



^{13}C -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *S. arizonae* O63

ацетамидных групп при 23,2–23,4 м.д. (CH_3) и 175,0–175,7 м.д. (CO). Таким образом, данные спектра хорошо согласуются с результатами определения моносахаридного состава и показывают, что полисахарид является регулярным и построен из повторяющихся пентасахаридных звеньев, а также что все три аминокислота присутствуют в *N*-ацетилированной форме. Кроме того, в спектре присутствовали сигналы при 21,2–21,6 м.д., принадлежащие *O*-ацетильным группам, что подтверждалось их исчезновением из спектра после обработки полисахарида водным раствором триэтиламина. Интегральные интенсивности этих сигналов были незначительными ($\sim 0,1$ – $0,2$) от интенсивности сигнала одной *N*-ацетильной группы), и *O*-ацетильные группы в полисахариде локализованы не были.

Из снятого без подавления *C,H*-взаимодействий ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида были определены величины КССВ $^1J_{\text{C,H}}$ для всех аномерных атомов углерода (таблица). Три из них были относительно большими (169–171 Гц), а две другие несколько меньше (162,3 Гц). Следовательно, три моносахаридных остатка присоединены α -гликозидными связями, а два другие — β -гликозидными [3].

Полисахарид был подвергнут метилированию [4], и частично метилированные моносахариды, полученные при гидролизе метилированного полимера, анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов полиолов. В результате идентифицированы 2,3,6-три-*O*-метилглюкоза, 2,6-ди-*O*-метилгалактоза, 3,6-ди-*O*-метил- и 4,6-ди-*O*-метил-2-(*N*-метил)-ацетамидо-2-дезоксигалактоза, а также 2,4-ди-*O*-метил-3-(*N*-метил)ацетамидо-3,6-дидезоксигалактоза. Из этих данных следовало, что полисахарид является разветвленным, в узле разветвления находится остаток галактозы, замещенный в положения 3 и 4, остаток 3-ацетамидо-3,6-дидезоксигалактозы представляет собой терминальный сахар боковой цепи, остаток глюкозы и один из остатков *N*-ацетилгалактозамина замещены в положение 4, а второй остаток *N*-ацетилгалактозамина замещен в положение 3.

Для структурного анализа регулярных полисахаридов нами ранее успешно использовалась программа на ЭВМ, позволяющая рассчитывать их ^{13}C -ЯМР-спектры, исходя из моносахаридного состава и средних значений эффектов гликозилирования, и находить структуру, для которой рассчитанный спектр наиболее близок экспериментальному ^{13}C -ЯМР-спектру [1, 5, 6]. Использованные в этих работах величины эффектов гликозилирования были определены при анализе данных ^{13}C -ЯМР для дисахаридов и дисахаридных фрагментов олиго- и полисахаридов. Вследствие этого расчетный метод дает хорошие результаты в случае линейных полисахаридов, но не может быть применен с использованием тех же величин эффектов гликозилирования для анализа разветвленных полимеров, так как в этом случае для моносахаридного остатка, лежащего в узле разветвления,

Химические сдвиги (δ , м. д.) в ^{13}C -ЯМР-спектрах *
 В скобках приведены КССВ $^1J_{\text{C-H}}$ в Гц

Соединение, остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Полисахарид (I), А						
-4GalNAc α 1-	95,4	51,0	68,7	79,5	72,5	61,5
-3GalNAc β 1-	104,0	52,1	76,5	65,3	76,0	62,2
-3Gal β 1-	103,8	71,3	82,9	69,7	76,0	62,1
-4Glc α 1-	101,3	72,8	72,7	79,8	72,2	61,1
Полисахарид (I), Б						
-4GalNAc α 1-	95,5	51,0	68,5	79,2	72,4	61,7
-3GalNAc β 1-	104,4	52,0	76,5	65,4	76,4	62,2
-3Gal β 1-	104,0	71,0	83,2	69,7	76,3	62,2
-4Glc α 1-	101,3	72,7	72,6	79,9	71,9	61,1
Полисахарид (II), А						
-4GalNAc α 1-	95,3	51,0	68,8	79,2	72,4	61,5
	(170,9)					
-3GalNAc β 1-	103,8	52,2	76,8	65,5	76,0	62,3
	(162,3)					
-3,4Gal β 1-	104,1	72,2	80,7	77,1	76,0	61,2
	(162,3)					
-4Glc α 1-	101,3	72,8	72,8	79,8	72,3	61,2
	(169,7)					
Fuc3NAc α 1-	99,7	67,7	51,8	71,8	68,1	16,6
	(170,9)					
Fuc3NAc α 1-OMe [9]	100,3	67,2	52,6	71,6	67,6	16,5

* Спектр экспериментальный (А) и рассчитанный (Б).

часто наблюдаются отклонения (иногда значительные, до 5 м.д. [7]) экспериментальных химических сдвигов ^{13}C от рассчитанных. Один из возможных путей включения расчетного метода в структурный анализ разветвленных полисахаридов может заключаться в отщеплении боковых цепей химическими методами, установлении строения образующегося при этом линейного полимера путем расчета ^{13}C -ЯМР-спектров для всех возможных структур и затем реконструировании структуры исходного разветвленного полисахарида с помощью сравнительного анализа его ^{13}C -ЯМР-спектра и спектра основной цепи.

Для отщепления боковых цепей в настоящей работе был использован сольволиз безводных фтористым водородом, так как известно, что гликозидные связи 6-дезоксисахаров расщепляются этим реагентом значительно легче, чем гликозидные связи гексоз и гексозаминов (например, [8]). Сольволиз полисахарида в относительно мягких условиях (-40°C) привел к полимерному продукту, выделенному гель-хроматографией. По данным кислотного гидролиза, в состав этого модифицированного полисахарида входят глюкоза, галактоза и галактозамин в соотношении $\sim 1:1:2$. ^{13}C -ЯМР-спектр свидетельствовал, что полимер построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев (таблица). Следовательно, терминальный остаток 3-ацетамидо-3,6-дидезоксигалактозы был избирательно отщеплен при сольволизе фтористым водородом при сохранении гликозидных связей остальных моносахаридов.

Анализ модифицированного полисахарида методом метилирования [4] привел к идентификации 2,3,6-три-О-метилглюкозы, 2,4,6-три-О-метилгалактозы, 3,6-ди-О-метил- и 4,6-ди-О-метил-2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксигалактозы. Следовательно, этот полимер линейный; остаток галактозы, лежащий в узле разветвления исходного полисахарида, замещен в основной цепи в положение 3, а боковая цепь присоединяется к нему, таким образом, в положение 4.

Для определения последовательности моносахаридных остатков и конфигурации гликозидных связей в модифицированном полисахариде был использован вышеупомянутый расчетный метод [5, 6]. С помощью ЭВМ были рассчитаны ^{13}C -ЯМР-спектры всех возможных линейных полимеров данного моносахаридного состава (за исключением полисахаридов с 1,6-гликозидными связями, так как из ^{13}C -ЯМР-спектра вытекало, что

ных величин дальних эффектов (в данном случае от гликозилирования по С2).

Таким образом, анализ спектра показал, что в узле разветвления лежит остаток галактозы, замещенный в положения 3 и 4, что согласуется со структурой (II). Хотя для изученного полисахарида этот вывод был легко сделан на основании данных метилирования, описанный здесь подход может оказаться полезным — например, в случае присутствия в основной цепи двух одинаково замещенных остатков одного и того же моносахарида, один из которых лежит в узле разветвления, или в случае недостаточно хорошего разделения частично метилированных моносахаридов при анализе ГЖХ.

Экспериментальная часть

^{13}C -ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) в D_2O при 60°C с использованием в качестве внутреннего стандарта ацетона (δ_{C} 31,45 м. д.). Оптическое вращение определяли на поляриметре ЕПО-1 в воде при 20°C . Хромато-масс-спектрометрия выполнена на приборе Varian Mat Gnom 111 на колонке с 3% OV-1 на носителе Diatomite CQ (100–120 меш), газ-носитель — гелий. Гель-хроматография, хроматография и электрофорез на бумаге и ионообменная хроматография аминокислот выполнены как описано ранее [10]. Анализ с помощью углеводного и аминокислотного анализаторов проведен как в работе [11].

Выращивание бактериальной структуры *S. arizonae* 63: z₄, z₃₂: — (Arizona 8: 1,7,8: —, штамм 40009) проводилось как описано в работе [12]. Липополисахарид выделяли по методу [2] и расщепляли как в работе [11].

Кислотный гидролиз проводили 4 М соляной кислотой (100°C , 3 ч); в аналитическом варианте гидролизат анализировали с помощью углеводного и аминокислотного анализаторов, а также методами ГЖХ и хроматографии на бумаге; в преципитативном варианте ионообменной хроматографией на катионите Chromex UA-8 (II⁺-форма) в 0,33 М соляной кислоте выделили хлоргидрат D-галактозаминна ($[\alpha]_{\text{D}} +71,2^\circ$ (с 0,4); [13]: $[\alpha]_{\text{D}} +82^\circ$ (вода)) и хлоргидрат 3-амино-3,6-дидезокси-D-галактозы ($[\alpha]_{\text{D}} +51,1^\circ$ (с 0,2); [14]: для N-ацетильного производного $[\alpha]_{\text{D}} +114^\circ$ (вода)). 3-Аминосакхар был превращен, как обычно, в 1,2,4,5-тетра-O-ацетил-3-ацетамидо-3,6-дидезокси-галактит, масс-спектр которого совпадал с описанным в работе [9]. По времени удерживания при анализе ГЖХ он был неотличим от заводского образца, полученного при гидролизе O-специфического полисахарида *Pseudomonas syringae*, патовар *syringae* 281 [15]. Ферментативное окисление глюкозы и галактозы в гидролизате полисахарида осуществляли согласно [10].

Метилирование полисахарида проводили по методу [4], продукт выделяли путем адсорбции в патроне Sep-Pak C18 (США) с последующим элюированием метанолом, как описано в работе [16], гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (120°C , 1 ч), частично метилированные моносахариды превращали в ацетаты полиолов согласно [17], гексозы идентифицировали по данным [18], аминосахара — с использованием данных [17].

Сольволиз полисахарида безводным фтористым водородом проводили при -40°C в течение 40 мин (охлаждение смесью твердая углекислота — ацетон), продукты осаждали из реакционной смеси эфиром, как описано в работе [19], и разделяли гель-хроматографией на геле TSK HW 40.

Авторы благодарят д-ра Б. Лани (Национальный институт гигиены, Будапешт) за предоставление бактериальной культуры и В. Н. Шибаева за плодотворное участие в обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов Е. В., Книрель Ю. А., Липкинд Г. М., Шашков А. С., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Холодкова Е. В. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1275–1281.
2. Вестфаль О., Яни К. // Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967. С. 325–332.
3. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293–297.
4. Коупрад Г. Е. // Методы исследования углеводов/Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975. С. 276–279.
5. Липкинд Г. М., Шашков А. С., Кочетков Н. К. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 833–840.
6. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1987. In press.
7. Lemieux R. U., Bock K., Delbaere L. T. J., Koto S., Rao V. S. // Can. J. Chem. 1980. V. 58. № 6. P. 631–653.
8. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Wilkinson S. G., Tahara Y., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashitova G. M. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 155. № 3. P. 659–669.
9. Lvov V. L., Tochmatysheva N. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Capek K. // Carbohydr. Res. 1983. V. 112. № 2. P. 233–239.

