



УДК 577.114.5:543.422.25:579.842.14.083.3

ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА  
*SALMONELLA ANATUM* С ПРИМЕНЕНИЕМ  
 $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Львов В. Л., Яковлев А. П., Шашков А. С.\*

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР,  
Москва;

\* Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

В результате полного отнесения сигналов в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, проведенного с использованием экспериментов с селективным гомо- и гетероядерным двойным резонансом и ядерным эффектом Оверхаузера, подтверждена структура О-специфической полисахаридной цепи полисахарида *Salmonella anatum* [-3(6Ac)Gal $\alpha$ 1-6Man $\beta$ 1-4Rhap $\alpha$ 1-]<sub>n</sub>.

В последние годы наблюдается тенденция к проведению исследований, позволяющих с помощью современных методик спектроскопии  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР уточнить полученные ранее химическими методами данные о структуре полисахаридов бактерий. В связи с продолжающимся в нашей лаборатории сравнительным структурным анализом липополисахаридов микроорганизмов, принадлежащих к различным родам энтеробактерий [1, 2], мы предприняли изучение О-специфического полисахарида (ПС1) *S. anatum* с использованием в основном метода ЯМР-спектроскопии. Структура данного полисахарида была установлена ранее [3] химическими методами.

ПС1 с  $[\alpha]_D^{20} +24^\circ$  (с 2,5, вода) получен деградацией 1% уксусной кислотой липополисахарида, выделенного из сухих бактериальных клеток по методу Вестфalia [4], с последующей гель-хроматографией супернатанта по колонке с сефадексом G-50. В гидролизате ПС1 методом ГЖХ-масс-спектрометрии были идентифицированы в виде ацетатов полиолов рамноза, манноза и галактоза в соотношении 1:1:1, абсолютная конфигурация моносахаридов (*L*, *D* и *D* соответственно) была определена ранее [3].

Анализ спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ПС1 подтвердил, что его повторяющееся звено построено из трех моносахаридных остатков, один из которых является 6-дезоксигексопиранозой, и, кроме того, позволил сделать заключение о наличии в повторяющемся звене нестехиометрического количества О-ацетильного заместителя (30–40%), что вызывало существенную нерегулярность спектра. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР О-деацетилированного полисахарида (ПС2), полученного при обработке ПС1 раствором триэтиламина при рН 9,5, содержал 18 хорошо разрешенных сигналов единичной интегральной интенсивности. В области резонанса аномерных атомов углерода присутствовали три сигнала (см. табл. 1), для которых из данных спектра, снятого в условиях сохранения спин-спиновой взаимоделимости углеродов с протонами (GD-спектр), были определены константы  $^1J_{\text{C},\text{H}}$ . Для сигналов при 99,6 и 103,2 м.д. они оказались равными 171 Гц, а для сигнала при 102,09 м.д. — 161 Гц, откуда следовало, что в состав повторяющегося звена полисахарида входят два моносахаридных остатка с  $\alpha$ -конфигурацией гликозидной связи и один с  $\beta$ -конфигурацией [5].

В отдельных случаях структурные характеристики сравнительно простых полисахаридов (конфигурация гликозидных связей, последовательность и тип замещения моносахаридных остатков) могут быть установлены без деградации полимерной цепи с использованием  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии в экспериментах с селективным гомоядерным двойным ре-

Химические сдвиги в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР олигосахаридов и полисахаридов

Соединение	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Трисахарид	Gal $\alpha$ 1-	99,4	69,6	70,7	70,5	72,0	62,2
	-6Man $\beta$ 1	102,0	71,8	74,4	68,1	75,8	<b>67,6</b>
	-4Rha $\alpha$	95,0	72,3	<b>71,2</b>	81,4	68,4	18,4
	$\beta$	94,6	71,8	74,0	81,0	72,8	18,4
Man $\beta$ 1-4Rha $\alpha$ 1-3Gal $\alpha$ [8]	Man $\beta$ 1-	101,9	71,9	74,4	68,1	77,5	62,3
	-4Rha $\alpha$ 1-	103,5	71,4	72,1	80,9	69,1	18,2
	-3Gal $\alpha$	93,6	70,4	78,7	69,8	71,9	62,3
ПС2	-3Gal $\alpha$ 1-	99,6	68,9	78,9	70,3	72,0	62,2
	-6Man $\beta$ 1-	102,1	71,8	74,4	68,0	75,8	67,7
	-4Rha $\alpha$ 1-	103,2	71,3	71,6	81,4	69,0	18,3
ПС1 *	-3Gal $\alpha$ 1- 6   Ac	99,5	68,7	78,6	70,2	69,6	64,9

\* Сигналы Man и Rha идентичны их сигналам в ПС2; хим. сдвиги  $\text{CH}_3$ - и  $\text{CO}$ -групп в  $O$ -ацетильном заместителе — при 21,4 и 175,0 м. д. соответственно.

Таблица 2

Параметры спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР трисахарида

Остаток	Химические сдвиги (м. д.); характер расщепления *; КССВ (J, Гц)						
	H1, д ( $J_{1,2}$ )	H2, дд ( $J_{2,3}$ )	H3, дд ( $J_{3,4}$ )	H4, т ( $J_{4,5}$ )	H5, дк ( $J_{5,6}$ )	H6a, д	H6b
Gal $\alpha$ 1- -6Man $\beta$ 1-	5,00(3,2)	3,82(9,6)	3,9(2,9)	—	—	—	—
	4,88, ус (1,6; $J_{1,3} \leq 1$ )	4,08(2,5)	3,62(9,1)	3,67(9,1)	3,53, ддд (5)	3,95, дд ( $J_{6a,5}$ 11)	3,77, дд ( $J_{6b,5}$ 2,1)
-4Rha $\alpha$ $\beta$	5,10(1,6)	3,91(3,2)	3,95(9,5)	3,65(9,5)	3,93(6,5)	1,31	—
	4,84(1,1)	3,92(3,1)	3,73(9,2)	3,59(9,2)	3,48(6,5)	1,34	—

\* д — дублет, т — триплет, ус — уширенный синглет, дк — дублет квартетов.

зонансом и ядерным эффектом Оверхаузера. Однако для этой цели необходим хорошо разрешенный  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр, который в нашем случае получить не удалось. Эту задачу можно решить, имея олигосахарид, который соответствовал бы повторяющемуся звену нативного полисахарида. Поэтому ПС2 был подвергнут избирательному расщеплению по рамнозидным связям (0,01 М щавелевая кислота, 2 ч,  $100^\circ\text{C}$ ) с последующей гель-хроматографией гидролизата на колонке с TSK HW-40(S). Практически единственным продуктом расщепления оказался трисахарид, в гидролизате которого (после предварительного восстановления  $\text{NaBD}_4$ ) методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов полиолов были идентифицированы в эквимольных количествах галактоза, манноза и рамноза. При этом, судя по наличию метки рамноза находится на восстанавливаемом конце трисахарида.

В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре трисахарида (табл. 2) по типичным для каждого из сахаров константам спин-спинового взаимодействия удалось выделить с помощью экспериментов с селективным гомоядерным двойным резонансом ряд ключевых сигналов [6]. Их однозначное отнесение позволило не только подтвердить моносахаридный состав трисахарида, но и определить конфигурацию гликозидных связей и размеры окисных циклов моносахаридных остатков.

В серии экспериментов с ядерным эффектом Оверхаузера (ЯЭО) были выяснены характер замещения и последовательность моносахаридных

Результаты экспериментов с ЯЭО для трисахарида \*

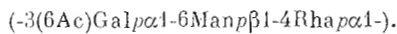
Предоблучаемый Н1-протон остатка	H2(G)	H2(M)	H2(R <sub>α</sub> )	H2(R <sub>β</sub> )	H66(M)	H4(R <sub>β</sub> )	H3(R <sub>β</sub> )	H3(M) H4(R <sub>α</sub> )	H5(R <sub>β</sub> )	H5(M)
G M R <sub>α</sub> R <sub>β</sub>	10	12	9	6	2,5	8		25	10	19

\* Приведено усиление сигналов (в % к площади предоблучаемого сигнала в разностном спектре ЯЭО). G, M, R<sub>α</sub> и R<sub>β</sub> — остатки Gal<sub>α</sub>, Man<sub>β</sub>, Rha<sub>α</sub> и Rha<sub>β</sub> соответственно.

остатков в трисахариде (табл. 3). Из этих данных следовало, что трисахарид имеет строение Gal<sub>α</sub>1-6Man<sub>β</sub>1-4Rha<sub>α</sub>,<sub>β</sub>. После установления строения трисахарида появилась возможность выяснить конфигурацию гликозидной связи остатка *L*-рамнозы и тип замещения остатка *D*-галактозы в полисахаридной цепи. Этот вопрос был решен с использованием данных спектров <sup>13</sup>C-ЯМР ПС2 и трисахарида, причем отношение всех сигналов в спектре последнего было выполнено с помощью двойного гетероядерного резонанса <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H<sub>i</sub> (табл. 1). Из того, что остаток *D*-маннопиранозы в трисахариде имеет β-конфигурацию гликозидной связи (см. табл. 3, ЯЭО на H3 и H5 этого остатка при облучении H1), следовало, что остатки *D*-галактозы и *L*-рамнозы соединены в полисахаридной цепи α-связями. Тип замещения в *D*-галактопиранозном остатке был определен исходя из следующих соображений. Замещение по C6 исключается анализом GD-спектра ПС2 с учетом установленного замещения остатка *D*-маннозы по C6 (см. выше). Совпадение химических сдвигов сигналов, соответствующих C1 *D*-галактопиранозы, в спектрах ПС2 и трисахарида (отсутствие β-эффекта замещения) указывало на отсутствие замещения по C2. С другой стороны, химический сдвиг 103,2 м.д. характерен для C1 остатка α-*L*-рамнопиранозы, если он замещает остаток *D*-галактопиранозы в положение 3 (см. химический сдвиг для модельного трисахарида в табл. 1), но не в положение 4, так как химический сдвиг при этом должен быть 101 м.д., как показано для модельного дисахарида *LRhaα*1-4*DGalα* [7]. Кроме того, сравнение спектров <sup>13</sup>C-ЯМР ПС2, трисахарида и модельного трисахарида *DManβ*1-4*LRhaα*1-3*DGalα* [8] позволило надежно отнести все сигналы в спектре ПС2, что равноценно подтверждению структуры повторяющегося звена ПС2.

Из сопоставления спектров ПС2 и ПС1 следует, что в ПС1 О-ацетильный заместитель находится при C6 *D*-галактопиранозного остатка (смещение сигналов C5 и C6 в спектре ПС1 по сравнению с ПС2).

Из приведенных выше данных следует, что повторяющееся звено О-специфического полисахарида *S. anatum* имеет строение



Таким образом, результаты проведенной работы полностью подтверждают ранние структурные исследования Хеллерквиста с соавторами [3].

Полученные спектральные характеристики О-специфического полисахарида *S. anatum* могут оказаться полезными при структурном анализе О-антигенов из родственных микроорганизмов рода *Salmonella*.

### Экспериментальная часть

Спектры <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР были сняты на приборе Bruker AM-300 при 40° С. При съемке <sup>13</sup>C-ЯМР-спектров в качестве внутреннего стандарта использовали метанол (δ 50,14 м.д. от (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si). Отнесение ключевых сигналов в спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР выполнено с применением методики селективного гомоядерного резонанса в обычном и разностном вариантах, а в спект-

рах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР — с применением методики селективного гетероядерного  $^{13}\text{C}$ - $\{^1\text{H}_i\}$ -резонанса. Величины ЯЭО измерены по методике [9] и рассчитаны в % как отношения интегральных интенсивностей наблюдаемого и предоблучаемого протонов в разностном спектре.

Все использованные экспериментальные методики описаны в работе [10].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dmitriev B. A., L'vov V. L., Kochetkov N. K., Jann B., Jann K. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 64. № 2. P. 491-498.
2. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Jann B., Jann K. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 79. № 1. P. 111-115.
3. Hellerqvist C. G., Lindberg B., Lönngren J., Lindberg A. A. // Acta chem. scand. 1971. V. 25. № 1. P. 939-944.
4. Westphal O., Jahn K. // Methods Carbohydr. Chemistry/Eds Whistler R., Bemiller J. M. N. Y.—L.: Acad. Press, 1965. P. 88-91.
5. Bock K., Lundt J., Pedersen C. // Tetrahedron Lett. 1973. V. 13. № 1. P. 1037-1040.
6. Altona C., Hassnoot C. A. G. // Org. Magn. Reson. 1980. V. 13. № 6. P. 417-429.
7. Liptak A., Szurmei Z., Nanasi P., Neszmelyi A. // Carbohydr. Res. 1982. V. 99. P. 13-21.
8. Николаев А. В., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 6. С. 914-919.
9. Wagner G., Wütrich C. // J. Magn. Resonance. 1979. V. 33. № 3. P. 675-680.
10. Львов В. Л., Яковлев А. П., Плужникова Г. Н., Лапина Е. Б., Шашков А. С., Дмитриев Б. А. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1256-1265.

Поступила в редакцию  
18.V.1989

#### STUDY OF THE STRUCTURE OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE FROM *SALMONELLA ANATUM* USING $^1\text{H}$ AND $^{13}\text{C}$ NMR SPECTROSCOPY

L'VOV V. L., YAKOVLEV A. P., SHASHKOV A. S.\*

*V. F. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;*

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

The *Salmonella anatum* O-specific polysaccharide structure was fully confirmed by means of complete interpretation of its  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum, using the selective double resonances and NOE experiments:

