



УДК 577.114.3 : 543.422.23: 579.843.1

© 1990 г.

*Е. Л. Назаренко, А. С. Шапков\*, Ю. А. Книурель\*,  
Е. П. Иванова, Ю. С. Оводов*

## НЕОБЫЧНЫЕ КИСЛЫЕ МОНОСАХАРИДЫ — КОМПОНЕНТЫ О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *VIBRIO*

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО АН СССР, Владивосток;  
\* Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва*

В ходе изучения состава и строения липополисахаридов микроорганизмов рода *Vibrio* нами обнаружены два необычных кислых моносахарида, выделение и идентификация которых описаны в настоящей работе.

Липополисахариды *Vibrio alginolyticus*, штамм 945-80, и *Vibrio fluvialis*, штамм AQ-0002B, были выделены экстракцией водным фенолом [1] и расщеплены 1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (100° С, 2 ч): О-специфические полисахариды были получены гель-хроматографией на сефадексе G-50. При мягком кислотном гидролизе полисахарида *V. alginolyticus* (1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 100° С, 2 ч) и *V. fluvialis* (0,1 М  $\text{HCl}$ , 100° С, 1 ч) образовались кислые моносахариды (I),  $[\alpha]_D^{25} +25,6^\circ$  (с 0,5, вода), и (II),  $[\alpha]_D^{25} +34,7^\circ$  (с 0,3, вода), соответственно, которые были выделены гель-хроматографией на Fraktogel TSK HW 40(S) и очищены ВЭЖХ на сорбенте Partisil ODS в 0,05%  $\text{CF}_3\text{COOH}$ . Моносахарид (I) частично образуется также при расщеплении 1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  липополисахарида *V. alginolyticus*.

В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре моносахарида (I) присутствовали сигналы двух дезоксизвеньев —  $\text{CH}_3$  при 20,4 м. д. и  $\text{CH}_2$  при 40,9 м. д., двух атомов углерода, связанных с азотом, при 54,1 и 54,5 м. д., трех атомов углерода, связанных с кислородом, при 67,9—70,8 м. д., одного аномерного атома углерода при 97,7 м. д. (судя по относительно низкой интенсивности, он принадлежит кетосахару), одной карбоксильной группы при 175,1 м. д., а также двух N-ацетильных групп:  $\text{CH}_3$  — при 23,0 и 23,4 м. д.,  $\text{CO}$  — при 175,1 м. д. (табл. 1).

Эти данные позволяли предположить, что моносахарид (I) относится к классу 5,7-диациламино-3,5,7,9-тетрадезоксинулозоновых кислот, идентифицированных ранее в О-антигенах *Pseudomonas aeruginosa* и некоторых других бактерий [2]. Присутствие в спектре одной серии сигналов показывало, что сахар (I), как и другие высшие альдулозоновые кислоты

Таблица 1

Данные  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров ( $\delta$ , м.д.)

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7 **	C8 ***	C9
Моносахарид (I)	175,1	97,7	40,9	67,9	54,1	70,8	54,5	68,3	20,4
Дисахарид (III) [4] *	173,7	104,3	41,9	69,4	53,8	74,8	54,5	70,1	19,7
Моносахарид (II) $\alpha$	95,2	69,6	79,5	72,5	69,5	18,0	75,2	19,8	
$\beta$	94,8	69,9	81,9	72,2	73,2	18,0	74,9	19,8	
L-Рамноза [5] $\alpha$	95,2	72,1	71,3	73,5	69,5	18,0			
$\beta$	94,7	72,6	74,0	73,1	73,2	18,0			

\* Приведены данные для остатка (I).  
\*\* Для моносахарида (II) — атом C1'.  
\*\*\* Для (II) — атом C2'.

Данные  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров

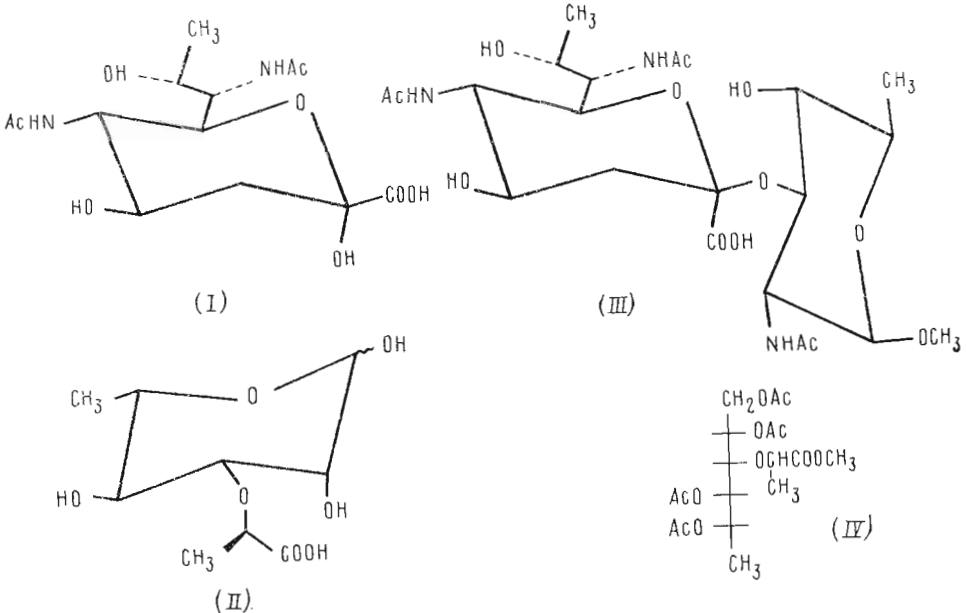
Протон	Моносахарид (I)							
	H3a	H3e	H4	H5	H6	H7	H8	H9
Мультиплетность	дд	дд	ддд	т	дд	м	м	д
$\delta_{\text{H}}$ , м.д.	1,80	2,20	3,93	3,70	4,22	3,84	3,84	1,14
KCCB, Гц *	$J_{3a,4}$	$J_{3a,3e}$	$J_{3e,4}$	$J_{4,5}$	$J_{5,6}$	$J_{6,7}$	$J_{8,9}$	
	11,5	13	5	10,3	10,4	1,8	6,3	
	(~12)	(~12)	(4,2)	(~10)	(~10)	(1,5)	(6)	

Протон	Моносахарид (II)							
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H1'	H2'
Мультиплетность	д	дд	дд	т	дк	д	к	д
$\alpha$ -Серия								
$\delta_{\text{H}}$ , м.д.	5,08	4,03	3,65	3,51	3,83	1,23	4,33	1,42
KCCB, Гц	$J_{1,2}$	$J_{2,3}$	$J_{3,4} \sim 10$	$J_{4,5} \sim 10$	$J_{5,6}$		$J_{1',2'}$	
	2	3,1			6,5		7,2	
$\beta$ -Серия								
$\delta_{\text{H}}$ , м.д.	4,78	4,06	3,48	3,39	3,36	1,25	4,33	1,42
KCCB, Гц	$J_{1,2} \leq 1$	$J_{2,3} \sim 3$	$J_{3,4} \sim 10$	$J_{4,5} \sim 10$	$J_{5,6}$		$J_{1',2'}$	
					6,5		7,2	

\* KCCB — константа спин-спинового взаимодействия; в скобках приведены данные для остатка (I) в спектре дисахарида (III) [4].

[3], существует в водном растворе только в одной, энергетически более выгодной аномерной форме с экваториальной карбоксильной группой.



$^1\text{H}$ -ЯМР-спектр моносахарида (I), расшифрованный с помощью селективного гомоядерного двойного резонанса (табл. 2), подтверждал эти выводы. Более того, константы спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов в этом спектре были практически идентичны соответствующим константам в спектре остатка 5,7-диацетида-3,5,7,9-тетрадезоксид-*D*-глицеро-*L*-галакто-нонупулозоновой кислоты в дисахариде (III), полученном из *O*-специфического полисахарида *P. aeruginosa* 013 (классификация Лани) [4].

Эти данные, а также близость положения сигналов в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре (за исключением положения сигналов С6, чувствительного к аномерной конфигурации [3], табл. 1) свидетельствовали о том, что оба моносахарида имеют одинаковую структуру и относительную конфигурацию. Предположительно у них и одинаковая абсолютная конфигурация, хотя прямо это доказано не было, так как кислый компонент О-антигена *P. aeruginosa* 013 не был выделен в свободном виде и его удельное оптическое вращение не было определено.

В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре моносахарида (II) присутствовали три серии сигналов (табл. 2). Две из них принадлежали остатку  $\alpha$ - и  $\beta$ -рамнопиранозы, а третья отвечала этилиденовой группе:  $\text{CH}_3$  (H2') при 1,42 м. д. (дублет,  $J_{1',2'}$  7,2 Гц);  $\text{CH}$  (H1') при 4,33 м. д. (квартет), причем протоны этой группы не имеют спин-спиновых взаимодействий с протонами остатка рамнозы, и, по-видимому, эти две части молекулы соединяются через атом кислорода.

Этот вывод подтверждался данными  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра моносахарида (II) (табл. 1), в котором присутствовали сигналы  $\alpha$ - и  $\beta$ -рамнопиранозы и О-этилиденовой группы:  $\text{CH}_3$  (C2') при 19,8 м. д. и  $\text{CH}$  (C1') при 74,9 и 75,2 м. д. ( $\alpha$ - и  $\beta$ -серия соответственно). Сопоставление спектров сахара (II) и рамнозы [5] показало, что сигналы C3 $\alpha$  и C3 $\beta$  в первом спектре смещены по сравнению с их положением во втором спектре на +8,2 и +7,9 м. д. соответственно, что характерно для замещения остатка рамнозы в положение 3.

Учитывая, что моносахарид (II), по данным электрофореза на бумаге, кислый ( $E_{\text{GalA}}$  0,90), можно предположить, что алкильный заместитель несет при C1' карбоксильную группу (ее сигнал не наблюдался в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре из-за его низкой интенсивности), и, таким образом, этот моносахарид представляет собой 3-О-(1-карбоксиэтил)рамнозу.

Ранее 3-О-[(*R*)-1-карбоксиэтил]-*L*-рамноза (рамнолактиловая кислота) была идентифицирована в О-специфическом полисахариде *Shigella dysenteriae*, тип 5 [6], и *Escherichia coli* 0:58 [7] и была синтезирована алкилированием *L*-рамнозы [8]. Сравнение этого соединения с сахаром (II) с использованием ЯМР-спектроскопии не представляется возможным, так как его спектры в работах [6—8] не описаны. Анализ с помощью ионообменной хроматографии на анионите Durrum DA  $\times$  4 (0,5 М натрийборатный буфер, pH 8,95) и ГЖХ в виде метилового эфира ацетата полиола (IV) показал, что моносахарид (II) совпадает по времени удерживания с рамнолактиловой кислотой из О-специфического полисахарида *Shigella dysenteriae*, тип 5. Эти соединения имеют одинаковые по знаку величины удельного оптического вращения —  $[\alpha]_D^{25} +34,7$  и  $+12^\circ$  (вода) [8] соответственно и, следовательно, одинаковую абсолютную конфигурацию.

Таким образом, в О-специфических полисахаридах *V. alginolyticus* и *V. fluvialis* идентифицированы 5,7-диацетидамо-3,5,7,9-тетрадезоксид-*D*-глицеро-*L*-галакто-нонулозоновая кислота (I) и 3-О-[(*R*)-1-карбоксиэтил]-*L*-рамноза (II) соответственно. Моносахарид (I) в индивидуальном виде выделен впервые в настоящей работе; его структуру, и в частности абсолютную конфигурацию, предполагается окончательно подтвердить сравнением с заведомым образцом, синтез которого проводится в настоящее время.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. // Z. Naturforsch. 1952. В. 7В. № 1. S. 148—155.
2. Kochetkov N. K., Knirel Yu. A. // Sov. Sci. Rev. 1989. V. 13. Part 1. P. 1—99.
3. Knirel Y. A., Kocharova N. A., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashtilova G. M. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. № 3. P. 639—652.
4. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashtilova G. M. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. № 3. P. 627—637.
5. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59—75.
6. Dmitriev B. A., Backinovsky L. V., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Hojman I. L. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 78. № 2. P. 331—337.

7. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Jann B., Jann K. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 79. № 1. P. 111—115.
8. Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Backinovsky L. V. // Carbohydr. Res. 1976. V. 51. № 2. P. 229—237.

Поступило в редакцию  
4.IV.1990

E. L. NAZARENKO, A. S. SHASHKOV\*, Yu. A. KNIREL\*, E. P. IVANOVA,  
Yu. S. OVODOV

UNUSUAL ACIDIC MONOSACCHARIDES AS COMPONENTS  
OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDES OF *VIBRIO*

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Academy of Sciences  
of the USSR, Vladivostok:*

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

On mild acid hydrolysis of O-specific polysaccharides of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio fluvialis* two unusual monosaccharides were isolated, viz., 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradecoxy-D-glycero-L-galacto-nonulosonic acid and 3-O-[(R)-1-hydroxyethyl]-L-rhamnose (rhamnolactilic acid), respectively. Structural elucidation of these sugars was carried out by using  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. Rhamnolactilic acid was also identified by comparison with the authentic sample obtained from the *Shigella dysenteriae* type 5 O-specific polysaccharide.