właściwy trisacharyd zawierający *spacer*, czyli odpowiednio przygotowany do połączenia z białkiem.

Przeprowadzono syntezę¹²⁷ disacharydu złożonego z dwóch jednostek L-glicero-D-manno-heptozy połączonych wiązaniem $\alpha(1-6)$ glikozydowym. Disacharyd ten występuje w regionie rdzenia wewnętrznego wyizolowanego z LPS bakterii *Aeromonas hydrophila*. (Schemat 23).

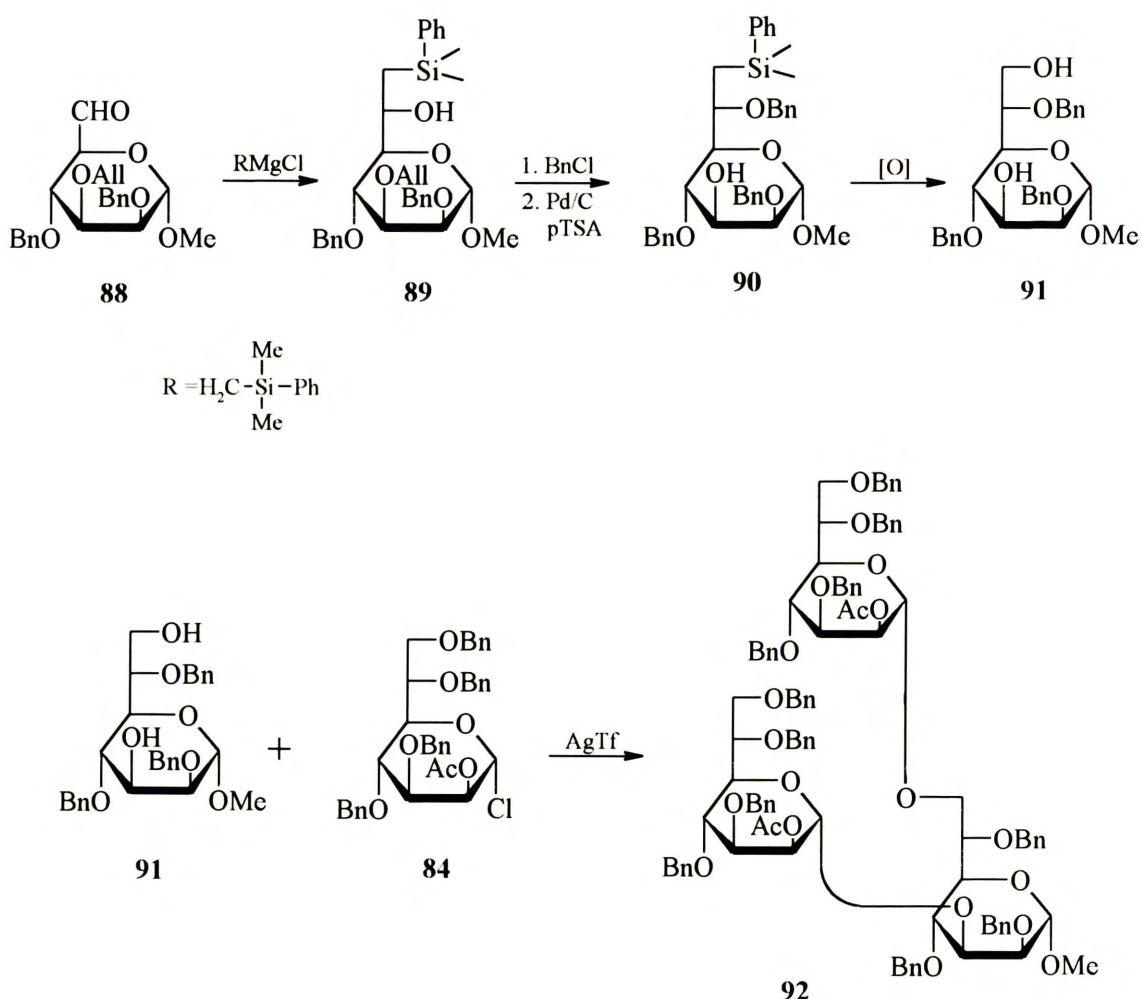


Schemat 23

Donorem był chlorek heptozyłowy posiadający grupę acetylową w położeniu C-2 **84**, który połączono z akceptorem glikozyłowym **85**, pochodną heptozy mającą wolną grupę

hydroksylową w położeniu C-6. Reakcja była katalizowana tryflanem srebra. W czasie kondensacji oprócz właściwego disacharydu powstawał również produkt eliminacji Petersona. Użycie suchego i wysokiej jakości tryfluenu prowadziło do otrzymania całkowicie zabezpieczonego disacharydu z wydajnością 45%. Przekształcenie grupy silylowej w hydroksymetylową, a następnie deacetylowanie i hydrogenoliza dały disacharyd **87**.

Zsyntezowano¹²⁸ rozgałęziony trisacharyd w którym centralna jednostka LD*man*Hepp połączona jest z dwiema resztami heptozowymi w pozycji $\alpha(1-3)$ i $\alpha(1-7)$.



Schemat 24

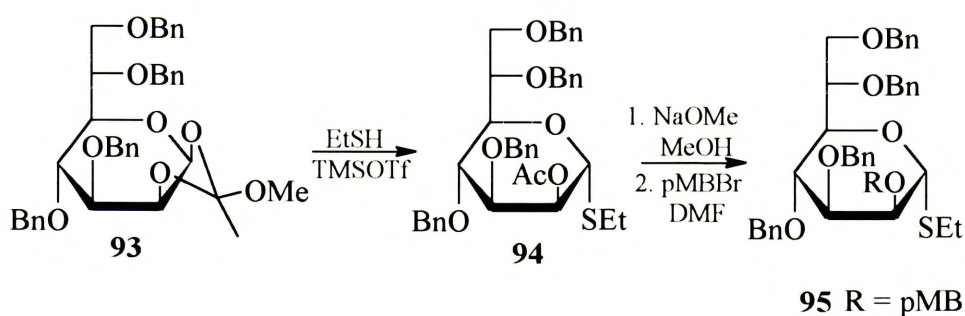
Trisacharyd ten, jak również jego partner w formie liniowej może występować w rdzeniu wewnętrznym lipopolisacharydów bakterii *Citrobacter* PCM 1487. Nie jest pewne czy heptozą III

jest połączona z heptozą I czy z heptozą II tak jak we wszystkich bakteriach z rodziny *Enterobacteriaceae*. Cykl reakcji wyglądał następująco (Schemat 24).

Przeprowadzono reakcję Grignarda aldehydu mannozowego **88** z chlorkiem dimetylo(fenylosilylo)metylomagnezowym i otrzymano pochodną silylową heptozy **89**. Związek ten poddano reakcji benzylowania, a następnie usunięto grupę allilową otrzymując **90**. W trakcie reakcji odblokowania otrzymano ok.6% produktu eliminacji Petersona. Akceptor glikozylowy otrzymano ze związku **90** utleniając grupę dimetylofenylosililową (PDMSi) metodą Fleminga¹¹¹. Chlorek heptozylowy **84** zsyntetyzowano podobnie jak Paulsen¹²⁶. Kondensacja związku **91** z nadmiarem donora **84** w warunkach opisanych przez Hanessiana i Banouba¹²⁹ prowadziła do trisacharydu **92** z 71% wydajnością. Deacetylowanie i hydrogenoliza dały właściwy związek, którego struktura została potwierdzona przez homo i heteronuklearne widma korelacyjne NMR.

Ostatnio została zsyntetyzowana¹³⁰ część heptozowa rdzenia wewnętrznego występującego w lipopolisacharydach bakterii *Haemophilus influenzae*. Trisacharyd znajdujący się w tym rdzeniu jest złożony z trzech jednostek *L-glicero-D-manno-heptozy* połączonych wiązaniami $\alpha(1-2)$ i $\alpha(1-3)$.

Reakcja pochodnej **93**¹²⁶ w obecności dużych ilości merkaptanu etylowego i tryfluanu trimetylosililowego prowadziła do 2-O-acetylowanego tioglikozydu **94** z wydajnością 76%. W celu uzyskania odpowiedniego donora glikozydowego **95**, ze związku **94** usunięto reszty acetylowe, a następnie w położeniu C-2 wprowadzono grupę p-metoksybenzylową (Schemat 25).

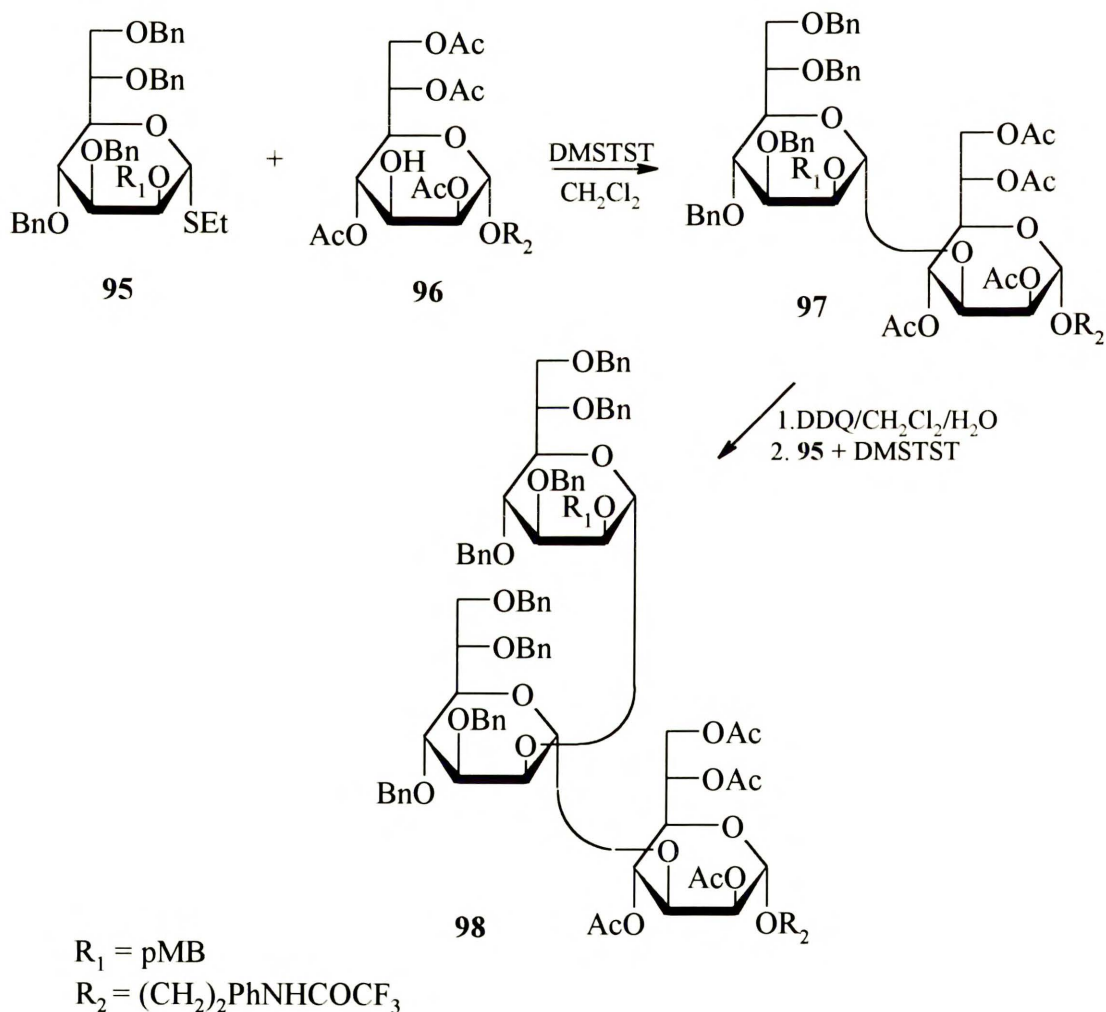


Schemat 25

Kondensacja tioglikozydu **95** z resztą *L-glicero-D-manno-heptozy* posiadającą wolną grupę hydroksylową w położeniu C-3 **96**¹³¹ wobec DMTST jako katalizatora prowadziła do

disacharydu **97** (89%) Usunięcie grupy p-metoksybenzylowej za pomocą 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzochinonu (DDQ) ze związku **97** (Schemat 26) dało nowy akceptor. Ponowna reakcja z tioglikozydem heptozylowym **95**, w takich samych warunkach jak poprzednio (DMTST) prowadziła do właściwego łańcucha trisacharydowego **98** z wydajnością 89%.

Hydrolityczne usunięcie grup zabezpieczających, a następnie deacetylowanie metodą Zemplena dało trisacharyd przygotowany do połączenia z białkiem. W obu reakcjach kondensacji otrzymano wyłącznie wiązanie o konfiguracji α .



Schemat 26

Oprócz oligosacharydów złożonych wyłącznie z jednostek *L-glicero-D-manno*-heptozy do tej pory zostały zsyntetyzowane również takie fragmenty rdzenia wewnętrznej bakterii, w

których heptoza lub oligosacharyd heptozowy jest połączony z resztami heksozowymi.^{122,130,131,132} Przeprowadzono również syntezy, w których oligosacharyd heptozowy jest połączony z Kdo^{133,134,135}.

Dopiero prosta i wysokowydajna synteza *L-glicero-D-manno*-heptozy poprzez reakcję Grignarda stworzyła szerokie możliwości syntezy fragmentów rdzenia wewnętrznego wyizolowanych z lipopolisacharydów. Do tej pory zostały zsyntetyzowane fragmenty rdzenia wewnętrznego występujące w bakteriach *Salmonella*, *Citrobacter*, *Neisseria* i *Haemophilus*. Synteza oligosacharydów była tak zaplanowana, aby były one przygotowane do połączenia z białkiem. Mając opracowaną dobrą metodę syntezy *L-glicero-D-manno*-heptozy można przeprowadzić syntezę wszystkich fragmentów rdzenia wewnętrznego wyizolowanych z lipopolisacharydów różnych bakterii.

III BADANIA WŁASNE

III. 1. Synteza

1. 1. Synteza „uniwersalnej” pochodnej L-glicero-D-manno-heptozy.

Fosforany cukrowe są powszechnie znanymi związkami przejściowymi w wielu procesach biologicznych, dlatego ich synteza jest interesująca i ważna.

Do tej pory zrealizowano wiele syntez tych związków¹³⁶⁻¹⁴². Zsyntetyzowano jednak tylko kilka fosforanów L-glicero-D-manno-heptozy: 1-fosforan LDmanHepp⁹⁹, 7-fosforan DLmanHepp¹⁴³ (enancjomer naturalnej LDmanHepp) oraz pochodne disacharydu złożonego z dwóch jednostek LDmanHepp połączonych wiązaniem $\alpha(1,3)$. 7'-(2-aminoetylofosforan)¹⁴⁴, 4 lub 4' fosforan i 4,4' difosforan¹⁴⁵.

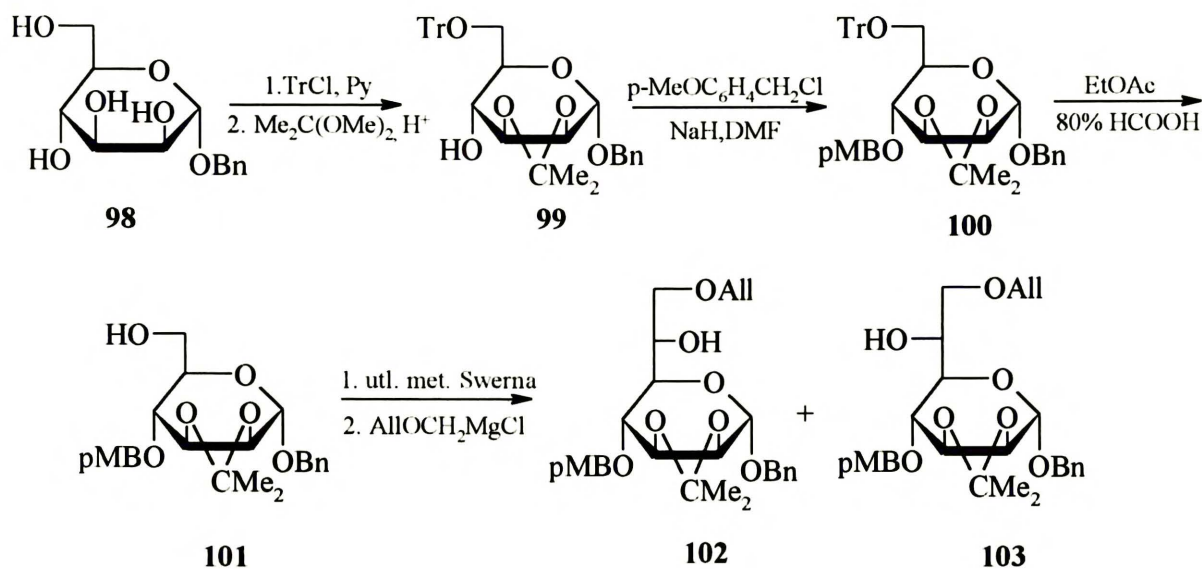
Aby zbadać zachowanie się fosforanów L-glicero-D-manno-heptozy w warunkach eksperymentalnych stosowanych w analizie strukturalnej lipopolisacharydów podjęłam syntezę modelowych monofosforanów tego cukru podstawionych w pozycjach 2, 3, 4, 6 i 7.

Do syntezy układu L-glicero-D-manno-heptozy zastosowałam metodę wykorzystującą dobudowanie grupy CH₂OR w łańcuchu D-mannozy opracowaną wcześniej w naszym laboratorium¹⁰¹ (patrz rozdział II). Metoda elongacji od strony atomu węgla C-6 umożliwia zastosowanie różnego rodzaju grup zabezpieczających, które są wprowadzone do cząsteczki D-mannopiranozy przed reakcją homologowania.

W celu wprowadzenia reszt fosforanowych do poszczególnych grup hydroksylowych należało tak dobrać grupy zabezpieczające, aby można je było odblokować selektywnie przed kolejną reakcją np. glikozydowania. Opracowałam metodę syntezy tzw. „uniwersalnej” pochodnej heptozy¹⁴⁶, która pozwala na odblokowanie pożądaných grup hydroksylowych pojedynczo, przy pozostawieniu innych zabezpieczeń.

Związkiem wyjściowym był benzylo α -D-mannopiranozyd (**98**) (Schemat 27). Reakcja z trifenylchlorometanem w pirydynie, a następnie izopropylidenowanie dały benzylo 2,3-O-izopropylideno-6-O-trytylo- α -D-mannopiranozyd (**99**) (84%).

Grupa izopropylidenowa została wprowadzona w reakcji z 2,2-dimetoksypropanem wobec katalitycznych ilości kwasu p-toluenosulfonowego. Dodanie większych ilości kwasu powodowało usunięcie grupy trifenylmetylowej i utworzenie podwójnego acetalu. W przewodzie powstawał wówczas benzylo 2,3:4,6-di-O-izopropylideno- α -D-mannopiranozyd.



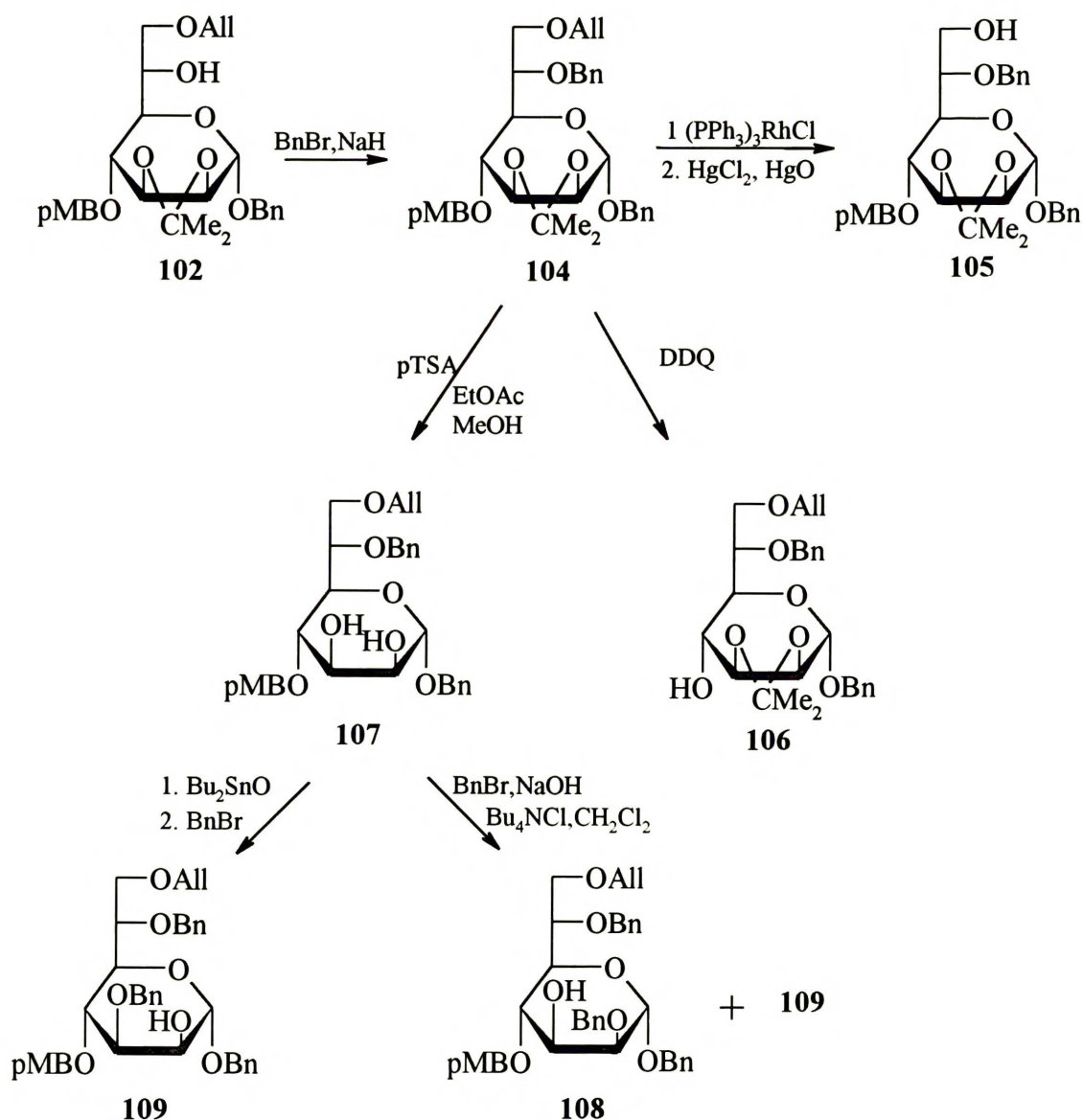
Schemat 27.

Jako podstawnik zabezpieczający grupę hydroksylową w położeniu C-4 wybrałam resztę p-metoksybenzylową (pMB), która jest usuwalna w warunkach utleniających. Może ona być zastosowana w obecności grup blokujących obecnych już w cząsteczce mannopiranozydu, a usuwanych w inny sposób. Po zabezpieczeniu pozycji 4 związek **100** poddałam reakcji detrytylowania. Ponieważ w cząsteczce oprócz reszty trifenylometrylowej, znajdowała się również kwasowo-labilna grupa izopropylidenowa, niezbędne było przeprowadzenie kilku prób odbezpieczenia. W niektórych reakcjach (50% kwas octowy, p-TSA, PPTS) usuwane były obydwie kwasowo-labilne grupy zabezpieczające. Natomiast w reakcji w eterze etylowym z dodatkiem kwasu mrówkowego¹⁴⁷ uległa odszczepieniu grupa trifenylometrylowa i p-metoksybenzylowa. Najlepsze rezultaty otrzymałam prowadząc reakcję deprotekcji związku **100** w mieszaninie rozpuszczalników octan etylu-kwas mrówkowy 1.4 : 1. Reakcja przebiegała w ciągu jednej godziny w temperaturze pokojowej i z wydajnością 60% otrzymywałam **101**. Związek ten został utleniony metodą Swerna¹⁴⁸ do aldehydu, który po dokładnym osuszeniu był użyty bez dodatkowego oczyszczania do reakcji elongacji. Użycie chlorku alliloksymetylomagnezowego do reakcji Grignarda-Sommeleta prowadziło w jednym etapie do heptozy posiadającej resztę allilową w położeniu C-7. W reakcji homologowania powstały dwie stereoisomeryczne heptozy o konfiguracjach *L-glicero-D-manno* (**102**) i *D-glicero-D-manno* (**103**) w proporcjach 3.5 : 1 i z całkowitą wydajnością 81%. Konfigurację głównego produktu

102 jako *L-glicero-D-manno* potwierdziłam otrzymując ditioacetal dietylowy o stałych fizycznych identycznych z wzorcem.

W ten sposób została otrzymana pochodna *L-glicero-D-manno*-heptozy (**102**) mająca wolną tylko jedną grupę hydroksylową w położeniu C-6.

Benzylowanie **102** w typowych warunkach (Schemat 28) prowadziło do związku **104** (70%). Reakcję deallilowania związku **104** przeprowadziłam w dwóch etapach. Najpierw za pomocą katalizatora Wilkinsonska przebiegła izomeryzacja podwójnego wiązania, a następnie hydroliza grupy propenylowej. Z wydajnością 50% otrzymałam związek **105** z wolną grupą hydroksylową w położeniu C-7.



Aby otrzymać związek z wolną grupą hydroksylową w położeniu C-4 z tej samej pochodnej mannoheptozy **104** usunęłam resztę p-metoksybenzylową wobec dichlorodicyjanochinonu jako utleniacza¹⁴⁹. Właściwy związek **106** otrzymałam z 86% wydajnością. Reakcja hydrolitycznego odszczepienia grupy izopropylidenowej z syntonu **104** przebiegała w 2% kwasie p-toluenosulfonowym w mieszaninie rozpuszczalników octan etylu - metanol 1 : 1. Otrzymałam z 72% wydajnością 2,3-diol (**107**). Zgodnie z danymi literaturowymi reakcja benzylowania w układzie dwufazowym¹⁵⁰ 5% roztwór wodny wodorotlenku sodowego - dichlorometan przebiega z wysoką regioselektywnością. Zastosowanie tej reakcji do związku **107** dało z 77% wydajnością związek **108** z grupą benzyłową w położeniu C-2. W mniejszej ilości 6% powstał związek **109** z zablokowaną pozycją C-3, dający się łatwo oddzielić chromatograficznie. Związek **108** był zatem pochodną benzylo L-*glicero- α -D-manno*-heptozydu mającą grupę OH w położeniu C-3.

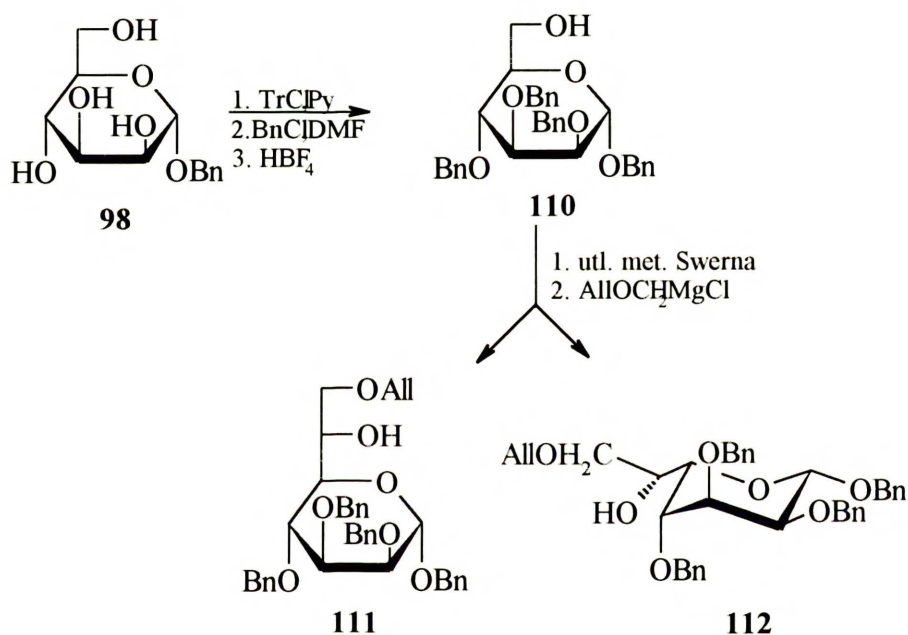
Chcąc otrzymać związek z wolną pozycją C-2 skorzystałam z danych literaturowych¹⁵¹, z których wynikało, że grupę hydroksylową przy atomie węgla C-3 można selektywnie zabezpieczyć poprzez dibutylostannan. Reakcja diolu **107** z tlenkiem dibutylocynowym w benzenie dała cykliczny 2,3-dibutylostannan. Bezpośrednie otwarcie pierścienia stannanu poprzez reakcję z bromkiem benzylu przebiegało z oczekiwaną wysoką regioselektywnością prowadząc do związku **109**.

Uniwersalna pochodna heptozy była dogodnym substratem w reakcjach glikozydowania lub podstawienia, lecz nie mogła zostać zastosowana do syntezy fosforanów ze względu na kwaśne warunki hydrolityczne stosowane podczas reakcji deprotekcji. W tych warunkach mogła następować bowiem migracja reszty fosforanowej.

Należało zatem tak zaprojektować syntezę heptoz, aby deprotekcja przebiegała w możliwie obojętnych warunkach. Najwłaściwszym wydawało się zastosowanie grup benzyłowych do blokady wszystkich grup hydroksylowych, gdyż grupy te są usuwane w neutralnych warunkach drogą hydrogenolizy, co jak udowodniono^{152,153} nie powoduje migracji.

1. 2. Synteza i charakterystyka monofosforanów *L-glicero-D-manno-heptopiranozy*

Związkami wyjściowymi w syntezie pięciu monofosforanów *L-glicero-D-manno-heptopiranozy* był również benzylo α -*D*-mannopiranozyd (**98**). Reakcje trytylowania, benzylowania, a następnie usunięcie grupy trytylowej dały alkohol **110** (Schemat 29). W celu otrzymania fosforanu w pozycji C-7 alkohol **110** utleniałam metodą Swerna, i przeprowadziłam reakcję homologowania łańcucha używając sześciokrotnego nadmiaru chlorku alliloksymetylomagnezowego.



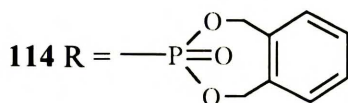
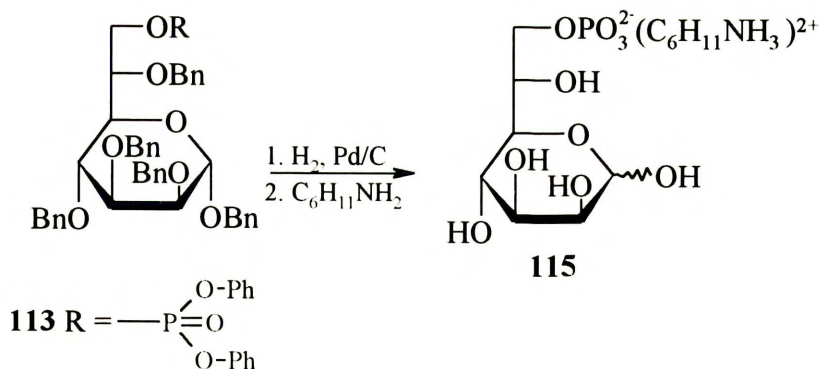
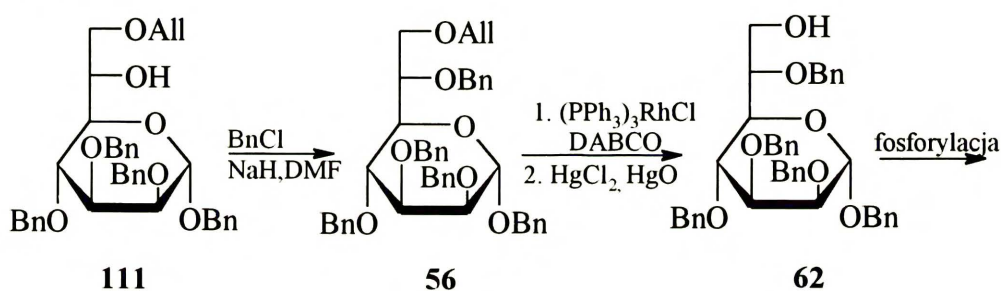
Schemat 29

Głównym produktem reakcji była pochodna benzylo *L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu* **111** (52.4%), a produktem ubocznym związek, który miał zmienioną konfigurację na atomie węgla C-5, **112** (23.6%). Powstanie tego związku było spowodowane epimeryzacją przebiegającą na atomie węgla C-5 w aldehydzie przed reakcją ze związkiem magnezoorganicznym. W reakcji aldehydu z odwróconą konfiguracją z odczynnikami Grignarda - zgodnie z cyklicznym modelem Crama dla stanu przejściowego - atak nukleofila następował od mniej zatłoczonej strony. Prowadziło to do powstania w przewodzie związku o konfiguracji *D-glicero-L-gulo*. Zmiana konformacji, a co za tym idzie przekształcenie pierścienia z formy ⁴C₁ do ¹C₄, była potwierdzona przez widmo ¹H NMR. Świadczyła o tym duża wartość stałej sprzężenia pomiędzy protonami przy pierwszym i drugim atomie węgla (J_{1,2} 8,1 Hz). Konfiguracja absolutna na atomie węgla C-6 była określona za pomocą widm CD. W tym celu usunęłam resztę allilową z

położenia C-7 w **112**, otrzymując benzylo 2,3,4-tri-O-benzylo- α -D-manno-heptopiranozyd. Po wykonaniu widm CD tego związku stwierdzono¹⁵⁴, że atom węgla C-6 ma konfigurację R, a atom węgla C-5 konfigurację S.

Aby wprowadzić resztę fosforanową w pozycję C-7, wolną grupę hydroksylową w związku **111** zabezpieczyłam grupą benzylową (Schemat 30). Po usunięciu reszty allilowej przeprowadziłam fosforylację difenylochlorofosforanem i z wydajnością 71.5% otrzymałam związek **113**.

Próba przeprowadzenia dwuetapowego odblokowania tego związku (hydrogenoliza wobec katalizatora Adamsa, następnie uwodornianie wobec palladu na węglu) nie prowadziła do właściwego produktu.



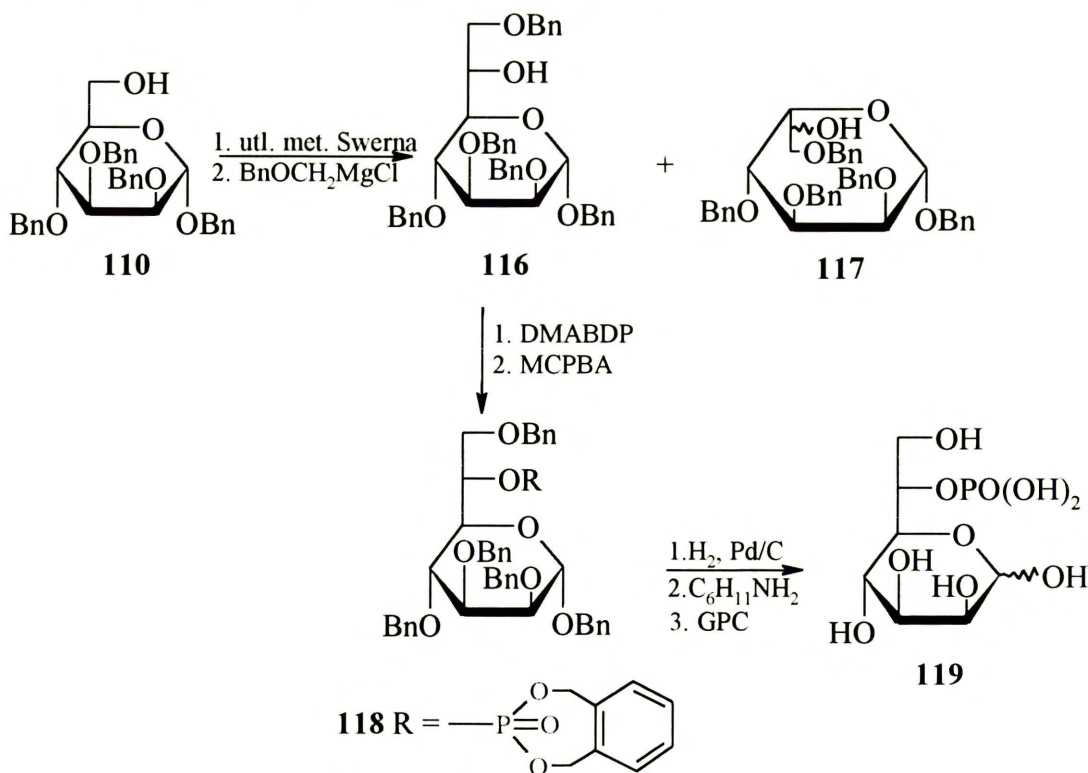
Schemat 30

Spośród wielu dostępnych odczynników fosforylujących do reakcji fosforylacji musiałam wybrać taki, w którym układ estrowy był zabezpieczony jednakowymi grupami blokującymi, łatwo usuwalnymi w tych samych warunkach, co grupy benzytowe. Takim odczynnikiem wydawał się być łatwo dostępny, trwały i wysoce efektywny w reakcji fosfitylacji 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepan (DMABDP)¹⁵⁵. Fosforylacja tym odczynnikiem

związku **62** w obecności tetrazolu dała fosforyn, który po utlenieniu kwasem m-chloronadbenzoesowym prowadził do fosforanu **114**.

Reakcja uwodnorodowania wobec palladu na węglu prowadziła w jednym etapie zarówno do usunięcia zabezpieczeń na grupach hydroksylowych, jak również do usunięcia zabezpieczenia układu estrowego w reszcie fosforanowej. Całkowicie odblokowany 7-O-fosforan *L-glicero-D-manno*-heptozy przeprowadziłam w sól dicykloheksyloamoniową **115**.

Najprostszą drogą do fosforanu w położeniu C-6 było użycie pochodnej *L-glicero-D-manno*-heptozy **111** otrzymanej bezpośrednio z reakcji elongacji. Fosforylacja difenylochlofosforanem związku **111** dała pochodną heptozy mającą resztę fosforanową przy 6 atomie węgla. Odblokowanie tego związku nie powiodło się. W trakcie reakcji usuwania grupy allylowej przebiegała jednocześnie migracja reszty fosforanowej. Przeprowadziłam szereg prób odbezpieczenia tej grupy (PdCl₂ i AcONa; Pd/C i pTSA; katalizator Wilkinsona, a następnie HgCl₂ i HgO). Udało mi się przeprowadzić tylko jej izomeryzację do propenyłu. Usunięcie reszty propenylowej było połączone z eliminacją fenolu z reszty fosforanowej. Aby otrzymać pożądany fosforan w położeniu C-6 należało więc zmienić grupę zabezpieczającą w położeniu C-7 na grupę benzylową. Wychodząc z benzylo 2,3,4-tri-O-benzylo- α -D-mannopiranozydu (**110**) przeprowadziłam reakcję homologowania łańcucha (Schemat 31).



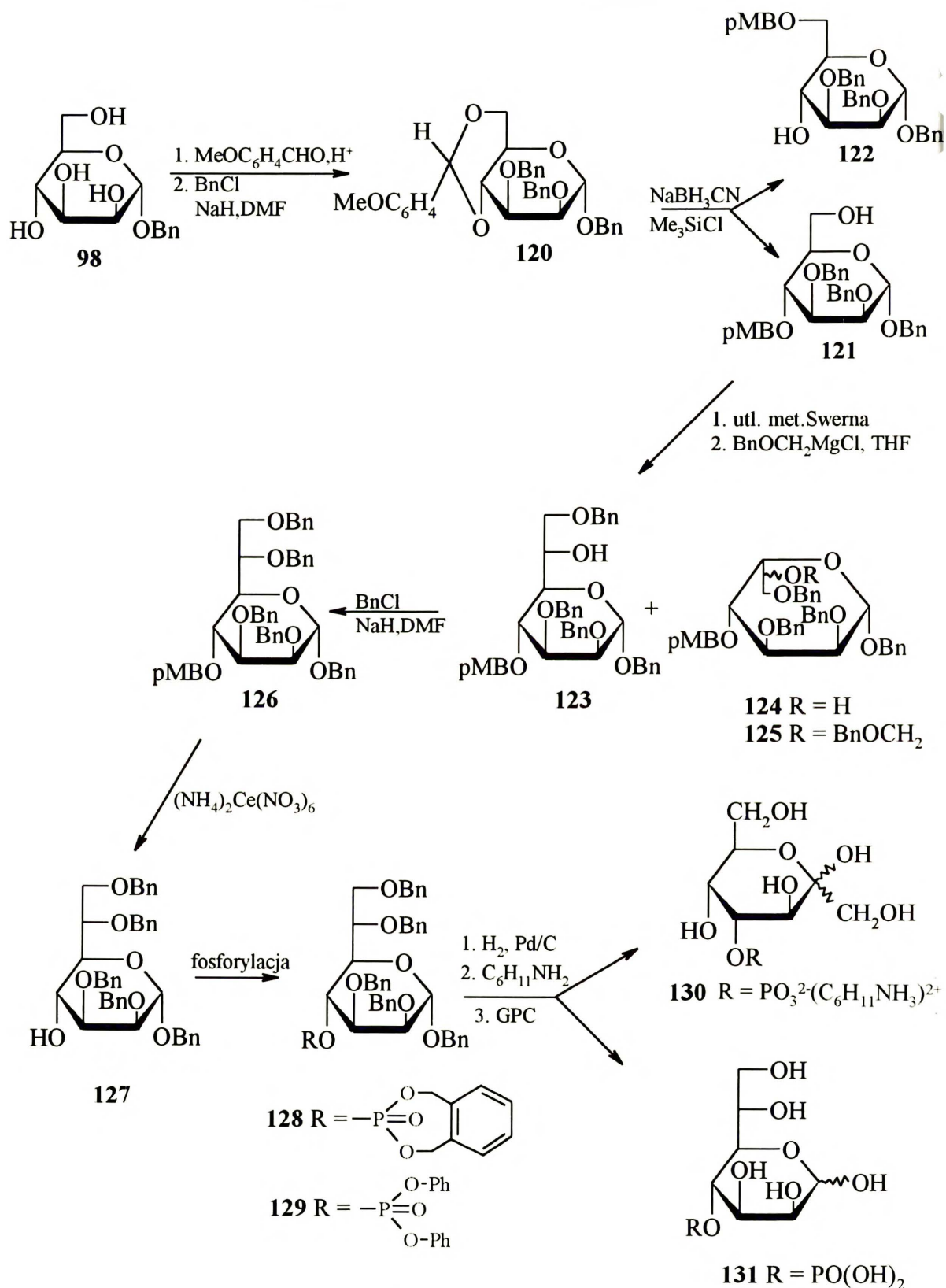
Schemat 31

Tym razem jako odczynnik Grignarda był użyty chlorek benzyloksymetylomagnezowy, a reakcja była prowadzona w wyższej temperaturze. Głównym jej produktem była, tak jak poprzednio, pochodna benzylo L-*glicero- α -D-manno*-heptopiranozydu **116** (46%), a w mniejszej ilości powstał związek o konfiguracji D(L)-*glicero-L-gulo* **117** (17.5%). Wolną grupę hydroksylową przy atomie węgla C-6 w związku **116** fosforylowałam DMABDP w obecności tetrazolu. Otrzymany fosforyn bez wyodrębniania utleniałam kwasem m-chloronadbenzoesowym i z wydajnością 70% otrzymałam fosforan **118**.

Uwodorowanie, a następnie dodanie wodnego roztworu cykloheksyloaminy prowadziło do mieszaniny produktów, które były rozdzielone za pomocą chromatografii permeacyjnej. Pierwszym związkiem eluowanym był 6-O fosforan w formie wolnego kwasu **119**, a drugim fosforan pochodnej ketozy w formie soli dicykloheksyloamoniowej. Identyfikacja tej pochodnej była oparta o dane NMR. W widmie ^1H NMR nie było sygnałów odpowiadających protonowi anomerycznemu, nie były również widoczne stałe sprzężenia w widmie GATED. W widmie ^{13}C NMR wykonanym techniką DEPT sygnał pochodzący od węgla anomerycznego również nie był widoczny. Powstawanie ketozydowego produktu może być wytłumaczone przegrupowaniem Amadoriego fosforanu heptozyloaminy. Był on utworzony z fosforanu cukrowego i cykloheksyloaminy w trakcie reakcji zobojętniania. Takie przegrupowania były obserwowane wiele lat temu, w rezultacie działania cykloheksyloaminy na cykliczny 4,6-fosforan α -D-glukopiranozy.¹⁵⁶

Fosforan w położeniu C-4 otrzymałam wychodząc, tak jak poprzednio, z benzylo α -D-mannopiranozydu (**98**). Zabezpieczenie (Schemat 32) grup hydroksylowych w położeniach C-4 i C-6 acetalem p-metoksybenzylowym i benzylowanie dało związek **120**.

Następnie otwarcie acetalu cyjanoborowodorkiem sodowym z dodatkiem chlorku trimetylosililowego w acetonitrylu w temperaturze 0°C dało mieszaninę związków **121** i **122** w proporcjach 4.5 : 1. Po rozdzieleniu chromatograficznym związek **121** utleniałam metodą Swerna i przeprowadziłam reakcję elongacji otrzymując związek o konfiguracji L-*glicero-D-manno* (**123**) (87,9%) i niewielką ilość produktu „inwertowanego” **125** (7.3%). Grupa hydroksylowa w położeniu C-6 była w tym produkcie **125** zabezpieczona resztą benzyloksymetylową. Obecność takiej grupy ochronnej była spowodowana alkilowaniem „*in situ*” wolnej grupy hydroksylowej w związku **124** spowodowanym obecnością nadmiaru chlorku benzyloksymetylomagnezowego w mieszaninie reakcyjnej. Związek **123** benzylowałam, a następnie w reakcji z azotanem amonowocerowym została usunięta reszta p-metoksybenzylowa co prowadziło do pochodnej heptozy **127**.

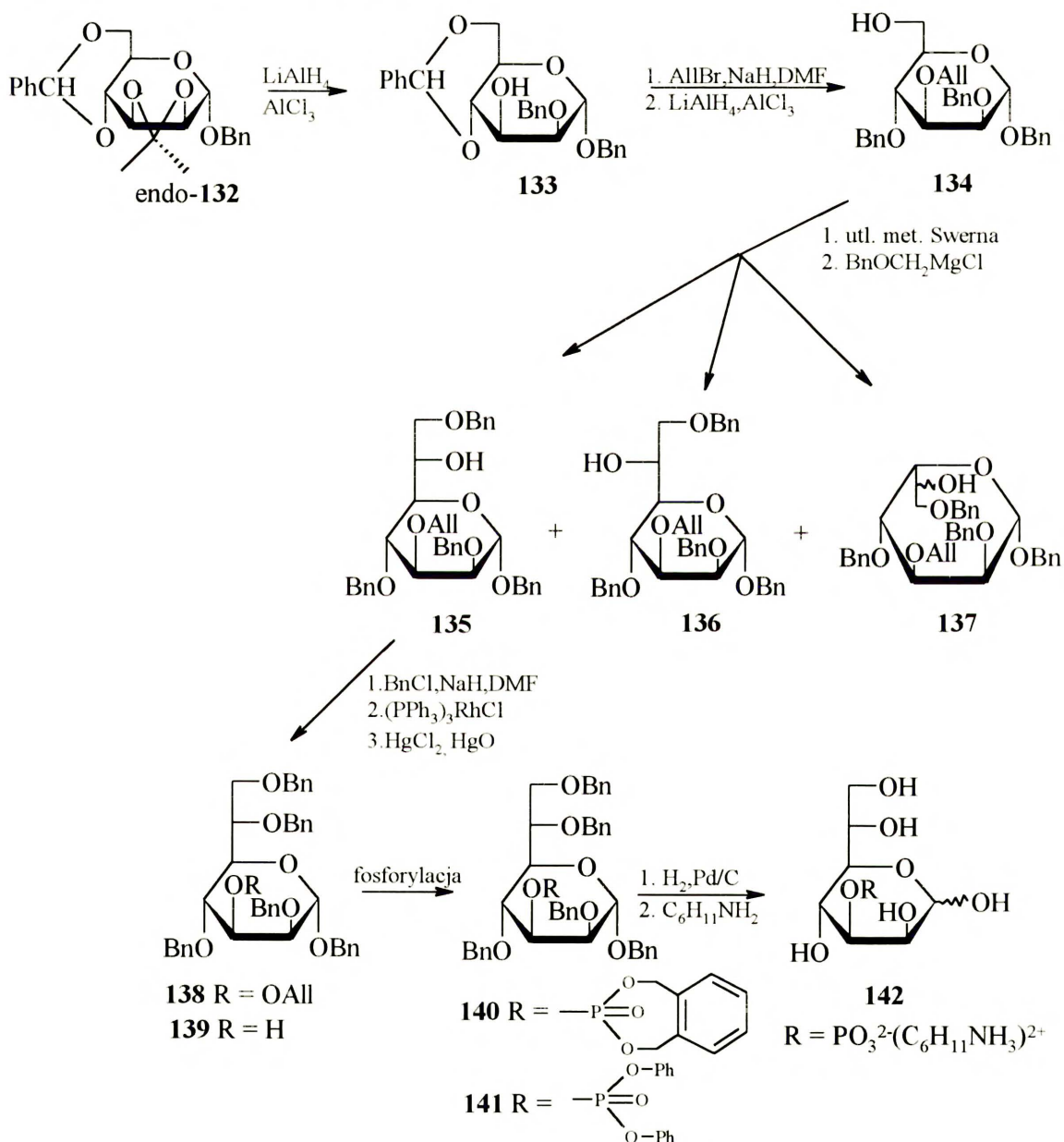


Schemat 32

Związek ten fosforylowałam zarówno za pomocą chlorodifenylofosforanu jak również DMABDP. Hydrogenolityczne odblokowanie wszystkich grup zabezpieczających w **128**, a

następnie dodatek cykloheksyloaminy dał mieszaninę produktów. Chromatografia permeacyjna na żelu dała dwa związki, przy czym jeden **131** zawierał resztę fosforanową na C-4 w formie wolnego kwasu, a drugi **130** był znowu pochodną fosforanu ketozy w formie soli dicykloheksyloamoniowej.

Metoda otrzymywania pochodnej L-glicero-D-manno-heptozy z resztą fosforanową w położeniu C-3 jest przedstawiona na schemacie 33.



Schemat 33

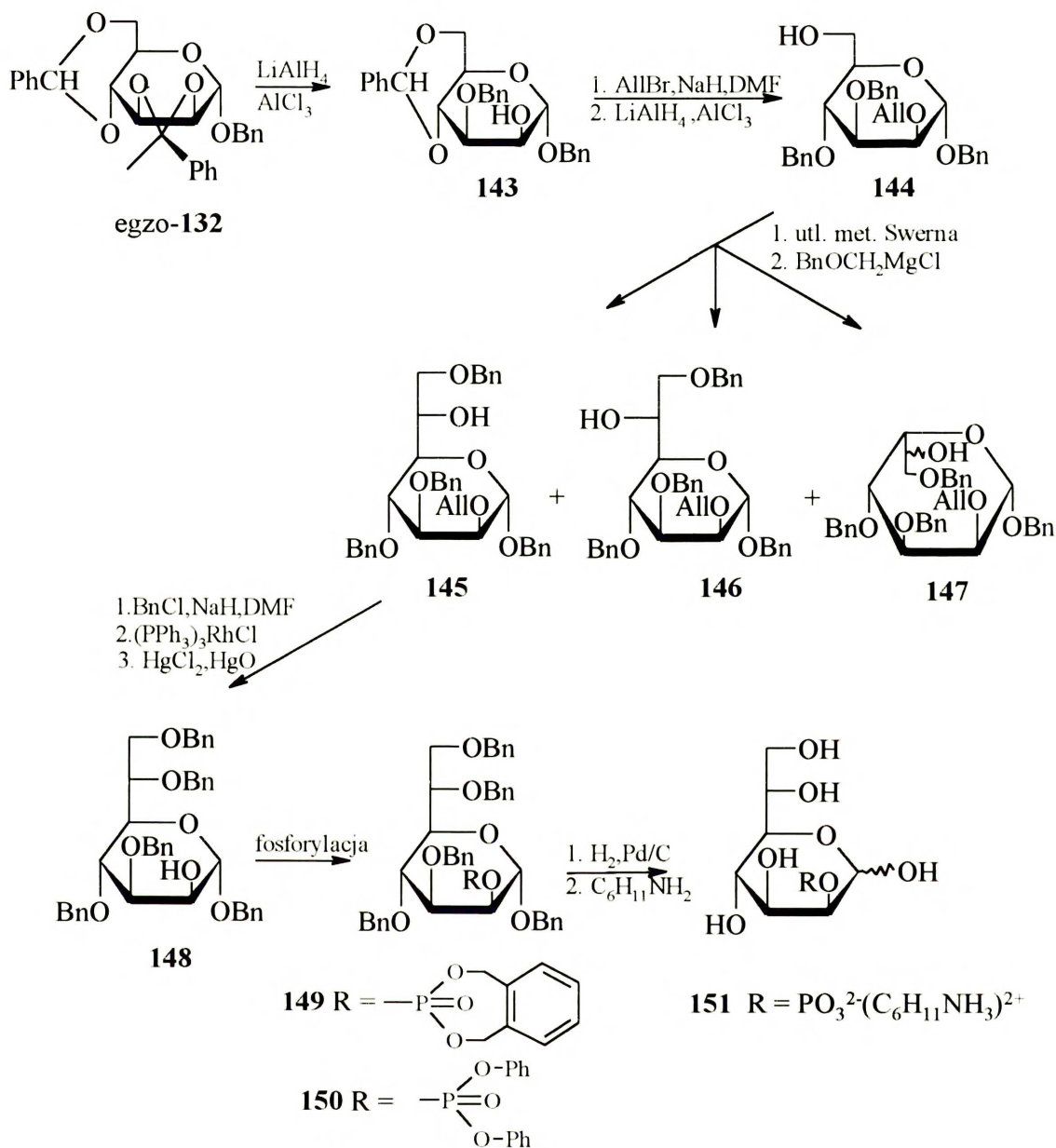
W reakcji benzylo α -D-mannopiranozydu (**98**) z dimetoksytoluenem otrzymałam dwa acetale 2,3:4,6-di-O-benzylidenowe o konfiguracji *egzo* i *endo*. Izomery te rozdzieliłam. Redukcja

izomeru **132** *endo* metodą Liptaka¹⁵⁷ dała benzylo 4,6-O-benzylideno-2-O-benzylo- α -D-mannopiranozyd (**133**), który po zabezpieczeniu resztą allilową w pozycji O-3, a następnie po redukcyjnym ($\text{LiAlH}_4\text{-AlCl}_3$) otwarciu acetalu 4,6 utworzył związek **134**.

Utlenienie **134** metodą Swerna, a następnie reakcja z chlorkiem benzyloksymetylomagnezowym prowadziła do mieszaniny trzech heptoz (łącznie 65.5%). Głównym produktem była pochodna benzylo L-*glicero- α -D-manno*-heptozydu **135**, poza tym otrzymałam związek o konfiguracji D-*glicero-D-manno* **136** oraz związek o zmienionej konfiguracji na atomie węgla C-5 mający najprawdopodobniej konfigurację D-*glicero-L-gulo* **137**. Mieszaninę tę rozdzieliłam chromatograficznie, a związek **135** poddałam benzylowaniu, a następnie deallilowaniu. Usunięcie reszty allilowej za pomocą katalizatora Wilkinsona oraz chlorku i tlenku rtęci, prowadziło do wyższych wydajności niż uzyskiwane przy zastosowaniu palladu na węglu i kwasu p-toluenosulfonowego. Reakcja **139** z 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepanem w obecności tetrazolu dała fosforyn, który był utleniony kwasem m-chloronadbenzoesowym do fosforanu **140** z wydajnością 86%. Następnie w łagodnych warunkach redukcyjnych usunęłam wszystkie zabezpieczenia i fosforan przeprowadziłam w sól dicykloheksyloamoniową **142**. Związek **139** fosforylowałam również difenylchlorofosforanem do **141**.

Wychodząc ze związku *egzo* **132** otrzymałam pochodną heptozy mającą wolną grupę hydroksylową w położeniu C-2 **143**. Przeprowadziłam analogiczną serię reakcji jak poprzednio. (Schemat 34).

Po redukcyjnym otwarciu acetalu 2,3 i zabezpieczeniu związku **143** resztą allilową, również redukcyjnie został otworzony acetał 4,6. W ten sposób uzyskano związek **144**, który po utlenieniu i reakcji Grignarda dał mieszaninę związków **145** : **146** : **147** w proporcjach 4.2 : 1.2 : 1 (łącznie 85%). Mieszaninę tę rozdzieliłam chromatograficznie, a związek **145** benzylowałam. Następnie taką samą metodą jak poprzednio usunęłam grupę allilową (96%) otrzymując **148**, (*n. b.* usunięcie reszty allilowej metodą Scheffolda¹⁵⁸ prowadziło do niższych wydajności). Przeprowadziłam fosforylację **148** stosując opisaną dla poprzednich związków metodę co dało pochodną **149** zawierającą resztę fosforanową przy atomie węgla C-2. Następnie w jednym etapie usunęłam wszystkie grupy zabezpieczające i fosforan przeprowadziłam w sól dicykloheksyloamoniową **151**. Fosforylacja związku **148** za pomocą difenylchlorofosforanu dała **150**.



Schemat 34

W ten sposób wykonałam syntezę wszystkich pięciu fosforanów wolnej *L-glicero-D-manno-heptozy*¹⁵⁹.

Fosforany występują w roztworze wodnym w formie piranozowej jako mieszaniny α i β anomerów.¹⁶⁰ Świadczyły o tym stałe sprzężenia $J_{\text{C-1,H-1}}$ ok.170 Hz dla anomerów α i $J_{\text{C-1,H-1}}$ ok.160 Hz dla anomerów β (tabela 8) Fosforany zostały scharakteryzowane za pomocą widm NMR (^1H , ^{13}C , i ^{31}P). W widmach ^1H NMR obserwowałam po fosforylacji przesunięcie sygnałów protonów przy fosforylowanych grupach hydroksylowych (od +0.2 do +0.3 ppm) w kierunku niższych pól. Podobnie w widmach ^{13}C NMR na skutek podstawienia resztami fosforanowymi pojawia się znaczący α efekt ($+3.0 \pm 0.5$ ppm). Poza tym znaleźć można było charakterystyczne

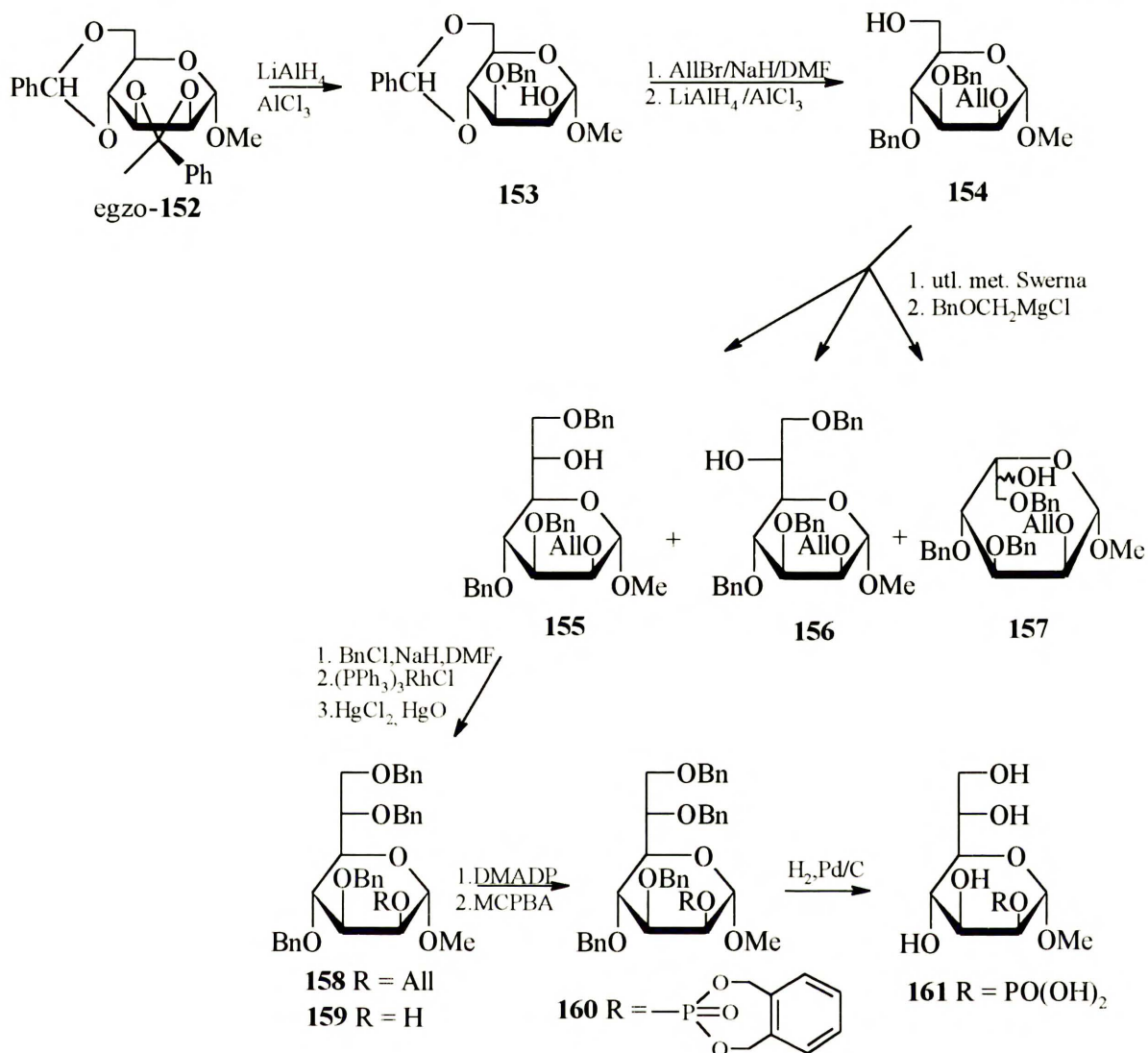
stałe sprzężenia $J_{C,P}$ ok. 6 Hz świadczące o obecności wiązania P-C, które były widoczne na atomach węgla ulegających fosforylacji i sąsiadujących z nimi. W widmach ^{31}P NMR wykonanych w obecności EDTA znajdowały się sygnały charakterystyczne dla monofosforanów. W każdym z widm monofosforanów widoczne były dwa sygnały (jeden dla anomeru α i drugi dla β). Regioizomeryczne fosforany były rozróżnione za pomocą czasów retencji w wysokociśnieniowej chromatografii anionowymiennej (Tabela 2). Tylko fosforany znajdujące się w położeniach C-3 i C-4 nie mogły być rozróżnione, gdyż ich czasy retencji były bardzo zbliżone.

Badania nad migracją reszt fosforanowych w układzie heptozy nie mogły być przeprowadzone na tych związkach. W warunkach zasadowych, ze względu na obecność wolnej grupy hydroksylowej na centrum anomerycznym, następowało otwarcie pierścienia cukrowego. Zdecydowałam się dlatego na syntezę fosforanów metylo *L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu*, gdyż reszta metoksylova nie jest usuwana w warunkach reakcji hydrogenolizy.

III. 1. 3. Synteza i charakterystyka monofosforanów metylo *L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu*

Przeprowadziłam analogiczny cykl reakcji jak poprzednio stosując jako substrat dostępny handlowo metylo α -D-mannopiranozyd.

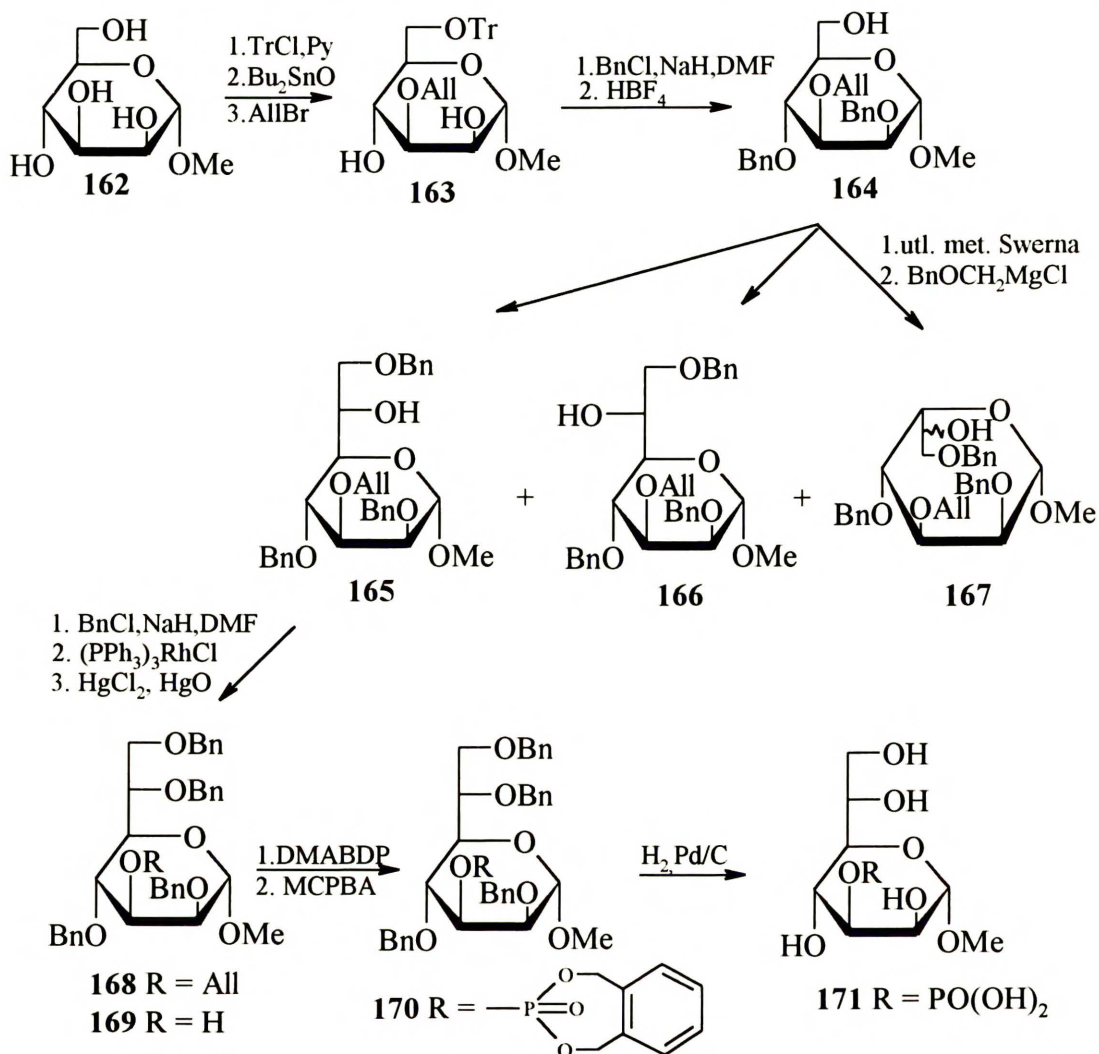
Związkiem wyjściowym do fosforanu w położeniu C-2 był metylo 2,3:4,6-di-O-benzylideno- α -D-mannopiranozyd. Redukcja acetalu *egzo-152* metodą Liptaka dała związek **153**, który po zabezpieczeniu resztą allilową i redukcyjnym otwarciu acetalu 4,6 utworzył **154** (Schemat 35). Po utlenieniu metodą Swerna i przeprowadzeniu reakcji Grignarda-Sommeleta z 2,5 krotnym nadmiarem chlorku benzyloksymetylomagnezowego powstał jako główny produkt związek o konfiguracji *L-glicero-D-manno* **155**. Z reakcji można było wydzielić również stereoizomer *D-glicero-D-manno* **156** oraz związek **157** mający odwróconą konfigurację na atomie węgla C-5 (najprawdopodobniej była to pochodna *D-glicero-L-gulo-heptozy*).



Schemat 35

Związek **155** benzylovałam, następnie usunęłam resztę allilową otrzymując **159**. Fosforylacja **159** przy wykorzystaniu dwuetapowej metody opisanej dla poprzedniej serii związków prowadziła do **160**. Reakcja hydrogenolizy dała w jednym etapie całkowicie odblokowany związek **161**. Metylo 2-O-fosforylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**161**) zobojętniłam wodnym roztworem wodorotlenku sodowego przeprowadzając go w sól disodową.

Metodę otrzymywania związku **171** zawierającego resztę fosforanową w położeniu C-3 metylo L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu przedstawia schemat 36.

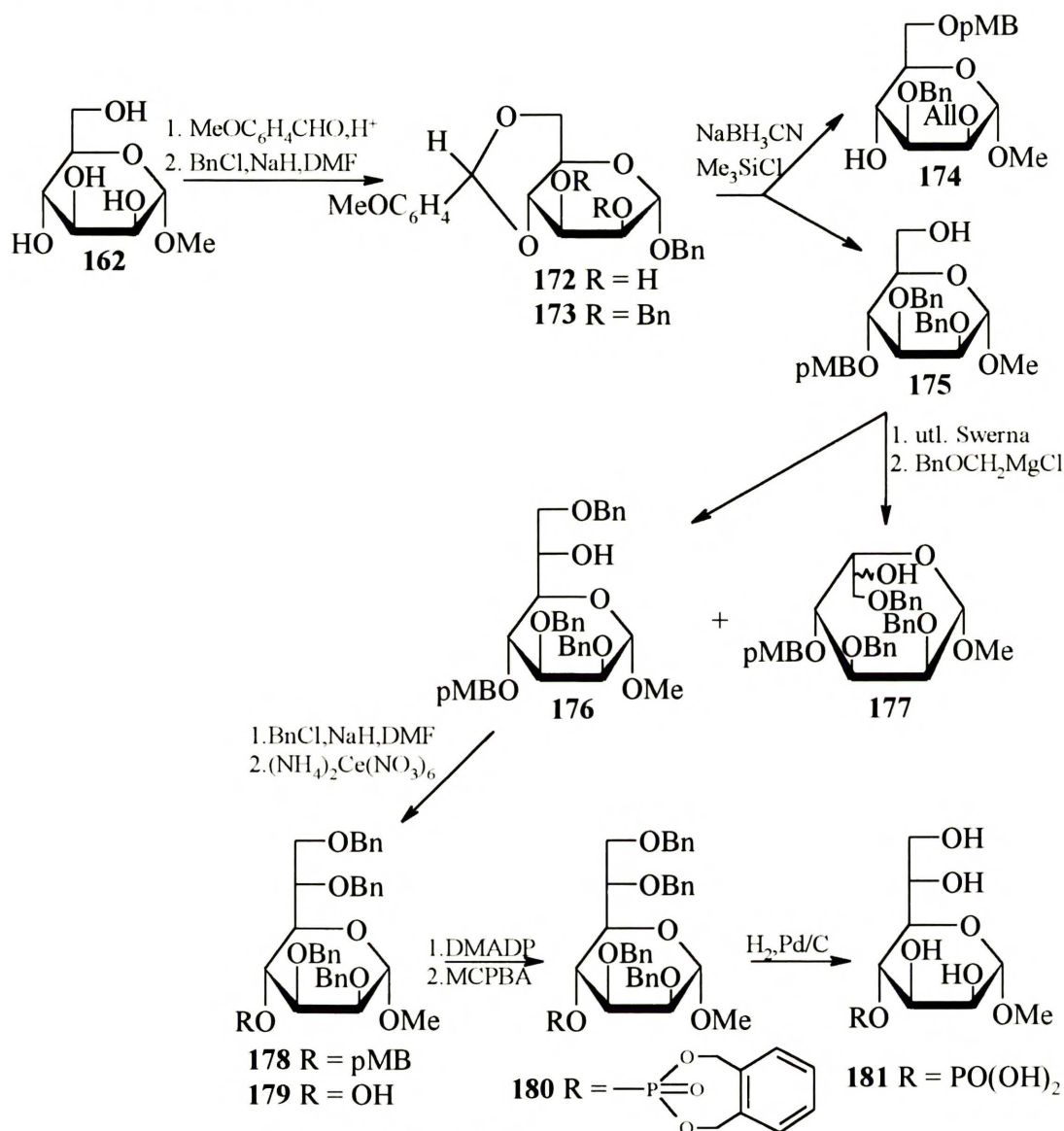


Schemat 36

I-rzędową grupę hydroksylową w metylo α -D-mannopiranozydzie (**162**) zabezpieczyłam resztą trifenylo-metylową i po reakcji z tlenkiem dibutylocynowym w benzenie otrzymałam 2,3 dibutylostannan. Otwarcie pierścienia stannanu za pomocą bromku allilu prowadziło z wysoką regioselektywnością do związku **163** zawierającego grupę allilową w położeniu C-3.

W wyniku benzylowania i usunięcia grupy trifenylo-metylowej za pomocą kwasu tetrafluoroborowego otrzymałam związek **164**, który utleniałam metodą Swerna, a następnie przeprowadziłam reakcję homologowania z chlorkiem benzyloksymetylomagnezowym. (2,5-krotny nadmiar tego odczynnika w stosunku do aldehydu.) Otrzymałam mieszaninę produktów o konfiguracji *L-glicero-D-manno* **165**, *D-glicero-D-manno* **166**, i związku z odwróconą konfiguracją na atomie węgla C-5 **167** w proporcjach 4 : 1.3 : 1. Pochodną **165** benzylowałam, a następnie usunęłam grupę allilową otrzymując **169**. Związek **169** fosforylowałam za pomocą 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepanu w obecności tetrazolu. Otrzymany fosforyn

utleniałam *in situ* do fosforanu **170** kwasem m-chloronadbenzoesowym. Hydrogenoliza wobec palladu na węglu prowadziła do związku **171** zawierającego resztę fosforanową w położeniu C-3, który przeprowadziłam w sól disodową.



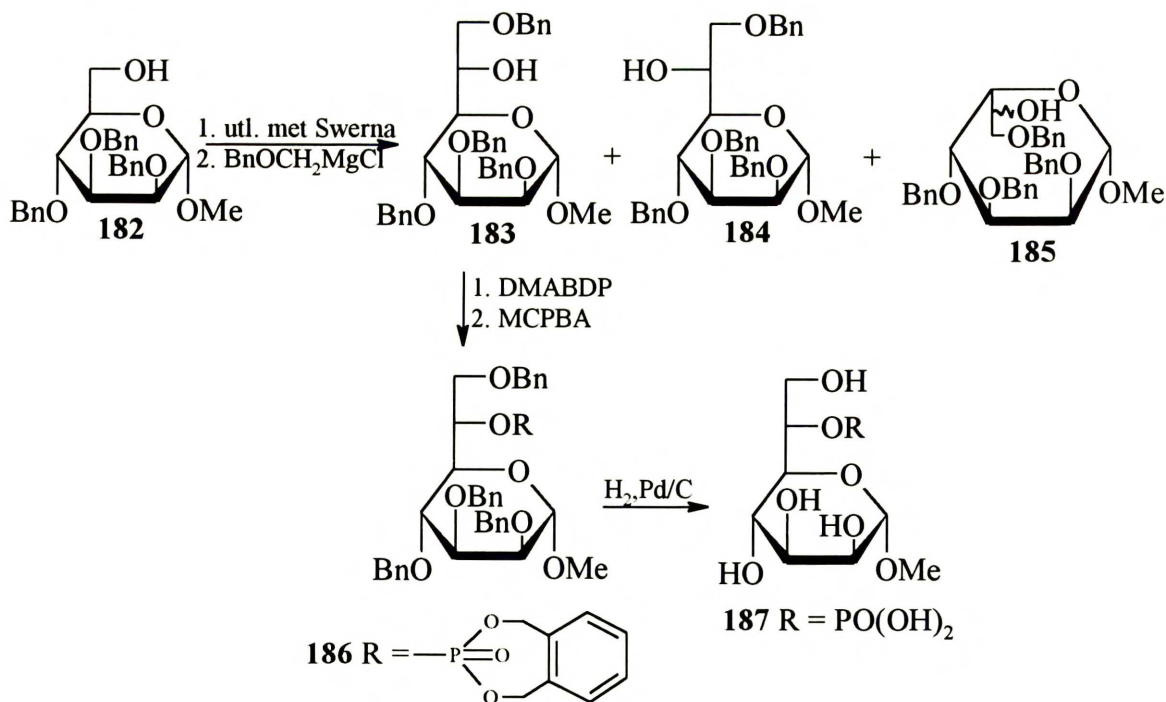
Schemat 37

Syntezy pochodnej metylo *L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu* z resztą fosforanową w położeniu C-4 przedstawia schemat 37. Próba otrzymania monoacetalu 4,6 w reakcji z aldehydem p-metoksybenzoesowym i ZnCl_2 nie powiodła się. W tej reakcji otrzymałam bisacetal, metylo 2,3:4,6-di-O-p-metoksybenzylideno- α -D-mannopiranozyd jako główny produkt. Reakcja metylo α -D-mannopiranozydu (**162**) z niewielkim nadmiarem aldehydu p-metoksybenzoesowego w dimetylosulfotlenku w obecności p-TSA prowadziła do związku **172**, który benzylowałam otrzymując **173** (Schemat 37).

Następnie otworzyłam acetal 4,6 stosując cyjanoborowodorek sodowy i trimetylochlorosilan w acetonitrylu w temperaturze 0°C otrzymując dwa związki **174** i **175** w proporcji 1 : 1.7. Związek **175** utleniałam metodą Swerna, a następnie przeprowadziłam reakcję Grignarda z chlorkiem benzyloksymetylomagnezowym stosując 2.5-krotny nadmiar związku magnezoorganicznego w temperaturze -20°C. Otrzymałam tylko dwa związki, w tym jako główny produkt związek o konfiguracji *L-glicero-D-manno* (**176**) oraz produkt mający zmienioną konfigurację na atomie węgla C-5 (**177**). Pochodną **176** benzylowałam, następnie w warunkach utleniających usunęłam grupę *p*-metoksybenzylową. Reakcja związku **179** z DMABDP i utlenienie fosforynu do fosforanu prowadziły do **180**, który po redukcji dał całkowicie odblokowany metylo 4-O-fosforylo-*L-glicero-α-D-manno*-heptopiranozyd (**181**).

Pozycja grupy fosforanowej została potwierdzona zarówno przez widma ¹³C NMR jak również poprzez widma ¹H NMR.

Do otrzymania fosforanów w położeniach C-6 i C-7 wykorzystałam taki sam substrat, a mianowicie metylo 2,3,4-tri-O-benzylo-*α-D*-mannopiranozyd (**182**). Związek ten otrzymałam w reakcjach trytylowania metylo *α-D*-mannopiranozydu, następnie benzylowania i usunięcia reszty trifenylo-metylowej kwasem tetrafluoroborowym.

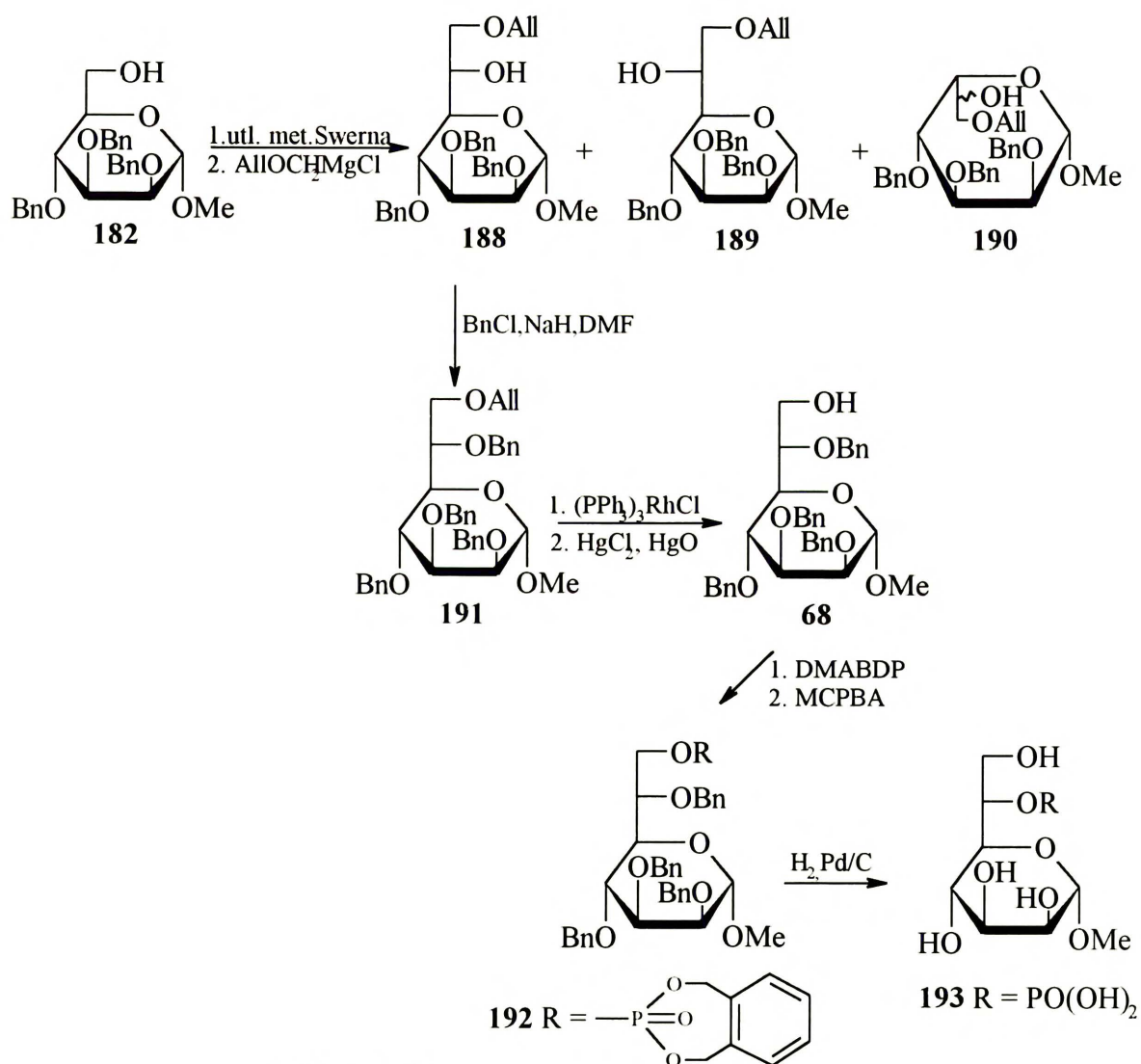


Schemat 38

W celu otrzymania metylo *L-glicero-α-D-manno*-heptopiranozydu zawierającego resztę fosforanową w położeniu C-6 związek **182** utleniłam metodą Swerna i przeprowadziłam elongację (Schemat 38).

Otrzymałam z sumaryczną wydajnością 81% trzy związki: pochodną metylo *LDman*Hepp **183**, metylo *DDman*Hepp **184**, oraz związek „inwertowany” **185** w proporcjach 3.75 : 1 : 1.4 (HPLC). Po rozdzieleniu chromatograficznym pochodną **183** przeprowadziłam w fosforyn, który *in situ* utleniłam do fosforanu **186**. Po odblokowaniu otrzymałam związek **187**.

Chcąc otrzymać pochodną metylo *L-glicero-α-D-manno*-heptopiranozydu z resztą fosforanową w położeniu C-7 korzystałam z tego samego substratu **182** (Schemat 39).



Schemat 39

Utlenienie metodą Swerna i reakcja Grignarda z czterokrotnym nadmiarem chlorku alliloksymetylomagnezowego dała z sumaryczną wydajnością 69,4% trzy produkty.

Po rozdzieleniu chromatograficznym otrzymałam w proporcjach 3.3 : 1 : 1.3 pochodne heptozy o konfiguracji *L-glicero-D-manno* **188**, *D-glicero-D-manno* **189** i związek „inwertowany” **190**. Główny produkt **188** poddałam reakcji benzylowania, a następnie przeprowadziłam deallilowanie otrzymując związek **68** z wolną grupą hydroksylową w położeniu C-7. Fosfitylacja **68** i utlenienie otrzymanego fosforynu kwasem *m*-chloronadbenzoesowym do fosforanu dało **192**. Reakcja uwodorowania tego produktu prowadziła do odblokowania wszystkich grup zabezpieczających. Otrzymałam metylo 7-O-fosforylo-*L-glicero- α -D-manno*-heptopiranozyd (**193**), który przeprowadziłam również w sól disodową.

Wszystkie fosforany były tak jak poprzednio scharakteryzowane za pomocą widm ^1H , ^{13}C i ^{31}P NMR.

III. 2. Migracje reszty fosforanowej w układzie metylo L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu

III. 2. 1. Wprowadzenie

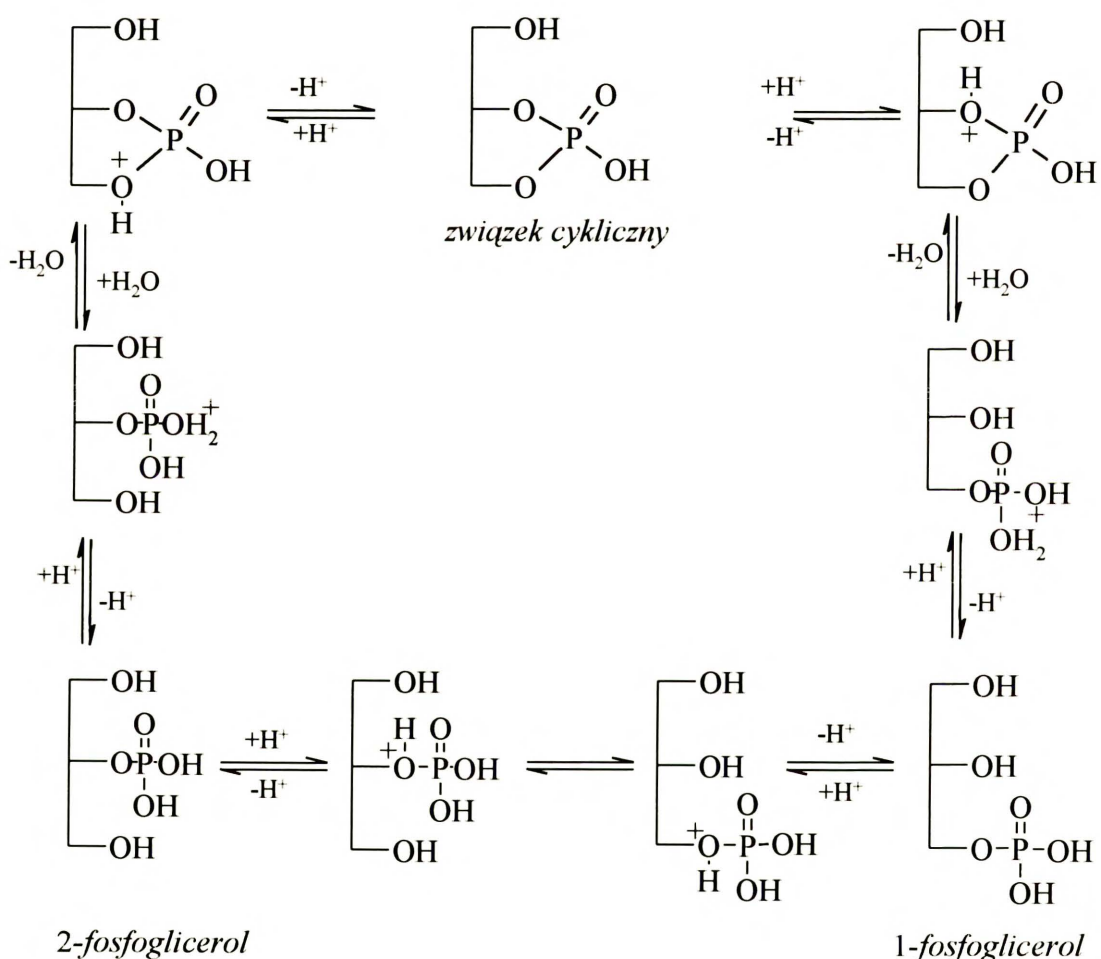
Migracja reszty fosforanowej w estrach fosforowych związków polihydroksylowych jest znana od bardzo dawna¹⁶¹. Była obserwowana w kwasach nukleinowych^{162,163}, fosfoinozytolach¹⁶⁴ i fosfolipidach¹⁶⁵.

Po raz pierwszy migrację tę zaobserwował Octav Bailly w roku 1916 na przykładzie 2-fosfoglicerolu¹⁶¹. Stwierdził on, że w środowisku kwaśnym reszta fosforanowa migruje z pozycji 2 do 1. Hydroliza estrów fosforanowych była wolniejsza w porównaniu reakcją izomeryzacji. Badania nad migracją reszty fosforanowej w fosfoglicerolach były kontynuowane przez wiele lat. Wykazano że, sól sodowa 2-fosfoglicerolu gotowana z rozcieńczonym kwasem siarkowym tworzy mieszaninę równowagową z 1-fosfoglicerolem¹⁶⁶. Zbadano stabilność 1- i 2- fosfogliceroli w środowisku zasadowym i kwaśnym. Stwierdzono, że sole sodowe 1 i 2 fosfogliceroli są trwałe podczas ogrzewania w silnych alkaliach, natomiast izomeryzują podczas ogrzewania w kwasie siarkowym. W środowisku kwaśnym (pH 0.9) dwa izomeryczne fosforany znajdują się w proporcji 8:1¹⁶⁷.

Po upływie pięćdziesięciu lat od pierwszego doniesienia o migracji reszty fosforanowej w fosfoglicerolach Fordham i Wang zbadali mechanizm tej reakcji¹⁶⁸. Przeprowadzili badania kinetyczne izomeryzacji katalizowanej kwasem. Szybkość tego procesu była zmierzona zarówno przez utlenienie kwasem nadjodowym jak również za pomocą technik NMR. Wykazano, że w środowisku kwaśnym szybkość izomeryzacji jest ok. 10^3 razy większa niż szybkość hydrolizy. Szybkości izomeryzacji i hydrolizy zwiększały się przy zmianie rozpuszczalnika z H₂O na D₂O.

Izomeryzacja fosfogliceroli polega na wewnątrzcząsteczkowej migracji grupy fosforanowej i może przebiegać przez utworzenie cyklicznego diestru, a następnie jego otwarcie do monoestru lub poprzez mechanizm uzgodniony tzn. bezpośredni atak nukleofilowy atomu tlenu sąsiadującej grupy hydroksylowej na atom fosforu z jednoczesnym rozerwaniem wiązania P-O, lub też przez kombinację obu mechanizmów (Schemat 40). Ponieważ szybkość hydrolizy cyklicznego fosfodiestru do niecyklicznego fosfomonoestru jest znacznie większa niż szybkość reakcji izomeryzacji, stężenie cyklicznego diestru w czasie reakcji izomeryzacji jest bardzo niskie. Aby uzyskać dokładne informacje na temat mechanizmu reakcji, pomiary były wykonane w

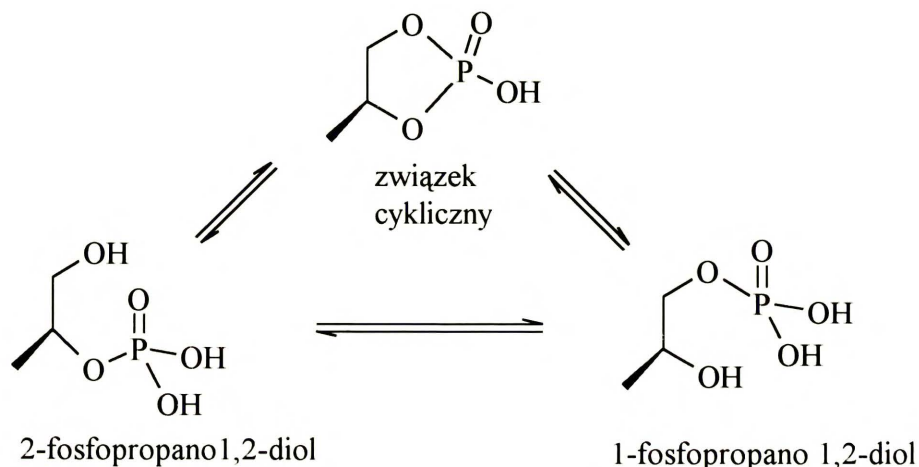
wodnym roztworze mocnego kwasu wzbogaconym wodą H_2O^{18} . Jeżeli izomeryzacja fosfoglicerolu przebiegała z utworzeniem cyklicznego związku przejściowego, obserwowano wprowadzenie znaczonego atomu tlenu O^{18} z rozpuszczalnika do fosfoglicerolu. Jeżeli natomiast izomeryzacja przebiegała bez utworzenia cyklicznego związku przejściowego (czyli bez udziału wody jako reagenta) nie obserwowano wprowadzenia znaczonego atomu tlenu O^{18} . Stwierdzono, że izomeryzacja przebiega zarówno poprzez cykliczny produkt pośredni jak i bez utworzenia tego produktu (Schemat 40).



Schemat 40

Piętnaście lat później S.L.Buchwald, D.H.Pliura i J.R.Knowles¹⁶⁹ przeprowadzili stereochemiczne badania migracji reszty fosforanowej na związkach modelowych, którymi były 2-fosfopropano-1,2-diol i 1-fosfopropano-1,2-diol. Potwierdzono mechanizm zaproponowany wcześniej przez Fordhama i Wanga¹⁶⁸ stwierdzający, że migracja przebiega dwiema drogami

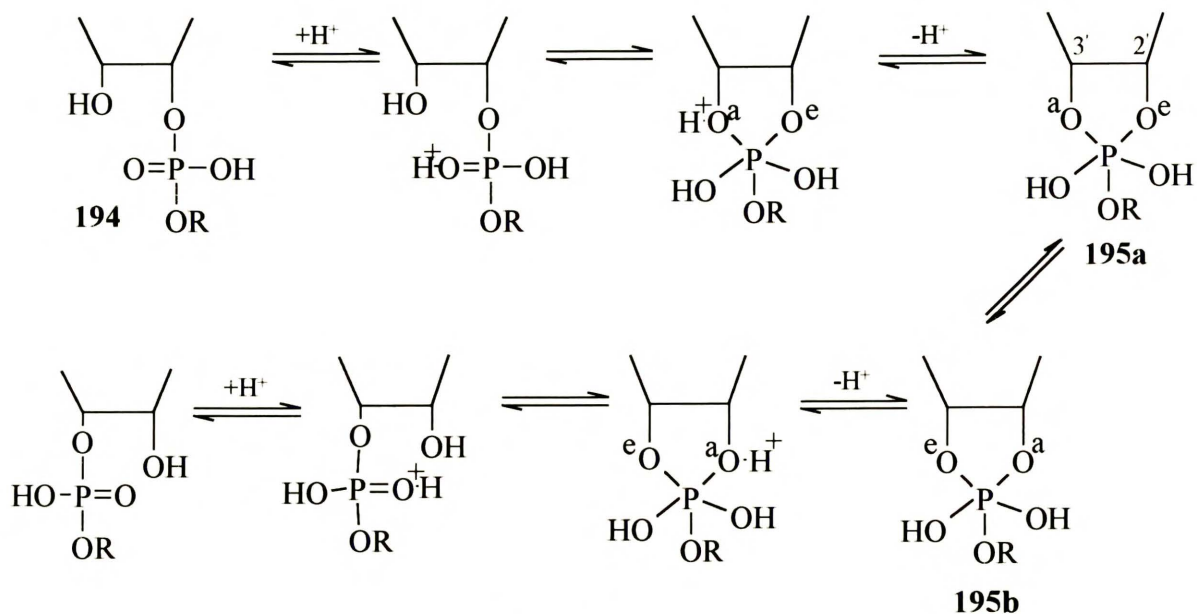
(Schemat 41). Dokładnie zbadano przebieg bezpośredniej izomeryzacji bez utworzenia związku cyklicznego. Stwierdzono, że izomeryzacja przebiega z retencją konfiguracji na atomie fosforu. Było to w zgodzie z założeniem, że reakcja ta biegnie przez pięciokoordynacyjny związek przejściowy z jedną pseudorotacją na atomie fosforu.



Schemat 41

Ze względu na znaczącą rolę jaką odgrywa wiązanie fosfodiesterowe w biochemii wiążąc jednostki nukleozydowe do kwasów nukleinowych, ważne jest dokładne zrozumienie zachowania się tego wiązania. Stwierdzono, że 2' i 3' monofosforany nukleozydów ulegały izomeryzacji w rozcieńczonych kwasach¹⁷⁰. Postulowano utworzenie cyklicznego produktu przejściowego, który następnie wyizolowano. Internukleotydowe wiązanie 3',5' fosfodiesterowe ulegało częściowej izomeryzacji do wiązania 2', 5' w czasie chemicznej syntezy oligorybonukleotydów, podczas usuwania w warunkach kwaśnych (pH=1) 2' grupy zabezpieczającej¹⁷¹. Zbadano mechanizm migracji reszty fosforanowej w nukleotydach¹⁶². Stwierdzono, że w środowisku kwaśnym (pH < 2) migracja reszty fosforanowej przebiegała przez pięciokoordynacyjny związek przejściowy, który ulegał jednej pseudorotacji na atomie fosforu (Schemat 42).

W środowisku kwaśnym następowało szybkie protonowanie neutralnego fosfodiestru **194**. Następnie, nukleofilowy atak sąsiadującej grupy hydroksylowej znajdującej się w pozycji 3' prowadził do utworzenia pięciokordynacyjnego związku przejściowego **195a**, gdzie atom tlenu znajdujący się w położeniu 3' był apikalny, a atom tlenu w położeniu 2' był ekwatorialny.



Zgodnie z koncepcją Westheimera¹⁷² wejście i odejście ligandu jest możliwe tylko z pozycji apikalnej. Musiała zatem nastąpić pseudorotacja związku **195a** powodująca powstanie związku **195b**, w którym atom tlenu 2' był apikalny, a atom tlenu 3' ekwatorialny. Protonowanie atomu tlenu 2', a następnie odejście grupy hydroksylowej prowadziło do związku zawierającego resztę fosforanową w położeniu 3'.

Zbadano również migrację grupy fosforanowej w fosfoinozytolach.¹⁷³ Stwierdzono, że proces migracji przebiega łatwiej pomiędzy grupami *cis* hydroksylowymi niż między grupami *trans*¹⁷⁴. Przebieg reakcji był taki sam jak w przypadku fosforanów innych związków polihydroksylowych.

Stwierdzono, że podczas reakcji hydrolizy monobenzylowych estrów fosforowych *cis* i *trans* cykloheksanodioli 1, 2 przebiega migracja reszty fosforanowej¹⁷⁵. Wykazano, że w warunkach kwaśnych zarówno dla pochodnej *cis* jak i dla pochodnej *trans* przebiega ona przez pięciocząłowy związek przejściowy.

Jakkolwiek zrealizowano wiele syntez fosforanów cukrowych¹³⁶⁻¹⁴², w literaturze niemal brak doniesień na temat migracji reszty fosforanowej w tego typu związkach. Do nielicznych prac z tego zakresu należy doniesienie Levene i Raymonda¹³⁷ o fosforylacji 5-O-benzoilo 1,2-O-izopropylideno- α -D-ksylofuranozy za pomocą POCl_3 w pirydynie. Po hydrolizie produktu kwasem octowym i kwasem siarkowym otrzymali wyłącznie 5-O-fosforylową pochodną zamiast

oczekiwanego 3-O-fosforanu. Baddiley, Buchanan i Cars¹³⁹ ogrzewali 5-fosforan D-rybitolu w 1N HCl co powodowało migrację reszty fosforanowej z pozycji 5 do 2 lub 3. Badana¹⁷⁶ była również katalizowana pirydyną migracja grupy tiofosforanowej w β -hydroksyfosfoditianach cukrowych.

W wielu pracach nie obserwowano migracji grupy fosforanowej^{99, 136, 140, 142, 143, 156}. Badano natomiast¹⁴¹ delokalizację tej grupy w 4-O-fosforylo lub 6-O-fosforylo metylo α -D-mannopiranozydzie. Oba związki były stabilne i nie obserwowano migracji grupy $-\text{PO}(\text{OH})_2$ ani w warunkach zasadowych (0,5M NaOH, 100°C, 4 h) ani w warunkach kwaśnych (2M HCl, 100°C, 2 h).

III. 2.2. Migracje reszt fosforanowych w układzie metylo L-glicero-D-manno-heptopiranozydu.

Migracja reszt fosforanowych w układzie L-glicero-D-manno-heptozy nie była dotąd w ogóle badana.

Do moich badań wykorzystałam pięć monofosforanów L-glicero- α, β -D-manno-heptozy oraz pięć monofosforanów metylo L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu i ich sole sodowe. Badania przeprowadziłam w warunkach stosowanych do degradacji lipopolisacharydów. Były to następujące warunki hydrolityczne:

1. 1M roztwór kwasu solnego; ogrzewanie w 100°C przez dwie godziny (warunki A).
2. 4M roztwór kwasu trifluoroctowego; ogrzewanie w 100°C przez cztery godziny (warunki B).
3. 4M roztwór wodorotlenku potasowego; ogrzewanie w 120°C przez 16 godzin (warunki C).

Wszystkie reakcje przeprowadziłam w termostatach w szczelnie zamkniętych naczyniach. Reakcje z wodorotlenkiem sodowym były ponadto przeprowadzone w atmosferze azotu. Analizy produktów zostały przeprowadzone przy wykorzystaniu wysokociśnieniowej chromatografii anionowymiennej (HPAE). Analiza była możliwa, ze względu na dobry podział monofosforanów L-glicero-D-manno-heptozy na kolumnie oraz dlatego, że fosforany heptozy były stabilne w środowisku zasadowym, w którym wykonywano analizy.

Pierwszą serię badań przeprowadziłam na kolumnie CarboPac Pa-100 (Dionex) stosując liniową zmianę gradientu eluentów 0,1M NaOH i 1M NaOAc/0,1M NaOH w przedziale 1-50%.

Czasy retencji monofosforanów *L-glicero- α,β -D-manno-heptopiranozy* przedstawione są w tabeli 1. Fosforany **151**, **119** i **115** dawały dobrze rozseparowane sygnały, natomiast fosforany **142** i **131** dawały jeden wspólny sygnał.

TABELA 1

Czasy retencji monofosforanów *L-glicero- α,β -D-manno-heptozy* w wysokociśnieniowej chromatografii anionowymiennej.(Gradient 1-50%)

Fosforany	Kolumna CarboPac PA 100	Kolumna CarboPac PA 10
151	17.53	20.67
142	18.13	21.47
131	18.00	21.47
119	16.87	20.20
115	15.73	18.87

Różnice w czasach retencji monofosforanów metylo *L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu* na tej kolumnie były bardzo małe. Zmiana kolumny na CarboPac PA-10 (Dionex) pozwoliła na lepszą separację. Chromatografia była prowadzona przy liniowej zmianie gradientu eluentów 0,1M NaOH i 1M NaOAc/0,1M NaOH w przedziale 1-20%.

Analiza różnych mieszanin monofosforanów metylo *L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu* i ich soli disodowych pozwoliła wysnuć wniosek, że można rozróżnić heptozydy zawierające reszty fosforanowe w pozycjach C-2 lub C-3 lub C-7, które dawały jeden wspólny sygnał od związków zawierających reszty fosforanowe w pozycjach C-4 lub C-6 (Tabela 2).

Okazało się, że przy zastosowaniu metody chromatografii anionowymiennej można zbadać migrację pomiędzy grupami OH-6 i OH-7 zarówno w warunkach kwaśnych jak i zasadowych. Migracja pomiędzy innymi grupami mogła być zbadana, przy użyciu tej metody, w środowisku kwaśnym, wtedy bowiem przebiegała hydroliza glikozydu metylowego, a monofosforany *L-glicero-D-manno- α,β -heptopiranozy* były dobrze rozróżniane za pomocą HPAE.

TABELA 2

Czasy retencji monofosforanów metylo *L-glicero- α -D-manno*-heptopiranozydu w wysokociśnieniowej chromatografii anionowymiennej. Kolumna CarboPac PA 10.

Fosforany	Gradient 1-20%	Gradient 1-50%
161	19.60	12.53
171	19.67	12.73
181	20.40	13.20
187	20.40	13.07
193	19.53	12.53

Badania migracji grup fosforanowych w monofosforanach metylo *L-glicero- α -D-manno*-piranozydu w warunkach zasadowych (4M KOH) były przeprowadzone przy wykorzystaniu spektroskopii NMR.

Aby przeprowadzić badania przygotowałam odpowiedni zestaw wzorców. W jednakowych warunkach tzn. na takiej samej kolumnie CarboPac PA 10 i przy zastosowaniu gradientu 1-50% określiłam czasy retencji monofosforanów *L-glicero- α,β -D-manno*-heptopiranozy (Tabela 1) oraz monofosforanów metylo *L-glicero- α -D-manno*-heptopiranozydu (Tabela 2).

Mając tak przygotowany zestaw wzorców mogłam przystąpić do analizy stabilności grup fosforanowych w metylo *L-glicero- α -D-manno*-heptopiranozydzie w różnych warunkach hydrolitycznych.

W celu zbadania migracji reszt fosforanowych pomiędzy położeniami C-2 i C-3 fosforan **161** rozpuściłam w 1M kwasie solnym, i ogrzewałam w 100°C przez dwie godziny. Analiza wykazała, że w tych warunkach przebiega migracja reszty fosforanowej z położenia C-2 do C-3. Reszta fosforanowa na skutek migracji przechodziła z pozycji aksjalnej do bardziej uprzywilejowanej pozycji ekwatorialnej. Świadczyła o tym proporcja fosforanów **141** : **151** (2 : 1, Tabela 3). Obecność fosforanów **151** i **142** (**131**) w mieszaninie reakcyjnej dowodziła ponadto, że hydroliza grupy metoksyłowej przebiega szybciej niż hydroliza reszty fosforanowej. W warunkach kwaśnych przebiegała również hydroliza glikozydu jak i hydroliza reszty fosforanowej. Otrzymywałam bowiem jako główny produkt 58-71% wolną *L-glicero-D-manno*-heptozę (**8**) (Tabela 3).

TABELA 3

Przekształcenia metylo 2-O-fosforylo-L-*glicero*- α -D-*manno*-heptopiranozydu (**161**).

Warunki reakcji	forma	Produkty (%)				
		161	151	142(131)	115	8
1M HCl, 100°C	H ⁺	10.1	7.2	11.8	-	70.9
	Na ⁺	16.1	8.9	16.5	-	58.5
4M TFA, 100°C	H ⁺	14.6	2.6	7.8	2.0	73.5
	Na ⁺	15.4	3.2	9.5	2.0	71.9
4M KOH 120°C	Na ⁺	100	-	-	-	-

Potwierdziła to obecność bardzo intensywnego sygnału pojawiającego się po 4,67 minutach, co odpowiadało L-*glicero*-D-*manno*-heptozie (**8**). Porównanie czasu retencji wzorca 4.67 min. z czasem retencji głównego produktu otrzymanego w reakcji **161** z 1N HCl nie budziło wątpliwości. Poza tym pozostało ok. 10-16% niezmienionego substratu **161**.

Działanie na związek **161** zawierający resztę fosforanową w położeniu C-2 kwasem trifluoroctowym (Warunki B) również powodowało migrację. Potwierdziła to obecność 3- i 2-fosforanów **142** i **151** w proporcji 3 : 1. Nieoczekiwaną nowością była obecność niewielkiej ilości 7-fosforanu (2%) **115**. Mogło to świadczyć o tym, że grupa PO(OH)₂ migruje poprzez cały szkielet węglowy i tworzy stabilny fosforan w położeniu C-7. Innym wytłumaczeniem mogła być bezpośrednia estryfikacja 7-OH przez uwolniony kwas fosforowy. Ta hipoteza została odrzucona po wykonaniu eksperymentu modelowego. Ogrzewanie metylo L-*glicero*- α -D-*manno*-heptopiranozydu z kwasem fosforowym w 4M roztworze kwasu trifluoroctowego, w takich samych warunkach jak podczas badań migracji, prowadziło do L-*glicero*- α -D-*manno*-heptozy, która powstała na skutek hydrolizy glikozydu metylowego. Na chromatogramie (HPAE) nie był widoczny żaden inny sygnał pochodzący od fosforanu heptozy. Na skutek hydrolizy glikozydu i fosforanu powstała również L-*glicero*-D-*manno*-heptoza (**8**) (73.5%) (Tabela 3). W mieszaninie pozostało tylko 14.6% niezmienionego substratu **161**.

W warunkach zasadowych C związek **161** pozostawał niezmieniony, co prowadziło do wniosku, że w tych warunkach związek ten jest stabilny i grupa fosforanowa nie ulega migracji.

Reszta fosforanowa znajdująca się przy atomie węgla C-3 w metylo 3-O-fosforylo-L-*glicero- α -D-manno-heptopiranozydzie* **171** w warunkach kwaśnych (warunki A) również ulegała migracji podobnie jak w związku **161** (Tabela 4).

Tabela 4

Przekształcenia metylo 3-O-fosforylo-L-*glicero- α -D-manno-heptopiranozydu* (**171**)

Warunki reakcji	forma	Produkty (%)				
		171	151	142(131)	115	8
1M HCl 100°C	H ⁺	16.2	9.5	19	-	55.3
	Na ⁺	13.3	7.4	16.5	-	62.7
4M TFA 100°C	H ⁺	14.9	3.5	8.8	2.6	70.1
	Na ⁺	12.7	2.7	7.2	2.6	74.7
4M KOH 120°C	Na ⁺	100	-	-	-	-

W mieszaninie znajdowały się dwie fosforylowane heptozy **151** (9,5%) i **142** (19%). Potwierdzało to migrację reszty PO(OH)₂ z położenia C-3 do C-2. Proporcja fosforanów była podobna jak podczas hydrolizy 2-fosforanu (**161**). Poza tym stwierdziłam obecność substratu **171** (13.3-16.2%) i dużej ilości L-*glicero-D-manno-heptozy* (**8**) (55.3-62.7%) pochodzącej z pełnej hydrolizy substratu.

Działanie 4M kwasem trifluoroctowym (warunki B) na **171** powodowało migrację reszty fosforanowej z położenia C-3 do C-2. Tak jak poprzednio, stwierdziłam również obecność związku **115** zawierającego resztę fosforanową w położeniu C-7 (2.6%) **115**. W mieszaninie reakcyjnej znajdował się ponadto substrat **171**, w podobnej ilości jak w przypadku 2-fosforanu. Głównym produktem była L-*glicero-D-manno-heptoza* (**8**) (74.7%).

W warunkach hydrolizy zasadowej również związek **171** pozostawał niezmienny.

Rezultaty osiągnięte dla **161** i **171** świadczą o tym, że w warunkach kwaśnych przebiega najpierw hydroliza glikozydu, następnie migracja reszty fosforanowej, a potem odszczepienie hydrolityczne grupy PO(OH)₂.

Analiza zachowania się grupy fosforanowej przy atomie węgla C-4 w metylo 4-O-fosforylo-L-*glicero- α -D-manno-heptopiranozydzie* (**181**) w warunkach hydrolizy kwaśnej pozwala

stwierdzić, że reszta ta migruje prawie do wszystkich grup hydroksylowych w cząsteczce heptozydu (Tabela 5).

TABELA 5

Przekształcenia metylo 4-O-fosforylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu (**181**)

Warunki reakcji	forma	Produkty (%)				
		181	151	142(131)	115	8
1M HCl 100°C	H ⁺	-	6.7	19.3	11.2	62.8
	Na ⁺	-	10.8	33.9	12.1	43.2
4M TFA 100°C	H ⁺	-	3.2	15.5	11.1	70.2
	Na ⁺	3,3	3.3	16.3	11.6	65.5
4M KOH 120°C	Na ⁺	100	-	-	-	-

Działając na fosforan **181** kwasem solnym (warunki A) obserwowałam pojawienie się związku **115**, który zawierał resztę fosforanową w położeniu C-7 (12.1%), oraz związków **151**, **142** i **131** z resztą fosforanową w położeniu C-2 (10.8%) lub w C-3 lub w C-4 (33.9%). Oznaczało to, że reszta fosforanowa może migrować zarówno w kierunku OH-2 jak i OH-7 (Tabela 5). W mieszaninie reakcyjnej znajdowała się tak jak w poprzednich przypadkach L-glicero-D-manno-heptoza (**8**) jako wynik reakcji hydrolizy glikozydu i fosforanu.

Działanie na fosforan w położeniu C-4 kwasem trifluoroctowym (warunki B) prowadziło do jeszcze większego "rozproszenia" reszty fosforanowej po całej cząsteczce. W mieszaninie reakcyjnej znajdowały się związki z resztą fosforanową w położeniu C-7 (12%), w położeniu C-2 (3.4%) oraz mające resztę fosforanową w położeniu C-3 (lub C-4) (16.9%). Zaobserwowałam również niewielki sygnał pochodzący od związku zawierającego resztę fosforanową w położeniu C-6. Głównym produktem reakcji - tak jak i w poprzednich przypadkach- była wolna L-glicero-D-manno-heptoza (**8**) (67.8%).

W środowisku zasadowym (warunki C) tak jak we wcześniejszych doświadczeniach metylo 4-O-fosforylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**181**) pozostawał niezmienny.

Zachowanie się metylo 6-O-fosforylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu (**187**) było inne niż pozostałych. Po wodorowaniu pochodnej **186** otrzymałam czysty związek **187**, co zostało potwierdzone przez widma ¹H i ¹³C NMR. Gdy związek ten został pozostawiony w

roztworze wodnym, następowała spontaniczna migracja reszty fosforanowej do I-rzędowej grupy hydroksylowej przy C-7. Po dwóch tygodniach proporcja fosforanów **187** i **193** wynosiła 62% do 38%. W miarę upływu czasu zawartość związku **193**, w którym reszta fosforanowa znajdowała się w pozycji C-7 wzrastała. Można sądzić, że kwasowość **187** (wyższa niż kwasu fosforowego pH 1.3¹⁷⁷) wystarczała, aby spowodować autokatalityczną migrację reszty fosforanowej z II-rzędowej na I-rzędową grupę hydroksylową.

TABELA 6

Przekształcenia metylo 6-O-fosforylo-L-*glicero*- α -D-*manno*-heptopiranozydu (**187**)

Warunki reakcji	forma	Produkty (%)			
		187	119	115	8
1M HCl 100°C	H ⁺	1.0	20.5	63.5	15.0
4M TFA 100°C	H ⁺	-	9.7	80.9	9.4
4M KOH 120°C	H ⁺	100	-	-	-

Działanie kwasu na **187** powodowało usunięcie grupy metoksylowej i migrację reszty fosforanowej z położenia C-6 **119** do C-7 **115** (Tabela 6).

W warunkach zasadowych (warunki C) tak samo jak inne monofosforany związek **187** pozostawał niezmienny.

Szerzej przebadalam możliwość migracji reszty fosforanowej w metylo 7-O-fosforylo-L-*glicero*- α -D-*manno*-heptopiranozydzie (**193**) (Tabela 7). Było to możliwe ze względu na dobry podział pomiędzy związkami **187** i **193** w chromatografii anionowymiennej.

Związek **193** zawierający resztę fosforanową w położeniu C-7 potraktowałam 1% kwasem octowym w 100°C przez dwie godziny. Otrzymałam wyłącznie niezmienny substrat. W słabym kwasie nie przebiegała migracja reszty fosforanowej. Podobnie w warunkach zasadowych (warunki C) związek **193** pozostawał niezmienny.

W warunkach kwaśnych (A) grupa metoksylowa w związku **193** ulegała hydrolizie z utworzeniem ponad 80% związku **115** zawierającego resztę fosforanową w położeniu C-7 (87.9%) oraz 10% związku **119** zawierającego resztę fosforanową w położeniu C-6. Poza tym stwierdziłam obecność niewielkiej ilości L-*glicero*-D-*manno*-heptozy (**8**) (2.5%)

TABELA 7

Przekształcenia metylo 7-O-fosforylo-L-*glicero- α -D-manno*-heptopiranozydu (**193**)

Warunki reakcji	forma	Produkty (%)			
		193	119	115	8
1M HCl 100°C	H ⁺	-	10	84.7	5.3
	Na ⁺	-	9.6	87.9	2.5
4M TFA 100°C	H ⁺	-	11.4	81.6	7.0
	Na ⁺	-	9.6	80.5	9.9
4M KOH 120°C	H ⁺	100			
	Na ⁺	100			
1% AcOH 100°C	H ⁺	100			
	Na ⁺	100	-	-	-

Podobnie, potraktowanie związku **193** 4 M kwasem trifluorooctowym (warunki B) prowadziło głównie do hydrolizy grupy metoksylowej z centrum anomerycznego. Reszta fosforanowa ulegała tylko niewielkiemu przemieszczeniu w położenie C-6 (ok. 10%). Przebiegała również hydroliza grupy fosforanowej, o czym świadczyła obecność L-*glicero-D-manno*-heptozy (**8**) (9.9%).

Utworzenie 6-fosforanu **119** ze związku **193** świadczyło o tym że możliwa jest również migracja reszty fosforanowej z pozycji I-rzędowej do II-rzędowej tzn. O-7 do O-6.

Położenie reszty fosforanowej przy pierwszorzędowej grupie hydroksylowej jest termodynamicznie uprzywilejowane. Po wykonaniu obliczeń za pomocą mechaniki molekularnej¹⁷⁸ okazało się, że niższą energię ma 7-fosforan **193** niż 6-fosforan **187**.

Na podstawie przedstawionych danych można wysnuć wniosek, że fosforany zarówno w formie soli disodowych jak i wolnych kwasów zachowują się tak samo. W środowisku zasadowym w żadnym z monofosforanów metylo L-*glicero-D-manno*-heptopiranozydu nie obserwowaliśmy przemieszczania się reszty fosforanowej ani degradacji związku. W silnie

kwaśnych warunkach przebiegała migracja, jakkolwiek głównym produktem reakcji była L-*glicero-D-manno*-heptoza (**8**) (dla związków **161**, **171**, **181**) powstająca wskutek hydrolizy zarówno grupy metoksylowej na centrum anomerycznym jak również reszty fosforanowej. Hydroliza glikozydu była procesem szybszym niż hydroliza reszty fosforanowej, co pozwalało na śledzenie delokalizacji za pomocą HPAE.

Tylko grupa fosforanowa znajdująca się przy atomie węgla C-7 w **193** była stabilna i migrowała tylko w niewielkim stopniu w warunkach stosowanych do badań lipopolisacharydów. Obserwowana była niewielka delokalizacja tej grupy w środowisku kwaśnym (ok. 9% związku zawierającego resztę fosforanową w położeniu C-6).

Natomiast reszty fosforanowe znajdujące się w położeniach C-2 lub C-3 migrowały w warunkach kwaśnych. Reszta fosforanowa zajmowała w przewadze położenie ekwatorialne bez względu na to który z substratów był użyty do reakcji: mający resztę fosforanową w położeniu aksjalnym **161** lub w położeniu ekwatorialnym **171**. Ustalała się równowaga i proporcja fosforanów **151** do **142** była praktycznie taka sama 2-3:1 w obydwu reakcjach.

Migracja przebiegała najprawdopodobniej poprzez utworzenie cyklicznego związku przejściowego, zgodnie z mechanizmem wcześniej zaproponowanym przez Fordhama i Wanga¹⁶⁸ dla fosfogliceroli.

Najmniej stabilny w warunkach silnie kwaśnych był związek **181** zawierający resztę fosforanową w położeniu C-4. Obserwowałam migracje pomiędzy O-4 i O-6 przebiegające najprawdopodobniej poprzez sześcioczłonowy stan przejściowy. Stwierdziłam również przemieszczanie się reszty fosforanowej pomiędzy dwiema ekwatorialnymi grupami hydroksylowymi znajdującymi się w położeniu *trans*. Migracja ta przebiegała najprawdopodobniej również poprzez pięcioczłonowy związek przejściowy. Istnienie tego typu związku było udowodnione wcześniej przez Browna i Higson¹⁷⁵ na przykładzie monofosforanów cykloheksanodiolu 1,2.

Na uwagę zasługuje autokatalityczna samoistna migracja reszty fosforanowej w monofosforanie **187** z położenia C-6 do C-7. W tym przypadku, ze względu na łatwość utworzenia cyklicznego fosforanu również obserwowałam migrację typu „1,2-cis”.

IV. PODSUMOWANIE

Zachodząca w trakcie wyodrębniania i degradacji produktów naturalnych migracja reszt fosforanowych jest często przyczyną trudności w badaniach strukturalnych. Aby ułatwić interpretację wyników tych badań otrzymałam syntetycznie pięć monofosforanów *L-glicero-D-manno*-heptopiranozy i metylo *L-glicero-D-manno*-heptopiranozydu oraz zbadalam migrację grup fosforanowych w układzie *L-glicero-D-manno*-heptozy podstawowego składnika rdzenia wewnętrznego lipopolisacharydów.

Do syntezy układu *L-glicero-D-manno*-heptozy zastosowałam metodę elongacji wykorzystującą dobudowanie grupy CH_2OR do atomu węgla C-6 w D-mannozie. Jest to bardzo wygodna, prosta i selektywna metoda otrzymywania heptoz. Korzysta się w niej z łatwo dostępnej D-mannozy, do której przed reakcją homologowania wprowadzane są grupy zabezpieczające. Wprowadzenie nowego centrum chiralności przebiega z dobrą stereoselektywnością. Głównym produktem reakcji była zawsze *LDmanHepp* odpowiednio przygotowana do dalszych przekształceń.

Stosując tę metodę opracowałam syntezę tzw. "uniwersalnej" pochodnej heptozy. Zastosowałam takie grupy zabezpieczające, aby można było odblokować poszczególne grupy hydroksylowe pojedynczo przy pozostawieniu innych zabezpieczeń. Uzyskany synton może być dogodnym substratem w reakcjach glikozydowania lub podstawienia.

W celu zbadania migracji reszty fosforanowej zsyntetyzowałam monofosforany benzylowych pochodnych *LDmanHepp*, gdyż deprotekcja grup benzylowych przebiega w obojętnych warunkach nie powodujących migracji. Do reakcji fosforylacji wybrałam 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepan, odczynnik w którym układ estrowy był zabezpieczony jednakowymi grupami estrowymi usuwanymi w tych samych warunkach co grupy benzylove.

Zsyntetyzowałam pięć monofosforanów *L-glicero-D-manno*-heptozy oraz pięć monofosforanów metylo *L-glicero-D-manno*-heptopiranozydu. Jest to pierwsza synteza kompletu tych związków.

Zbadałam przemieszczanie się reszty fosforanowej w metylo *L-glicero- α -D-manno*-heptopiranozydzie w warunkach zasadowych i w warunkach kwaśnych. Stwierdziłam, że w warunkach zasadowych monofosforany *LDmanHepp* są trwałe i migracja reszt fosforanowych nie przebiega. Natomiast w warunkach kwaśnych głównym procesem była hydroliza grupy

metoksylowej jak również reszty fosforanowej. Na skutek tego, że hydroliza reszt fosforanowych przebiegała wolniej niż hydroliza glikozydu można było obserwować przebieg migracji. Zaobserwowałam migracje typu „1,2-*cis*” (pomiędzy grupami OH-2 i OH-3 oraz pomiędzy OH-6 i OH-7) oraz 1,2-*trans* pomiędzy dwiema grupami ekwatorialnymi (OH-4 i OH-3). Migracje te przebiegały najprawdopodobniej poprzez pięcioczłonowy związek przejściowy. Stwierdziłam ponadto, że przemieszczanie się reszty fosforanowej może również przebiegać poprzez sześcioczłonowy związek przejściowy (migracje pomiędzy grupami OH-4 i OH-6).

Jedyną grupą fosforanową która nie migrowała lub migrowała w bardzo niewielkim stopniu w warunkach stosowanych do badań LPS była grupa fosforanowa znajdująca się przy atomie węgla C-7. Ważną obserwacją była samoistna migracja reszty fosforanowej znajdującej się przy II-rzędowej grupie hydroksylowej w położeniu C-6 do pierwszorzędowej grupy hydroksylowej (OH-7).

Obserwacje te pozwolą na dokładniejsze wyjaśnienie budowy rdzenia wewnętrznego lipopolisacharydów, a dokładniej rzecz biorąc, regionu heptozowego tego rdzenia. Poznanie rzeczywistego położenia grup fosforanowych przyczyni się zapewne do syntezy takich fragmentów oligosacharydów zawierających heptozy, które będą zbliżone swą budową do układów naturalnych, a tym samym wykażą specyficzną czynność biologiczną.

V. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej (TLC) na płytkach firmy Merck (Silica Gel HF-254). Produkty wydzielano i oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej typu "flash"¹⁷⁹ używając żelu krzemionkowego firmy Merck (Kieselgel 60, 230-400 mesh lub 70-230 mesh). Chromatografia permeacyjna była wykonana na kolumnach (165 x 1.5 cm) z Bio-żelu P2 (Bio-Rad, Niemcy) w wodzie. Badania migracji grup fosforanowych przeprowadzono w termostatach w szczelnie zamkniętych naczyniach. Analizy produktów zostały przeprowadzone przy wykorzystaniu wysokociśnieniowej chromatografii anionowymiennej (HPAE). Badania zostały przeprowadzone na dionexie. System Dionex DX 300 był wyposażony w AS 3500 autoinjektor (Thermo Separation Products) i kolumny (4 x 250) CarboPac Pa 100 (Dionex) lub CarboPac Pa 10 (Dionex). Eluentem była mieszanina roztworów 0,1M NaOH i 1M NaOAc/0,1M NaOH przygotowanych ze zdejonizowanej, pozbawionej CO₂ wody, przechowywanych nad helem. Skład eluenta zmieniał się liniowo począwszy od 0-50% przez 30 minut lub 0-20% przez 30 minut. Do kontroli składu frakcji był używany pulsacyjny detektor amperometryczny (Dionex).

Widma IR wykonano na aparacie Perkin - Elmer 1640 FT-IR. Widma ¹H NMR wykonano na aparacie Bruker AM-500 (500 MHz) i Varian AC-200 (200 MHz). Widma ¹³C NMR były wykonane techniką DEPT na tych samych aparatach odpowiednio przy 125 MHz i 50 MHz, stosując tetrametylosilan (TMS) jako wzorzec wewnętrzny. Sygnały pochodzące od grup CH₂ w resztach benzylowych, allilowych znajdowały się we właściwych położeniach i zostały w większości przypadków pominięte przy opisie widm NMR. Widma fosforylowanych odblokowanych heptoz były mierzone w D₂O w 23°C na aparacie Bruker 360 MHz w następujących warunkach ¹H, 360 MHz wobec acetonu (δ 2.225), ¹³C, 90.6 MHz wobec acetonu (δ 31.45), ³¹P, 145 MHz wobec kwasu fosforowego jako standardu wewnętrznego.

Widma masowe i widma wysokiej rozdzielczości mierzono na spektrometrze masowym AMD-604. Pomiar skręcalności optycznej wykonano za pomocą polarymetru JASCO DIP-360 w temperaturze pokojowej 20 ± 2°C. Temperatury topnienia mierzono na aparacie Koflera i nie korygowano ich.

Wszystkie rozpuszczalniki były oczyszczane według ogólnie znanych metod¹⁸⁰. Acetylowanie prowadzono najczęściej w pirydynie za pomocą bezwodnika octowego z dodatkiem

katalitycznych ilości 4- N,N-dimetyloaminopirydyny. Roztwory związków były suszone za pomocą bezwodnego siarczanu magnezowego.

Benzylo 2,3-O-izopropylideno-6-O-trytylo- α -D-mannopiranozyd (99).

Benzylo 6-O-trytylo- α -D-mannopiranozyd¹⁰¹ (10.1 g) rozpuszczono w 2,2-dimetoksypropanie (70 ml) i dodano kwas p-toluenosulfonowy (0.108 g), mieszano w temperaturze pokojowej przez dwie godziny. Po zakończeniu reakcji (TLC ligroina-eter dietylowy 1 : 1) zobojętniono mieszaninę reakcyjną trietyloaminą, rozcieńczono chloroformem i osuszono. Po odparowaniu otrzymano surowy produkt (11.2 g) w postaci białej pianki. Chromatografia w układzie ligroina - eter dietylowy 9 : 1 - 4 : 1 dała **99** (9.1 g, 83.6%).

$[\alpha]_D + 14^\circ$ (1.7, CHCl₃),

Analiza dla C₃₅H₃₆O₆ (552.6); obl.: C 76.06, H 6.57; otrzym.: C 76.23, H 6.63.

IR (KBr) 3450, 1070 cm⁻¹

¹H NMR (CDCl₃): δ 5.12 (s, 1 H, H-1), 4.84-4.54 (ABq, 2 H, CH₂Ph), 4.18 (d, 1 H, J_{2,3} 6.2 Hz, H-2), 4.13 (t, 1 H, J_{3,4} 5.8 Hz, H-3), 3.80 (ddd, 1 H, J_{4,5} 9.6, J_{4,OH} 3.6 Hz, H-4), 3.69 (ddd, 1 H, J_{5,6A} 3.7, J_{5,6B} 6.0 Hz, H-5), 3.42 (dd, 1 H, J_{6A,6B} 10.0 Hz, H-6A), 3.35 (dd, 1 H, H-6B), 1.48, 1.33 (2 s, 6 H, 2 x CMe₂).

Benzylo 2,3-O-izopropylideno-4-O-(p-metoksybenzylo)-6-O-trytylo- α -D-mannopiranozyd (100)

Benzylo 2,3-O-izopropylideno-6-O-trytylo- α -D-mannopiranozyd (**99**) (9.3 g), rozpuszczono w dimetyloformamidzie (80 ml). Po ochłodzeniu do 0°C dodano 50% wodorek sodowy (1.459 g) i mieszano przez ok. 0.5 godz., a następnie wkroplono roztwór chlorku p-metoksybenzylowego (4.12 ml) w absolutnym tetrahydrofuranie (4 ml). Reakcję kontynuowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji (TLC ligroina - eter dietylowy 1 : 1) dodano metanol (1 ml), mieszano przez 15 minut, następnie mieszaninę reakcyjną wylano do wody z lodem (250 ml) i ekstrahowano eterem dietylowym. Po wysuszeniu i odparowaniu bezbarwny olej chromatografowano w układzie ligroina - eter dietylowy 95 : 5. Otrzymano **100** z wydajnością 11.0 g (97%).

$[\alpha]_D + 19^\circ$ (1.1, CHCl₃)

Analiza dla C₄₃H₄₄O₇ (672.8); obl.: C 76.76, H 6.59; otrzym.: C 76.88, H 6.73;

IR (film) 1513, 1246, 1081 cm^{-1} ;

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.18 (s, 1 H, H-1), 4.77 (ABq, 2 H, CH_2Ph), 4.30 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 6.6, $J_{3,2}$ 6.2 Hz, H-3), 4.21 (dd, 1 H, H-2), 3.91 (m, 1 H, $J_{5,4}$ 10.2, $J_{5,6B}$ 6.0 Hz, H-5), 3.78 (s, 3 H, OCH_3), 3.51 (dd, 1 H, H-4), 3.44 (dd, 1 H, $J_{6A,5}$ 1.6, $J_{6A,6B}$ 10.5 Hz, H-6A), 3.22 (dd, 1 H, H-6B), 1.52, 1.37 (2 s, 6 H, CMe_2).

Benzylo 2,3-O-izopropylideno-4-O-(p-metoksybenzylo)- α -D-mannopiranozyd (101)

Benzylo 2,3-O-izopropylideno-4-O-(p-metoksybenzylo)-6-O-trytylo- α -D-mannopiranozyd (**100**) (4.34 g) rozpuszczono w octanie etylu (20 ml) i w kwasie mrówkowym (14 ml), mieszano w temperaturze pokojowej 1 godzinę (TLC ligroina : octan etylu 1 : 1). Następnie mieszaninę reakcyjną zobojętniono nasyconym roztworem węgla potasowego, rozdzielono warstwy, a warstwę wodną dodatkowo ekstrahowano octanem etylu. Po wysuszeniu i odparowaniu olej chromatografowano w układzie heksan - eter dietylowy 9 : 1 - 3 : 1. Otrzymano produkt **101** (1.68g, 60.4%) w postaci białych kryształków.

tt 85-86 $^{\circ}\text{C}$ (heksan : eter dietylowy 4 : 1); $[\alpha]_D^{+61}$ (1.2, CHCl_3);

Analiza dla $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_7$ (430.5); obl.: C 66.96, H 7.02; otrzym.: C 67.15, H 7.17.

IR (KBr) 3400, 1510, 1245, 1070 cm^{-1}

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.12 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 0.5 Hz, H-1), 4.83-4.49 (2 x ABq, 4 H, 1 x CH_2Ph , 1 x $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 4.34 (t, 1 H, $J_{3,2}$ 6.0, $J_{3,4}$ 6.8 Hz, H-3), 4.19 (dd, 1 H, H-2) 3.79 (s, 3 H, OCH_3) 3.84-3.78 (m, 1 H, H-5), 3.75-3.68 (m, 2 H, H-4, H-6A), 3.54 (dd, 1 H, $J_{6B,6A}$ 9.9, $J_{6B,5}$ 7.0 Hz, H-6B), 1.55, 1.36 (2 s, 6 H, CMe_2).

Benzylo 7-O-allilo-2,3-O-izopropylideno-4-O-(p-metoksybenzylo)-D i L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (102 i 103).

Roztwór chlorku oksalilu (0.94 ml) w dichlorometanie (23.7 ml) silnie mieszano i ochłodzono do -60 $^{\circ}\text{C}$, następnie dodano roztwór dimetylosulfotlenku (1.62 ml) w dichlorometanie (45 ml). Po 5 minutach bardzo wolno wkroplono roztwór **101** (2.05 g) w dichlorometanie (19 ml). Reakcję kontynuowano w temperaturze -60 $^{\circ}\text{C}$ przez 1 godz., następnie wkroplono trietyloaminę (6.6 ml), mieszano jeszcze 5 min. w tej temperaturze i bardzo powoli ogrzano mieszaninę reakcyjną do temperatury pokojowej. Dodano wodę (50 ml) i ekstrahowano dichlorometanem. Warstwę

organiczną wysuszono i odparowano. Otrzymany olej po dokładnym wysuszeniu przez trzykrotne odparowanie z benzenem był używany do następnej reakcji bez dodatkowego oczyszczania.

W kolbie z mieszadłem magnetycznym umieszczono wiórki magnezowe (0.694 g) i chlorek rtęciowy (26 mg), dodano świeżo destylowany z nad LiAlH_4 tetrahydrofuran (1.5 ml), tak aby wiórki były pokryte rozpuszczalnikiem. Podczas intensywnego mieszania wkroplono niewielką ilość czystego eteru chlorometyloallilowego (destylowanego bezpośrednio przed reakcją) obniżając temperaturę początkowo do -10°C , a następnie do -20°C . Reakcję kontynuowano w tej temperaturze jeszcze przez dwie godziny. Po obniżeniu temperatury do -30°C wkroplono benzylo 2,3-O-izopropylideno-4-O-(p-metoksybenzylo)- α -D-manno-heksodialdo-1,5-piranozyd (2.04 g) rozpuszczony w absolutnym tetrahydrofuranie (11 ml). Po 2 godzinach mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury pokojowej i reakcję kontynuowano jeszcze przez 12 godzin. Następnie roztwór wytrząsano z ochłodzonym do 0°C nasyconym roztworem chlorku amonowego (120 ml) i ekstrahowano eterem dietylowym. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan - eter dietylowy 9 : 1 otrzymując mieszaninę pochodnych D-glicero-D-manno (**103**) i L-glicero-D-manno-heptopiranozy (**102**) (1.931 g, 81%).

Analiza surowego produktu za pomocą chromatografii wysokociśnieniowej (HPLC) wskazywała na powstawanie dwóch diastereoizomerów w proporcji 3.5 : 1.

Ponowna chromatografia w układzie heksan : eter dietylowy 9 : 1 dała jako pierwszy związek pochodną D-glicero-D-manno-heptopiranozy (**103**) 0.186 g.

$[\alpha]_{\text{D}} + 55^\circ$ (1.25, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_8$ (500.6); obl.: C 67.18, H 7.25, otrzym.: C 66.78, H 7.53.

IR (film) 3450, 1456, 1084 cm^{-1}

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.99 -5.79 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.34-5.09 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$) 5.07 (s, 1 H, H-1), 4.92-4.41 (2 x ABq, 4 H, 1 x CH_2Ph , 1 x $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 4.36 (t, 1 H, $J_{3,2}$ 6.4 $J_{3,4}$ 6.8 Hz, H-3), 4.18 (dd, 1 H, H-2) 4.06-3.92 (m, 3 H, H-6, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.92-3.46 (m, 4 H, H-4, H-5, H-7A, H-7B), 3.79 (s, 3 H, OCH_3), 3.34 (d, 1 H, OH) 1.53, 1.36 (2 s, 6 H, 2 x CH_3)

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 117.25 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), 96.1 (C-1), 78.85 (C-3), 78.15 (C-2), 76.78 (C-4), 72.63 (C-5), 69.13 (C-7), 67.29 (C-6), 76.63, 72.58, 72.42 (CH_2Ph , $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$) 55.32 (OCH_3) 28.06, 26.34 (2 x CMe_2).

Otrzymano ponadto mieszaninę obu heptoz **102** i **103** (0.417 g) oraz pochodną L-glicero-D-manno-heptozy (**102**) (1.262 g) w postaci krystalizującego oleju.

$[\alpha]_D + 49^\circ$ (1.2, CHCl_3), t.t. 60-61°C

Analiza dla $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_8$ (500.6); obl.: C 67.18, H 7.25; otrzym.: C 66.91, H 7.41.

IR (KBr) 3480, 1510, 1240, 1080 cm^{-1}

^1H NMR (CDCl_3) δ : 6.0-5.76 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.35-5.16 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.13 (s, 1 H, H-1), 4.90 - 4.39 (2 x ABq, 4 H, 1 x CH_2Ph , 1 x $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 4.35 (t, 1 H, $J_{3,2}$ 7.0, $J_{3,4}$ 6.0 Hz, H-3) 4.38-4.26 (m, 1 H, H-6), 4.23 - 3.90 (m, 4 H, H-2, H-5, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 3.79 (s, 3 H, OCH_3), 3.69 (m, 1 H, H-4), 3.67-3.48 (AB, 2 H, $J_{7A,7B}$ 9.3, $J_{7A,6}$ 7.0, $J_{7B,6}$ 6.1 Hz, H-7A, H-7B), 1.51, 1.36 (2 s, 6 H, CMe_2).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 96.38 (C-1), 79.02 (C-3), 75.70 (C-2), 74.89 (C-4), 67.81^a (C-5), 67.76^a (C-6), 69.11 (C-7), 71.32, 73.01, 72.41 (2 x CH_2Ph , $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 55.33 (OMe), 28.07, 26.48, (CMe_2).

Acetylowanie pochodnej *L-glicero-D-manno-heptozy* (**102**) w standartowych warunkach prowadziło do otrzymania pochodnej acetylowej (**102Ac**).

$[\alpha]_D + 56^\circ$ (1.5, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{O}_9$ (542.6); obl.: C 66.40, H 7.06; otrzym.: C 66.27, H 6.94.

IR (film) 1750, 1510, 1240, 1370, 1080 cm^{-1}

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.98-5.70 (m, 1 H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.51 (dt, 1 H, $J_{6,7A}$ 7.7, $J_{6,7B}$ 7.8, $J_{6,5}$ 1.5 Hz, H-6) 5.25-5.09 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.18 (ps, 1 H, H-1), 4.80-4.41 (2 x ABq, 4 H, 1 x CH_2Ph , 1 x $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 4.38 (t, 1 H, $J_{3,2}$ 6.2, $J_{3,4}$ 6.3 Hz, H-3) 4.18 (dd, 1 H, $J_{2,1}$ 0.7 Hz, H-2), 4.01 (dd, 1 H, $J_{5,4}$ 10.3 Hz, H-5), 4.0-3.98 (m, 2 H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.79 (s, 3 H, OCH_3) 3.69 (dd, 1 H, $J_{7A,7B}$ 9.5 Hz, H-7A), 3.63 (dd, 1 H, H-7B), 3.47 (dd, 1 H, H-4), 2.02 (s, 3 H, OAc), 1.51, 1.37, (2 s, 6 H, 2 x CMe_2).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 96.27 (C-1), 79.18 (C-3), 75.62 (C-2), 74.00 (C-4), 68.94 (C-6), 66.25 (C-5), 67.01 (C-7), 69.14, 72.17, 72.29, (2 x CH_2Ph , $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 55.33 (OMe), 28.14, 26.47, (C-Me_2), 20.99 (OAc).

Benzylo 7-O-allilo-6-O-benzylo-2,3-O-izopropylideno-4-O-(p-metoksybenzylo)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**104**).

Benzylo 7-O-allilo-2,3-O-izopropylideno-4-O-(p-metoksybenzylo)-*L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd* (**102**) (0.403 g) rozpuszczono w dimetyloformamidzie (9 ml) i ochłodzono do 0°C, a następnie dodano woderek sodowy (0.089 g). Mieszano ok. 0.5 godziny i wkroplono

roztwór chlorku benzylu (1.58 ml) w dimetyloformamidzie (1 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej 4 godziny. Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : eter dietylowy 4 : 1) wylano mieszaninę reakcyjną do wody z lodem i ekstrahowano eterem dietylowym. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie ligroina : eter dietylowy 4 : 1. Otrzymano **104** (0.320 g, 69%) w postaci bezbarwnego oleju.

$[\alpha]_D^{+61}$ (1.1, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{O}_8$ (590.7); obl.: C 71.15, H 7.17; otrzym.: C 70.95, H 7.44.

IR (film) 1510, 1240, 1070 cm^{-1}

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.97-5.75 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.35-5.10 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.20 (s, 1 H, H-1), 4.90 - 4.23 (3 x ABq, 6 H, 2 x CH_2Ph , 1 x $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 4.18 (pd, 1 H, $J_{2,3}$ 5.9, H-2); 4.09 (bt, 1 H, $J_{6,7A}$ 6.2, $J_{6,7B}$ 6.8 Hz, H-6), 4.02-3.93 (m, 2 H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.92-3.61 (m, 4 H, H-4, H-5, H-7A, H-7B), 3.77 (s, 3 H, OCH_3) 1.56, 1.38 (2 s, 6 H, CMe_2).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 96.44 (C-1), 79.27 (C-3), 75.75 (C-4), 75.18 (C-6), 74.80 (C-2), 69.04 (C-7), 68.09 (C-5), 69.67, 71.89, 72.58, (3 x CH_2Ph , $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 55.33 (OMe), 28.03, 26.52 (CMe_2).

Benzyl-6-O-benzyl-2,3-O-izopropylideno-4-O-(p-metoksybenzyl)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (105).

Związek **104** (0.126 g) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników etanol : benzen : woda (8 : 3 : 1), a po podgrzaniu dodano katalizator Wilkinsona (0.014 g) i 1.4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (6.6 mg). Ogrzewano do wrzenia przez 3 godziny. Po ochłodzeniu mieszaninę przesączono przez Celit i odparowano rozpuszczalniki. Surowy produkt rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników aceton : woda 10 : 1, dodano chlorek rtęciowy (0.058 g) i tlenek rtęciowy (0.046 g). Mieszano w temperaturze pokojowej 1 godzinę, następnie odsączono katalizatory na warstwie Celitu, przesącz rozcieńczono octanem etylu i przemyto 50% roztworem jodku potasowego oraz 1% roztworem wodorosiarczynu sodowego i 1% roztworem wodorowęglanu sodowego. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 4 : 1. Otrzymano **105** (0.059 g, 50%) w postaci bezbarwnego oleju.

$[\alpha]_D^{+64}$ (1.5, CHCl_3)

IR (film) 3480, 1515, 1077 cm^{-1}

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.17 (s, 1 H, H-1), 4.37 (t, 1 H, $J_{3,4}$ 6.2, $J_{3,2}$ 5.8 Hz, H-3), 4.19 (d, 1 H, H-2), 3.96-3.72 (m, 5 H, H-4, H-5, H-6, H-7A, H-7B), 3.76 (s, 3 H, OCH_3), 1.56, 1.37 (2 s, 6 H, 2 x CMe_2).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 96.44 (C-1), 78.99 (C-3), 76.67 (C-6), 75.60 (C-4), 75.00 (C-2), 69.76 (C-5), 62.54 (C-7), 69.33, 71.96, 73.08 (2 x CH_2Ph , $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 55.33 (OMe), 28.00, 26.41 (CMe_2).

Pochodną acetylową **105Ac** otrzymano w warunkach standardowych.

$[\alpha]_{\text{D}} + 60^\circ$ (0.84, CHCl_3).

Analiza dla $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{O}_9$ (592.7); obl.: C 68.90, H 6.80; otrzym.: C 68.81, H 7.02.

IR (film) 1742, 1514, 1247, 1077 cm^{-1}

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.19 (s, 1 H, H-1), 4.94-4.34 (m, 8 H, 2 x CH_2Ph , 1 x $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$, H-7A, H-7B), 4.34-3.78 (m, 5 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.76 (s, 3 H, OCH_3), 1.91 (s, 3 H, OAc), 1.56, 1.37 (2 s, 6 H, CMe_2).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 96.54 (C-1), 79.21 (C-3), 75.74 (C-4), 75.63^a (C-2), 74.09 (C-6), 67.88 (C-5), 62.53 (C-7), 69.08, 71.96, 73.52 (2 x CH_2Ph , $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 55.30 (OMe), 28.02, 26.50 (CMe_2), 20.86 (OAc).

Benzylo 7-O-allilo-6-O-benzylo-2,3-O-izopropylideno-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (106).

Benzylo 7-O-allilo-6-O-benzylo-2,3-O-izopropylideno-4-O-(p-metoksybenzylo)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (104) (0.031 g) rozpuszczono w dichlorometanie (1.4 ml), dodano wodę (0.2 ml), a następnie DDQ (0.018 g) i mieszano w temperaturze pokojowej w ciemności przez 3 godziny. Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : eter dietylowy 1 : 1) przesączono mieszaninę reakcyjną przez warstwę Celitu. Przesącz rozcieńczono dichlorometanem, przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodowego i wodą. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : eter dietylowy 85 : 15 otrzymując **106** (0.0217 g, 87%) w postaci bezbarwnego oleju.

$[\alpha]_{\text{D}} + 54^\circ$ (2.0, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_7$ (470.5); obl.: C 68.92, H 7.28; otrzym.: C 69.01, H 7.15.

IR (film) 3445, 1455, 1085 cm^{-1}

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.91-5.84 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.28-5.15 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.13 (s, 1 H, H-1), 4.83-4.42 (2 x ABq, 4 H, 2 x CH_2Ph), 4.13 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 5.7 $J_{2,1}$ 0.6 Hz, H-2), 4.1-3.99 (m, 3 H, H-3, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.91 (pt, 1 H, $J_{6,7A}$, 6.1 $J_{6,7B}$ 6.1 Hz, H-6), 3.77-3.70 (m, 4 H, H-5, H-7A, H-7B), 1.51, 1.32 (2 s, 6 H, CMe_2).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 96.47 (C-1), 78.56 (C-3), 75.74 (C-2), 74.36 (C-6), 69.18 (C-7), 69.10 (C-5), 68.71 (C-4), 69.08, 71.96, 73.55 (2 x CH_2Ph , CH_2CHCH_2), 28.16, 26.37 (CMe_2).

Po acetylowaniu w warunkach standartowych otrzymano krystaliczny związek **106Ac**.

$[\alpha]_D + 41^\circ$ (1.9, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_8$ (512.6); obl.: C 67.95, H 7.08, otrzym.: C 67.82, H 7.22.

IR (KBr) 1750, 1370, 1220, 1080 cm^{-1}

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.97-5.75 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.40 (dd, $J_{4,3}$ 6.8 $J_{4,5}$ 10.5 Hz, H-4), 5.28-5.14 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.2 (s, 1 H, H-1) 4.75-4.43 (2 x ABq, 4 H, 2 x CH_2Ph) 4.26 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 5.5 Hz, H-3), 4.15 (dd, 1 H, $J_{1,2}$ 0.7 Hz, H-2), 4.02-3.95 (m, 3 H, H-5, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.76-3.67 (m, 3 H, H-6, H-7A, H-7B), 2.05 (s, 3 H, OAc) 1.59, 1.33 (2 s, 6 H, CMe_2).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 96.21 (C-1), 76.87 (C-3), 75.68 (C-2), 74.39 (C-6), 69.09 (C-4), 68.59 (C-7), 66.74 (C-5), 69.13, 72.36, 73.58 (2 x CH_2Ph , $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 27.51, 26.50 (CMe_2), 21.12 (OAc).

Benzylo 7-O-allilo-6-O-benzylo-4-O-(p-metoksybenzylo)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (107)

Benzylo 7-O-allilo-6-O-benzylo-2,3-O-izopropylideno-4-O-(p-metoksybenzylo)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**104**) (0.325 g) rozpuszczono w octanie etylu (5 ml), dodano metanol (5 ml) oraz kwas p-toluenosulfonowy (0.209 g). Po dwóch godzinach mieszania w temperaturze pokojowej reakcję zobojętniono za pomocą trietyloaminy i odparowano. Surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 7 : 3 i otrzymano **107** (0.220 g, 73%) w postaci bezbarwnego oleju.

$[\alpha]_D + 77.5^\circ$ (1.0, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_8$ (550.6); obl.: C 69.80, H 6.96. otrzym.: C 69.70, H 7.19.

IR(film) 3430, 1510, 1090 cm^{-1}

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.97-5.77 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.52-5.10 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.91 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.5 Hz, H-1), 4.74-4.34 (m, 6 H, 2 x CH_2Ph , 1 x $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 4.09 (pt, $J_{6,7A}$ 6.4, $J_{6,7B}$ 6.2

Hz, H-6), 4.03-3.96 (m, 2 H, $CH_2CH=CH_2$), 3.96-3.62 (m, 6 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-7A, H-7B), 3.77 (s, 3 H, OCH_3), 2.67 (d, 1 H, J 2.7 Hz, OH), 2.45 (d, 1 H, J 7.0 Hz, OH).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ : 98.62 (C-1), 75.22^a (C-6), 75.07^a (C-4), 72.34 (C-5), 70.58 (C-2), 69.07 (C-7), 69.74, 72.34, 73.00, 73.93, (3 x CH_2Ph , $CH_2CH=CH_2$), 55.32 (OMe).

Po acetylowaniu w warunkach standardowych otrzymano pochodną 2,3-O-acetylową **107Ac**.

$[\alpha]_D^{+76^\circ}$ (2.1, $CHCl_3$)

Analiza dla $C_{36}H_{42}O_{10}$ (634.7); obl.: C 68.12, H 6.67 otrzym.: C 67.86, H 6.77.

IR (film) 1750, 1514, 1246, 1087 cm^{-1}

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 6.0-5.77 (m, 1 H, $CH=CH_2$), 5.42 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.4, $J_{3,4}$ 9.5 Hz, H-3), 5.29 (dd, 1 H, $J_{2,1}$ 1.9 Hz, H-2), 5.28-5.15 (m, 2 H, $CH=CH_2$), 4.90 (d, 1 H, H-1), 4.09 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.7 Hz, H-4), 4.08 (dt, 1 H, $J_{6,7A}$ 6.5 $J_{6,7B}$ 6.3, $J_{6,5}$ 1.3 Hz, H-6), 3.97 (dd, 1 H, H-5), 3.78 (dd, 1 H, $J_{7A,7B}$ 9.6 Hz, H-7), 3.76 (s, 3 H, OCH_3), 3.68 (dd, 1 H, H-7B), 2.1, 1.97 (2 s, 6 H, 2 x OAc).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ : 96.50 (C-1), 74.75 (C-6), 72.60 (C-4), 72.49 (C-3), 71.22 (C-5), 70.17 (C-2), 69.70 (C-7), 69.15, 72.43, 72.87, 74.01 (3 x CH_2Ph , $CH_2CH=CH_2$), 55.33 (OMe), 21.03 (OAc).

Benzylo 7-O-allilo-2,6-di-O-benzylo-4-O-(p-metoksybenzylo)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (108)

Benzylo 7-O-allilo-6-O-benzylo-4-O-(p-metoksybenzylo)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**107**) (0.139 g) rozpuszczono w dichlorometanie (3 ml), dodano 5% roztwór wodorotlenku sodowego (2 ml), bromek tetrabutylamoniowy (0.014 g) i bromek benzylo (0.039 ml). Intensywnie mieszano i ogrzewano do wrzenia przez 5 godzin. Po zakończeniu reakcji (TLC heksan: octan etylu 7 : 3) mieszaninę reakcyjną ochłodzono, warstwę organiczną wysuszono bezwodnym siarczanem magnezowym i odparowano otrzymując surowy produkt, który chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 9 : 1. Otrzymano pierwszy związek **108** w postaci bezbarwnego oleju (0.125 g, 77%).

$[\alpha]_D^{+33^\circ}$ (1.1, $CHCl_3$).

Analiza dla $C_{39}H_{44}O_8$ (640.7); obl.: C 73.10, H 6.92 ,otrzym.: C 73.32, H 6.65.

IR (film) 3450, 1458, 1061 cm^{-1}

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 6.0-5.89 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.33-5.12 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.11 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.5 Hz, H-1), 4.92-4.31 (3 x ABq, 8 H, 3 x CH_2Ph , 1 x $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 4.10 (pt, $J_{6,7A}$ 6.3, $J_{6,7B}$ 7.5 Hz, H-6), 4.05-3.99 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) 3.93 (t, 1 H, $J_{4,3}$ 8.2, $J_{4,5}$ 9.5 Hz, H-4), 3.88-3.68 (m, 5 H, H-2, H-3, H-5, H-7A, H-7B), 3.76 (s, 3 H, OCH_3), 2.36 (d, 1 H, J 9.5 Hz, OH).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 95.6 (C-1), 78.41 (C-2), 75.87 (C-4), 75.09 (C-6), 72.30 (C-3), 70.81 (C-5), 69.91 (C-7), 68.96, 72.41, 72.71, 72.92, 74.09 (4 x CH_2Ph , $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 55.32 (OMe).

Drugim produktem otrzymanym z chromatografii był związek **109** (0.010 g, 6.2%).

$[\alpha]_D + 49^\circ$ (1.4, CHCl_3)

Związek **108** acetylowano w warunkach standardowych otrzymując pochodną **108Ac**.

$[\alpha]_D + 44^\circ$ (1.8, CHCl_3).

Analiza dla $\text{C}_{41}\text{H}_{46}\text{O}_9$ (682.8); obl.: C 72.12, H 6.79; otrzym.: C 72.10, H 6.86.

IR (film) 1742, 1514, 1454, 1247 cm^{-1}

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.98-5.75 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.24 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.4 $J_{3,4}$ 8.4 Hz, H-3), $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.99 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 2.3 Hz, H-1), 4.89-4.22 (m, 8 H, 3 x CH_2Ph , 1 x $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 4.17 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.5 Hz, H-4), 4.07-3.94 (m, 3 H, H-6, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.94-3.73 (m, 3 H, H-2, H-5, H-7A), 3.75 (s, 3 H, OCH_3), 3.68 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.4, $J_{7B,7A}$ 9.6 Hz, H-7B), 1.96 (s, 1 H, OAc).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 97.08 (C-1), 75.95 (C-4), 75.01 (C-6), 73.99 (C-2), 73.07 (C-3), 71.40 (C-5), 69.94^a(C-7), 68.98^a, 72.41, 72.80, 72.80, 73.57 (4 x CH_2Ph , $\text{CHCH}=\text{CH}_2$), 55.33 (OCH_3), 21.22 (OAc).

Benzyl 7-O-allilo-3,6-di-O-benzyl-4-O-(p-metoksybenzyl)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**109**).

Benzyl 7-O-allilo-6-O-benzyl-4-O-(p-metoksybenzyl)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**107**) (0.221 g) rozpuszczono w benzenie (15 ml) i ogrzewano z nasadką azeotropową aż 7 ml rozpuszczalnika oddestyluje, następnie dodano tlenek dibutylocynowy (0.110 g) i kontynuowano ogrzewanie przez dwie godziny. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej wkroplono roztwór bromku benzylu (0.048 ml) w benzenie (1 ml). Zatężono mieszaninę reakcyjną do ok. 3 ml i ogrzewano do wrzenia przez 6 godzin. Po ostudzeniu odparowano, surowy produkt

chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 4 : 1. Otrzymano **109** w postaci bezbarwnego oleju (0.181 g, 66%).

$[\alpha]_D + 49^\circ$ (1.4, CHCl_3).

Analiza dla $\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{O}_8$ (670.4); obl.: C 73.10, H 6.92, otrzym.: C 73.00, H 6.89.

I.R. (film) 3452, 1514, 1248, 1085, 1056 cm^{-1}

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.98-5.75 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.32-5.08 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.0 (s, 1 H, $J_{1,2}$ 1.5 Hz, H-1), 4.16-3.84 (m, 7 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.84-3.66 (AB, 2 H, $J_{7A,6}$ 6.2, $J_{7A,7B}$ 9.4, $J_{7B,6}$ 6.8 Hz, H-7A, H-7B), 3.77 (s, 3H, OCH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 98.43 (C-1), 80.92 (C-3), 74.87 (C-4), 73.41 (C-6), 70.90 (C-5), 69.01 (C-7), 68.22 (C-2), 69.74, 71.83, 72.41, 72.83, 74.44, (4 x CH_2Ph , $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 55.34 (OMe)

Próbkę analityczną acetylowano w warunkach standardowych i otrzymano **109A** w postaci bezbarwnego oleju.

$[\alpha]_D + 34^\circ$ (0.9, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{41}\text{H}_{46}\text{O}_9$ (682.8); obl.: C 72.12, H 6.79; otrzym.: C 72.29, H 6.92.

IR (film) 1742, 1514, 1239, 1066 cm^{-1}

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.98-5.77 (m, 1 H $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.42 (t, 1 H, $J_{2,1}$ 1.9, $J_{2,3}$ 2.1 Hz, H-2), 5.34 - 5.10 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.96 (d, 1 H, H-1), 4.17-3.84 (m, 6 H, H-3, H-4, H-5, H-6, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.84-3.63 (AB, 2 H, $J_{7A,6}$ 6.8, $J_{7A,7B}$ 9.6 Hz, H-7A, H-7B), 3.77 (s, 3 H, OCH_3), 2.14 (s, 3 H, OAc).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 96.94 (C-1), 78.93 (C-3), 74.86 (C-4), 73.58 (C-6), 71.28 (C-5), 69.18 (C-7), 68.65 (C-2), 69.75, 71.85, 72.43, 73.06, 74.52 (4 x CH_2Ph , 1 x $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 55.33 (OMe), 21.21 (OAc).

Benzylo 7-O-allilo-2,3,4-tri-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd, benzylo 7-O-allilo-2,3,4-tri-O-benzylo-D(L)-glicero- β -L-gulo-heptopiranozyd (111 i 112).

Roztwór chlorku oksalilu (0.816 ml) w dichlorometanie (10.2 ml) silnie mieszano i ochłodzono do -60°C , następnie dodano roztwór dimetylosulfotlenku (1.38 ml) w dichlorometanie (4 ml). Po 5 minutach bardzo wolno wkroplono roztwór benzylo 2,3,4-tri-O-benzylo- α -D-mannopiranozydu¹⁰¹ (**110**) (2.206 g) w dichlorometanie (5 ml). Reakcję kontynuowano w temperaturze -60°C przez 1 godzinę następnie wkroplono trietyloaminę (5.71 ml), mieszano

jeszcze 5 minut w tej temperaturze i bardzo powoli ogrzano mieszaninę do temperatury pokojowej. Dodano wodę (50 ml) i ekstrahowano dichlorometanem. Warstwę organiczną wysuszone i odparowano. Otrzymano olej, który po dokładnym wysuszeniu przez kilkakrotne odparowanie z benzenem użyto do dalszej reakcji bez dodatkowego oczyszczania.

W kolbie z mieszadłem magnetycznym umieszczono wiórki magnezowe (0.595 g) i chlorek rtęciowy (26 mg), dodano świeżo destylowany tetrahydrofuran (1.5 ml). Podczas intensywnego mieszania dodano niewielką ilość eteru chlorometyloallilowego (destylowanego bezpośrednio przed reakcją) obniżając temperaturę od 0°C do -15°C. Po zapoczątkowaniu reakcji wkroplono pozostałą część eteru chlorometyloallilowego utrzymując temperaturę -18°C do -20°C. Reakcję kontynuowano w tej temperaturze jeszcze przez dwie godziny. Po obniżeniu temperatury do -30°C wkroplono roztwór benzylo 2,3,4-tri-O-benzylo- α -D-manno-heksodialdo-1,5-piranozydu (2.198 g) w absolutnym tetrahydrofuranie (10 ml) i mieszano dwie godziny w tej temperaturze, następnie mieszaninę bardzo powoli ogrzano do temperatury pokojowej. Reakcję kontynuowano jeszcze przez 12 godzin. Potem roztwór wytrząsano z ochłodzonym do 0°C nasyconym roztworem chlorku amonowego (120 ml) i ekstrahowano eterem dietylowym. Po odparowaniu, wysuszeniu i chromatografii w układzie heksan : octan etylu 85 : 15 otrzymano pochodną **112** (0.586 g, 24%).

$[\alpha]_D + 5.3^\circ$ (2.5, CHCl₃).

HR MS (LSIMS) dla $[M+Na]^+$ (C₃₈H₄₂O₇Na) obl.: 633.2828, otrzym.: 633.2827.

¹H NMR (CDCl₃): *inter alia* δ 4.93 (d, 1 H, J_{1,2} 8.1 Hz, H-1), 3.81 (dd, 1H, J_{5,6} 9.0, J_{5,4} 1.1 Hz, H-5), 3.63 (dd, 1 H, J_{4,3} 3.2 Hz, H-4), 3.56 (dd, 1 H, J_{7B,6} 9.7 Hz, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃) δ : 100.6 (C-1), 76.09, 74.96, 73.83, 72.70, 67.91 (C-2, 3, 4, 5, 6), 71.5 (C-7).

Drugim związkem wymytym z kolumny była pochodna L-glicero-D-manno-heptopiranozy **111** (1.302 g, 52%).

$[\alpha]_D + 40^\circ$ (2.6, CHCl₃), lit.¹⁰¹ $[\alpha]_D + 35^\circ$ (1.1, CHCl₃).

¹H NMR (CDCl₃) δ : 5.99-5.75 (m, 1 H, CH=CH₂), 5.26-5.04 (m, 2 H, CH=CH₂), 4.86 (d, 1 H, J_{1,2} 1.9 Hz, H-1), 5.01-4.25 (m, 8 H, 4 x CH₂Ph), 4.19 (t, 1 H, J_{4,3} 9.6, J_{4,5} 9.5 Hz, H-4), 4.85 (pt, 1 H, H-6) 4.25-3.86 (m, 3 H, OCH₂CH=CH₂, H-3), 3.81 (dd, 1 H, J_{2,3} 2.8 Hz, H-2), 3.68 (dd, J_{5,6} 1.1 Hz, H-5), 3.60 (dd, 1 H, J_{7A,7B} 9.4, J_{7A,6} 7.3 Hz, H-7A), 3.50 (dd, 1 H, J_{7B,6} 6.2 Hz, H-7B), 1.80 (ps, 1 H, OH).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 117.17 (CH=CH₂), 97.49 (C-1), 80.40 (C-3), 74.83, 74.40 (C-2,C-4), 71.19 (C-5), 68.94 (C-7), 67.93 (C-6).

Próbkę analityczną zacetylowano w warunkach standardowych **111Ac**.

$[\alpha]_D + 19^\circ$ (1.7, CHCl_3), lit¹⁰¹ $[\alpha]_D + 18$ (1.5, CHCl_3).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.95-5.72 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.63 (pt, 1 H, $J_{6,7A}$ 5.9, $J_{6,7B}$ 7.0, $J_{6,5}$ 1.1 Hz, H-6), 4.05-3.86 (m, 5 H, H-3, H-4, H-5, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 3.82 (dd, 1 H, $J_{2,1}$ 1.9, $J_{2,3}$ 2.4 Hz, H-2), 3.72-3.62 (m, 2 H, H-7A, H-7B), 3.09 (s, 3 H, OAc).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 96.94 (C-1), 80.64 (C-3), 74.07, 73.91 (C-2, C-4), 69.72 (C-5), 68.88 (C-6), 67.55 (C-7), 134.42 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 117.23 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 75.39, 72.47, 2 x 72.16, 69.01 (4 x CH_2Ph , 1 x $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{}$).

Benzyl 7-O-allilo-2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-difenylofosforylo-L-glicero- α -D-mannoheptopiranozyd.

Triazol (0.098 g) rozpuszczono w absolutnym tetrahydrofuranie (1 ml), dodano trietyloaminę (0.197 g), ochłodzono mieszaninę reakcyjną do 0°C , a następnie wkroplono roztwór difenylochlofosforanu (0.295 ml) rozpuszczony w tetrahydrofuranie (1 ml). Mieszano 10 minut w tej temperaturze i 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Odsączono chlorowodorek trietyloaminy. Do wysuszonego benzylu 7-O-allilo-2,3,6-tri-O-benzyl-L-glicero- α -D-mannoheptopiranozydu (**111**) przesączono bis triazolid i mieszaninę reakcyjną ogrzewano przez dwie godziny w temperaturze 40°C . Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : eter dietylowy 1 : 1), dodano wodę, mieszano przez 0.5 godziny, a następnie ekstrahowano dichlorometanem. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy olej chromatografowano w układzie heptan : octan etylu 85 : 15. Otrzymano (0.341 g) w postaci bezbarwnego oleju.

$[\alpha]_D + 25^\circ$ (1.2, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{50}\text{H}_{51}\text{O}_{10}\text{P}$ (842.9); obl.: C 71.24, H 6.10; otrzym.: C 71.09, H 6.18.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.88-5.66 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.32-5.02 (m, 3 H, H-6, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.04 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.7 Hz, H-1), 4.09 (t, 1 H, $J_{4,3}$ 9.2, $J_{4,5}$ 9.5 Hz, H-4), 4.0-3.87 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.83 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 3.0 Hz, H-2), 3.81 (dd, 1 H, $J_{7A,6}$ 6.6, $J_{7A,7B}$ 9.7 Hz, H-7A), 3.74 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 7.0 Hz, H-7B).

Benzyl 7-O-allilo-2,3,4,6-tetra-O-benzyl-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (56)

Związek **111** (1.123 g) rozpuszczono w absolutnym dimetyloformamidzie (10 ml) i po ochłodzeniu do 0°C dodano wodorek sodowy (0.176 g), mieszano ok.10 minut, dodano roztwór chlorku benzylu (0.424 ml) w dimetyloformamidzie (1 ml). Reakcję kontynuowano przez 8 godzin w temperaturze pokojowej, następnie rozłożono wodorek metanolem i wylano mieszaninę reakcyjną do wody z lodem. Produkt ekstrahowano eterem dietylowym i suszono siarczanem magnezowym. Otrzymano **56** (1.107 g, 86%) w postaci białych kryształów.

t.t. 60-61°C [α]_D +45° (1.4, CHCl₃); lit.¹⁰¹ [α]_D + 43°(2.0, CHCl₃)

IR (film) 1500, 1450, 1100 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃) δ : 5.28-5.10 (m, 2 H, CH=CH₂), 5.02 (d, 1 H, J_{1,2} 1.7 Hz, H-1), 4.92-4.35 (m, 10 H, 5 x CH₂Ph, CH₂CH=CH₂), 4.24 (t, 1 H, J_{4,3} 9.5, J_{4,5} 9.6 Hz, H-4), 4.12 (dt, H-6), 4.04-3.93 (m, 3 H, H-3, CH₂CH=CH₂), 3.87 (dd, 1 H, J_{5,6} 1.3 Hz, H-5), 3.83 (dd, 1 H, J_{2,3} 3.0 Hz, H-2), 3.79 (dd, 1 H, J_{7A,7B} 9.6, J_{7A,6} 6.3 Hz, H7A), 3.72 (dd, 1 H, J_{7B,6} 6.5 Hz, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃) δ : 117.05 (CH=CH₂), 97.03 (C-1), 80.8 (C-3), 75.04 (C-6), 74.62 (C-2), 74.49 (C-4), 71.63 (C-5), 69.86 (C-7), 74.63, 72.77, 72.42, 72.32, 72.05, 68.81 (5 x CH₂Ph, CH₂CH=CH₂).

Benzyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (62)

Związek **56** (0.459 g) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników etanol : benzen : woda 9 : 3 : 1, następnie dodano DABCO (0.015 g), podgrzano mieszaninę reakcyjną i w temperaturze bliskiej wrzenia dodano katalizator Wilkinsona (0.042 g). Ogrzewano do wrzenia 3 godziny. Pozostawiono mieszaninę reakcyjną na noc w temperaturze pokojowej. Następnie przesączono przez Celit i odparowano. Otrzymany olej rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników aceton : woda 15 : 1, dodano tlenek rtęciowy (0.149 g) i chlorek rtęciowy (0.187 g), mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Po zakończeniu reakcji katalizatory odsączono na warstwie Celitu, a przesącz odparowano i rozpuszczono w eterze dietylowym. Przemyto 50% jodkiem potasowym, 1% wodorosiarczynem sodowym i 1% wodorowęglanem sodowym. Po wysuszeniu i odparowaniu, chromarografowano w układzie ligroina : eter dietylowy 7 : 3. Otrzymano **62** (0.373 g) w postaci bezbarwnego oleju (83%).

$[\alpha]_D +48^\circ$ (1.3, CHCl_3), lit.¹⁰¹: $[\alpha]_D +83^\circ$ (0.9, CHCl_3).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.0 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.9 Hz, H-1), 4.82-4.36 (5 x ABq, 10 H, 5 x CH_2Ph), 4.23 (t, 1 H, $J_{4,3}$ 9.2, $J_{4,5}$ 9.5 Hz, H-4), 4.02-3.85 (m, 5 H, H-3, H-5, H-6, H-7A, H-7B), 3.83 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 3.0 Hz, H-2).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 97.26 (C-1), 80.48 (C-3), 76.05 (C-6), 74.51 (C-2), 74.46 (C-4), 73.54 (C-5), 62.59 (C-7), 74.76, 72.59, 72.23, 72.12, 69.25, (5 x CH_2Ph).

Pochodna acetylowa została wykonana w warunkach standardowych **62Ac**.

$[\alpha]_D +30^\circ$ (1.0, CHCl_3).

HR MS (LSIMS) dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{44}\text{H}_{46}\text{O}_8$) obl.: 725.3090, otrzym.: 725.3083.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.02 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.7 Hz, H-1), 4.53 (dd, 1 H, $J_{7A,7B}$ 11.1, $J_{7A,6}$ 6.0 Hz, H-7A), 4.27 (dd, $J_{7B,6}$ 7.3 Hz, H-7B), 4.22 (t, 1 H, $J_{4,3}=J_{4,5}=9.4$ Hz, H-4), 4.11 (dt, 1 H, $J_{6,5}$ 1.5 Hz, H-6), 3.93 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.0 Hz, H-3), 3.82 (dd, 1 H, H-2), 3.81 (dd, 1 H, H-5), 1.96 (s, 3 H, OAc)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 97.01 (C-1), 80.61 (C-3), 74.29 (C-6), 74.09 (C-2), 73.84 (C-4), 71.27 (C-5), 62.54 (C-7).

Benzyl 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-7-O-(5,6-benzo-2-okso-1,3,2,-dioksafosfepan-2-ylo)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (114).

Związek **62** (0.373 g) rozpuszczono w absolutnym dichlorometanie (10 ml) i dodano tetrazol (0.119 g). Mieszano w temperaturze pokojowej przez ok. 10 minut. Następnie wkroplono roztwór 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepanu (0.143 g) w dichlorometanie (1 ml) i mieszano w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : eter dietylowy 1 : 1) ochłodzono mieszaninę reakcyjną do -60°C i dodano kwas metachloronadbenzoesowy (0.175 g) w dichlorometanie. Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : octan etylu 1 : 1) dodano octan etylu (20 ml) i przemyto 1% wodnym roztworem wodorosiarczyny sodowego i 1% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego. Warstwę organiczną wysuszono i odparowano, otrzymano surowy produkt (0.813 g), który chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 4 : 1. Otrzymano **114** (0.465 g, 98%) w postaci bezbarwnego oleju.

$[\alpha]_D +31^\circ$ (1.4, CHCl_3).

Analiza dla $C_{50}H_{51}O_{10}P$ (842.9); obl.: C 71.24, H 6.10; otrzym.: C 71.06, H 6.06.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 5.24-4.27 (m, 16 H, 5 x CH_2Ph , H-7A, H-7B), 5.03 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.9 Hz, H-1), 4.22 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.4 Hz, H-4), 4.18 (dt, 1 H, H-6), 4.0 (dd, 1 H $J_{3,2}$ 3.0, $J_{3,4}$ 9.1 Hz, H-3), 3.87 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ 1.3 Hz, H-5), 3.82 (dd, 1 H, H-2).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ : 97.14 (C-1), 80.60 (C-3), 74.80 (d, $J_{C,P}$ 7.7 Hz, C-6), 74.25, 74.01 (C-4, C-2) 70.94 (C-5), 66.06 (d, $J_{C,P}$ 5.7 Hz, C-7).

Sól di(cykloheksyloamoniowa) 7-O-fosforanu L-glicero- α,β -D-manno-heptopiranozy (115)

Związek **114** (0.693 g) rozpuszczono w mieszaninie etanolu (10 ml) i octanu etylu (5 ml), a następnie dodano 10% pallad na węglu (0.690 g), wodorowano przez noc w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji mieszaninę przesączono przez warstwę Celitu. Po odparowaniu otrzymano białą piankę, którą po przemyciu eterem dietylowym i acetonem oraz wysuszeniu rozpuszczono w 0.3 M roztworze cykloheksyloaminy (3 ml), mieszano 5 godzin w temperaturze pokojowej. Wodę zliofilizowano, otrzymano **115** (0.298 g) w postaci białej pianki (74%).

$[\alpha]_D^{+20} + 7.5^\circ$ (0.9, H_2O), wartość równowagowa.

^{13}C NMR, 1H NMR i ^{31}P NMR znajdują się w tabeli 8.

Benzylo 2,3,4,6-tetra-O-benzylo-7-O-(difenylfosforylo)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (113)

Triazol (0.064 g), rozpuszczono w absolutnym tetrahydrofuranie (1.5 ml), dodano trietyloaminę (0.128 ml), a następnie wkroplono roztwór difenylchlorofosforanu (0.19 ml) w tetrahydrofuranie (1 ml) w $0^\circ C$. Mieszano 20 minut w obniżonej temperaturze i 40 minut w temperaturze pokojowej. Następnie podgrzano reakcję do $40^\circ C$ i kontynuowano przez 4 godziny. Po zakończeniu reakcji (TLC, heksan : eter dietylowy 1 : 1), do mieszaniny reakcyjnej dodano wody i ekstrahowano dichlorometanem. Otrzymany olej chromatografowano w układzie heksan : eter dietylowy 3 : 1. Otrzymano **113** (0.196 g) w postaci bezbarwnego oleju (72%).

$[\alpha]_D^{+20} + 31^\circ$ (1.0, $CHCl_3$).

Analiza dla $C_{54}H_{53}O_{10}P$ (893.0); obl.: C 72.63, H 5.98; otrzym.: C 72.22, H 5.93.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.0 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.6 Hz, H-1), 4.96-4.27 (m, 12 H, 5 x CH_2Ph , H-7A, H-7B), 4.21 (t, 1 H, $J_{4,3}$ 9.3, $J_{4,5}$ 9.5 Hz, H-4), 4.20-4.12 (pt, 1 H, H-6), 3.97 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.1 Hz, H-3), 3.88-3.80 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ 1.4 Hz, H-5), 3.80 (dd, 1 H, H-2).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 97.19 (C-1), 80.60 (C-3), 74.99 (d, $J_{\text{C,P}}$ 8.1 Hz, C-6), 74.35^a (C-2), 74.04^a (C-4), 71.18 (C-5), 67.67 (d, $J_{\text{C,P}}$ 6.5 Hz, C-7), 74.59, 73.11, 72.57, 72.06, 69.21 (5 x CH_2Ph).

Benzylo 2,3,4,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd i *benzylo 2,3,4,7-tetra-O-benzylo-D(L)-glicero- β -L-gulo-heptopiranozyd* (**116** i **117**).

Roztwór chlorku oksalilu (1.5 ml) w dichlorometanie (36.4 ml) silnie mieszano i ochłodzono do -60°C , następnie dodano roztwór dimetylosulfotlenku (2.48 ml) w dichlorometanie (7.3 ml). Po 5 minutach bardzo powoli wkroplono benzylo 2,3,4-tri-O-benzylo- α -D-mannopiranozyd (**110**) (3.93 g) rozpuszczony w dichlorometanie (10 ml). Reakcję kontynuowano w temperaturze -60°C przez dwie godziny. Następnie wkroplono trietyloaminę (10.2 ml), mieszano jeszcze 5 minut w tej temperaturze i bardzo powoli ogrzano do temperatury pokojowej. Dodano wodę (73 ml) i ekstrahowano dichlorometanem. Warstwę organiczną wysuszono i odparowano. Otrzymano olej, który po dokładnym wysuszeniu przez kilkukrotne odparowanie z benzenem użyto do następnej reakcji bez dodatkowego oczyszczania.

W kolbie z mieszadłem magnetycznym umieszczono wiórki magnezowe (1.05 g) i chlorek rtęciowy (50 mg), dodano świeżo destylowany z nad LiAlH_4 tetrahydrofuran (1.5 ml), tak aby wiórki były przykryte rozpuszczalnikiem. Podczas intensywnego mieszania wkroplono niewielką ilość czystego eteru chlorometylowobenzylowego (destylowanego bezpośrednio przed reakcją) obniżając temperaturę do ok. 0°C . Po zapoczątkowaniu reakcji bardzo powoli wkroplono pozostały roztwór eteru chlorometylowobenzylowego (6.84 g) w tetrahydrofuranie (3 ml) utrzymując temperaturę 0 - 5°C . Reakcję kontynuowano w tej temperaturze przez 2 godziny, po obniżeniu temperatury do -20°C wkroplono roztwór benzylo 2,3,4-tri-O-benzylo- α -D-manno-heksodialdo-1,5-piranozydu (3.92 g) w absolutnym tetrahydrofuranie (10 ml). Reakcję kontynuowano w temperaturze -20° - -10°C przez dwie godziny i przez 12 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór wytrząsano z ochłodzonym do 0°C nasyconym roztworem chlorku amonowego (150 ml) i ekstrahowano eterem dietylowym. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 9 : 1 do 85 : 15 otrzymując jako pierwszy związek pochodną **117** (0.709 g, 17.5%).

Produkt **117** został scharakteryzowany w postaci pochodnej acetylowej.

6-O-acetylo-2,3,4,7-O-tetra-O-benzylo-D(L)-glicero-β-L-gulo-heptopiranozyd (117 Ac),

$[\alpha]_D +18^\circ$ (1.1, CHCl₃);

¹H NMR (C₆D₆): *inter alia* δ: 5.71 (ddd, 1 H, J_{6,5} 8.6, J_{6,7A} 2.0, J_{6,7B} 4.8 Hz, H-6), 5.25 (d, 1 H, J_{1,2} 8.1 Hz, H-1), 3.89 (dd, 1 H, J_{5,4} 1.2 Hz, H-5), 3.99 (dd, 1 H, J_{3,2} 3.3, J_{3,4} 3.3 Hz, H-3), 3.94 (dd, 1H, H-2), 3.91 (dd, 1H, J_{7A,7B} 11.1 Hz, H-7A), 3.82 (dd, 1 H, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃): *inter alia*, δ 100.80 (C-1), 75.97, 74.38, 73.63, 70.31, 70.10 (C-2, 3, 4, 5, 6), 68.30 (C-7).

Drugim związkem otrzymanym z chromatografii był **116** (3.997 g, 46%).

$[\alpha]_D +24^\circ$ (1.14, CHCl₃)

Analiza dla C₄₂H₄₄O₇ x 0.5 H₂O (660.77 + 9.0); obl.: C 75.31, H 6.62; otrzym.: C 75.65, H 6.69.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.89 (d, 1 H, J_{1,2} 1.6 Hz, H-1), 4.19 (dt, 1 H, J_{6,7A} 7.3, J_{6,7B} 6.1 Hz, H-6), 4.21 (t, 1 H, J_{4,5} 9.8 Hz, H-4), 3.96 (dd, 1 H, J_{3,2} 3.0 J_{3,4} 9.5 Hz, H-3), 3.80 (dd, 1 H, H-2), 3.74 (dd, 1 H, H-5), 3.64 (dd, 1 H, J_{7A,7B} 9.4 Hz, H-7A), 3.55 (dd, 1 H, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 97.49 (C-1), 80.40 (C-3), 74.70 (C-2), 74.37 (C-4), 71.21 (C-5), 67.98 (C-6), 71.51 (C-7).

Benzylo 2,3,4,7-tetra-O-benzylo-6-O-(5,6-benzo-2-okso-1,3,2-dioksafosfepan-2-yl)-L-glicero-α-D-manno-heptopiranozyd (118)

Związek **116** (0.477 g) rozpuszczono w dichlorometanie (8 ml), dodano tetrazol (0.153 g), mieszano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie wkroplono roztwór 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepanu (0.183 g) w dichlorometanie (1 ml) i pozostawiono mieszaninę reakcyjną na noc w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : octan etylu 7 : 3) mieszaninę reakcyjną ochłodzono do -60°C i wkroplono roztwór kwasu m-chloronadbenzoesowego (0.224 g) w dichlorometanie. Po 15 minutach reakcja była zakończona (TLC, heksan : octan etylu 1 : 1). Ogrzano mieszaninę reakcyjną do temperatury pokojowej, dodano octan etylu (20 ml) i przemyto 50% wodnym roztworem jodku potasowego, 1% roztworem wodorosiarczynu sodowego oraz 1% roztworem wodorowęglanu sodowego. Po

wysuszeniu i odparowaniu olej chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 9 : 1 do 85 : 15. Otrzymano **118** (0.427 g) w postaci krystalizującego oleju (70%).

t.t. 138° - 139°C [α]_D+ 6.4° (0.7, CHCl₃).

Analiza dla C₅₀H₅₁O₁₀P. (842.9); obl.: C 71.24, H 6.10; otrzym.: C 71.16, H 5.97.

¹H NMR (CDCl₃) δ : 4.4-4.3 (m, 11 H, 5 x CH₂Ph, H-6), 4.98 (d, 1 H, J_{1,2} 1.9 Hz, H-1), 4.17 (t, 1 H, J_{4,3}= J_{4,5}= 9.4 Hz, H-4), 4.04 (dd, 1 H, J_{3,2} 2.8 Hz, H-3), 3.98-3.74 (m, 4 H, H-2, H-5, H-7A, H-7B),

¹³C NMR (CDCl₃) δ : 97.15 (C-1), 80.87 (C-3), 75.11^a(C-4), 74.67 (d, J_{C,P} 5.5 Hz C-6), 73.97^a (C-2), 70.31 (d, J_{C,P} 5.9 Hz, C-5), 68.8 (d, J_{C,P} 1.6 Hz, C-7) 75.30, 73.36, 72.96, 72.30, 69.14 (5 x CH₂Ph).

a) przypisania mogą być zamienione

Sól di(cykloheksyloamoniowa) 6-O-fosforanu L-glicero- α,β -D-manno-heptopiranozy (119).

Związek **118** (0.383 g) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników etanol : octan etylu 1 : 1. Dodano 10 % pallad na węglu (0.383 g) i wodorowano przez całą noc w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono na warstwie Celitu, przemyto etanolem. Po wysuszeniu otrzymano białą piankę (0.133 g), którą przemyto acetonem i eterem dietylowym. Następnie dodano 0.3 M roztwór cykloheksyloaminy (3 ml), mieszano 40 minut w tej temperaturze i liofilizowano. Otrzymano mieszaninę produktów (0.208 g, 94%). Po przeprowadzeniu chromatografii permeacyjnej otrzymano **119** i pochodną ketozy w formie soli dicykloheksyloamoniowej.

[α]_D +6° (0.2, H₂O)

¹H NMR i ¹³C NMR, ³¹P NMR w tabeli 8.

Benzylo 2,3-di-O-benzylo-4,6-O-(p-metoksybenzylideno)- α -D-mannopiranozyd (120).

Do aldehydu p-metoksybenzoesowego (100 ml) dodano bezwodny chlorek cynkowy (10 g) i intensywnie mieszano przez 10 minut. Następnie dodano benzylo- α -D-mannopiranozyd (**98**) (10 g) i mieszano 4 doby w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną wylano do wody z lodem i ekstrahowano chloroformem. Warstwę organiczną przemyto 5% roztworem wodorotlenku sodowego, a następnie wodą. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt

chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 9 : 1 otrzymując benzylo 2,3:4,6-di-O-(*p*-metoksybenzylideno)- α -D-mannopiranozyd (1.3 g) $\{[\alpha]_D +25.5^\circ (1.0, \text{CHCl}_3)$ mieszanina *egzo* i *endo* 1:1} i benzylo 4,6-O-(*p*-metoksybenzylideno)- α -D-manno-piranozyd (6.55 g).

$[\alpha]_D + 71^\circ (1.9, \text{CHCl}_3)$

Analiza dla $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7 \times 0.5 \text{H}_2\text{O}$ (276.4 + 9.0); obl.: C 63.46, H 6.34; otrzym.: C 63.32, H 6.32.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.53 (s, 1H, H-acetalowy), 4.96 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.1 Hz, H-1), 4.64 (ABq, 2 H, CH_2Ph), 4.3-3.82 (m, 6 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6A, H-6B), 3.80 (s, 3 H, OCH_3).

Benzylo 4,6-O-(*p*-metoksybenzylideno)- α -D-mannopiranozyd (5.4 g) rozpuszczono w absolutnym dimetyloformamidzie (90 ml), po ochłodzeniu do 0°C , dodano wodorek sodowy (2 g). Mieszano 10 minut i wkropiono roztwór bromku benzylu (5 ml) w dimetyloformamidzie (10 ml). Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : eter dietylowy 1 : 1) wylano mieszaninę reakcyjną do wody i ekstrahowano eterem dietylowym. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : eter dietylowy 4 : 1 otrzymując **120** (6.12 g).

$[\alpha]_D +58^\circ (1.7, \text{CHCl}_3)$

Analiza dla $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{O}_7$ (568.6); obl.: C 73.92, H 6.38; otrzym.: C 73.86 H 6.35.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.61 (s, 1 H, CH-acetalowe), 4.88 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.5 Hz, H-1), 4.86-4.39 (3 x ABq, 6 H, 3 x CH_2Ph), 4.32-4.18 (m., 2 H, H-6A, H-6B), 4.01 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.3 Hz, $J_{3,4}$ 9.8 Hz, H-3), 3.95-3.83 (m., 3 H, H-2, H-4, H-5), 3.80 (s, 3H, OCH_3).

Benzylo 2,3-di-O-benzylo-4-O-(p-metoksybenzylideno)- α -D-mannopiranozyd (121).

Związek **120** (3.2 g) rozpuszczono w acetonitrylu (115 ml) i dodano sita 3 Å i mieszano 5-10 minut. Następnie ochłodzono mieszaninę reakcyjną w łaźni woda - lód i dodano cyjanoborowodorek sodowy (2.17 g). Po rozpuszczeniu dodano roztwór trimetylochlorosilanu (4.36 g) w acetonitrylu (4.4 ml) ochłodzony do 0°C . Po zakończeniu reakcji (TLC w układzie heksan : eter dietylowy 1 : 1) przesączono mieszaninę reakcyjną przez Celit i wylano do roztworu wodorowęglanu sodowego. Warstwę wodną ekstrahowano dichlorometanem i suszono bezwodnym siarczanem magnezowym. Po odparowaniu otrzymano surowy produkt (4.7 g), który chromatografowano w układzie heksan : eter dietylowy 4 : 1. Otrzymano pierwszy związek **122** zawierający wolną grupę hydroksylową w położeniu C-4 (0.35 g, 11%).

$[\alpha]_D + 25.5^\circ$ (0.5, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_7$ (570.6), obl.: C 73.66, H 6.71; otrzym.: C 73.65, H 6.79.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.97 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.3 Hz, H-1), 4.80-4.40 (4 x ABq, 8 H, 4 x CH_2Ph), 4.07 (t, 1 H, $J_{4,3}$ 9.0, $J_{4,5}$ 9.0 Hz, H-4), 3.90-3.68 (m., 5 H, H-2, H-3, H-5, H-6A, H-6B).

Drugim produktem wymyłym z kolumny był związek **121** (1.57 g 49%).

$[\alpha]_D + 49^\circ$ (0.6, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_7$ (570.6), obl.: C 73.66, H 6.71; otrzym.: C 73.78, H 6.55.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.89 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.9 Hz, H-1), 4.84-4.36 (m., 8 H, 3 x CH_2Ph , 1 x CH_2pMB), 4.0-3.6 (m., 6 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6A, H-6B).

Benzyl 2,3,7-tri-*O*-benzyl-4-*O*-(*p*-metoksybenzyl)-*L*-glicero- α -*D*-manno-heptopiranozyd,
Benzyl 2,3,7-tri-*O*-benzyl-6-benzylksymetylo-4-*O*-(*p*-metoksybenzyl)-*D*(*L*)-glicero- β -*L*-gulo-heptopiranozyd (**123** i **125**).

Roztwór chlorku oksalilu (0.304 ml) w dichlorometanie (7.5 ml) ochłodzono do -60°C . Następnie dodano roztwór dimetylosulfotlenku (0.517 ml) w dichlorometanie (1.5 ml). Po 5 minutach bardzo wolno wkroplono roztwór **121** (0.864 g) w dichlorometanie (7 ml). Reakcję kontynuowano w temperaturze -60°C przez 40 minut. Wkroplono trietyloaminę (2.1 ml), mieszano jeszcze 5 minut w tej temperaturze i powoli ogrzano mieszaninę reakcyjną do temperatury pokojowej. Dodano wodę (15 ml) i ekstrahowano dichlorometanem. Warstwę organiczną wysuszono i odparowano. Produkt (0.860 g) po osuszeniu przez kilkakrotne odparowanie z benzenem był używany do następnej reakcji bez dodatkowego oczyszczania.

W kolbie z mieszadłem magnetycznym umieszczono wiórki magnezowe (0.220 g) i chlorek rtęciowy (50 mg), dodano świeżo destylowany tetrahydrofuran (1 ml). Podczas intensywnego mieszania wkroplono niewielką ilość czystego eteru chlorometylowobenzylowego obniżając temperaturę do 0°C . Po zapoczątkowaniu reakcji temperaturę obniżono do -10°C i wkroplono pozostałą ilość eteru chlorometylowobenzylowego rozpuszczonego w absolutnym tetrahydrofuranie (1 ml). Reakcję kontynuowano w tej temperaturze przez 2 godziny. Następnie ochłodzono mieszaninę reakcyjną do -20°C i wkroplono benzyl 2,3-di-*O*-benzyl-4-*O*-(*p*-metoksybenzyl)- α -*D*-manno-heksodialdo-1,5-piranozyd rozpuszczony w tetrahydrofuranie (10 ml). Mieszano 2 godziny w obniżonej temperaturze i całą noc w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną wylano do ochłodzonego do 0°C nasyconego roztworu chlorku

amonowego i ekstrahowano eterem dietylowym. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : eter dietylowy 4 : 1. Otrzymano mieszaninę **123** i **125** (1.007 g, 95%).

Ponowna chromatografia w tym samym układzie dała benzylo 6-O-benzyloksymetylo-4-O-(*p*-metoksybenzylo)-D(L)-*glicero*-β-L-*gulo*-heptopiranozyd (**125**) (0.079 g, 7.3%)

$[\alpha]_D^{+6}$ (0.78, CHCl₃)

MS/LSIMS dla $[M + Na]^+$ (C₅₁H₅₄O₉Na) 833

¹H NMR (C₆D₆): *inter alia* δ: 5.23 (d, 1 H, J_{1,2} 8.1 Hz, H-1), 4.37 (ddd, 1 H, J_{6,5} 8.9 J_{6,7A} 3.2, J_{6,7B} 5.6 Hz, H-6), 4.15 (dd, 1 H, J_{5,4} 1.4 Hz, H-5), 4.00 (dd, 1 H, J_{2,3} 3.0 Hz, H-2), 3.95 (t, 1 H, J_{3,4} 3.8 Hz, H-3), 3.96, 3.87 (ABq, 2 H, J_{A,B} 9.8 Hz, OCH₂OBn), 3.64 (dd, 1 H, J_{7A,7B} 9.9 Hz, H-7A), 3.59 (dd, 1 H, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 100.6 (C-1), 76.13, 74.92, 73.36, 72.29, 68.04 (C-2, 3, 4, 5, 6), 71.58 (C-7).

Drugim związkiem otrzymanym z chromatografii był benzylo 2,3,7-tri-O-benzylo-4-(*p*-metoksybenzylo)-L-*glicero*-α-D-*manno*-heptopiranozyd (**123**) (0.925 g, 88%)

$[\alpha]_D^{+28}$ (1.1, CHCl₃)

Analiza dla C₄₃H₄₈O₇ (676.8), obl.: C 74.76, H 6.71; otrzym.: C 74.36, H 6.74.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.89 (d, 1 H, J_{1,2} 1.8 Hz, H-1), 4.19 (t, 1 H, J_{4,5} 9.6 Hz, H-4), 4.19 (pt, 1 H, H-6), 3.94 (dd, 1 H, J_{3,2} 3.0, J_{3,4} 9.4 Hz, H-3), 3.80 (dd, 1 H, J_{2,3} 3.1 Hz, H-2), 3.78 (s, 3 H, OCH₃), 3.77-3.70 (m., 1 H, H-5), 3.64 (dd, 1 H, J_{7A,7B} 9.4, J_{7A,6} 7.2 Hz, H-7A), 3.54 (dd, 1 H, J_{7B,6} 6.2 Hz, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 97.42 (C-1), 80.36 (C-3), 74.65^a (C-2), 74.06 (C-4), 71.17 (C-5), 68.92 (C-7), 67.91 (C-6), 55.26 (OCH₃).

Benzylo 2,3,6,7-tetra-O-benzylo-4-O-(p-metoksybenzylo)-L-glicero-α-D-manno-heptopiranozyd (**126**).

Związek **123** (0.778 g) rozpuszczono w dimetyloformamidzie (8 ml) i po ochłodzeniu do około 0°C dodano wodorek sodowy (0.108 g). Następnie wkroplono roztwór chlorku benzylu (0.258 g) w dimetyloformamidzie (1 ml). Po 5 godzinach reakcję zakończono przez dodanie kilku kropel metanolu. Mieszaninę reakcyjną wylano do wody i ekstrahowano eterem dietylowym. Po

wysuszeniu i odparowaniu otrzymano surowy produkt (1.51 g). Chromatografia w układzie heksan : octan etylu 9 : 1 dała **126** (0.724 g, 83%).

$[\alpha]_D + 30^\circ$ (1.1, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{50}\text{H}_{52}\text{O}_8$ (780.9) obl.: C 76.90 H 6.71; otrzym.: C 76.95 H 6.67.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.01 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.7 Hz, H-1), 4.23 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.6 Hz, H-4), 4.15 (bt, 1 H, H-6), 3.97 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.0, $J_{3,4}$ 9.2 Hz, H-3), 3.90-3.71 (m., 4 H, H-2, H-5, H-7A, H-7B), 3.81 (s, 3 H, OCH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 96.96 (C-1), 80.73 (C-3), 75.03 (C-2), 74.32 (C-4), 73.96 (C-6), 71.73 (C-5), 68.85 (C-7).

Benzyl 2,3,6,7-tetra-O-benzyl-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (127).

Związek **126** (0.464 g) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników acetonitryl : woda 9 : 1 (10 ml) i dodano azotan amonowo-cerowy (0.669 g). Mieszano 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : eter dietylowy 2 : 1) dodano dichlorometan (15 ml) i wylano do nasyconego roztworu wodorowęglanu sodowego. Chromatografia w układzie heksan : eter dietylowy 3 : 1 dała **127** w postaci bezbarwnego oleju (0.331 g, 84%).

$[\alpha]_D + 17^\circ$ (1.3, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{O}_7$ (660.7); obl.: C 76.34 H 6.71; otrzym.: C 75.89 H 6.89.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.04 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.3 Hz, H-1), 4.85-4.24 (m., 10 H, 5 x CH_2Ph), 4.31 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.0, $J_{4,3}$ 9.6 Hz, H-4), 4.10 (dt, 1 H, $J_{6,5}$ 1.8, $J_{6,7A}$ 6.3, $J_{6,7B}$ 8.3 Hz, H-6), 3.88-3.68 (m, 5 H, H-2, H-3, H-5, H-7A, H-7B), 2.35 (d, 1 H, $J_{\text{H, OH}}$ 2.4 Hz, OH).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 97.16 (C-1), 80.08 (C-3), 74.95 (C-2), 73.76 (C-6), 71.71 (C-5), 68.88 (C-7), 68.27 (C-4), 73.67, 73.43, 72.47, 71.87, 69.61 (5 x CH_2Ph).

Próbkę analityczną acetylowano w warunkach standardowych (**127Ac**).

$[\alpha]_D + 37^\circ$ (1.0, CHCl_3).

Analiza dla $\text{C}_{44}\text{H}_{46}\text{O}_8 \cdot \text{x H}_2\text{O}$ (702.8 + 18.0); obl.: C 74.23; H 6.66; otrzym.: C 74.23; H 6.69.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.77 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.8, $J_{4,3}$ 9.6 Hz, H-4), 3.92 (pd, 1 H, H-6), 3.88 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.0 Hz, H-3), 3.79 (dd, 1 H, $J_{2,1}$ 1.8 Hz, H-2), 3.75-3.63 (m, 3 H, H-5, H-7A, H-7B), 1.96 (s, 3 H, OAc).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 97.20 (C-1), 77.79 (C-3), 74.88 (C-2), 73.72 (C-6), 69.68 (C-5), 68.86 (C-7), 67.79 (C-4), 73.58, 73.54, 72.41, 71.58, 69.21 (5 x CH_2Ph), 21.06 (OCH_3).

Benzylo 2,3,6,7-tetra-O-benzylo-4-O-difenylofosforylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (129).

Triazol (0.079 g) rozpuszczono w absolutnym tetrahydrofuranie (1.5 ml), dodano trietyloaminę (0.159 ml). Następnie wkroplono roztwór difenylochlofosforanu (0.236 ml) w tetrahydrofuranie (0.1 ml) w 0°C . Mieszano 20 minut w obniżonej temperaturze i 40 minut w temperaturze pokojowej. Do wysuszonego benzylo 2,3,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu (**127**) przesączono bis triazolid i pozostawiono na noc w temperaturze 40°C . Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : octan etylu 7 : 3) dodano wodę (0.5 ml) i mieszano 0.5 godziny. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono wodą, ekstrahowano dichlorometanem, suszono i odparowano. Otrzymany olej chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 85 : 15. Otrzymano **129** (0.307 g, 91%) w postaci bezbrwnego oleju.

$[\alpha]_{\text{D}} + 35^\circ$ (1.2, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{54}\text{H}_{53}\text{O}_{10}\text{P}$ (892.9); obl.: C 72.63; H 5.98; otrzym.: C 72.48 ; H 5.97.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.38 (q, 1 H, $J_{3,5}$ 9.5, $J_{\text{C-H,P}}$ 9.6 Hz, H-4), 5.01 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.8 Hz, H-1), 4.48-4.30 (m, 10 H, 5 x CH_2Ph), 4.16-3.99 (m., 2 H, H-5, H-6), 4.10 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.2, $J_{3,4}$ 9.2 Hz, H-3), 3.79 (t, 1 H, H-2), 3.78-3.96 (m., 1 H, H-7A), 3.64 (dd, 1 H, $J_{7B,7A}$ 9.2, $J_{7B,6}$ 5.8 Hz, H-7B).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 97.09 (C-1), 78.22 (d, $J_{\text{C,P}}$ 7.1 Hz, C-4), 74.49 (C-6), 74.47 (C-2), 70.48 (d, $J_{\text{C,P}}$ 7.3 Hz, C-5), 68.69 (C-7), 73.40, 73.40, 72.70, 71.89, 69.07 (5 x CH_2Ph).

Benzylo 2,3,6,7-tetra-O-benzylo-4-O-(5,6-benzo-2-okso-1,3,2-dioksafosfep-2-ylo)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (128).

Związek **127** (0.378 g) rozpuszczono w bezwodnym dichlorometanie (10 ml), dodano tetrazol (0.120 g) i mieszano ok. 10 minut, aż utworzyła się drobna zawiesina, następnie dodano roztwór 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepanu (0.145 g) w dichlorometanie (1 ml). Mieszano w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji (TLC w układzie heksan : eter dietylowy 2 : 1) ochłodzono mieszaninę reakcyjną do -60°C i wkroplono kwas metachloronadbenzoesowy

(0.179 g) rozpuszczony w dichlorometanie (1 ml). Po 1 godzinie dodano octan etylu (20 ml), przemyto warstwę organiczną 1% roztworem wodorosiarczynu sodowego i 1 % roztworem wodorowęglanu sodowego. Po wysuszeniu i odparowaniu otrzymano surowy produkt (1.014 g), który chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 95 : 5. Otrzymano **128** (0.466 g, 97%). $[\alpha]_D + 27^\circ$ (0.9, CHCl_3).

Analiza dla $\text{C}_{50}\text{H}_{51}\text{O}_{10}\text{P}$ (842.9); obl.: C 71.24 H 6.10; otrzym.: C 70.87, H 5.94.

^1H NMR (CDCl_3) *inter alia* δ : 5.27 (q, 1 H, $J_{4,3}$ 9.2, $J_{\text{H-4,P}}$ 9.4 Hz, H-4), 4.25 (pt, 1 H, $J_{6,7A}$ 7.1, $J_{6,7B}$ 6.2 Hz, H-6), 4.08 (pd, 1 H, $J_{5,4}$ 9.7 Hz, H-5), 4.06 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.0 Hz, H-3), 3.83 (t, 1 H, $J_{2,1}$ 2.4 Hz, H-2).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 96.84 (C-1), 78.34 (d, C-3), 74.29^a (C-6), 74.26 (d, $J_{\text{C-4,P}}$ 3.4 Hz, H-4), 73.76^a (C-2), 70.53 (d, $J_{\text{C-5,P}}$ 5.7 Hz, C-5), 68.84 (C-7).

4-O-fosforan-L-glicero- α,β -D-manno-heptopiranozy (131).

Związek **128** (0.466 g) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników etanol (7 ml) i octan etylu (3.5 ml). Dodano pallad na węglu (0.466 g) i wodorowano w temperaturze pokojowej całą noc. Katalizator odsączono na warstwie Celitu, odparowano, otrzymano produkt w postaci białej pianki (0.190 g). Po przemyciu eterem dietylowym i wysuszeniu produkt rozpuszczono w 0.3 M roztworze cykloheksyloaminy (2 ml), mieszano 1 godzinę w temperaturze pokojowej, następnie odparowano i otrzymano mieszaninę produktów (**131** i **130**) (0.227 g, 84%). Chromatografia permeacyjna dała czysty **131**.

$[\alpha]_D -14.2^\circ$ (0.9, H_2O) wartość równowagowa

^1H NMR, ^{13}C NMR i ^{31}P NMR tabela 8.

Benzylo 3-O-allilo-2,4,7-tri-O-benzylo-D i -L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd, benzylo 3-O-allilo-2,4,7-tri-O-benzylo-D(L)-glicero- β -L-gulo-heptopiranozyd (135, 136 i 137).

Roztwór chlorku oksalilu (0.428 ml) w dichlorometanie (10.7 ml) silnie mieszano i ochłodzono do -60°C , następnie dodano roztwór dimetylosulfotlenku (0.728 ml) w dichlorometanie (2.14 ml). Po 5 minutach bardzo wolno wkroplono roztwór związku **134**¹⁵⁷ (1.05 g) w dichlorometanie (10 ml). Reakcję kontynuowano w tej temperaturze -60°C przez 1 godzinę. Wkroplono trietyloaminę (3.0 ml), mieszano jeszcze 5 min. w tej temperaturze i bardzo powoli ogrzano mieszaninę

reakcyjną do temperatury pokojowej. Dodano 20 ml wody i ekstrahowano dichlorometanem. Warstwę organiczną wysuszono i odparowano. Olej (1.04 g) po dokładnym osuszeniu przez trzykrotne odparowanie z benzenem był używany do następnej reakcji bez dodatkowego oczyszczania.

W kolbie z mieszadłem magnetycznym umieszczono wiórki magnezowe (0.312 g) i chlorek rtęciowy (50 mg), dodano świeżo destylowany tetrahydrofuran (1 ml) tak, aby wiórki były pokryte rozpuszczalnikiem. Podczas intensywnego mieszania wkroplono niewielką ilość czystego eteru chlorometylowobenzylowego (destylowanego bezpośrednio przed reakcją) obniżając temperaturę do 0°C. Po zapoczątkowaniu reakcji, ochłodzono mieszaninę reakcyjną do -20°C i wkroplono pozostałą ilość eteru chlorometylowobenzylowego rozpuszczonego w tetrahydrofuranie (1 ml). Reakcję kontynuowano w tej temperaturze przez 1.5 godziny, a następnie ochłodzono mieszaninę reakcyjną do -30°C i dodano benzylo 3-O-allilo-2,4-di-O-benzylo- α -D-manno-heksodialdo-1,5-piranozyd (1.04 g) rozpuszczony w tetrahydrofuranie (14 ml). Mieszano jeszcze 3 godziny w tej temperaturze. Po ogrzaniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej kontynuowano mieszanie przez 12 godzin. Wylano mieszaninę reakcyjną do ochłodzonego do 0°C nasyconego roztworu chlorku amonowego (100 ml) i ekstrahowano eterem dietylowym. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 98 : 2 otrzymując: pochodną D-glicero-D-manno-heptozy (**136**) (0.075 g, 5.3%), pochodną L-glicero-D-manno-heptozy (**135**) (0.881 g, 61.8%) oraz związek **137** (0.084 g, 5.9%).

*Benzylo-3-O-allilo-2,4,7-tri-O-benzylo-D(L)-glicero- β -L-gulo-heptopiranozyd (**137**).*

$[\alpha]_D +7.5^\circ$ (0.95, CHCl₃)

¹H NMR (CDCl₃) δ : 4.84 (d, 1 H, J_{1,2} 8.2 Hz, H-1), 4.1-3.91 (m, 3 H, H-6, CH₂CH=CH₂), 3.79 (dd, 1 H, J_{5,4} 1.4, J_{5,6} 9.1, H-5), 3.72 (dd, 1 H, J_{4,3} 3.7 Hz, H-4), 3.69 (dd, 1 H, J_{7A,6} 3.1, J_{7A,7B} 9.6 Hz, H-7A), 3.65 (t, 1 H, H-3), 3.63 (dd, 1 H, J_{2,3} 3.3 Hz, H-2), 3.61 (dd, 1 H, J_{7B,6} 5.5 Hz, H-7B)
¹³C NMR (CDCl₃) δ : 100.6 (C-1), 75.76 (C-3), 74.96 (C-2), 73.80 (C-4), 72.60 (C-5), 71.13 (C-7), 67.95 (C-6), 73.30, 73.24, 72.87, 72.27, 70.83 (4 x CH₂Ph, 1 x CH₂CH=CH₂).

Pochodna D-glicero-D-manno-heptopiranozy (**136**) została scharakteryzowana w postaci pochodnej acetylowej.

Benzylo 6-O-acetylo-3-O-allilo-2,4,7-tri-O-benzylo-D-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (136 Ac)

$[\alpha]_D^{+45}$ (0.6, CHCl₃)

HR MS (LSIMS) dla C₄₀H₄₄O₈ obl.: [M+Na]⁺ 675.2934, otrzym.: 675.2931.

¹H NMR (CDCl₃) δ : 5.56 (ddd, 1 H, J_{6,5} 2.0, J_{6,7A} 4.7, J_{6,7B} 6.9 Hz, H-6), 4.90 (d, 1 H, J_{1,2} 1.9 Hz H-1), 3.97 (dd, 1 H, J_{4,3} 9.0, J_{4,5} 9.9 Hz, H-4), 3.89 (dd, J_{5,6} 2.0 Hz, H-5), 3.81 (dd, J_{3,2} 3.1 Hz, H-3), 3.77 (dd, 1 H, H-2), 3.74 (dd, 1 H, J_{7A,7B} 10.7 Hz, H-7A), 3.70 (dd, 1 H, H-7B)

¹³C NMR (CDCl₃) δ : 97.00 (C-1), 80.12 (C-3), 74.87 (C-2), 74.74 (C-4), 71.96 (C-6), 71.92 (C-5), 68.32 (C-7), 74.74, 72.95, 72.59, 71.10, 68.87 (4 x CH₂Ph, 1 x CH₂CH=CH₂)

Benzylo 3-O-allilo-2,4,7-tri-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (135)

$[\alpha]_D^{+31}$ (0.9, CHCl₃), lit.¹⁰² +39 (0.9, CHCl₃).

Analiza dla C₃₈H₄₂O₇ (610.7); obl.: C 74.73, H 6.73; otrzym.: C 74.32, H 6.84.

¹H NMR (CDCl₃) δ : 6.04-5.08 (m, 1 H, CH=CH₂), 5.40-5.11 (m, 2 H, CH=CH₂), 4.89 (d, 1 H J_{1,2} 1.5 Hz, H-1), 4.26-4.03 (m, 3 H, H-6, CH₂CH=), 4.16 (t, 1 H, J_{4,5} 9.5 Hz, H-4), 3.83 (dd, 1 H, J_{3,2} 3.0, J_{3,4} 9.2 Hz, H-3), 3.78 (dd, 1 H, H-2), 3.78 - 3.70 (m, 1 H, H-5), 3.64 (dd, 1 H, J_{7A,7B} 7.2 J_{7A,7B} 9.4 Hz, H-7A), 3.54 (dd, 1 H, J_{7B,6} 6.3 Hz, H-7B)

¹³C NMR (CDCl₃) δ : 134.89 (CH=CH₂), 116.4 (CHCH₂), 97.4 (C-1), 80.0 (C-3), 74.50^a (C-2), 74.18^a (C-4), 71.00 (C-5), 67.82 (C-6), 75.32, 73.28, 72.79, 71.37, 71.11 (5 x CH₂Ph).

Benzylo 3-O-allilo-2,4,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (138)

Związek **135** (0.593 g) rozpuszczono w absolutnym dimetyloformamidzie (5 ml) i ochłodzono do ok. +5°C. Następnie dodano woderek sodowy (0.093 g), a po 10 minutach roztwór chlorku benzylo (0.224 ml) w dimetyloformamidzie (1 ml). Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : octan etylu 7 : 3) dodano parę kropel metanolu, a następnie wylano do wody z lodem. Ekstrahowano eterem dietylowym i suszono bezwodnym siarczanem magnezowym. Po odparowaniu chromatografii otrzymano **138** (0.586 g) w postaci bezbarwnego oleju (86%).

$[\alpha]_D^{+33}$ (0.81, CHCl₃); lit.¹⁰² $[\alpha]_D^{+44}$ (0.7, CHCl₃).

Analiza C₄₅H₄₈O₇ (700.8); obl.: C 77.12, H 6.9; otrzym.: C 77.00 H 6.81.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 6.02-5.80 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.38-5.13 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.0 (s, 1 H, $J_{1,2}$ 1.7 Hz, H-1), 4.19 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.6, $J_{4,6}$ 9.3 Hz, H-4), 4.17-3.94 (m, 3 H, H-6, $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.90-3.72 (m, 5 H, H-2, H-3, H-5, H-7A, H-7B).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 134.83 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 116.65 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 96.91 (C-1), 80.42 (C-3), 74.94 (C-2), 74.17 (C-4), 74.07 (C-6), 71.53 (C-5), 68.81 (C-7).

Benzylo 2,4,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (139).

Związek **138** (0.544 g) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników etanol: benzen: woda 9:3:1 (5 ml), dodano 1.4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (0.017 g) i w temperaturze bliskiej wrzenia katalizator Wiklinsona (0.047 g). Ogrzewano do wrzenia przez 3 godziny i mieszano 12 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę przesączono przez Celit i odparowano otrzymując jasnobrązowy olej, który rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników aceton : woda 15:1. Dodano tlenek rtęciowy (0.117 g) i chlorek rtęciowy (0.211 g). Po 1 godzinie intensywnego mieszania reakcja była zakończona (TLC heksan : eter dietylowy 1:1). Odsączono katalizatory na Celicie, przesącz odparowano, rozpuszczono w eterze dietylowym, przemyto 50% roztworem jodku potasowego oraz 1% roztworem wodorosiarczynu sodowego i 1% roztworem wodorowęglanu sodowego. Po wysuszeniu i odparowaniu otrzymano surowy produkt (0.531 g), który chromatografowano w układzie heksan : eter dietylowy 4 : 1 otrzymując **139** (0.414 g) w postaci bezbarwnego oleju (71%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{+34^\circ}$ (0.98, CHCl_3); lit.¹⁰² $+29^\circ$ (1.4, CHCl_3).

Analiza dla $\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{O}_7$ (660.8) obl.: C 76.34 H 6.71, otrzym.: 75.92, H 6.70.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.07 (s, 1 H, $J_{1,2}$ 1.3 Hz, H-1), 4.14 (dt, 1 H, $J_{6,7A}=J_{6,7B}=6.3$ Hz, H-6), 4.06 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 8.8, $J_{3,2}$ 3.7 Hz, H-3), 3.91 (t, 1 H, H-4), 3.85 (dd, 1 H, $J_{5,4}$ 8.6, $J_{5,6}$ 1.1 Hz, H-5), 3.83 (dd, 1 H, $J_{7A,6}$ 6.3, $J_{7A,7B}$ 9.6 Hz, H-7A), 3.76 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.5 Hz, H-7B), 3.74 (dd, 1H, H-2).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 95.96 (C-1) 78.36 (C-2), 76.20 (C-4), 75.12 (C-6), 72.25 (C-3), 70.84 (C-5), 70.10 (C-7).

Małą próbkę acetylowano w warunkach standardowych otrzymując bezbarwny olej (**139Ac**).

$[\alpha]_{\text{D}}^{+20^\circ}$ (2.0, CHCl_3)

Analiza dla $C_{44}H_{46}O_8$ (702.8) obl.: C 75.19, H 6.60; otrzym.: C 74.92, H 6.64.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 5.29 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.3, $J_{3,4}$ 8.7 Hz, H-3), 4.98 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 2.2 Hz, H-1), 4.18 (t, 1 H, H-4), 4.06 (dt, 1 H, $J_{6,5}$ 1.4, $J_{6,7A}$ 6.4, $J_{6,7B}$ 6.3 Hz, H-6), 3.92 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ 1.4, $J_{5,4}$ 9.7 Hz, H-5), 3.87 (dd, 1 H, H-2), 3.84 (dd, 1 H, $J_{7A,7B}$ 9.6, $J_{7A,6}$ 6.3 Hz, H-7A), 3.74 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.1 Hz, H-7B).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ : 96.97 (C-1), 75.84 (C-2), 75.00 (C-6), 73.93 (C-3), 73.44 (C-4), 71.43 (C-5), 70.09 (C-7), 73.96, 73.52, 2 x 72.74, 68.99 (5 x CH_2Ph).

Benzylo 2,4,6,7-tetra-O-benzylo-3-O-difenylofosforylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd
(141)

Osuszony triazol (0.057 g) rozpuszczono w absolutnym tetrahydrofuranie (1 ml), dodano trietyloaminę (0.115 ml) i ochłodzono do 0°C, następnie wkroplono roztwór difenylchlorofosforanu (0.171 ml) w tetrahydrofuranie (1 ml) i mieszano 10 minut w obniżonej temperaturze, a następnie 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Do wysuszonego benzylo 2,4,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu (**139**) (0.182 g) przesączono bis-triazolid i pozostawiono na noc w temperaturze 30°C. Po zakończeniu reakcji (TLC, heksan : octan etylu 7 : 3) dodano wodę (0.5 ml) i mieszano 0.5 godziny. Następnie po rozcieńczeniu mieszaniny reakcyjnej wodą, ekstrahowano dichlorometanem, suszono i odparowano. Otrzymano surowy produkt (0.207 g). Po chromatografii w układzie heksan : eter dietylowy 85 : 15 otrzymano **141** (0.154 g, 63%) w postaci bezbarwnego oleju.

$[\alpha]_D^{+30}$ (1.0, $CHCl_3$).

Analiza dla $C_{54}H_{53}O_{10}P$ (893.0), obl.: C 72.63, H 5.98; otrzym.: C 72.52, H 6.04.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 5.11 (ddd, 1 H, $J_{H-3,P}$ 7.4 Hz, H-3), 4.98 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 2.0 Hz, H-1), 4.29 (t, 1 H, $J_{4,3}$ 9.4 Hz, H-4), 4.09 (bt, 1H, H-6), 4.09 (t, 1 H, $J_{2,3}$ 3.1 Hz, H-2), 3.92 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ 1.2, $J_{5,4}$ 9.6 Hz, H-5), 3.83 (dd, 1 H, $J_{7A,6}$ 6.2, $J_{7A,7B}$ 9.6 Hz, H-7A), 3.73 (dd, $J_{7B,6}$ 6.5 Hz, H-7B).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ : 96.81 (C-1), 80.54 (d, $J_{c,p}$ 6.9 Hz, C-3), 77.09 (C-6), 75 (C-2), 71.55 (C-5), 69.15 (C-7), 73.85 (d, $J_{C-4,P}$ 7.0 Hz C-4).

Benzylo 2,4,6,7-tetra-O-benzylo-3-O-(5,6-benzo-2-okso-1,3,2-dioksafosfo-2-ylo)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (140).

Związek **139** (0.414 g) rozpuszczono w dichlorometanie (10 ml), dodano tetrazol (0.132 g) i mieszano 15 min. Następnie wkroplono roztwór 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepanu (0.159 g) w absolutnym dichlorometanie (1 ml) i pozostawiono mieszaninę reakcyjną na noc w temperaturze pokojowej. Ochłodzono mieszaninę reakcyjną do -60°C , dodano kwas metachloronadbenzoesowy (0.195 g) w dichlorometanie (1 ml), po 15 minutach dodano nową porcję kwasu. Po dalszych 15 minutach reakcję zakończono przez dodanie octanu etylu (20 ml). Warstwę organiczną przemyto 1% roztworem wodorosiarczynu sodowego i 1% roztworem wodorowęglanu sodowego. Po wysuszeniu chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 95 : 5 otrzymując **140** (0.459 g) w postaci bezbarwnego oleju (86%).

$[\alpha]_{\text{D}} +36^{\circ}$ (0.9, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{50}\text{H}_{51}\text{O}_{10}\text{P}$ (842.9); obl.: C 71.24, H 6.10, otrzym.: C 71.35, H 6.25.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 4.96 (ddd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.2 $J_{3,4}$ 8.8 $J_{\text{H-3,P}}$ 6.9 Hz, H-3), 4.74 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 2.1 Hz, H-1), 4.28 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.5 Hz, H-4), 4.12 (dd, 1 H, H-2), 4.65 (bt, 1 H, $J_{6,7\text{A}}$ 6.2 Hz, H-6), 3.89 (dd, 1 H $J_{5,6}$ 1.3, $J_{5,4}$ 9.6 Hz, H-5), 3.86 (dd, 1 H, $J_{7\text{A},6}$ 6.2, $J_{7\text{A},7\text{B}}$ 9.8 Hz, H-7A), 3.74 (dd, 1 H, $J_{7\text{B},6}$ 6.3 Hz, H-7B).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 97.24 (C-1), 79.05 (d, $J_{\text{C-3,P}}$ 5.8 Hz, C-3), 76.98 (d, C-2), 75.13 (C-6), 74.09 (d, $J_{\text{C-4,P}}$ 6.5 Hz, C-4), 71.50 (C-5), 69.10 (C-7).

Sól di(cykloheksyloamoniowa) 3-O-fosforanu-L-glicero- α,β -D-manno-heptopiranozy (142).

Związek **140** (0.459 g) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników etanol : octan etylu 2 : 1 (1.5 ml), dodano 10% pallad na węglu (0.459 g) i wodorowano w temperaturze pokojowej. Następnego dnia przesączono przez Celit, przemyto etanolem, odparowano, otrzymano produkt (0.167 g), który dokładnie przemyto eterem dietylowym. Po wysuszeniu produkt rozpuszczono w 0.3 M roztworze cykloheksyloaminy (2 ml), mieszano 45 minut i liofilizowano. Otrzymano **142** (0.220 g) w postaci białej pianki (83%).

$[\alpha]_{\text{D}} + 12.5^{\circ}$ (0.25, H_2O), wartość równowagowa.

^1H NMR, ^{13}C NMR i ^{31}P NMR w tabeli 8.

Benzylo 2-O-allilo-3,4,7-tri-O-benzylo-D i -L-glicero- α -D-manno heptopiranozyd, benzylo 2-O-allilo-3,4,7-tri-O-benzylo-D(L)-glicero- α -L-gulo-heptopiranozyd (145, 146 i 147).

Roztwór chlorku oksalilu (0.84 ml) w dichlorometanie (21 ml) silnie mieszano i ochłodzono do -60°C , następnie dodano roztwór dimetylosulfotlenku (1.43 ml) w dichlorometanie (4.2 ml). Po 5 minutach wkroplono **144**¹⁵⁷ (2.07 g) w dichlorometanie (15 ml). Reakcję kontynuowano w temperaturze -60°C przez 1 godzinę. Wkroplono trietyloaminę (5.9 ml) i mieszano jeszcze 5 minut w tej temperaturze. Bardzo powoli ogrzano mieszaninę reakcyjną do temperatury pokojowej. Dodano wodę (42 ml) i ekstrahowano dichlorometanem. Warstwę organiczną wysuszono i odparowano. Olej po dokładnym wysuszeniu przez kilkakrotne odparowanie z benzenem był używany do dalszych reakcji bez dodatkowego oczyszczania.

W kolbie z mieszadłem magnetycznym umieszczono wiórki magnezowe (0.615 g) i chlorek rtęciowy (50 mg), dodano świeżo destylowany z nad LiAlH_4 tetrahydrofuran (1.5 ml), tak aby wiórki były przykryte rozpuszczalnikiem. Podczas intensywnego mieszania wkroplono niewielką ilość czystego eteru chlorometylowobenzylowego (destylowanego bezpośrednio przed reakcją) w temperaturze 0°C . Po zapoczątkowaniu reakcji temperaturę obniżono do -10°C i wkroplono pozostałą ilość eteru chlorometylowobenzylowego w tetrahydrofuranie (2 ml). Reakcję kontynuowano w tej temperaturze przez 2 godziny, a następnie po obniżeniu temperatury do -20°C wkroplono benzylo 2-O-allilo-3,4-di-O-benzylo- α -D-manno-hexodialdo-1,5-piranozyd (2.04 g) rozpuszczony w absolutnym dichlorometanie (10 ml), i mieszano dwie godziny w tej temperaturze. Mieszaninę powoli ogrzano do temperatury pokojowej, reakcję kontynuowano przez 12 godzin. Roztwór wytrząsano z ochłodzonym do 0°C roztworem chlorku amonowego (120 ml.) i ekstrahowano eterem dietylowym. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 9 : 1 otrzymując mieszaninę pochodnych D-glicero-D-manno (**146**), L-glicero-D-manno-heptopiranozy (**145**) oraz związku **147** ze zmienioną konfiguracją na atomie węgla C-5 (2.2 g, 85%).

Ponowna chromatografia w układzie heksan : eter dietylowy 9:1 pozwoliła na otrzymanie **145** (1.45 g), **146** (0.406 g), **147** (0.348 g).

Benzylo-2-O-allilo-3,4,7-tri-O-benzylo-D(L)-glicero-β-L-gulo-heptopiranozyd (147).

$[\alpha]_D +6.0^\circ$ (c 1.6 CHCl₃);

¹H NMR (CDCl₃) *inter alia* δ: 4.84 (d, 1 H, J_{1,2} 8.2 Hz, H-1), 3.82 (dd, 1 H, J_{5,6} 9.3, J_{5,4} 1.3 Hz, H-5), 3.81 (t, 1 H, J_{3,2} 3.2, J_{3,4} 3.6 Hz, H-3), 3.74 (dd, 1 H, H-4), 3.67 (dd, 1 H, J_{7A,6} 3.1, J_{7A,7B} 9.6 Hz, H-7A), 3.60 (dd, 1 H, J_{7B,6} 5.4 Hz, H-7B), 3.53 (dd, 1 H, H-2).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 100.6 (C-1), 76.37, 75.11, 74.20, 72.68, 68.07 (C-2, 3, 4, 5, 6), 71.23 (C-7).

Benzylo 2-O-allilo-3,4,7-tri-O-benzylo-D-glicero-α-D-manno-heptopiranozyd (146).

$[\alpha]_D + 34^\circ$ (0.9, CHCl₃)

¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.875 (d, 1 H, J_{1,2} 1.9 Hz, H-1), 4.20-4.04 (m., 3 H, CH₂CH=CH₂, H-6), 3.74 (t, 1 H, J_{2,3} 2.5 Hz, H-2), 3.67 (dd, 1 H, J_{7A,6} 6.7, J_{7A,7B} 10.1 Hz, H-7A), 3.60 (dd, 1 H, J_{7B,6} 3.1 Hz, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 97.40 (C-1), 80.38 (C-3), 76.37 (C-2), 74.92 (C-4), 72.29 (C-5), 70.96 (C-7), 71.36 (C-6), 74.92, 73.51, 72.23, 72.20, 69.10 (4 x CH₂Ph, 1 x CH₂CH=CH₂).

Benzylo 2-O-allilo-3,4,7-tri-O-benzylo-L-glicero-α-D-manno-heptopiranozyd (145).

$[\alpha]_D +39^\circ$ (1.5, CHCl₃)

Analiza dla C₃₈H₄₂O₇ x H₂O (610.7 + 18) obl.: C 72.59 H 7.06; otrzym.: C 72.69, H 6.86.

I.R. (film) 3450, 1450, 1100 cm⁻¹

¹H NMR (CDCl₃) δ: 6.0-5.78 (m, 1 H, CHCH₂), 5.30-5.11 (m, 2 H, CH₂=CH), 4.99-4.30 (m, 8 H, 4 x CH₂Ph), 4.89 (d, 1 H, J_{1,2} 1.8 Hz, H-1), 4.18 (dt, 1 H, J_{6,7B} 6.1 Hz, H-6), 4.13 (t, 1 H, J_{4,5} 9.5 Hz, H-4), 3.95 (dd, 1 H, J_{3,2} 3.2, J_{3,4} 9.5 Hz, H-3), 3.76 (dd, 1 H, H-2), 3.75 (dd, 1 H, J_{5,6} 1.0 Hz, H-5), 3.64 (dd, 1 H, J_{7A,6} 7.3, J_{7A,7B} 9.4 Hz, H-7A), 3.55 (dd, 1 H, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 134.88 (CH₂CH), 117.66 (CH₂=CH), 97.60 (C-1), 80.12 (C-3), 74.70 (C-2), 74.23 (C-4), 71.06 (C-5), 68.95 (C-7), 67.81 (C-6), 75.32, 73.30, 2 x 72.35, 71.36 (4 x CH₂Ph, OCH₂CH=CH₂).

Benzylo-3,4,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero-α-D-manno-heptopiranozyd (148).

Związek **145** (0.496 g) rozpuszczono w absolutnym dimetyloformamidzie (5 ml), schłodzono w wodzie z lodem, dodano wodorek sodowy (0.078 g), a po 10 minutach roztwór chlorku benzyliu

(0.187g) w dimetyloformamidzie (1 ml.). Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : eter dietylowy 1 : 1) wylano mieszaninę reakcyjną do wody z lodem i ekstrahowano eterem dietylowym. Po wysuszeniu bezwodnym siarczanem magnezowym i odparowaniu, produkt chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 9 : 1 otrzymując benzylo 2-O-allilo-3,4,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (0.410 g) w postaci bezbarwnego oleju (72%).

$[\alpha]_D + 45^\circ$ (2.1, CHCl_3).

Analiza dla $\text{C}_{45}\text{H}_{48}\text{O}_7 \times 0.5 \text{H}_2\text{O}$ (700.8 + 9) obl.: C 76.14, H 6.96; znal.: C 75.97, H 6.83.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 6.0-5.75 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.32-5.10 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.97 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.9 Hz, H-1), 4.24-4.08 (m, 6 H, $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{O}$, H-4, H-6), 3.97 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.1, $J_{4,3}$ 9.3 Hz, H-3), 3.92-3.71 (m, 4 H, H-2, H-5, H-7A, H-7B).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 97.08 (C-1), 80.49 (C-3), 74.91 (C-2), 74.22 (C-4), 74.16 (C-6), 71.54 (C-5), 68.86 (C-7), 134.94 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 117.6 ($\text{CH}=\text{CH}_2$).

Benzylo 2-O-allilo-3,4,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (0.410 g) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników etanol : benzen : woda 18 : 3 : 1 i dodano 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (0.013 g). W temperaturze bliskiej wrzenia dodano katalizator Wilkinsona (0.036 g) i ogrzewano do wrzenia przez 5 godzin. Następnie odsączono katalizatory na Celicie, a przesącz odparowano, otrzymano brązowy olej, który rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników aceton : woda 15 : 1 (8 ml). Do roztworu dodano tlenek rtęciowy (0.133 g) i chlorek rtęciowy (0.167 g), mieszano w temperaturze pokojowej przez 0.5 godziny. Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : eter dietylowy 1 : 1), przesączono mieszaninę reakcyjną przez Celit, przesącz odparowano, rozpuszczono w eterze dietylowym i przemyto 50% roztworem jodku potasowego, 1% roztworem wodorosiarczynu sodowego i 1% roztworem wodorowęglanu sodowego. Po wysuszeniu bezwodnym siarczanem magnezowym, odparowano i chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 9 : 1 do 4 : 1. Otrzymano **148** (0.372 g) w postaci bezbarwnego oleju (96.5%).

$[\alpha]_D + 55.5^\circ$ (1.1, CHCl_3)

Analiza dla $\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{O}_7$ (660.8); obl.: C 76.34, H 6.71; otrzym.: C 76.23, H 6.80.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 4.99 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.5 Hz, H-1), 4.14 (dt, 1 H, $J_{6,7A}$ 6.6, $J_{6,7B}$ 6.0, $J_{6,5}$ 1.2 Hz, H-6), 4.16-3.89 (m, 4 H, H-2, H-3, H-4, H-5), 3.83 (dd, 1 H $J_{7A,7B}$ 9.6 Hz H-7A), 3.78 (dd, 1 H, H-7B)

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 98.45 (C-1), 80.86 (C-3), 74.91^a (C-4), 73.74^a (C-6), 70.96 (C-5), 69.10 (C-7), 68.21 (C-2).

Pochodną acetylową wykonano w warunkach standardowych **148Ac**

$[\alpha]_{\text{D}}$ + 24° (1.0, CHCl_3).

Analiza dla $\text{C}_{44}\text{H}_{46}\text{O}_8 \times \text{H}_2\text{O}$ (702.8 + 18) obl. C 73.31, H 6.71, otrzym.: C 73.51, H 6.51.

I.R. (film) 1740, 1260, 1060 cm^{-1} .

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.44 (t, 1 H, $J_{2,3}$ 2.1 Hz, H-2), 4.96 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.7 Hz, H-1), 4.95-4.28 (m, 10 H, 5 x $\text{C}'\text{H}_2\text{Ph}$), 4.38 (bt, 1 H, $J_{6,7A}$ 6.2, Hz H-6), 4.33-3.90 (m, 3 H, H-3, H-4, H-5), 3.84 (dd, 1 H, $J_{7A,7B}$ 9.6 Hz, H-7A), 3.79 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.8 Hz, H-7B), 2.16 (s, 3 H, OAc).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 96.97 (C-1), 78.86 (C-3), 74.88 (C-4), 73.85 (C-6), 71.33 (C-5), 69.26 (C-7), 68.60 (C-2), 74.84, 73.59, 74.12, 71.85, 69.95 (5 x $\text{C}'\text{H}_2\text{Ph}$), 21.22 (OAc).

Benzylo 3,4,6,7-tetra-O-benzylo-2-(5,6-benzo-2-okso-1,3,2-dioksafosfepan-2-ylo)-L-glicero- α -D-manno heptopiranozyd (149).

Związek **148** (0.326 g) rozpuszczono w absolutnym dichlorometanie (10 ml) i dodano tetrazol (0.104 g), mieszano 10 minut w temperaturze pokojowej, następnie wkroplono roztwór 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepanu (0.125 g) w dichlorometanie (1 ml) i mieszano 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji (TLC ligroina: octan etylu 7 : 3) obniżono temperaturę do -60°C i wkroplono roztwór kwasu metachloronadbenzoesowego (0.153 g) w absolutnym dichlorometanie (7 ml). Po 10 minutach reakcję zakończono, rozcieńczono octanem etylu (10 ml). Warstwę organiczną przemyto 1% roztworem wodorosiarczynu sodowego i 1% roztworem wodorowęglanu sodowego. Po wysuszeniu i odparowaniu chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 7 : 3 otrzymując **149** (0.379 g) w postaci białych kryształków (91%) .

t.t. 128-129°C $[\alpha]_{\text{D}}$ -2.3° (1.44, CHCl_3).

Analiza dla $\text{C}_{50}\text{H}_{51}\text{O}_{10}\text{P}$ (842.9); obl.: C 71.24, H 6.10; otrzym.: C 71.04, H 6.14.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.22 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.7 Hz, H-1), 5.03 (dt, 1 H, $J_{2,3}$ 2.1 $J_{\text{P,H-2}}$ 8.0 Hz, H-2), 4.16 (dt, 1 H, $J_{6,7A}$ 6.4, $J_{6,5}$ 1.2 Hz, H-6), 4.15-4.08 (m, 2 H, H-4, H-3), 3.97-3.93 (m, 1 H, H-5), 3.87 (dd, 1 H, $J_{7A,7B}$ 9.6, $J_{7A,6}$ 6.2 Hz, H-7A), 3.76 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.4 Hz, H-7B).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 97.71 (d, $J_{\text{C,P}}$ 3.3 Hz, C-1), 78.65 (d, $J_{\text{C,P}}$ 4.5 Hz, C-3), 75.3 (C-6), 73.8 (C-4), 73.4 (d, $J_{\text{C,P}}$ 5.4 Hz, C-2), 71.60 (C-5), 69.76 (C-7), 75.07, 73.65, 73.02, 71.89, 70.05 (5 x $\text{C}(\text{H}_2\text{Ph})$).

Benzylo 3,4,6,7-tetra-O-benzylo-2-O-difenylofosforylo-L-glicero- α -D-manno heptopiranozyd (150).

Osuszony triazol (0.027g) rozpuszczono w absolutnym tetrahydrofuranie (1 ml), dodano trietyloaminę (0.054 ml) i ochłodzono do 0°C, następnie wkroplono difenylochlofosforan (0.080 ml) rozpuszczony w tetrahydrofuranie (1 ml), mieszano 10 minut w obniżonej temperaturze, a następnie 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Do wysuszonego benzylo 3,4,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu (**148**) (0.085g) przesączono bis-triazolid i pozostawiono na noc w temperaturze 30°C. Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : octan etylu 7 : 3) dodano wodę (0.5 ml) i mieszano 0.5 godz. Następnie, po rozcieńczeniu mieszaniny reakcyjnej wodą, ekstrahowano dichlorometanem, suszono i odparowano. Otrzymano surowy produkt (0.201 g), który chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 85 : 15. Otrzymano **150** (0.0945 g, 82%) w postaci bezbarwnego oleju.

$[\alpha]_{\text{D}} +16^\circ$ (1.3, CHCl_3).

Analiza dla $\text{C}_{54}\text{H}_{53}\text{O}_{10}\text{P}$ (893.0); obl.: C 72.63, H 5.98; otrzym.: C 72.64, H 6.01.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.04 (dt, 1 H $J_{2,3}$ 2.1 Hz, H-2), 5.15 (s, 1 H, H-1), 4.90-4.18 (m, 10 H, 5 x $\text{C}(\text{H}_2\text{Ph})$), 4.13 (dt, 1 H, $J_{6,7\text{A}}$ 6.5, $J_{6,7\text{B}}$ 6.2, $J_{6,5}$ 0.9 Hz, H-6), 4.60-3.87 (m, 3 H, H-3, H-4, H-5), 3.80 (dd, 1 H, $J_{7\text{B},7\text{A}}$ 9.5 Hz, H-7B), 3.75 (dd, 1 H, H-7A).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 97.20 (d, $J_{\text{C,P}}$ 5.2 Hz, C-1), 78.87 (d, $J_{\text{C,P}}$ 4.0 Hz, C-3), 74.98 (C-6), 74.74 (d, $J_{\text{C,P}}$ 5.9 Hz, C-2), 73.48 (C-4), 71.58 (C-5), 69.86 (C-7), 74.90, 73.57, 72.90, 71.87, 69.32 (5 x $\text{C}(\text{H}_2\text{Ph})$).

Sól di(cykloheksyloamoniowa) 2-O-fosforanu L-glicero- α,β -D-manno heptopiranozy (151).

Związek **149** (0.422 g) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników etanol (6 ml) i octan etylu (3 ml). Dodano 10% pallad na węglu (0.422 g) i wodorowano całą noc w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji mieszaninę przesączono przez warstwę Celitu. Po odparowaniu otrzymano produkt (0.164 g) w postaci białej pianki, którą przemyto dokładnie

eterem dietylowym i wysuszono, a następnie dodano do niej 0.3M wodny roztwór cykloheksyloaminy (3 ml) i mieszano 40 minut. Wodę zliofilizowano i otrzymano **151** (0.199 g, 84%).

$[\alpha]_D +2.6^\circ$ (1.1, H₂O) wartość równowagowa.

¹H NMR, ¹³C NMR i ³¹P NMR w tabeli 8.

Metylo 2-O-allilo-3,4-di-O-benzylo- α -D-mannopiranozyd (154).

Do roztworu metylo 3-O-benzylo-4,6-O-benzylideno- α -D-mannopiranozydu (**153**)¹⁸¹ (9.0 g) w dimetyloformamidzie (26 ml) oziębionego do 0°C dodano 50 % wodorek sodowy (3.48 g). Po 20 min wkroplono roztwór bromku allilowego (6 ml) w dimetyloformamidzie (6 ml). Po 3 godzinach nadmiar wodorku rozłożono metanolem, mieszaninę wylano do wody z lodem, ekstrahowano dichlorometanem, suszono i odparowano. Po chromatografii w układzie heksan - eter dietylowy 4 : 1 otrzymano metylo 2-O-allilo-3-O-benzylo-4,6-O-benzylideno- α -D-mannopiranozyd (9.89 g, 99%).

$[\alpha]_D +51.3^\circ$ (2.1, CHCl₃).

Analiza dla C₂₄H₂₈O₆ (412.46) obl. C, 69.88, H, 6.84; otrzym. C, 69.44, H, 6.62.

¹H NMR (C₆D₆): *inter alia*, δ : 5.38 (s, 1 H, PhCH), 4.66 (d, 1 H, J_{1,2} 1.6 Hz, H-1), 4.42 (t, 1 H, H-4), 4.19 (dd, 1 H, J_{6A5} 4.8, J_{6A,6B} 10.2 Hz, H-6A), 4.07 (dd, 1 H, J_{3,2} 3.2, J_{3,4} 9.9 Hz, H-3), 3.86 (ddd, 1 H, J_{5,4} 9.8, J_{5,6A} 5.0 Hz, H-5), 3.76 (dd, 1 H, H-2), 3.69 (t, 1 H, H-6B).

Do roztworu metylo 2-O-allilo-3-O-benzylo-4,6-O-benzylideno- α -D-mannopiranozydu (5.8 g) w mieszaninie rozpuszczalników eter dichlorometan 1 : 1 (100 ml) dodano LiAlH₄ (2.26 g) i wkroplono roztwór AlCl₃ (6.8 g) w eterze dietylowym (20 ml). Mieszaninę ogrzewano do wrzenia przez 45 minut. Po zakończeniu reakcji nadmiar wodorku rozłożono octanem etylu (10 ml) i wodą (10 ml). Produkt ekstrahowano eterem dietylowym, wysuszono siarczanem magnezowym i chromatografowano w układzie heksan : octan etylu otrzymując **154** (5.6 g, 96%).

$[\alpha]_D +45^\circ$ (1.2, CHCl₃).

Analiza dla C₂₄H₃₀O₆ x 0.5 H₂O (414.5 +9.0) obl. C, 68.06, H, 7.38; otrzym. C 68.28, H 7.13

¹H NMR (CDCl₃): *inter alia*, δ 4.71 (s, 1 H, J_{1,2} 1.8 Hz, H-1), 3.75 (dd, 1 H, J_{2,3} 2.6 Hz, H-2), 3.60 (ddd, 1 H, J_{5,6A} 2.8, J_{5,6B} 4.9, J_{5,4} 9.6 Hz, H-5).

Metylo 2-O-allilo-3,4,7-tri-O-benzylo D i L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd i metylo 2-O-allilo-3,4,7-tri-O-benzylo-D (L)-glicero- β -L-gulo-heptopiranozyd (155, 156, 157).

Roztwór chlorku oksalilu (2.5 ml) w dichlorometanie (63 ml) oziębiono do -60°C i wkroplono roztwór dimetylosulfotlenku (4.3 ml) w dichlorometanie (12.6 ml). Po 5 minutach bardzo powoli wkroplono roztwór **154** (5.2 g) w dichlorometanie (20 ml). Reakcję kontynuowano w temperaturze -60°C przez 1 godzinę, wkroplono trietyloaminę (17.7 ml) i mieszano jeszcze 5 minut w tej temperaturze. Bardzo powoli ogrzano mieszaninę reakcyjną do temperatury pokojowej, dodano wodę (126 ml) i ekstrahowano dichlorometanem. Warstwę organiczną suszono i odparowano otrzymując olej (5.19 g), który po dokładnym wysuszeniu poprzez kilkakrotne odparowanie z benzenem użyto do następnej reakcji bez dodatkowego oczyszczania.

Do wiórek magnezowych (0.757 g) i chlorku rtęciowego (50 ml) dodano destylowany bezpośrednio przed reakcją tetrahydrofuran (1.5 ml). Temperaturę obniżono do 0°C i dodano kilka kropel czystego eteru chlorometylowobenzylowego. Po zapoczątkowaniu reakcji wkroplono roztwór eteru chlorometylowobenzylowego (4.94 g) w tetrahydrofuranie (5 ml) obniżając temperaturę do -5°C - 10°C . Mieszanie kontynuowano w tej temperaturze przez 1 godzinę, a następnie po obniżeniu temperatury do -30°C wkroplono roztwór benzylo 2-O-allilo-3,4-di-O-benzylo- α -D-manno-heksodialdo-1,5-piranozydu (5.19 g) w tetrahydrofuranie (20 ml). Mieszano dwie godziny w tej temperaturze, mieszaninę bardzo powoli ogrzano do temperatury pokojowej i reakcję kontynuowano jeszcze przez 12 godzin. Dodano ochłodzony do 0°C nasycony roztwór chlorku amonowego (200 ml) i ekstrahowano eterem etylowym. Po wysuszeniu, odparowaniu i chromatografii w układzie heksan : octan etylu 85 : 15 otrzymano mieszaninę (**155, 156, 157**) (5.4 g, 80.5 %). Ponowna chromatografia tej mieszaniny dała :

Metylo 2-O-allilo-3,4,7-tri-O-benzylo-D(L)-glicero- β -L-gulo-heptopiranozyd (157) (0.831 g, 12,4%).

$[\alpha]_{\text{D}} + 11^{\circ}$ (1.25, CHCl_3).

HR MS (LSIMS) dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_7\text{Na}$), obl.: 557.2515, otrzym.: 557.2509

^1H NMR (CDCl_3): *inter alia*, δ : 4.62 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 8.2 Hz, H-1), 3.82 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ 9.0, $J_{5,4}$ 1.2 Hz, H-5), 3.79 (t, 1 H, $J_{3,2}$ 3.4, $J_{3,4}$ 3.5 Hz, H-3), 3.75 (dd, 1 H, H-4), 3.70 (dd, 1 H, $J_{7A,6}$ 3.1, $J_{7A,7B}$ 9.6 Hz, H-7A), 3.62 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 5.4 Hz, H-7B), 3.50 (dd, 1 H, H-2).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 101,7 (C-1), 76.14, 74.56, 73.98, 72.45, 68.01 (C-2, 3, 4, 5, 6), 71.23 (C-7).

Drugim związkiem otrzymanym z chromatografii był metylo 2-O-allilo-3,4,7-tri-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**155**) (1.906 g, 32.0%).

$[\alpha]_D^{+24}$ (1.2, CHCl₃).

HR MS/LSIMS dla $[M+Na]^+$ (C₃₂H₃₈O₇Na), obl.: 557.2515; otrzym.: 557.2509.

¹H NMR (CDCl₃): δ 4.85 (d, 1 H, J_{1,2} 1.8 Hz, H-1), 4.18 (dt, 1 H, J_{6,7A} 7.2, J_{6,7B} 6.1 Hz, H-6), 4.13 (t, 1 H, J_{4,5} 9.5 Hz, H-4), 3.95 (dd, 1 H, J_{3,4} 9.5 Hz, H-3), 3.76 (dd, 1 H, J_{2,3} 3.0 Hz, H-2), 3.75 (dd, 1 H, J_{5,6} 1.0 Hz, H-5), 3.64 (dd, 1 H, J_{7A,7B} 9.4 Hz, H-7A), 3.55 (dd, 1 H, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃): δ : 99.45 (C-1), 80.03 (C-3), 74.46 (C-2), 74.18 (C-4), 71.44 (C-7), 70.70 (C-5), 67.89 (C-6).

Trzecim związkiem wymytm z kolumny był metylo 2-O-allilo-3,4,7-tri-O-benzylo-D-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**156**) (0.827 g, 15.8%).

$[\alpha]_D^{+55}$ (1.18, CHCl₃).

¹H NMR (CDCl₃): *inter alia*, δ 4.68 (d, 1 H, J_{1,2} 2.1 Hz, H-1), 3.94 (t, 1 H, J_{2,3} 2.5 Hz, H-2), 3.67 (dd, 1 H, J_{7A,6} 6.7, J_{7A,7B} 10.1 Hz, H-7A), 3.60 (dd, 1 H, J_{7B,6} 3.1, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 99.09 (C-1), 80.25 (C-3), 76.07, 74.40, 71.99, 71.01 (C-2, 4, 5, 6), 70.82 (C-7).

Pochodną acetylową tego związku otrzymano w warunkach standartowych **156Ac**

$[\alpha]_D^{+31}$ (0.87, CHCl₃)

HR MS/LSIMS dla $[M+Na]^+$ (C₃₄H₄₀O₈Na), obl.: 599.2621; otrzym.: 599.2626.

¹H NMR (CDCl₃): δ : 4.70 (d, 1 H, J_{1,2} 1.9 Hz, H-1), 5.55 (ddd, 1 H, J_{6,5} 2.0, J_{6,7A} 4.6, J_{6,7B} 7.2 Hz, H-6) 3.92 (t, 1 H, J_{4,5} 9.8, J_{4,3} 9.2 Hz, H-4), 3.84 (dd, 1 H, J_{3,2} 3.1 Hz, H-3), 3.79 (dd, 1 H, H-5), 3.75 (dd, J_{7A,7B} 10.7 Hz, H-A), 3.69 (dd, 1 H, H-2), 3.68 (dd, 1 H, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃): δ : 98.84 (C-1), 80.10 (C-3), 74.77, 74.46 (C-2, 4), 71.74, 71.58 (C-5, C-6), 68.13 (C-7).

Metylo 2-O-allilo-3,4,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**158**).

Do oziębionego do 0°C roztworu **155** (1.78 g) w dimetyloformamidzie (15 ml) dodano woderek sodowy (0.32 g). Mieszano 10 minut i wkroplono roztwór chlorku benzylu (0.77 ml) w dimetyloformamidzie (5 ml). Po 2 godzinach nadmiar wodorku został rozłożony za pomocą metanolu i mieszaninę reakcyjną wylano do wody z lodem, ekstrahowano eterem etylowym, wysuszono i odparowano. Chromatografia w układzie heksan : octan etylu 9 : 1 dała **158** (1.822 g, 88%).

$[\alpha]_D^{+45}$ (1.1, CHCl_3).

HR-MS /LSIMS: dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{O}_7\text{Na}$), obl.: 647.2985. otrzym.: 647.2951.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 4.77 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.7 Hz, H-1), 4.12 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.5 Hz, H-4), 3.88 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.2, $J_{3,4}$ 9.2 Hz, H-3), 3.84 (dd, 1 H, $J_{7A,6}$ 6.3, $J_{7A,7B}$ 9.6 Hz, H-7A), 3.77 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.2, H-7B), 3.73 (dd, 1 H, $J_{6,5}$ 1.3 Hz, H-5), 3.73 (dd, 1 H, H-2).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 90.05 (C-1), 80.40 (C-3), 74.94 (C-2), 74.13, 74.10 (C-4, C-6), 71.24 (C-5), 70.15 (C-7).

Metylo 3,4,6,7-tetra-O-benzyl-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (159).

Związek **158** (1.75 g) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników etanol : benzen : woda 18 : 3 : 1. Następnie dodano 1.4-diazabicyklo[2.2.2]-oktan (0.064 g), mieszaninę reakcyjną podgrzano i w temperaturze bliskiej wrzenia dodano katalizator Wilkinsona (0.176 g). Ogrzewano do wrzenia przez 3 godziny i pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Następnie przesączono przez Celit i odparowano. Produkt rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników aceton : woda 15 : 1. Dodano tlenek rtęciowy (0.637 g) i chlorek rtęciowy (0.798 g), mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Po zakończeniu reakcji katalizatory odsączono na warstwie Celitu, przesącz odparowano i rozpuszczono w eterze dietylowym. Warstwę organiczną przemyto 50% roztworem jodku potasowego, 1% roztworem wodorosiarczyny sodowego, 1% roztworem wodorowęglanu sodowego. Po wysuszeniu i odparowaniu chromatografowano w układzie ligroina : eter dietylowy 7 : 3. Otrzymano **159** (1.489 g, 91%).

$[\alpha]_D^{+59}$ (0.97, CHCl_3).

HR-MS /LSIMS dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{Na}$), obl.: 607.2672. otrzym.: 607.2672.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 4.79 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.5 Hz, H-1), 4.10 (dt, 1 H, $J_{6,5}$ 1.5, $J_{6,7A}$ 6.2 Hz, H-6), 4.01 (dd, 1 H, H-2), 4.00 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.6, H-4), 3.88 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.3, $J_{3,4}$ 9.1 Hz, H-3), 3.83 (dd, 1 H, $J_{7A,7B}$ 9.7 Hz, H-7A), 3.79 (dd, 1 H, H-5), 3.78 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.4 Hz, H-7B).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ : 100.39 (C-1), 80.59 (C-3), 74.80, 73.57 (C-4, 6), 70.57 (C-5), 69.98 (C-7), 67.94 (C-2).

Pochdną acetylową wykonano w warunkach standardowych metylo 2-O-acetylo-3,4,6,7-tetra-O-benzyl-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**159Ac**).

$[\alpha]_D^{+30}$ (1.0, CHCl_3);

HR MS /LSIMS dla $[M+Na]^+$ ($C_{38}H_{42}O_8Na$) .obl.: 649.2777; otrzym.: 649.2762.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 5.32 (dd, 1 H, $J_{2,1}$ 1.9, $J_{2,3}$ 2.1 Hz, H-2), 4.71 (d, 1 H, H-1), 4.09 (dt, 1 H, $J_{5,6}$ 1.3, $J_{6,7A}$ 6.3 Hz, H-3), 3.79 (dd, 1 H, $J_{7A,7B}$ 9.6 Hz, H-7A), 3.77 (dd, 1 H, H-5), 3.72 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.4 Hz, H-7B).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ : 98.71 (C-1), 78.57 (C-3), 74.82 (C-4), 73.69 (C-6), 70.93 (C-5), 69.98 (C-7), 68.37 (C-2).

Metylo 2-O-(5,6-benzo-2-okso-1,3,2-dioksafosfep-2-ylo)-3,4,6,7-tetra-O-benzyl-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (160).

Do roztworu związku **159** (1.37 g) w dichlorometanie (15 ml) dodano tetrazol (0.496 g) i mieszano 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie wkroplono roztwór 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepanu (0.594 g) w dichlorometanie (1 ml) i mieszano 1.5 godziny w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : octan etylu 7 : 3) mieszaninę reakcyjną ochłodzono do $-60^\circ C$ i dodano roztwór kwasu metachloronadbenzoesowego (0.311 g) w dichlorometanie (5 ml). Po 15 minutach reakcja była zakończona. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono octanem etylu (40 ml), przemyto 1% roztworem wodorowęglanu sodowego, 1% roztworem wodorosiarczyny sodowego, wysuszono i odparowano. Chromatografia w układzie heksan : octan etylu 4 : 1 dała **160** (1.655 g, 92%).

t.t $83-86^\circ C$, $[\alpha]_D -11^\circ$ (6.9, $CHCl_3$).

HR MS/LSIMS dla $[M+Na]^+$ ($C_{44}H_{47}O_{10}PNa$) obl.: 789.2805 otrzym: 789.2780.

1H NMR (C_6D_6) δ : 5.30 (ddd, 1 H, $J_{2,1}$ 2.2, $J_{2,3}$ 2.7, $J_{H-2,P}$ 7.5 Hz, H-2), 5.12 (bs, 1 H, H-1), 4.41 (t, 1 H, H-4), 4.28 (ddd, 1 H, $J_{6,5}$ 1.7 Hz, H-6), H-3 (dt, 1 H, $J_{3,4}$ 9.2, $J_{H-3,P}$ 2.8 Hz, H-3), 4.03 (dd, 1 H, $J_{5,4}$ 9.6 Hz, H-5), 3.86 (dd, 1 H, $J_{7A,6}$ 6.3, $J_{7A,7B}$ 9.3 Hz, H-7A), 3.80 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.5 Hz, H-7B).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ : 99.04 (d, 1 H, $J_{C-1,P}$ 2.8 Hz, C-1), 78.34 (d, $J_{C-3,P}$ 4.6 Hz, C-3), 75.23 (C-6), 73.64 (C-4), 73.01 (d, $J_{C-2,P}$ 5.4 Hz, C-2), 71.16 (C-5), 70.05 (C-7).

Metylo 2-O-fosforylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (161).

Do roztworu związku **160** (0.5 g) w mieszaninie rozpuszczalników etanol (9 ml), octan etylu (3 ml) dodano 10% pallad na węglu (0.5 g) i wodorowano całą noc w temperaturze pokojowej. Po

zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną przesączono przez ciekłą warstwę Celitu. Przesącz odparowano, otrzymano **161** (0.196 g, 99%).

$[\alpha]_D +27.5^\circ$ (0.52, H₂O).

¹H NMR, ¹³C NMR, ³¹P NMR w tabeli 9.

Metylo-3-O-allilo-2,4,7-tri-O-benzylo-D i L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd i metylo 3-O-allilo-2,4,7-tri-O-benzylo D(L)-glicero- β -L-gulo-heptopiranozyd (165, 166, 167)

Roztwór chlorku oksalilu (2.8 ml) w dichlorometanie (70 ml) oziębiono do -60°C i wkroplono roztwór dimetylosulfotlenku (4.8 ml) w dichlorometanie (14 ml). Po 5 minutach bardzo powoli wkroplono roztwór **164**¹⁸² (5.8 g) w dichlorometanie (20 ml). Reakcję kontynuowano w temperaturze -60°C przez 1 godzinę następnie wkroplono trietyloaminę (19.7 ml) i mieszano jeszcze 5 minut w tej temperaturze. Bardzo powoli ogrzano mieszaninę reakcyjną do temperatury pokojowej, dodano wodę (140 ml) i ekstrahowano dichlorometanem. Warstwę organiczną suszono i odparowano otrzymując olej, który po dokładnym wysuszeniu poprzez kilkakrotne odparowanie z benzenem użyto do następnej reakcji bez dodatkowego oczyszczania.

W kolbie z mieszadłem magnetycznym umieszczono wiórki magnezowe (0.845 g) i chlorek rtęciowy (50 mg), dodano świeżo destylowany z nad LiAlH₄ tetrahydrofuran (1.5 ml). Podczas intensywnego mieszania dodano niewielką ilość czystego eteru chlorometyłowobenzylowego (destylowanego bezpośrednio przed reakcją) obniżając temperaturę do 0° . Po zapoczątkowaniu reakcji wkroplono pozostałą ilość eteru chlorometyłowobenzylowego (4.41 g) w tetrahydrofuranie (4 ml) utrzymując temperaturę $0^\circ -10^\circ\text{C}$. Reakcję kontynuowano w tej temperaturze przez jedną godzinę. Po obniżeniu temperatury do -20°C wkroplono roztwór metylo 3-O-allilo-2,4-O-benzylo- α -D-manno-heksodialdo-1.5-piranozydu (5.8 g) w absolutnym tetrahydrofuranie (20 ml). Mieszano w tej temperaturze przez 2 godziny, a następnie mieszaninę bardzo powoli ogrzano do temperatury pokojowej i reakcję kontynuowano jeszcze przez 12 godzin. Dodano ochłodzony do 0°C wodny roztwór chlorku amonowego (200 ml) i ekstrahowano eterem dietylowym. Po wysuszeniu, i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 4 : 1 otrzymując mieszaninę **167, 166, 165** (5.7 g 76%). Ponowna chromatografia w tym samym układzie dała jako pierwszy związek :

Metylo 3-O-allilo-2,4,7-tri-O-benzylo-D(L)-glicero- β -L-gulo-heptopiranozyd (**167**) (0.676 g, 9.0%),
 $[\alpha]_D + 2,2^\circ$ (0.94, CHCl₃);

HR MS/LSIMS dla $[M+Na]^+$ (C₃₂H₃₈O₇Na) obl.: 557.2515; otrzym.: 557.2515.

¹H NMR (CDCl₃): δ 4.62 (d, 1 H, J_{1,2} 8.2 Hz, H-1), 3.78 (dd, 1 H, J_{5,6} 9.0, J_{5,4} 1.3 Hz, H-5), 3.71 (dd, 1 H, J_{4,5} 1.4, J_{4,3} 3,7 Hz, H-4), 3.71 (dd, 1 H, J_{7A,6} 3.1, J_{7A,7B} 9.8 Hz, H-7A), 3.63 (t, 1 H, J_{3,2} 3.3 Hz, H-3), 3.63 (dd, 1 H, J_{7B,6} 5.5 Hz, H-7B), 3.53 (dd, 1 H, H-2).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 101.8 (C-1), 75.85, 74.88, 73.79, 72.48, 68.00 (C-2, 3, 4, 5, 6), 71.17 (C-7).

Drugim związkiem otrzymanym z chromatografii był metylo 3-O-allilo-2,4,7-tri-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**165**) (2.737 g, 36,3%).

$[\alpha]_D + 25^\circ$ (0.9, CHCl₃).

HR MS/LSIMS dla $[M+Na]^+$ (C₃₂H₃₈O₇Na) obl.: 557.2515, otrzym.: 557.2509.

¹H NMR (CDCl₃): δ 4.69 (bs, 1 H, H-1), 4.12 (t, 1 H, H-4), 3.76 (dd, 1 H, J_{3,2} 3.1, J_{3,4} 9,3 Hz, H-3), 3.74 (dd, J_{2,1} 1.8 Hz, H-2), 3.65 (dd, 1 H, J_{7A,6} 7.2, J_{7A,7B} 9.5 Hz, H-7B) 3.63 (dd, 1 H, J_{5,6} 1.0 J_{5,4} 9.8 Hz, H-5) 3.57 (dd, J_{7B,6} 6.0 Hz, 1 H, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃) δ : 99.39 (C-1), 79.90 (C-3), 74.46 (C-3), 74.14 (C-4), 71.06 (C-7), 70.70 (C-5), 67.92 (C-6).

Trzecim związkiem był metylo 3-O-allilo-2,4,7-tri-O-benzylo-D-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**166**) (0.870 g, 11.5%) nie był to jednak związek czysty analitycznie.

Metylo 3-O-allilo-2,4,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**168**).

Do oziębionego do 0°C roztworu **165** (2.326 g) w dimetyloformamidzie (15 ml) dodano wodorek sodowy (0.416 g) i mieszano 10 minut. Następnie wkroplono roztwór chlorku benzylu (1.0 ml) w dimetyloformamidzie (5 ml), mieszano 12 godzin w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji nadmiar wodorku rozłożono metanolem, a mieszaninę reakcyjną wylano do wody z lodem i ekstrahowano eterem dietylowym. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : eter dietylowy 4 : 1 otrzymując **168** (2.326 g, 86%).

$[\alpha]_D + 34^\circ$ (1.1, CHCl₃).

HR-MS /LSIMS: dla $[M+Na]^+$ (C₃₉H₄₄O₇Na) obl.: 647.2985. otrzym.: 647.2981.

¹H NMR (CDCl₃) δ : 4.80 (d, 1 H, J_{1,2} 1.7 Hz, H-1), 4.15 (t, 1 H, H-4), 4.12 (dt, 1 H, J_{6,5} 1.5 Hz, H-6), 3.84 (dd, 1 H, J_{7A,6} 6.3, J_{7A,7B} 9.6 Hz, H-7A), 3.79 (dd, 1 H, J_{3,2} 3.0, J_{3,4} 9.0 Hz, H-3), 3.77 (dd, 1 H,

$J_{7B,6}$ 6.3, $J_{7A,7B}$ 9.6 Hz, H-7A), 3.79 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.0, $J_{3,4}$ 9.0 Hz, H-3), 3.77 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.2 Hz, H-7B), 3.75 (dd, 1 H, H-2), 3.73 (dd, 1 H, $J_{5,4}$ 9.8 Hz, H-5).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ : 98.97 (C-1), 80.30 (C-3), 74.97 (C-2), 74.16 (C-4), 74.12 (C-6), 71.27 (C-5), 70.15 (C-7).

Metylo 2,4,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (169).

Do roztworu **168** (2.256 g) w mieszaninie rozpuszczalników etanol : benzen : woda 18 : 3 : 1 dodano 1.4-diazabicyklo[2.2.2]-oktan (0.0825 g) i roztwór ogrzano do 80°C. Dodano katalizator Wilkinsona (0.227 g), mieszaninę reakcyjną ogrzewano do wrzenia przez 3 godziny. Następnie przesączono przez Celit i odparowano. Otrzymany olej rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników aceton : woda 15:1, dodano tlenek rtęciowy (0.149 g) oraz chlorek rtęciowy (0.187 g). Mieszano 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji odsączono katalizatory na warstwie Celitu, przesącz odparowano i rozpuszczono w eterze dietylowym. Przemycło 50% roztworem jodku potasowego, 1% roztworem wodorosiarczynu sodowego oraz 1 % roztworem wodorowęglanu sodowego. Po wysuszeniu, odparowaniu i chromatografii otrzymano **169** (0.373 g, 83%).

$[\alpha]_D^{+20}$ (1.3, CHCl_3).

HR MS /LSIMS dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{Na}$), obl.: 607.2672, otrzym.: 607.2672.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 4.87 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.3 Hz, H-1), 4.12 (dt, 1 H, $J_{6,5}$ 1.4, $J_{6,7A}$ 6.3, $J_{6,7B}$ 6.3 Hz, H-6), 3.99 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.7, $J_{3,4}$ 8.9, H-3), 3.87 (t, 1 H, H-4), 3.84 (dd, 1 H, $J_{7A,7B}$ 9.6 Hz, H-7A), 3.77 (dd, 1 H, H-7B), 3.73 (dd, 1 H, $J_{5,4}$ 9.6 Hz, H-5), 3.70 (dd, 1 H, H-2).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ : 97.85 (C-1), 78.29 (C-2), 76.05 (C-4), 75.05 (C-6), 72.07 (C-3), 70.42 (C-5), 70.12 (C-7).

Pochodną acetylową wykonano w warunkach standardowych metylo 2,4,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**169Ac**).

$[\alpha]_D^{+20}$ (1.8, CHCl_3).

HR MS/LSIMS dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{O}_8\text{Na}$), obl.: 649.2777. otrzym.: 649.2774.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.22 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.3, $J_{3,4}$ 8.7 Hz, H-3), 4.80 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 2.2 Hz, H-1), 4.16 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.4 Hz, H-4), 4.05 (dt, 1 H, $J_{5,6}$ 1.5 Hz, H-6), 3.85 (dd, 1 H, $J_{7A,6}$ 6.3, $J_{7A,7B}$ 9.6 Hz, H-7A), 3.85 (dd, 1 H, H-2), 3.82 (dd, 1 H, H-5), 3.77 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.2 Hz, H-7B).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ : 98.99 (C-1), 75.74 (C-2), 74.89 (C-6), 73.86, 73.24 (C-3, 4), 71.08 (C-5), 70.03 (C-7).

Metylo 3-O-(5,6-benzo-2-okso-1,3,2-dioksafosfep-2-ylo)-2,4,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (170).

Związek **169** (1.05 g) rozpuszczono w dichlorometanie (20 ml), dodano tetrazol (0.379 g) i mieszano 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie wkroplono roztwór 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepanu (0.455 g) w dichlorometanie (1 ml). Mieszano 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną ochłodzono do -60°C i dodano kwas metachloronadbenzoesowy (0.557 g) w dichlorometanie (5 ml). Po 20 minutach reakcja była zakończona (TLC heksan : octan etylu 1 : 1). Dodano 20 ml octanu etylu, przemyto 1% roztworem wodorowęglanu sodowego i 1% roztworem wodorosiarczynu sodowego. Po wysuszeniu i odparowaniu chromatografowo w układzie heksan : octan etylu 7 : 3 otrzymując **170** (1.01 g, 73%).

$[\alpha]_{\text{D}} +18^{\circ}$ (1.1, CHCl_3);

HR- MS/LSIMS dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{44}\text{H}_{47}\text{PO}_{10}\text{Na}$) obl: 789.2805, otrzym.: 789.2780.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 4.91 (ddd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.0, $J_{3,4}$ 8.4, $J_{3,P}$ 7.1 Hz, H-3), 4.78 (dd, 1 H, $J_{1,2}$ 2.2 Hz, H-1), 4.26 (t, 1 H $J_{4,5}$ 9.2 Hz, H-4), 4.08 (t, 1 H, H-2), 4.05 (bt, 1 H, H-6), 3.86 (dd, 1 H, $J_{7A,6}$ 6.3, $J_{7A,7B}$ 9.6 Hz, H-7A), 3.80 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ 1.3 Hz, H-5), 3.77 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.1 Hz, H-7B).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ : 99.16 (C-1), 78.86 (d, C-3), 76.82 (C-2), 75.01 (C-6), 73.89 (d, $J_{C-4,P}$ 6.4 Hz, C-4), 71.12 (C-5), 69.88 (C-7).

Metylo 3-O-fosforylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (171).

Związek **170** (0.418 g) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników etanol : octan etylu 2 : 1 (10.5 ml), dodano 10% pallad na węglu (0.418 g) i wodorowano całą noc w temperaturze pokojowej. Następnie katalizator odsączono na Celicie, przesącz odparowano. Otrzymano **171** (0.157 g, 94.6%)

$[\alpha]_{\text{D}} +40^{\circ}$ (0.5, H_2O).

^1H NMR, ^{13}C NMR ^{31}P NMR w tabeli 9.

Metylo 4,6-O-(p-metoksybenzylideno)- α -D-mannopiranozyd (172).

Do roztworu metylo α -D-mannopiranozydu (19.4 g) w dimetylosulfotlenku (120 ml) dodano sita molekularne 3 Å i mieszano 20 minut. Następnie dodano chlorek cynku (15.7 g) i kwas p-toluenosulfonowy (2.07 g) mieszanie kontynuowano przez 6 dni. Po zakończeniu reakcji mieszaninę

zobojętniono 25% wodnym roztworem amoniaku (57 ml) i przesączono przez warstwę Celitu. Po wylaniu do wody ekstrahowano chloroformem. Warstwę organiczną wysuszono i odparowano. Surowy produkt chromatografowano w układzie heksan - octan etylu 9 : 1. Otrzymano metylo 2,3:4,6-di-O-(*p*-metoksybenzylideno)- α -D-mannopiranozyd (13.4 g) $\{[\alpha]_D -8.6^\circ (0.5, \text{CHCl}_3)$, mieszanina *exo:endo* 1:1} i (172) (6.8 g), $[\alpha]_D +60^\circ (1.6, \text{CHCl}_3)$.

Analiza dla $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_7 \times 0.25 \text{H}_2\text{O}$ (312.3) obl.: C, 56.86, H, 3.32; otrzym.: C 56.98, H 6.80.

^1H NMR (200 MHz) (CDCl_3): *inter alia*, δ 5.50 (s, 1 H, $\text{MeOC}_6\text{H}_4\text{CH}$), 4.69 (s, 1 H, H-1), 3.8 - 4.3 (m, 6 H, H-2, 3, 4, 5, 6A, 6B), 3.79 (s, 3 H, OMe), 3.37 (s, 3 H, OMe),

Metylo 2,3-di-O-benzylo-4-O-(p-metoksybenzylo)- α -D-mannopiranozyd (175).

Związek 172 (13.9 g) był benzylowany standartową metodą (NaH, BnBr, DMF, 0°C) otrzymano 173 (20.7 g, 95.1%).

Roztwór związku 173 (9.8 g) w acetonitrylu (160 ml) mieszano z sitami molekularnymi 3 Å przez 10 minut Następnie ochłodzono mieszaninę reakcyjną w łaźni woda-lód i dodano cyjanoborowodorek sodowy (4.81 g). Po kilku minutach wkroplono roztwór chlorku trimetylosililowego (9.7 ml) w acetonitrylu (20 ml). Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : eter dietylowy 1 : 1) przesączono mieszaninę reakcyjną przez Celit i wylano do roztworu wodorowęglanu sodowego. Warstwę wodną ekstrahowano dichlorometanem, suszono i odparowano. Chromatografowano w układzie heksan - eter dietylowy 9 : 1.

Pierwszym związkiem otrzymanym z chromatografii był metylo 2,3-di-O-benzylo-6-O-(*p*-metoksybenzylo)- α -D-mannopiranozyd (3.13 g) (174).

$[\alpha]_D -6.3^\circ (1.7 \text{CHCl}_3)$,

^1H NMR data (CDCl_3): *inter alia*, δ : 4.77 (d, 1 H, $J_{1,2} 1.7 \text{ Hz}$, H-1), 4.03 (t, 1 H, $J_{4,3} J_{4,5} 9.4 \text{ Hz}$, H-4).

Drugim produktem wymytym z kolumny był związek 175 (5.2 g).

$[\alpha]_D +32^\circ (1.2, \text{CHCl}_3)$.

Analiza dla $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_7$ (494.6) obl.: C, 70.42; H, 6.93, otrzym.: C, 70.25; H, 7.03.

^1H NMR (CDCl_3): *inter alia*, δ : 4.70 (d, 1 H, $J_{1,2} 1.8 \text{ Hz}$, H-1), 4.27 (t, 1 H, $J_{4,5} = J_{4,3} = 9.6 \text{ Hz}$, H-4), 4.04 (dd, 1 H, $J_{3,2} 3.1 \text{ Hz}$, H-3).

Metylo 2,3,7-tri-O-benzylo-4-O-(p-metoksybenzylo)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd i metylo 2,3,7-tri-O-benzylo-4-O-(p-metoksybenzylo)-D(L)-glicero- β -L-gulo-heptopiranozyd (176 i 177)

Do roztworu chlorku oksalilu (1.6 ml) w dichlorometanie (40 ml) oziębionego do -60°C dodano roztwór dimetylosulfotlenku (2.7 ml) w dichlorometanie (8 ml). Po 5 minutach powoli wkroplono roztwór **175** (3.8 g) w dichlorometanie (15 ml). Mieszano 1 godzinę w temperaturze -60°C , następnie wkroplono trietyloaminę (11 ml) i mieszano jeszcze 5 minut w tej temperaturze. Bardzo powoli ogrzano mieszaninę reakcyjną do temperatury pokojowej, dodano wodę (79 ml) i ekstrahowano dichlorometanem. Warstwę organiczną suszono i odparowano otrzymując olej, który po dokładnym wysuszeniu poprzez kilkakrotne odparowanie z benzenem użyto do następnej reakcji bez dodatkowego oczyszczania.

W kolbie z mieszadłem magnetycznym umieszczono wiórki magnezowe (0.475 mg) i chlorek rtęciowy (50 mg), dodano świeżo destylowany z nad LiAlH_4 tetrahydrofuran (1.0 ml). Podczas intensywnego mieszania dodano niewielką ilość czystego eteru chlorometylowo benzylowego (destylowanego bezpośrednio przed reakcją) obniżając temperaturę do 0°C . Po zapoczątkowaniu reakcji wkroplono pozostałą ilość eteru chlorometylowobenzylowego (3.1 g) w tetrahydrofuranie (1.5 ml) utrzymując temperaturę -10°C . Reakcję kontynuowano w tej temperaturze przez jedną godzinę. Po obniżeniu temperatury do -30°C wkroplono roztwór metylo 2,3-di-O-benzylo-4-O-(p-metoksybenzylo)- α -D-manno-heksodialdo-1,5-piranozydu (3.9 g) w absolutnym tetrahydrofuranie (15 ml). Mieszano w tej temperaturze przez 2 godziny, a następnie mieszaninę bardzo powoli ogrzano do temperatury pokojowej i reakcję kontynuowano jeszcze przez 12 godzin. Dodano ochłodzony do 0°C nasycony roztwór chlorku amonowego (100 ml) i ekstrahowano eterem dietylowym. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 9 : 1 otrzymując mieszaninę **176 i 177** (2.985 g, 61.2%).

Ponowna chromatografia w tym samym układzie dała jako pierwszy związek metylo 2,3,7-tri-O-benzylo-4-O-(p-metoksybenzylo)-D(L)-glicero- β -L-gulo-heptopiranozyd (**177**) (1.014 g, 20.2%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{+6^{\circ}}$ (1.07, CHCl_3).

HR MS /LSIMS dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{O}_8\text{Na}$) obl.: 637.2777, otrzym.:637.2768.

^1H NMR (CDCl_3) *inter alia*, δ : 4.67 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 8.2 Hz, H-1), 4.02 (ddd, 1 H, $J_{6,5}$ 8.7, $J_{6,7A}$ 3.1, $J_{6,7B}$ 5.4 Hz, H-6), 3.81 (dd, 1 H, $J_{5,4}$ 1.0 Hz, H-5), 3.97 (t, 1 H, $J_{3,4}$ 3.6 Hz, H-3), 3.71-3.66 (m, 2 H, H-4, H-7A), 3.62 (dd, 1 H, $J_{7B,7A}$ 9.7 Hz, H-7B), 3.53 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 2.7 Hz, H-2).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 101.8 (C-1), 76.10, 74.81, 73.25, 72.41, 68.06 (C-2, 3, 4, 5, 6), 71.16 (C-7).

Drugim związkiem otrzymanym z chromatografii był metylo 2,3,7-tri-O-benzylo-4-O-(p-metoksybenzylo)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**176**) (1.396 g, 28,6%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{+13}$ (1.2, CHCl_3);

HR MS/LSIMS dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{O}_8\text{Na}$) obl.: 637.2777, otrzym.: 637.2792.

^1H NMR (CDCl_3): δ 4.62 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.7 Hz, H-1), 4.09 (dt, 1 H, $J_{6,5}$ 1.1 Hz, H-6), 4.08 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.6 Hz, H-4), 3.79 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.1 $J_{3,4}$ 9.5 Hz, H-3), 3.70 (dd, 1 H, H-2), 3.58 (dd, 1 H, $J_{7A,6}$ 7.3, $J_{7A,7B}$ 9.4 Hz, H-7A) 3.55 (dd, 1 H, H-5), 3.49 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 5.9 Hz, H-7B).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ : 99.33 (C-1), 80.26 (C-3), 74.59 (C-2), 74.01 (C-4), 71.49 (C-7), 70.80 (C-5), 67.94 (C-6).

*Metylo 2,3,6,7-tetra-O-benzylo-4-O-(p-metoksybenzylo)-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**178**).*

Roztwór związku **176** (0.606 g) w dimetyloformamidzie (10 ml) oziębiono do 0°C i dodano woderek sodowy (0.095 g). Mieszano 10 minut, a następnie wkroplono roztwór chlorku benzylo (0.27 ml) w dimetyloformamidzie (5 ml). Reakcję kontynuowano przez 8 godzin, rozłożono nadmiar wodoru metanolem i wylano mieszaninę reakcyjną do wody z lodem. Produkt ekstrahowano eterem etylowym, po wysuszeniu odparowano. Chromatografia w układzie heksan : octan etylu 9 : 1 dała **178** (0.507 g, 73%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{+23}$ (0.53, CHCl_3).

HR-MS/LSIMS: dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{44}\text{H}_{48}\text{O}_8\text{Na}$), obl.: 727.3247, otrzym.: 727.3255.

^1H NMR (C_6D_6) δ : 4.79 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.7 Hz, H-1), 4.62 (t, 1 H, H-4), 4.37 (dt, 1 H, $J_{6,7A}$ 6.4, $J_{6,7B}$ 6.4, H-6), 4.13 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.0 $J_{3,4}$ 9.3 Hz, H-3), 4.05 (dd, 1 H, $J_{5,4}$ 9.7, $J_{5,6}$ 1.7 Hz, H-5), 3.93-3.86 (m, 2 H, H-7A, H-7B), 3.82 (dd, 1 H, H-2).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ : 99.23 (C-1), 81.19 (C-3), 75.58 (C-2), 75.42 (C-4), 74.41 (C-6), 71.83 (C-5), 69.45 (C-7).

*Metylo 2,3,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**179**).*

Do roztworu **178** (466 mg) w mieszaninie rozpuszczalników acetonitryl : woda (9 : 1, 10 ml) dodano azotan amonowo cerowy (743 mg) i mieszano w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : eter dietylowy 2 : 1) mieszaninę rozcieńczono dichlorometanem (15 ml) i wylano do

nasyconego roztworu wodorowęglanu sodowego (30 ml). Warstwę organiczną wysuszono i odparowano, a surowy produkt chromatografowano w układzie heksan-eter dietylowy 3 : 1. Otrzymano **179** (336 mg, 87%).

$[\alpha]_D -5.1^\circ$ (1.84, CHCl_3).

HR-MS /LSIMS dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{Na}$), obl.: 607.2672, otrzym.: 607.2672.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 4.81 (d, 1 H, $J_{1,5}$ 1.5 Hz, H-1), 4.25 (t, 1 H, H-4), 4.05 (dt, 1 H, $J_{6,5}$ 2.0, $J_{6,7A}=J_{6,7B}$ = 6.3 Hz, H-6), 3.78 (dd, 1 H, $J_{7A,7B}$ 9.7 Hz, H-7A), 3.77 (dd, 1 H, H-2), 3.73 (dd, 1 H, H-7B), 3.69 (dd, 1 H, $J_{5,4}$ 9.6 Hz, H-5), 3.67 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.1, $J_{3,4}$ 9.6 Hz, H-3).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ : 99.15 (C-1), 79.94 (C-3), 70.01 (C-2), 73.75 (C-6), 71.35 (C-5), 69.65 (C-7), 66.17 (C-4).

Pochodną acetylową wykonano w warunkach sandardowych **179 Ac**.

$[\alpha]_D +16^\circ$ (1.3 CHCl_3).

HR MS/LSIMS dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{38}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{Na}$), obl.: 649.2777, otrzym.: 649.2780.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.73 (t, 1 H, H-4), 4.80 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.9 Hz, H-1), 3.83 (dd, 1 H, H-5), 3.80 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 9.3, $J_{3,2}$ 3.0 Hz, H-3), 3.76 (dd, 1 H, H-7A), 3.77 (dd, 1 H, H-2), 3.74 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 5.8, $J_{7B,7A}$ 9.3 Hz, H-7B), 3.67 (dt, 1 H, $J_{6,5}$ 1.5, $J_{6,7A}$ 6.7 Hz, H-6).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ : 99.27 (C-1), 77.75 (C-3), 74.99 (C-2), 73.72 (C-6), 69.38 (C-5), 69.33 (C-7), 67.82 (C-4).

Metylo 4-O-(5,6-benzo-2-okso-1,3,2-dioksafosfep-2-ylo)-2,3,6,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (180).

Do roztworu związku **179** (0.289 g) w dichlorometanie (5 ml), dodano tetrazol (0.105 g) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Następnie wkroplono roztwór 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepanu (0.125 g) w dichlorometanie (1 ml), mieszano dwie godziny. Po zakończeniu reakcji (TLC toluen : aceton 9 :1) ochłodzono mieszaninę reakcyjną do -60°C oraz dodano roztwór kwasu metachloronadbenzoesowego (0.153 g) w dichlorometanie (1 ml). Po 15 minutach zakończono reakcję, dodano octan etylu (20 ml) i przemyto 1% roztworem wodorowęglanu sodowego i 1% roztworem wodorosiarczynu sodowego. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 4 : 1. Otrzymano **180** (0.334 g, 88%)

$[\alpha]_D +11^\circ$ (1.0, CHCl_3).

HR MS/LSIMS dla $[M+Na]^+$ ($C_{44}H_{47}O_{10}PNa$) obl: 789.2805, otrzym: 789.2788.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 5.23 (q, 1 H, $J_{H-4,P}$ 9.6 Hz, H-4), 4.82 (bs, 1 H, H-1), 4.22 (bt, 1 H, $J_{6,5}$ 1.0 Hz, H-6), 4.00 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.0, $J_{3,4}$ 9.3 Hz, H-3), 3.96 (dd, 1 H, $J_{5,4}$ 9.7 Hz, H-5), 3.81 (dd, 1 H, $J_{2,1}$ 2.3 Hz, H-2), 3.77 (dd, 1 H, $J_{7A,6}$ 7.3, $J_{7A,7B}$ 9.4 Hz, H-7A), 3.74 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 5.6 Hz, H-7B).

^{13}C NMR ($CDCl_3$), δ : 98.93 (C-1), 78.35 (C-3), 74.35 (C-2), 74.27 (d, $J_{C-4,P}$ 6.3 Hz, C-4), 73.84 (C-6), 70.30 (d, $J_{C,P}$ 5.5 Hz, C-5), 69.02 (C-7).

Metylo 4-O-fosforylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (181).

Związek **180** (0.294 g) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników etanol : octan etylu 2 : 1 (9 ml), dodano 10% pallad na węglu (0.294 g) i wodorowano całą noc w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji mieszaninę przsączono przez warstwę Celitu, przesącz odparowano i otrzymano **181** (0.115 g, 99%) w postaci białej pianki.

$[\alpha]_D^{+60}$ (0.22, H_2O).

1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR w tabeli 9.

Metylo 2,3,4,7-tetra-O-benzyl-D i L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd, metylo 2,3,4,7-tetra-O-benzyl-D(L)-glicero- β -L-gulo-heptopiranozyd (183, 184, 185).

Roztwór chlorku oksalilu (2 ml) w dichlorometanie (30 ml) ochłodzono do -50° $-60^\circ C$ i wkroplono roztwór dimetylosulfotlenku (3.4 ml) w dichlorometanie (10 ml). Po 5 minutach bardzo powoli wkroplono roztwór **182**¹⁸³ (4.6 g) w dichlorometanie (20 ml). Reakcję kontynuowano w $-60^\circ C$ przez 1 godzinę. Wkroplono trietyloaminę (14 ml) i mieszano jeszcze 5 minut w tej temperaturze $-60^\circ C$. Następnie bardzo powoli ogrzano mieszaninę reakcyjną do temperatury pokojowej, dodano wodę (100 ml) i ekstrahowano dichlorometanem. Warstwę organiczną wysuszono i odparowano otrzymując olej (4.6 g), który po dokładnym wysuszeniu poprzez kilkakrotne odparowanie z benzenem użyto do dalszych reakcji bez dodatkowego oczyszczania.

W kolbie z mieszadłem magnetycznym umieszczono wiórki magnezowe (0.958 g) i chlorek rtęciowy (50 mg), dodano świeżo destylowany z nad $LiAlH_4$ tetrahydrofuran (1.5 ml). Podczas intensywnego mieszania dodano niewielką ilość czystego eteru chlorometylowobenzylowego (destylowanego bezpośrednio przed reakcją) obniżając temperaturę do $0^\circ C$. Po zapoczątkowaniu reakcji wkroplono pozostałą ilość eteru chlorometylowobenzylowego (6.3 ml) w tetrahydrofuranie (4 ml) utrzymując

temperaturę $-10 - 0^{\circ}\text{C}$. Reakcję kontynuowano w tej temperaturze przez jedną godzinę. Po obniżeniu temperatury do -30°C wkroplono roztwór metylo 2,3,4-tri-O-benzylo- α -D-manno-heksodialdo-1,5-piranozydu (4,6 g) w absolutnym tetrahydrofuranie (14 ml). Mieszano w tej temperaturze przez 2 godziny, a następnie mieszaninę bardzo powoli ogrzano do temperatury pokojowej i reakcję kontynuowano jeszcze przez 12 godzin. Dodano ochłodzony do 0°C wodny roztwór chlorku amonowego (100 ml) i ekstrahowano eterem dietylowym. Po wysuszeniu, i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 4 : 1. Otrzymano mieszaninę **183**, **184**, **185**, (4.768 g, 80.9%).

Ponowna chromatografia w tym samym układzie dała jako pierwszy związek metylo 2,3,4,7-tetra-O-benzylo-D(L)-glicero- β -L-gulo-heptopiranozyd (**185**) (0.893 g., 15.2%),

$[\alpha]_{\text{D}} +0,0^{\circ}$ (1.3 CHCl_3);

HR MS (LSIMS) dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{Na}$), obl.: 607.2672, otrzym.: 607, 2694.

^1H NMR (CDCl_3): *inter alia*, δ 4,68 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 8.2 Hz, H-1), 4,04 (ddd, 1 H, $J_{6,7A}$ 3.1, $J_{6,7B}$ 5.3, $J_{6,5}$ 9.0 Hz, H-6), 3.82 (dd, 1 H, H-5) 3.65 (dd, 1 H, $J_{7A,7B}$ 9.5 Hz, H-7B).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 101.9 (C-1), 76.07, 74.84, 73.69, 72.43, 68.03 (C-2, 3, 4, 5, 6), 71.12 (C-7)

Drugim związkiem otrzymanym z chromatografii był metylo 2,3,4,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd **183** (2.397 g, 40,7%).

$[\alpha]_{\text{D}} +18^{\circ}$ (1.0, CHCl_3).

HR MS/LSIMS dla $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{Na}$), obl.: 607.2672; otrzym.: 607.2672.

^1H NMR (CDCl_3): δ : 4.70 (d, 1 H, H-1), 4.17 (dt, 1 H, H-6), 4.17 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.6 Hz, H-4), 3.88 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ 3.1, $J_{3,4}$ 9.4 Hz, H-3), 3.77 (dd, $J_{1,2}$ 1.9 Hz, 1 H, H-2), 3.56 (dd, 1 H, $J_{7A,6}$ 7.2, $J_{7A,7B}$ 9.5 Hz, H-7A), 3.65 (bd, 1 H, H-5), 3.57 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.0 Hz, H-7B)

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 99.34 (C-1), 80.23 (C-3), 74.51 (C-2), 74.23 (C-4), 71.47 (C-7), 70.76 (C-5), 67.93 (C-6).

Pochodną acetylową tego związku otrzymano w warunkach standartowych **183Ac**.

Metylo 6-O-acetylo-2,3,4,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**183Ac**).

$[\alpha]_{\text{D}} -20.5^{\circ}$ (1.4, CHCl_3)

HR MS/LSIMS dla $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{O}_8\text{Na}$), obl.: 649.2777; otrzym.: 649.2774.

^1H NMR (C_6D_6) δ : 6.03 (dt, 1 H, $J_{6,5}$ 1.5, $J_{6,7A}$ 7.1 Hz, H-6), 4.72 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.7 Hz, H-1), 4.23 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 9.5 Hz, H-4), 4.08 (dd, 1 H, H-5), 4.07 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 9.6, $J_{3,2}$ 3.1 Hz, H-3), 3.83 (dd, 1 H, $J_{6,7A}$ 6.8, $J_{7A,7B}$ 6.4 Hz, H-7A), 3.80 (dd, 1 H, H-7B), 3.78 (dd, 1 H, H-2).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 98.91 (C-1), 80.48 (C-3), 73.09 (C-2), 73.77 (C-4), 69.43 (C-5), 68.80 (C-6), 67.83 (C-7).

Trzecim związkiem otrzymanym z chromatografii był metylo 2,3,4,7-tetra-O-benzylo-D-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (**184**) (0.971 g, 16.5%), został on scharakteryzowany w postaci pochodnej acetylowej **184Ac**.

Metylo 6-O-acetylo-2,3,4,7-tetra-O-benzylo-D-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (184Ac).

+34° (1,0 CHCl_3).

HR MS/LSIMS dla $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{O}_8\text{Na}$), obl.: 649.2777; otrzym. 649.2774.

^1H NMR (CDCl_3): *inter alia*, δ : 4.71 (bs, 1 H, H-1), 5.56 (ddd, 1 H, $J_{6,5}$ 2.0, $J_{6,7A}$ 4.6 Hz, H-6) 3.98 (t, 1 H, H-4), 3.86 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 9.0, $J_{3,2}$ 3.0 Hz, H-3), 3.80 (dd, 1 H, $J_{5,4}$ 9.9 Hz, H-5), 3.76 (dd, 1 H, $J_{7A,7B}$ 10.7 Hz, H-7A), 3.74 (dd, 1 H, H-2), 3.68 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 7.2 Hz, H-7B).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ : 98.69 (C-1), 80.22 (C-3), 74.74, 74.66, 71.76, 71.67, (C-2, 4, 5, 6), 68.18 (C-7).

Metylo 6-O-(5,6-benzo-2-okso-1,3,2-dioksafosfep-2-ylo)-2,3,4,7-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (186).

Do roztworu związku **183** (1.0 g) w dichlorometanie (7 ml) dodano tetrazol (0.361 g) i mieszano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, następnie wkroplono roztwór 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepanu (0.433 g) w dichlorometanie (1 ml.). Po zakończeniu reakcji (TLC heksan : eter dietylowy 1 : 1) ochłodzono mieszaninę reakcyjną do -60°C i dodano kwas metachloronadbenzoesowy (0.531 g) rozpuszczony w dichlorometanie (2 ml). Po 15 minutach mieszaninę reakcyjną rozcieńczono octanem etylu (40 ml), przemyto 1% roztworem wodorowęglanu sodowego i 1% roztworem wodorosiarczyny sodowego. Po wysuszeniu, odparowaniu i chromatografii w układzie heksan : octan etylu 1 : 1 otrzymano **186** (1.116 g, 85%).

$[\alpha]_D$ -3.5° (1.14, CHCl_3);

HR MS /LSIMS dla $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{44}\text{H}_{47}\text{O}_{10}\text{PNa}$) obl.: 789.2805, otrzym.: 789.2795.

^1H NMR (C_6D_6) δ : 5.77 (q, 1 H, $J_{6,P}$ 7.8 Hz, H-6), 4.75 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.7 Hz, H-1), 4.56 (t, 1 H, $J_{4,5}$ 10.0 Hz, H-4) 4.12 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 9.2, $J_{3,2}$ 3.0 Hz, H-3), 4.07 (dd, 1 H, $J_{7A,6}$ 6.9, $J_{7A,7B}$ 9.7 Hz, H-7A), 4.03 (bt, 1 H, H-5), 5.83 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 7.2 Hz, H-7B), 3.77 (dd, 1 H, H-2).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ : 98.93 (C-1), 80.68 (C-3), 74.91 (C-4), 74.60 (d, $J_{\text{C-6,P}}$ 5.6 Hz, C-6), 73.81 (C-2), 69.90 (d, $J_{\text{C-5,P}}$ 5.6 Hz, C-5), 68.74 (d, $J_{\text{C-7,P}}$ 1.7 Hz, C-7).

Metylo 6-O-fosforylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (187)

Związek **186** (0.467 g) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników etanol : octan etylu, dodano 10% pallad na węglu (0.467 g) i wodorowano całą noc w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji mieszaninę przesączono przez warstwę Celitu i odparowano. Otrzymano **187** (0.180 g, 97%) w postaci białej pianki.

$[\alpha]_{\text{D}}$ +49.5° (0.5, H_2O).

^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR w tabeli 9.

Metylo 7-O-allilo-2,3,4-tri-O-benzylo D i L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd i metylo-7-O-allilo-2,3,4-tri-O-benzylo-D(L)-glicero- β -L-gulo-heptopiranozyd (188, 189, 190).

Roztwór chlorku oksalilu (1.8 ml) w dichlorometanie (22 ml) ochłodzono do -50° , -60°C i wkroplono roztwór dimetylosulfotlenku (3.0 ml) w dichlorometanie (9.0 ml). Po 5 minutach bardzo powoli wkroplono roztwór **182**¹⁸³ (4.1 g) w dichlorometanie (20 ml). Reakcję kontynuowano w temperaturze -60°C przez 1 godzinę. Wkroplono trietyloaminę (12.4 ml) i mieszano jeszcze 5 minut w tej temperaturze. Następnie bardzo powoli ogrzano mieszaninę reakcyjną do temperatury pokojowej, dodano wodę (88 ml) i ekstrahowano dichlorometanem. Warstwę organiczną wysuszono i odparowano otrzymując olej (4.1 g), który po dokładnym wysuszeniu poprzez kilkakrotne odparowanie z benzenem użyto do następnej reakcji bez dodatkowego oczyszczania.

W kolbie z mieszadłem magnetycznym umieszczono wiórki magnezowe (0.848 g) i chlorek rtęciowy (58 mg), dodano świeżo destylowany z nad LiAlH_4 tetrahydrofuran (1.5 ml). Podczas intensywnego mieszania dodano niewielką ilość czystego eteru chlorometylowoallilowego (destylowanego bezpośrednio przed reakcją) obniżając temperaturę do -10°C . Po zapoczątkowaniu reakcji wkroplono pozostałą ilość eteru chlorometylowoallilowego (3.8 g) w tetrahydrofuranie (2 ml) utrzymując temperaturę -18 - -20°C . Reakcję kontynuowano w tej temperaturze przez jedną godzinę. Po obniżeniu temperatury do -30°C wkroplono roztwór metylo 2,3,4-tri-O-benzylo- α -D-manno-heksodialdo-1,5-piranozydu (4.1 g) w absolutnym tetrahydrofuranie (15 ml). Mieszano w tej temperaturze przez 2 godziny, a następnie mieszaninę bardzo powoli ogrzano do temperatury

pokojuwej i reakcję kontynuowano jeszcze przez 12 godzin. Dodano ochłodzony do 0°C wodny roztwór chlorku amonowego (200 ml) i ekstrahowano eterem etylowym. Po wysuszeniu i odparowaniu surowy produkt chromatografowano w układzie heksan : octan etylu 7 :3. Otrzymano mieszaninę produktów: **188**, **189**, **190**, (3.776 g, 80%).

Ponowna chromatografia w tym samym układzie dała:

Metylo-7-O-allilo-2,3,4-tri-O-benzylo-D(L)-glicero-β-L-gulo-heptopiranozyd (190) (0.651g, 13,8%)
[α]_D +3,2° (1.3, CHCl₃).

HR MS/LSIMS dla [M+Na]⁺ (C₃₂H₃₈O₇Na) obl.: 557.2515, otrzym.: 557.2520.

¹H NMR (CDCl₃): *inter alia*, δ: 4.70 (d, 1 H, J_{1,2} 8.1 Hz, H-1), 3.80 (dd, 1 H, J_{5,6} 9.0, J_{5,4} 0.9 Hz, H-5), 3.71 (t, 1 H, J_{3,4} 3.8 Hz, H-3), 3.70 (dd, 1 H, H-4), 3.66 (dd, 1 H, J_{7A,6} 3.1, J_{7A,7B} 9.7 Hz, H-7A), 3.57 (dd, 1 H, J_{7B,6} 5.7 Hz, H-7B), 3.56 (dd, 1 H, J_{2,3} 2.7 Hz, H-2).

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 101.9 (C-1), 76.10, 74.88, 73.76, 72.56, 67.94 (C-2, 3, 4, 5, 6), 71.10 (C-7),

Drugim produktem otrzymanym z chromatografii był *metylo 7-O-allilo-2,3,4-tri-O-benzylo-L-glicero-α-D-manno-heptopiranozyd (188)* (1.628 g, 34,5%).

[α]_D +21,3° (1.0 CHCl₃).

HR MS/LSIMS dla [M+Na]⁺ (C₃₂H₃₈O₇Na), obl.: 557.2515, otrzym.: 557.2509.

¹H NMR (CDCl₃): δ 4.71 (bs, 1 H, H-1), 4.17 (t, 1 H, H-4), 4.14 (bt, 1 H, H-6), 3.88 (dd, 1 H, J_{3,2} 3.1, J_{3,4} 9.5 Hz, H-3), 3.78 (dd, 1 H, J_{2,1} 1.9 Hz, H-2), 3.64 (dd, 1 H, J_{5,6} 1.0 J_{5,4} 9.8 Hz, H-5), 3.60 (dd, 1 H, J_{7A,6} 7.3, J_{7A,7B} 9.5 Hz, H-7A), 3.52 (dd, 1 H, J_{7B,6} 6.0 Hz, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 99.33 (C-1), 80.24 (C-3), 74.56 (C-2), 74.21 (C-4), 71.32 (C-7), 70.70 (C-5), 67.87 (C-6).

Trzecim związkiem otrzymanym z chromatografii była pochodna *D-glicero-D-manno heptozy (189)* (0.981 g, 20.8%). Związek ten został scharakteryzowany w postaci pochodnej 6-O-acetylowej.

Metylo 6-O-acetylo-7-O-allilo-2,3,4-tri-O-benzylo-D-glicero-α-D-manno-heptopiranozyd (189Ac)
[α]_D ° (1,0 CHCl₃)

HR MS/LSIMS dla [M+Na]⁺ (C₃₄H₄₀O₈Na), obl.: 559.2621, otrzym.: 559.2620.

¹H NMR (CDCl₃), δ: 5.50 (ddd, 1 H, J_{6,5} 2.1, J_{6,7A} 4.8, J_{6,7B} 6.9 Hz, H-6), 4.72 (bs, 1 H, H-1), 3.99 (t, 1 H, H-4), 3.87 (dd, 1 H, J_{3,2} 3.1, J_{3,4} 9.1 Hz, H-3), 3.79 (dd, 1 H, J_{5,4} 9.9 Hz, H-5), 3.75 (dd, 1 H, J_{2,1} 1.8 Hz, H-2), 3.74 (dd, 1 H, J_{7A,7B} 10.7 Hz, H-7A), 3.64 (dd, 1 H, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 99.06 (C-1), 80.64 (C-3), 75.14, 75.06 (C-2, 4), 72.12, 72.04 (C-5,6), 68.34 (C-7)

Metylo 7-O-allilo-2,3,4,6-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (191)

Do oziębionego do 0°C roztworu **188** (2.168 g) w dimetyloformamidzie (10 ml) dodano wodorek sodowy (0.389 g). Mieszano 10 minut i dodano roztwór chlorku benzyłu (1.0 ml) w dimetyloformamidzie (1 ml). Po 4 godzinach mieszania, nadmiar wodorku rozłożono metanolem i mieszaninę wylano do wody z lodem. Produkt ekstrahowano eterem dietylowym, suszono i zateżono. Po chromatografii w układzie heksan : octan etylu 95 : 5 otrzymano **191** (2.459 g, 97%)

$[\alpha]_D^{+38^\circ}$ (1.4, CHCl₃);

HR MS/LSIMS dla $[M+Na]^+$ (C₃₉H₄₄O₇Na), obl: 647.2985, otrzym.: 647.2981.

¹H NMR (CDCl₃) δ : 4.83 (d, 1 H, J_{1,2} 1.7 Hz, H-1), 4.20 (t, 1 H, H-4), 4.09 (t, 1 H, J_{6,5} 1.5 Hz, H-6), 3.90 (dd, 1 H, J_{3,2} 3.1, J_{3,4} 9.2 Hz, H-3), 3.79 (dd, 1 H, J_{7A,6} 6.2, J_{7A,7B} 9.7 Hz, H-7A), 3.79 (dd, 1 H, H-2), 3.74 (dd, 1 H, J_{5,4} 9.8, H-5), 3.72 (dd, 1 H, J_{7B,6} 6.4 Hz, H-7B).

¹³C NMR (CDCl₃): δ : 98.95 (C-1), 80.64 (C-3), 74.92, 74.27, 74.19 (C-2, 4, 6), 71.20 (C-5), 69.88 (C-7)

Metylo 2,3,4,6-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (68),

Do roztworu **191** (2.46 g) w mieszaninie rozpuszczalników etanol (36 ml), benzen (6 ml) i woda (2 ml) dodano 1.4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (DABCO, 0.091 g) i ogrzano do 80°C. W tej temperaturze dodano katalizator Wilkinsona (0.246 g). Mieszaninę ogrzewano do wrzenia przez 5 godzin. Następnie odsączono katalizatory na Celicie, a przesącz odparowano. Otrzymano brązowy olej, który rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników aceton : woda 15 : 1 (15 ml). Do roztworu dodano tlenek rtęciowy (0.897 g) i chlorek rtęciowy (1.123 g). Mieszano 0.5 godziny w temperaturze pokojowej, katalizatory odsączono na Celicie, a przesącz odparowano. Produkt rozpuszczono w eterze dietylowym i przemyto 50% roztworem jodku potasowego, 1% roztworem wodorosiarczyny sodowego, 1% roztworem wodorowęglanu sodowego, suszono i zateżono. Surowy produkt chromatografowano w układzie ligroina : eter dietylowy 4 : 1. Otrzymano **191** (1.756 g, 76.2%).

$[\alpha]_D^{+38^\circ}$ (1.0 CHCl₃); lit.¹⁸⁴ $[\alpha]_D^{+37.8^\circ}$ (1.1, CHCl₃).

¹H NMR (CDCl₃) δ : 4.81 (d, 1 H, J_{1,2} 1.9 Hz, H-1), 4.20 (t, 1 H, J_{3,4} = J_{4,5} 9.4 Hz H-4), 3.95-3.86 (m, 4 H, H-3, 6, 7A, 7B), 3.80 (dd, 1 H, J_{2,3} 2.9 Hz, H-2), 3.78 (dd, 1 H, J_{5,6} 1.4, J_{5,4} 9.7 Hz, H-5).

¹³C NMR (CDCl₃), δ : 99.12 (C-1), 80.34 (C-3), 75.83, 74.80, 74.23 (C-2, 4, 6), 73.09 (C-5), 69.52 (C-7).

Pochodną acetylową otrzymano w warunkach standartowych *metrylo 7-O-acetylo-2,3,4,6-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (68Ac)*.

$[\alpha]_D^{+32}$ (1.6, CHCl₃);

¹H NMR (CDCl₃) δ : 4.83 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.5 Hz, H-1), 4.51 (dd, $J_{7A,6}$ 6.2, $J_{7A,7B}$ 11.6 Hz, H-7A), 4.27 (dd, 1 H, $J_{7B,6}$ 6.9 Hz, H-7B), 4.18 (t, $J_{4,5}$ 9.5, $J_{4,3}$ 9.4 Hz, H-4), 4.09 (ddd, 1 H, $J_{6,5}$ 1.3 Hz, H-6), 3.90 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 9.2, $J_{3,2}$ 3.0 Hz, H-3), 3.80 (dd, 1 H, H-2), 3.70 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ 1.3, $J_{5,4}$ 9.7 Hz, H-5).

¹³C NMR (CDCl₃): δ : 99.05 (C-1), 80.54 (C-3), 74.15, 73.98, 73.83 (C-2, 4, 6), 70.99 (C-5), 62.87 (C-7).

Metrylo 7-O-(5,6-benzo-2-okso-1,3,2-dioksafosfep-2-ylo)-2,3,4,6-tetra-O-benzylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd (192).

Do roztworu **68** (0.859 g) w absolutnym dichlorometanie (8 ml) dodano tetrazol (0.310 g) i mieszano 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie wkroplono roztwór 2-dimetyloamino-5,6-benzo-1,3,2-dioksafosfepanu (0.372 g) w dichlorometanie (1 ml) i mieszano 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji (TLC heksan-eter dietylowy 1:1) ochłodzono mieszaninę reakcyjną do -60°C i dodano kwas metachloronadbenzoesowy (0.456 g) w dichlorometanie (5 ml). Po 15 minutach mieszaninę reakcyjną rozcieńczono octanem etylu (40 ml) przemyto 1 % roztworem wodorowęglanu sodowego i 1% roztworem wodorosiarczynu sodowego. Po wysuszeniu, odparowaniu i chromatografii otrzymano **192** (0.992 g, 88 %).

$[\alpha]_D^{+16}$ (0.91, CHCl₃).

HR- MS /LSIMS dla $[M+Na]^+$ (C₄₄H₄₇O₁₀PNa), obl.: 789.2805. otrzym.: 789.2788.

¹H NMR (CDCl₃) δ : 4.82 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 1.8 Hz, H-1), 4.50 (ddd, 1 H, $J_{7A,P}$ 6.5, $J_{7A,7B}$ 10.5, $J_{7A,6}$ 6.6 Hz, H-7A), 4.39 (ddd, 1 H, $J_{7B,P}$ 6.6, $J_{7B,6}$ 7.8 Hz, H-7B), 4.17 (pt, 1 H, H-6), 4.17 (t, 1 H, H-4), 3.91 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 9.2, $J_{3,2}$ 3.0 Hz, H-3), 3.79 (dd, 1 H, H-2), 3.73 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ 1.3, $J_{5,4}$ 9.7 Hz, H-5);

¹³C NMR (CDCl₃): δ 99.11 (C-1), 80.48 (d, $J_{C,P}$ 7.6 Hz, C-6), 74.15, 73.90 (C-2, 4), 70.70 (C-5), 66.40 (d, $J_{C,P}$ 5.7, C-7).

Metylo 7-O-fosforylo-L-glicero- α -D-manno-heptopiranozyd. (193) .

Do roztworu **192** (0.459 g), w mieszaninie rozpuszczalników etanol : octan etylu 7 : 3 dodano 10% pallad na węglu (0.459 g), i wodorowano przez całą noc. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną przesączono przez Celit i odparowano. Otrzymano **193** (0.188 g, 98.9%).

$[\alpha]_D^{+32}$ (0.8, H₂O).

¹H NMR, ¹³C NMR, ³¹P NMR w tabeli 9.

Tabela 8
Dane NMR dla monofosforanów L-glicero-D-manno-heptopiranozy^a

Fosforan	Przesunięcia chemiczne (δ)							
	H-1 C-1	H-2 C-2 2-P	H-3 C-3 3-P	H-4 C-4 4-P	H-5 C-5	H-6 C-6 6-P	H-7a C-7 7-P	H-7b
α Hep 2P (151)	5.26 94.47 ^b	4.28 74.83 ^c 3.34	3.80 71.73	3.90 68.04	3.73 72.50	4.02 69.92	3.64 64.23	3.64
β Hep 2P. (151)	4.91 95.74 ^d	4.38 75.35 ^e 4.99	3.62 74.41	3.83 67.50	3.32 76.00	3.99 69.89	3.68 64.03	3.68
α -Hep3P (142)	5.17 95.21 ^f	4.08 71.40	4.26 75.43 ^g 2.95	3.97 67.26	3.81 72.29	4.04 70.14	3.69 64.25	3.69
β -Hep 3P (142)	4.91 95.06 ^h	4.08 71.82	4.08 77.78 3.11	3.92 66.94	3.39 75.73	4.04 70.05	3.73 63.98	3.73
α -Hep 4P (131)	5.15 93.13 ⁱ	3.92 71.88 ^j	3.97 71.88 ^j	4.25 70.74 ^k 4.60	3.79 71.68 ^l	4.12 69.64	3.66 63.76	3.66
β -Hep 4P (131)	4.86 95.28 ^m	3.93 71.47	3.82 74.56	4.20 70.40 ⁿ 4.79	3.38 75.65 ^o	4.07 69.54	3.70 63.50	3.70
α -Hep 6P (119)	5.16 95.69 ^p	3.90 71.04 ^q	3.86 72.45 ^q	3.92 67.16	3.84 74.22 ^r	4.40 72.63 ^s 5.04	3.66 63.18	3.66
β -Hep 6P (119)	4.85 95.56 ^t	3.93 71.91 ^q	3.67 73.55	3.89 66.87	3.37 76.23 ^u	4.35 72.74 ^v 5.14	3.74 62.71	3.74
α -Hep 7P (115)	5.17 95.50 ^w	3.91 71.89 ^x	3.84 71.82 ^x	3.82 67.44	3.92 72.42	4.16 68.99 ^y	3.88 66.66 ^z 3.13	3.88
β -Hep 7P (115)	4.89 95.15 ^{aa}	3.94 71.73 ^x	3.65 74.50	3.79 67.13	3.38 75.63	4.12 68.91 ^y	3.88 66.69 ^{ab} 3.05	3.88

a. Próbkę posiadały następujące pD: Hep 2P (151): 6.6; Hep 3P (142): 6.5; Hep 4P (131): 7.0; Hep 6P (119): 7.0; (115): 6.6. W pomiarach ³¹P NMR próbki zawierały 2 M EDTA.

b. J_{C-1,H-1} 173.8 Hz. J_{C-1,P} 2.8 Hz. c. J_{C-2,P} 3.9 Hz. d. J_{C-1,H} 163.2 Hz. e. J_{C-2,P} 3.2 Hz. f. J_{C-1,H-1} 171.2 Hz. g. J_{C-3,P} 2.1 Hz. h. J_{1,H-1} 160.5 Hz. i. J_{C-1,H-1} 169.8 Hz. j. Nie przypisane jednoznacznie; k. J_{C-4,P} 5.3 Hz. l. J_{C-5,P} 6.6 Hz. m. J_{C-1,H-1} 160.6 Hz. n. J_{4,P} 4.0 Hz. o. J_{C-5,P} 6.6 Hz. p. J_{C-1,H-1} 171.2 Hz. q,x,y przypisania mogą być zamienione. r. J_{C-5,P} 5.3 Hz. s. J_{C-6,P} 5.3 Hz. t. J_{1,H-1} 161.0 Hz. u. J_{C-5,P} 5.3 Hz. v. J_{C-6,P} 5.3 Hz. w. J_{C-1,H-1} 171.2 Hz. z. J_{C-7,P} 5.3 Hz. aa. J_{C-1,H-1} 160.6 Hz. ab. J_{C-7,P} 5.3 Hz.

TABELA 9
Dane NMR dla monofosforanów metylo *L-glicero- α -D-manno-heptopiranozydu* i ich soli sodowych^{a,b}

Fosforan	Przesunięcia chemiczne (δ)									
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7a	H-7b		
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7			
	2-P	3-P	4-P		6-P	7-P				
2P (161)	H ⁺	4.984	4.370	3.854	3.895	3.598	4.063	3.745	3.745	
	100.48	74.40 ^d	71.20 ^e	67.10	72.00	69.53	63.73			
	c	100.7	74.10 ^d 0.81	71.39 ^e	67.26	72.06	69.56	63.76		
Na ⁺	4.952	4.339	3.811	3.920	3.595	4.065	3.750	3.750		
	100.12	75.17 ^f 1.99	70.82 ^g	66.84	71.97	69.47	63.66			
3P (171)	H ⁺	4.799	4.143	4.308	3.985	3.641	4.074	3.995	3.995	
	101.01	69.75	73.63 ^h 0.66	66.18 ⁱ	71.31	69.72	63.21			
	Na ⁺	4.840	4.102	4.219	4.019	3.641	4.094	3.774	3.774	
	100.92	69.82 ^j	77.36 ^k 4.20	65.83 ^l	71.82	69.61	63.65			
4P (181)	H ⁺	4.782	3.968	3.943	4.386	3.704	4.082	3.754	3.754	
	101.49	70.52	71.18	71.53 ^m 1.41	71.00 ⁿ	69.25	63.29			
	Na ⁺	4.830	3.968	3.972	4.317	3.673	4.169	3.766	3.766	
	101.56	70.72	71.05 ^o	72.39 3.65	70.82 ^p	69.23	63.28			
6P (187)	H ⁺	4.773	3.935	3.783	3.870	3.731	4.581	3.808	3.896	
	102.05	70.79	71.04	66.64	71.94 ^r	72.91 ^s 1.44	62.31			
	Na ⁺	4.826	3.946	3.852	3.989	3.712	4.524	3.911	3.786	
	101.99	70.64	71.30	66.71	71.17 ^t	74.49 ^u 4.03	61.55			
7P (193)	H ⁺	4.780	3.928	3.771	3.868	3.628	4.216	4.059	4.059	
	101.80	70.79	71.67	66.85	71.51	68.49 ^w	66.57 ^v			
	Na ⁺	4.797	3.945	3.791	3.889	3.647	4.220	3.989	3.989	
	101.80	70.75	71.61	66.73	71.28	68.00 ^x	67.17 ^y 2.50			

a. Sygnały grupy OCH₃ występowały przy δ 3.38-3.42 (¹H) i 54.98-55.69 (¹³C). b. Próbkę posiadały następujące pH: 2P (161): 1.3; sól Na⁺ 5.3, 3P (171): 1.5; Na⁺ sól 6.6, 4P (181): 1.4; Na⁺ sól 6.0, 6P (187): 1.2; Na⁺ sól 5.9, 7P (193): 1.3; Na⁺ sól: 6.0. c. próbka po hydrolizie w warunkach C. d. J_{C-2,P} 5.1 Hz; e J_{C-3,P} 5.4 Hz; f J_{C-2,P} 3.7 Hz; g. J_{C-3,P} 4.4 Hz; h. J_{C-3,P} 5.5 Hz; i. J_{C-4,P} 5.8 Hz; j. J_{C-2,P} 2.2 Hz; k. J_{C-3,P} 3.3 Hz; l. J_{C-4,P} 1.9 Hz; m. J_{C-4,P} 5.6 Hz; n. J_{C-5,P} 6.4 Hz; o. J_{C-3,P} 4.3 Hz; p. J_{C-5,P} 6.1 Hz; r. J_{C-5,P} 5.7 Hz; s. J_{C-6,P} 5.3 Hz; t. J_{C-5,P} 4.2 Hz; u. J_{C-6,P} 4.0 Hz; w. J_{C-6,P} 8.5 Hz; v. J_{C-7,P} 4.7 Hz; x. J_{C-6,P} 7.6 Hz; y. J_{C-7,P} 4.1 Hz.

VI. LITERATURA

1. Westphal O., *Int. Archs. Allergy appl. Immun.*, 49 (1975) 1-43.
2. Rietschel E. Th., Brade H., *Infection* 15 (1987) 133-141.
3. Kochetkov N.K., *Izv. ANSSR* 1 (1984) 243-256.
4. Aman P., Frazen L. R., Darvill J. E., Mc. Neil M., Darvill A. G., Albersheim., *Carbohydr. Res.*, 103 (1982) 77-100.
5. Griffiss J. M., Schneider H., Mandrel R. E., Yamasaki R., Jarvis G. A., Kim J. J., Gibson B. W., Hamadeh R., Apicella M. A., *Rev. Inf. Dis.*, 10 (1988) 287-295.
6. Holst O., Brade H., in D. C. Morrison i J.L. Ryan (Eds) *Bacterial Endotoxic Lipopolisacharides CRC Press, Boca Raton F.L.*, (1992) 135-170.
7. Brade H., Brade L., Rietschel E. Th., *Zbl. Bakt. Hyg., A.268* (1988) 151-179.
8. Zähringer U., Lindner B., Rietschel E. Th., *Adv. in Carbohydr. Chem. and Biochem.*, 50 (1994) 211-276.
9. Makela C. P. H., Hovi M., Saxen H., Muotiala A., Rhen M., in Novotny A., Spitzer J.J., Zeigler E.J., [Eds] *Cellural and Molecular Aspects of Endotoxin Reactions. Endotoxin Research series vol.1 Excerpta Medica Amsterdam* (1990) 537-546.
10. Rietschel E. Th., Kim Y. B., Watson D. W., Galanos C., Luderitz O., Westphal O., *Infect. Immunity.*, 8 (1973) 173-177.
11. Jennings H. J., Ługowski C., Asthon F. E., *Infect. Immun.*, 43 (1984) 407-412.
12. Jennings H. J., Beurret M., Gamian A., Michon F., *Antonie van Leeuwenhook, J. Microbiol. Serol.*, 53 (1987) 519-522.
13. Brade H., Galanos Ch., *Infect. Immun.*, 42 (1983) 250-256.
14. Lebbar S., Cavaillon J. M., Caroff M., Ledur A., Brade H., Sarfati R., Haeffner-Cavaillon N., *Eur. J. Immunol.*, 16 (1986) 87-91.
15. Ekelof K., Oscarson S., Hoogerhout P., Poolman J. T., Snipe H., Verhoef J., Braat A. J., Leenhout J. M., *J. Carbohydr. Chem.*, 14 (1995) 299-315.
16. Verheul A. F. M., Braat A. K., Leennhout J. M., Hoogerhout P., Poolman J. T., Snippe H., Verhoef J., *Infect. Immun.*, 59 (1991) 843-851.

17. Baumann H., Tzianobos A. O., Brisson J-R., Kasper D. L., Jennings H.J., *Biochemistry* 31 (1992) 4081-4089.
18. Bax A., Summers M.F., *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1996) 2093-2094.
19. Kenne L., Lindberg B., in *GO Aspinall (Ed). The Polysaccharides, Vol.II, Academic Press, New York*, 1983, 287-363. Droge W., Lehman V., Luderitz O., Westphal O., *Eur. J. Biochem.*, 14 (1970) 175-184. Prehm P., Strim S., Jann B., Jann K., *Eur. J. Biochem.*, 56 (1975) 41-55. Brade H., Rietschel E. Th., *Eur. J. Biochem.*, 145 (1984) 231-236.
20. Michon F., Shaw D. H., Banoub J. H., *Eur. J. Biochem.*, 145 (1984) 107-114.
21. Radziejewska-Lebrecht J., Mayer H., *Eur. J. Biochem.*, 183 (1989) 573-581.
22. Holst O., Zahringer U., Brade H., Zamojski A., *Carbohydr. Res.*, 215 (1991) 323-335.
23. Knirel Y. A., Tantar N. V., Soldatkina M. A., Shaskov A. S., Zakharova I. Y., *Bioorg. Khim.*, 14 (1988) 77-81.
24. Ansari A. A., Kenne L., Lindberg B., Gustafsson B., Holme T., *Carbohydr. Res.*, 150 (1986) 213-219.
25. Chowdhury T., Jansson P-E., Lindberg B., Lindberg J., Gustafsson B., Holme T., *Carbohydr. Res.*, 215 (1991) 304-314.
26. Neal D. J., Wilkinson S. G., *Eur. J. Biochem.*, 128 (1982) 143-149.
27. Weintraub A., Zähringer U., Lindberg A. A., *Eur. J. Biochem.*, 122 (1982) 233-237.
28. Rowe P. S. N., Meadow P. M., *Eur. J. Biochem.*, 132 (1983) 329-337.
29. Kondo S., Haishima Y., Hisatsune K., *FEMS Microbiol. Lett.*, 68 (1990) 155-158.
30. Jachymek W., Ługowski C., Romanowska E., Witkowska D., Petersson C., Kenne L., *Carbohydr. Res.*, 251 (1994) 327-330.
31. Katzenellenbogen E., Gamian A., Romanowska E., Dąbrowski U., Dąbrowski J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194 (1993) 1058-1064.
32. Knirel Y. A., Grosskurth H., Helbig J. H., Zahringer U., *Carbohydr. Res.*, 279 (1995) 215-226.
33. Masoud H., Altman E., Richards J. C., Lam J. S., *Biochemistry*, 33 (1994) 10568-10578.
34. De Kievit T. R., Lam J. S., *J. Bacteriol.*, 176 (1994) 7129-7139.
35. Dell A., Azadi P., Tiller P., Thomas-Oates J., Jennings H. J., Beurret M., Michon F., *Carbohydr. Res.*, 200 (1990) 59-76.

36. DiFabio J. L., Michon F., Brisson J.R., Jennings H. J., *Can. J. Chem.*, 68 (1990) 1029-1034.
37. Verheul A. F. M., Boons G. J. P. H., van der Marel G. A., van Boom J. H., Jennings H. J., Snippe H., Verhoef J., Hoogerhout P., Poolamn J. T., *Infect. Immun.*, 59 (1991) 3566-3573.
38. Pavliak V., Brisson J. R., Michon F., Uhrin D., Jennings H. J., *J. Biol. Chem.*, 268 (1993) 14146-14152.
39. Kogan G., Uhrin D., Brisson J. R., Jennings H. J., *Carbohydr. Res.*, 298 (1997) 191-199.
40. Verheul A. F. M., Snippe H., Poolman J. T., *Microbiol. Rev.*, 57 (1993) 34-49.
41. Jennings H. J., Johnson K. G., Kenne L., *Carbohydr. Res.*, 121 (1983) 233-241.
42. Yamasaki R., Griffiss J. M., Quinn K. P., Mandrell R. E., *J. Bacteriol.*, 175 (1993) 4565-4568.
43. Kerwood D. E., Schneider H., Ymasaki R., *Biochemistry*, 31 (1992) 12760-12768.
44. Aspinall G. O., Mc. Donald A. G., Raju T. S., Pang H., Moran A. P., Penner J. L., *Eur. J. Biochem.*, 213 (1993) 1017-1027.
45. Aspinall G. O., Mc. Donald A. G., Pang H., Kurjańczyk L. A., Penner J.L., *Biochemistry*, 33 (1994) 241-249.
46. Hoogerhout P., Poolman J. T., Wiertz J. H., van Boom J. H., van der Marel G. A., Boons G. J. P. H., *Neth. Appl.*, (1993) 1-45.
47. Michon F., Beurret M., Gamian A., Brisson J. R., *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 7243-7247.
48. Manderll R. E., Griffiss J. M. L., Macher B. A., *J. Exp. Med.*, 168 (1988) 107-126.
49. Dimitriev B. A., Ovchinnikov M. A., Lapina E. B., Pluzhnikova G. N., Lopyrev I. V., Chernyak A. Y., *Glycoconjugate J.*, 9 (1992) 168-173.
50. Lebbar S., Caroff M., Szabo L., Merienne C., Szilogi L., *Carbohydr. Res.*, 259 (1994) 257-275.
51. Kondo S., Zähringer U., Seydel U., Sinnwell V., Hisatsune K., Rietschel E. Th., *Eur. J. Biochem.*, 200 (1991) 689-698.
52. Radziejewska-Lebrecht J., Bhat U. R., Brade H., Mayer H., *Eur. J. Biochem.*, 172 (1988) 535-541.

53. Banoub J. H., Shaw D. H., *Carbohydr. Res.*, 98 (1981) 93-103.
54. Kondo S., Watabe T., Haishima Y., Hisatsune K., *Carbohydr. Res.*, 245 (1993) 353-359.
55. Aspinall G. O., Mc. Donald A. G., Raju T. S., Pang H., Kuriańczyk L. A., Penner J. L., Moran A. P., *Eur. J. Biochem.*, 213 (1993) 1029-1037.
56. Radziejewska-Lebrecht J., Bhat U. R., Brade H., Kaca W., Mayer H., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 256 (1990) 121-126.
57. Wollin R., Creeger E. S., Rothfield L. I., Stocker B. A. D., Lindberg A. A., *J. Biol. Chem.*, 258 (1983) 3769-3774.
58. Helander I. M., Kilpelainen J., Vaara M., *Mol. Microbiol.*, 11 (1994) 481-487.
59. Luk J. M. C., Lind S. M., Tsang R. S. W., Lindberg A. A., *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 23215-23225.
60. Bruse G. W., Wollin R., Lindberg A. A., *J. Mol. Recognit.*, 2 (1989) 18-24.
61. Seydler U., Koch M. H. J., Brandenburg K., *J. Struct. Biol.*, 110 (1993) 232-243.
62. Brade H., Zähringer U., Rietshel E. Th., Christian R., Schultz G., Unger F. M., *Carbohydr. Res.*, 134 (1984) 157-166.
63. Hammerling G., Lehmann V., Luderitz O., *Eur. J. Biochem.*, 38 (1973) 453-458.
64. Sandulache R., Prehm P., Expert D., Toussaint A., Kamp D., *FEMS Microbiol. Lett.*, 28 (1985) 307-310.
65. Jansson P. E., Wollin R., Bruse G. W., Lindberg A. A., *J. Mol. Recognit.*, 2 (1989) 25-36.
66. Sandulache R., Prehm P., *J. Bacteriol.*, 161 (1985) 1226-1227.
67. Dąbrowski J., Hauck M., Romanowska E., Gamian A., *Carbohydr. Res.*, 180 (1988) 163-174.
68. Gamian A., Katzenellenbogen E., Romanowska E., Dąbrowski U., Dąbrowski J., *Carbohydr. Res.*, 266 (1995) 221-228.
69. Droge W., Luderitz O., Westphal O., *Eur. J. Biochem.*, 4 (1968) 126-133.
70. Holst O., Brade H., *Carbohydr. Res.*, 245 (1993) 159-163.
71. Brade H., Brade L., Kaca W., Tacke A., Rietschel E. Th., *EOS-Riv Immunol. Immunofarmacol.* 6 (1986) 26-28.
72. Holst O., Brade H., Dziewiszek K., Zamojski A., *Carbohydr. Res.*, 204 (1990) 1-9.
73. Jansson P. E., Lindberg A. A., Lindberg B., Wollin R., *Eur. J. Biochem.*, 115 (1981) 571.

74. Jansson P. E., Lindberg A. A., Lindberg B., Wollin R., *Carbohydr. Res.*, 68 (1979) 385-389.
75. Prehm P., Schmidt G., Jann B., Jann K., *Eur. J. Biochem.*, 70 (1976) 171-177.
76. Pakulski Z., Zamojski A., Holst O., Zahringer U., *Carbohydr. Res.*, 215 (1991) 337-344.
77. Katzenellenbogen E., Romanowska E., *Eur. J. Biochem.*, 113 (1980) 205-211.
78. Gamian A., Romanowska E., *Eur. J. Biochem.*, 129 (1982) 105-109.
79. Müller-Loennies S., Holst O., Brade H., *Eur. J. Biochem.*, 224 (1994) 742-760.
80. Haishima Y., Holst O., Brade H., *Eur. J. Biochem.*, 207 (1992) 1129-1130.
81. Radziejewska-Lebrecht J., Shaskov A. S., Stroobant V., Wartenberg K., Warth C., Mayer H., *Eur. J. Biochem.*, 221 (1994) 343-351.
82. Phillips N. J., Apicella M. A., Griffiss J. M. L., Gibson B. W., *Biochemistry* 31 (1992) 4515-4526.
83. Melaugh W., Phillips N. J., Campagnari A. A., Tullius M. V., Gibson B. W., *Biochemistry*, 33 (1994) 13070 - 13078.
84. Schweda E. K. H., Jansson P-E., Moxon E. R., Lindberg A. A., *Carbohydr. Res.* 272 (1995) 213-224.
85. Schweda E. K. H., Hegedus O. E., Borrelli S., Lindberg A. A., Weiser J. N., Maskell D. J., Moxon E. R., *Carbohydr. Res.*, 246 (1993) 319-330.
86. Vinogradov E. V., Stuike-Prill R., Bock K., Holst O., Brade H., *Eur. J. Biochem.*, 218 (1993) 534-554.
87. Shaw D. H., Squires M. J., Jshiguro E. E., Trust T. J., *Eur. J. Biochem.*, 161 (1986) 309-313.
88. Erler W., Feist H., Jacob B., Schade W., *J. Basic. Microbiol.*, 26 (1986) 383-387.
89. Bellman W., Lingens F., *Biol. Chem. Hoppe-Selyer* 366 (1985) 567-575.
90. Gamian A., Romanowska E., *Carbohydr. Res.*, 198 (1990) 381-383.
91. Rietschel E. Th., Galanos C., Luderitz O., Westphal O., *Immunopharmacology and Regulation of Leucocyte Function. Webb O. Ed. Marcel Dekker., New York* 1982, 183
92. Katzenellenbogen E., Gamian A., Romanowska E., Dąbrowski U., Dąbrowski J., *Eur. J. Biochem.*, 196 (1991) 197-201.

93. Michon F., Shaw D. H., Banoub J. H., *Eur. J. Biochem.* 145 (1984) 107-114.
94. Banoub J. H., Choy Y. M., Michon F., Schaw D., *Carbohydr. Res.*, 114 (1983) 267-276.
95. Banoub J. H., Hodder H. J., *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 63 (1985) 1199-1205.
96. Schaw D. H., Hart M. J., Luderitz O., *Carbohydr. Res.*, 231 (1992) 83-91.
97. Radziejewska-Lebrecht J., Feige U., Mayer H, Weckesser J., *J. Bacteriol.* 145 (1981) 138-144.
98. Sowden J.C., Strobach D. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 954-955.
99. Teuber M., Bevill R. D. Osborn J. M., *Biochemistry* (1968) 3303-3308.
100. Paulsen H., Heitman A. C., *Liebigs Ann. Chem.*, (1986) 675-686.
101. Dziewiszek K., Zamojski A., *Carbohydr. Res.*, 150 (1986) 163-171.
102. Dziewiszek K., Banaszek A., Zamojski A., *Studies in natural Products Chemistry Vol.4* Elsevier Amsterdam (1989) 195-219.
103. Castro B., *Bull. Soc. Chim. France.*, (1967) 1533-1540., Castro B., *Bull. Soc. Chim. France.*, (1967) 1540-1547.
104. Boons G. J. P. H., van der Klein P. A. M., van der Marel G. A., van Boom J. H., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*, 107 (1988) 507-508.
105. Dasser M., Chretien F., Chapleur., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.*, (1990) 3091-3094.
106. Tamao K., Yshida N., *Tett. Lett.*, 25 (1984) 4245-4248., Tamao K., Ishida N., Tanaka T., Kumada M., *Organometalics* 2 (1983) 1694., Tamao K., Ishida N., Ito Y., Kumada M., *Organic Synth.* 69 (1990) 96-105.
107. Boons G. J. P. H., van der Marel G. A., Poolman J. T., van Boom J. H., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*, 108 (1989) 339-343.
108. Boons G. J. P. H., van der Marel G. A., van Boom J. H., *Tett. Lett.*, 30 (1989) 229-232.
109. Fleming I., Sanderson P. E. J., *Tett. Lett.*, 28 (1987) 4229-4232.
110. Peterson D. J., *J. Org. Chem.*, 33 (1968) 780-784.
111. Fleming I., Henning R., Parker C., Plaut H. E., Sanderson P. E. J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.*, (1995) 317-337.
112. Delft F. L., van der Marel G. A., van Boom J. H., *Symlett* (1995) 1069-1070.
113. Irleand R. E., Norbeck., *J. Org. Chem.*, 50 (1985) 2198-2200.
114. Brimacombe J. S., Kabir K. M. S., *Carbohydr. Res.*, 150 (1986) 35-51.

115. Cha J. K., Christ W. J., Kishi Y., *Tetrahedron* 40 (1984) 2247-2255.
116. Rosenfeld D. A., Richtmyer N. K. and Hudson C. S., *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 4907-4910.
117. Hulyacar R. K., Jones J. K. N., Perry M. B., *Can. J. Chem.*, 41 (1963) 1490-1492.
118. Dziewiszek K., Chmielewski M., Zamojski A., *Carbohydr. Res.*, 104 (1982) C-1-C-3.
119. Albano E., Horton D., Tsuchiya T., *Carbohydr. Res.*, 2 (1966) 349-362. Horton D., Tsuchiya T., *Carbohydr. Res.*, 3 (1966) 257-259.
120. Brimacombe J. S., Kabir A. K. M. S., *Carbohydr. Res.*, 152 (1986) 329-334.
121. Schmidt R. R., *Angew. Chem.*, 98 (1986) 213-236.
122. Garegg P. J., Oscarson S., Szonyi M., *Carbohydr. Res.*, 205 (1990) 125-132.
123. Garegg P. J., Oscarson S., Szonyi M., *Carbohydr. Res.*, 228 (1992) 121-128.
124. Lonn H., *Carbohydr. Res.*, 139 (1985) 115-121.
125. Lemieux R. U., Diriguez H., *J. Am. Chem. Soc.*, 97 (1975) 4069-4075.
126. Paulsen H., Heitman A. C., *Liebigs Ann. Chem.*, (1988) 1061-1071.
127. Boons G. J. P. H., Steyer R., Overhand M., van der Marel G. A., van Boom J. H., *J. Carbohydr. Chem.*, 10 (1991) 995-1007.
128. Boons G. J. P. H., Overhand M., van der Marel G. A., van Boom J. H., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 111 (1992) 144-148.
129. Hanessian S., Banoub J., *Carbohydr. Res.*, 53 (1977) C-13-C-16.
130. Berlind C., Oscarson S., *Carbohydr. Res.*, 297 (1997) 251-260.
131. Oscarson S., Ritzen H., *Carbohydr. Res.*, 254 (1994) 81-90.
132. Boons G. J. P. H., Overhand M., van der Marel G. A., van Boom J. H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28 (1989) 1504-1506.
133. Paulsen H., Breken M., *Liebigs Ann. Chem.*, (1991) 1113-1112.
134. Paulsen H., Wulff A., Breken M., *Liebigs Ann. Chem.* (1991) 1127-1145.
135. Paulsen H., Hoffgen E. C., *Liebigs Ann. Chem.*, (1993) 534-550.
136. Szabo P., Szabo L., *J. Chem. Soc.*, (1960) 3758-3762, 3762-3768.
137. Levene P. A., Raymond A. L., *J. Biol. Chem.*, 107 (1934) 75-84.
138. Harvey W. E., Michalski J. J., Tood A. R., *J. Chem. Soc.*, (1951) 2271-2278.

139. Baddiley J., Buchanan J. G., Cars B., *J. Chem. Soc.*, (1957) 1869-1876.
140. Danan A., Mondange M., Sarfati S. R., Szabo P., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, (1982) 1275-1282.
141. Cawley T. N., Letters R., *Carbohydr. Res.*, 19 (1971) 373-382.
142. Berling Ch., Oscarson S., Wildman G., *Carbohydr. Res.*, 263 (1994) 173-180.
143. Szabo P., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, (1974) 920-923.
144. Boons G. J. P. H., Hoogerhout P., Poolman J. T., van der Marel G. A., van Boom J. H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1 (1991) 303-308.
145. Ekelof K., Oscarson S., *J. Carbohydr. Chem.*, 14 (1995) 299-315.
146. Grzeszczyk B., Zamojski A., *Carbohydr. Res.*, 262 (1994) 49-57.
147. Bessodes M., Komiotis D., Antonakis K., *Tett. Lett.* 27 (1986) 579-580.
148. Mancuso A. J., Huang S-L., Swern D., *J. Org. Chem.*, 43 (1978) 2480-2482.
149. Oikawa Y., Yoshioka, Yonemitsu D., *Tett. Lett.*, 23 (1982) 885-888. Oikawa Y., Tanaka T., Horita K., Yonemitsu O., *Tett. Lett.*, 25 (1984) 5397-5400.
150. Pozgay V., *Carbohydr. Res.*, 69 (1979) 284-286.
151. Varma A. J., Schuerch C., *J. Org. Chem.*, 46 (1981) 799-803.
152. Billington D. C., Baker R., Kulagowski J. J., Mawer I. M., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1987) 314-316.
153. Billington D. C., Baker R., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1987) 1011-1013.
154. Akitopolou-Zanze I., Nakanishi K., Stępowaska H., Grzeszczyk B., Zamojski A., Berova N., *Chirality w druku*
155. Arbusov B. A., Kadyrov R. A., Klochkov V. V., Arshinova R. P., Agonov A. V., *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim.*, (1982) 588-593, *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.*, (1982) 520-525.
156. Baddiley J., Buchanan J. G., Szabo L., *J. Chem. Soc.*, (1954) 3826-3832.
157. Liptak A., Imre J., Harangi J., Nanasi P., Neszmelyi A., *Tetrahedron* 38 (1982) 3721-3727.
158. Boss R., Scheffold R., *Angew. Chem.*, 15 (1976) 578-579.
159. Grzeszczyk B., Holst O., Zamojski A., *Carbohydr. Res.*, 290 (1996) 1-15.
160. Angyal S. J., Tran T. Q., *Aust. J. Chem.*, 36 (1983) 937-946.

161. Bailly O., *Ann. Chim., (Paris)* 6 (1916) 96-54 i 215-278.
162. Oivanen M., Schnell R., Pfeleinderer W., Lonnerberg H., *J. Org. Chem.* 56 (1991) 3623-3628.
163. Sekine M., Tsuruoka H., Imura S., Kusuoku H., Wada T., *J. Org. Chem.*, 61 (1996) 4087-4100.
164. Watanabe Y., *Studies in Natural Products Chemistry (Atta-ur-Rahman Ed.) Elsevier, Amsterdam*, vol 18 (1996) 391-456.
165. Brown D. M., Hall G. E., Letters R., *J. Chem. Soc.*, (1959) 3547-3555.
166. Bailly M. C., *Compt. Rend.*, 208 (1939) 443-445.
167. Verkade P.E., Stoppelenburg J. C., Cohen W. D., *Rec. Trav. Chim.*, 5 (1940) 886-892.
168. Fordham W. D., Wang J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 89 (1967) 4197-4203.
169. Buchwald S. L., Pliura D. H., Knowles J. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 845-847, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 4916-4922.
170. Brown D. M., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, (1952) 52-58.
171. Norman D. G., Reese C. B., Serafinowska H. T., *Tett. Lett.*, 25 (1984) 3015-3018; Griffin B. E., Jarman M., Reese C. B., *Tetrahedron* 24 (1968) 639-662.
172. Weistheimer F. H., *Acc. Chem. Res.*, 1 (1968) 70-78.
173. Posternak T., *Helv. Chim. Acta.*, 42 (1959) 390-393.
174. Angyal S. J., Tate M., *J. Chem. Soc. (C)* (1961) 4122-4128.
175. Brown D. M., Higson K. M., *J. Chem. Soc.*, (1957) 2034-2041.
176. Michalska M., Brzezińska E., Lipka P., *J. Am. Chem. Soc.*, 113 (1991) 7945-7951.
177. Kumler W. D., Eiler J. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 65 (1943) 2355-2361.
178. PCModel, Serena Software, Bloomington, IN 47402
179. Still W. C., Kahn M., Mitra A., *J. Org. Chem.*, 43 (1978) 2923-2925.
180. Perrin D. D., Armarego W. L. F., Perrin D. R., *Purification of laboratory chemicals*, Pergamon Press Inc, 1980.
181. Nasheed M. A., *Carbohydr. Res.*, 60 (1978) 200-205.
182. Szurmai Z., Balatoni L., Liptak A., *Carbohydr. Res.*, 254 (1994) 301-309.
183. Boren H.B., Eklind K., Garegg P.J., Lindberg B., Pilotti A., *Acta Chem. Scand.*, 26 (1972) 4143-4146.

184. Boons G. J. P. H, Steyger R., Overhand M., van der Marel G. A., van Boom J. H., *J. Carbohydr. Chem.*, 10 (1991) 995-1007.



B Org. 217/97

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.217/97



8000000090984