



Данные спектра <sup>1</sup>H-ЯМР 3,6-дидезокси-3-[(E)-3-гидроксибутирамидо]-D-галактозы

Аномер	Протон	Химический сдвиг, м.д.	Наблюдаемая мультиплетность	Константа взаимодействия
α	H1	5,22	д	J <sub>1,2</sub> 4,0
	H2	3,82	дд	J <sub>2,3</sub> 12,0
	H3	4,19	дд	J <sub>3,4</sub> 3,5
	H4	3,75	дд	J <sub>4,5</sub> 1,2
	H5	4,26	дк	J <sub>5,6</sub> 6,5
	H6	1,18	д	
β	H1	4,64	д	J <sub>1,2</sub> 8,5
	H2	3,47	дд	J <sub>2,3</sub> 12,0
	H3	3,96	дд	J <sub>3,4</sub> 3,5
	H4	3,70	дд	J <sub>4,5</sub> 1,5
	H5	3,88	дк	J <sub>5,6</sub> 6,5
	H6	1,23	д	
3-Гидроксибутирильная группа	H2 (2H)	2,47	м	J <sub>2,3</sub> 8,5
	H3	4,21	ддк	J <sub>3,4</sub> 6,5
	H4	1,21	д	

Таблица 2

Химические сдвиги в спектрах <sup>13</sup>C-ЯМР

Соединение	Звено	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Специфический полисахарид	A	106,2	75,6	77,3	71,6	77,6	62,7
	B	98,3	55,6	71,6	71,6	73,2	68,8
	C	98,3	50,0	78,8	77,3	71,7	61,1
	D	103,7	56,2	82,5	71,6	74,5	64,5
	E	102,7	83,0	76,9	70,2	77,8	82,7
Олигосахарид (1)	3-Гидроксибутирильный остаток	101,5	77,8	56,2	71,6	73,2	16,7
	A	175,4	46,3	66,3	23,6		
	A	106,1	75,7	77,2	71,6	77,0	62,6
	B	98,3	55,2	72,5	71,6	74,2	61,5
	C	98,7	50,9	79,0	77,2	72,8	60,7
	D	103,7	55,5	81,2	71,2	76,7	61,2
	E	106,6	81,5	72,0	70,8	72,9	61,4

звена. Кроме того, в этой же области наблюдаются сигналы одной O-ацетильной и трех ацетамидных групп. Характерные сигналы при 23,6; 46,3 и 66,3 и 175,4 м. д. относятся к 3-гидроксибутирильной группе. Из других характерных сигналов следует отметить сигналы атомов углерода, связанных с азотом (50,0; 55,2; 55,6 и 56,2 м. д.) и трех гидроксиметильных групп (61,1 и 62,7 м. д.).

Как видно, общее количество C6-атомов (6-дезокси- и гидроксиметильных) равно четырем. При гексасахаридном составе повторяющегося звена и пяти сигналах карбонильных групп, принадлежащих четырем ацильным остаткам аминсахаров и одной O-ацетильной группе, это означает, что в составе повторяющегося звена имеются два 1,6-замещенных остатка. Отнесение сигналов замещенных C6-атомов (64,5 и 68,8 м. д.) проведено с применением эксперимента по неселективному переносу поляризации [4]. При обработке полисахарида щелочью O-ацетильные группы были гидролизированы, сигнал при 64,5 м. д. в спектре O-деацетилированного полисахарида исчез и появился новый сигнал в области 62,0 м. д. Кроме того, произошло некоторое перемещение сигналов в области 75—80 м. д., где резонируют атомы углерода, участвующие в образовании гликозидной связи, и C5-атомы сахаров с β-конфигурацией гликозидного центра [5].

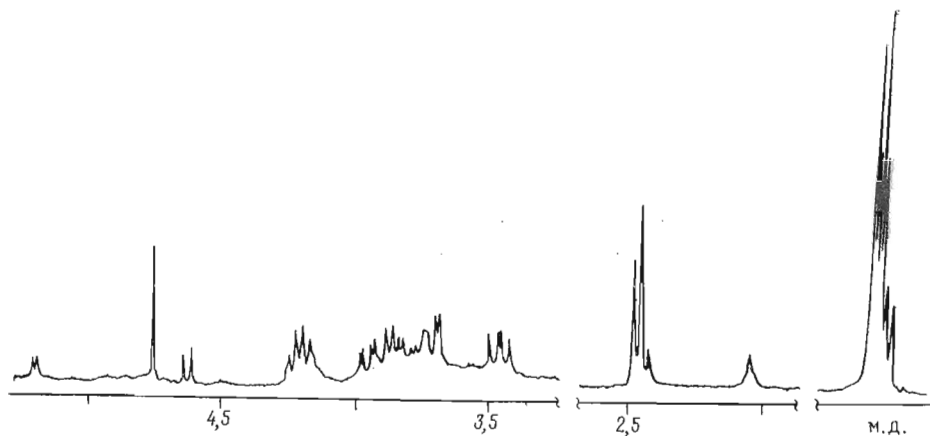


Рис. 1.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр 3,6-дидеокси-3[(*R*)-3-гидроксибутирамидо]-*D*-галактозы

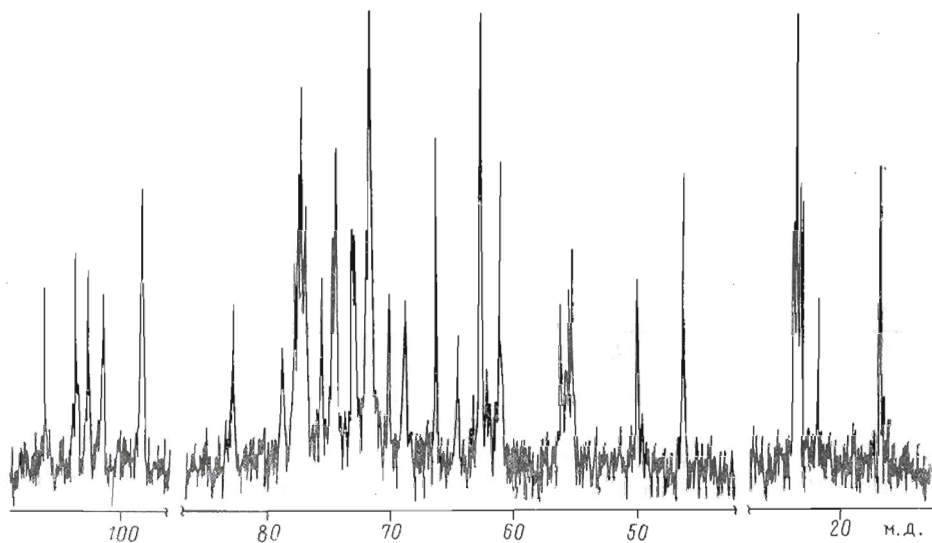


Рис. 2.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр *O*-специфического полисахарида *Y. aldovae*

Это указывает на то, что *O*-ацетильная группа локализована при  $\text{C}_6$ -атоме  $\beta$ -сахара.

Таким образом, результаты первичного анализа  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра *O*-специфического полисахарида соответствуют химическим данным и свидетельствуют о том, что повторяющееся звено *O*-специфического полисахарида представляет собой гексасахарид, содержащий остаток 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы, по два остатка 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы и *D*-глюкозы и остаток 3-амино-3,6-дидеокси-*D*-галактозы, *N*-ацилированный 3-гидроксибутирильным остатком. Кроме того, один из остатков  $\beta$ -сахара имеет *O*-ацетильную группу при  $\text{C}_6$ .

Из спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, снятого без подавления *S*,*H*-взаимодействия, определены величины  $\text{KCCB } ^1J_{\text{C,H}}$  для всех аномерных атомов углерода *O*-специфического полисахарида (табл. 2). Четыре из них были относительно небольшими (160 Гц), а две, относящиеся к сигналу двойной интегральной интенсивности при 98,3 м. д., были несколько больше (170 Гц). Следовательно, четыре моносахаридных остатка присоединены  $\beta$ -гликозидными связями, а два других —  $\alpha$ -гликозидными [6].

Полисахарид подвергали метилированию [7] и частично метилированные моносахариды, полученные при гидролизе сполна метилированного полисахарида, анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов полиолов. В результате идентифицированы 2,3,6-тетра-*O*-метилглюкоза, 3,4-ди-*O*-метил-2-(*N*-метил)ацетамидо-2-дезоксиглюкоза, 6-*O*-ме-

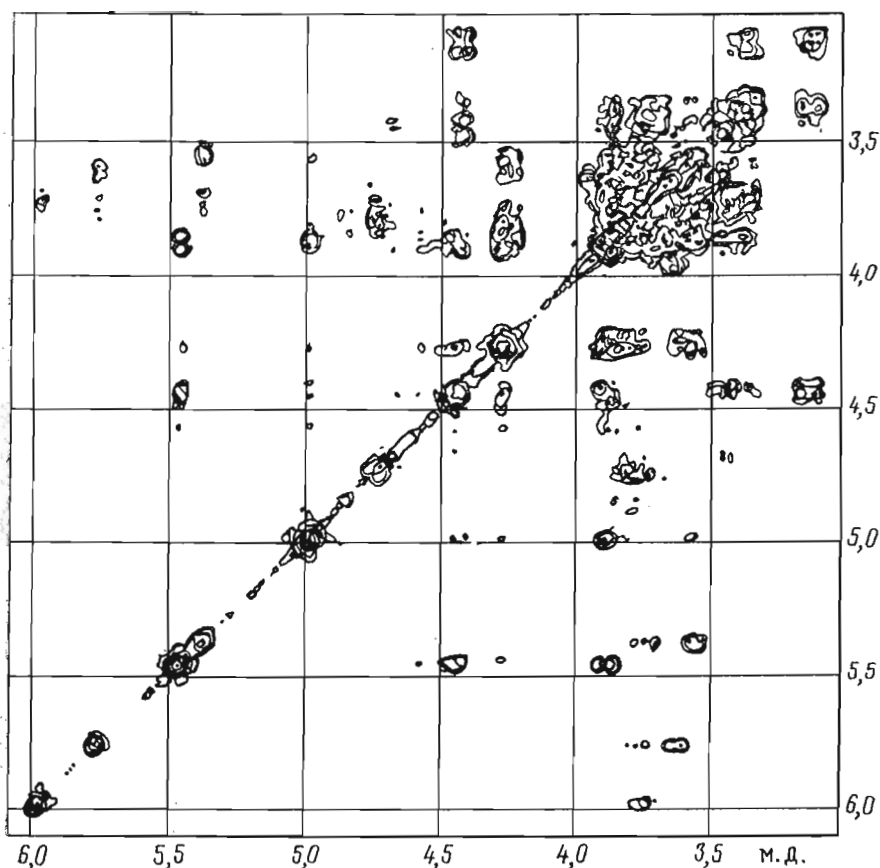


Рис. 3. COSY RCT-спектр олигосахарида (I)

тил-2-(N-метил)ацетиамидо-2-дезоксигалактоза, 4,6-ди-О-метил-2-(N-метил)ацетиамидо-2-дезоксиглюкоза, 3,4,6-три-О-метилглюкоза и 4-О-метил-3-(N-метил)ацетиамидо-3,6-дидезоксигалактоза.

Из этих данных следует, что полисахарид разветвлен, в узле разветвления находится остаток 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы, замещенной в положения 3 и 4, один остаток глюкозы представляет собой терминальный сахар, а другой остаток глюкозы и остаток 3-аминосахара замещены в положение 2. Два остатка 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы входят в линейную цепь и один из них замещен в положение 6, а другой — в положение 3.

Для выделения олигосахаридных фрагментов, необходимых для установления полной структуры полисахарида, в настоящей работе был использован сольволиз безводным фтористым водородом, так как известно, что гликозидные связи 6-дезоксисахаров расщепляются легче, чем гликозидные связи гексоз и гексозаминов [8]. Сольволиз полисахарида в относительно мягких условиях ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) привел к двум олигомерным продуктам (I) и (II), выделенным гель-хроматографией с последующим разделением ВЭЖХ на обращенной фазе  $\text{C}_{18}$ . Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР обоих олигосахаридов были почти идентичны и различались только тем, что в спектре олигосахарида (II) присутствовал сигнал О-ацетильной группы, а в спектре олигосахарида (I) отсутствовал. Такое различие объясняется тем, что в процессе сольволиза происходит частичное отщепление О-ацетильной группы. Кроме того, в спектрах обоих олигосахаридов отсутствуют сигналы 3-аминосахара и 3-гидроксibuтирильной группы. Это указывает на то, что при сольволизе происходит полное отщепление необычного моносахарида. В гидролизате сполна метилированного олигосахарида отсутствовали 4-О-метил-3-(N-метил)ацетиамидо-3,6-дидезоксигалактоза и 3,4-ди-О-метил-2-(N-метил)ацетиамидо-2-дезоксиглюкоза, а вместо них появилась 3,4,6-

Таблица 3

Данные спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР олигосахаридов (I)

Звено	Протон	Химический сдвиг, м.д.	Наблюдаемая мультиплетность	Константа взаимодействия
A	H1	4,43	д	$J_{1,2}$ 8,5
	H2	3,14	т	$J_{2,3}$ 9,0
	H3	3,46	т	$J_{3,4}$ 9,1
	H4 + H5	3,38		
B	H1	4,98	д	$J_{1,2}$ 3,0
	H2 + H3	3,87	м	
C	H1	5,46	д	$J_{1,2}$ 4,0
	H2	4,48	дд	$J_{2,3}$ 9,0
	H3	3,89	дд	$J_{3,4}$ 3,0
	H4	4,25	д	
D	H1	4,75	д	$J_{1,2}$ 8,0
	H2	3,80	дд	$J_{2,3}$ 9,0
	H3	3,75	дд	
	H4	3,72		
E	H1	5,86	дд	$J_{1,2}$ 3,5
	H2	3,70		$J_{1,F}$ 53,0

Таблица 4

Данные  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра ацетилированного олигосахаридов (I)

Звено	Протон	Химический сдвиг, м.д.	Наблюдаемая мультиплетность	Константа взаимодействия	
A	H1	4,67	д	$J_{1,2}$ 8,4	
	H2	4,92	дд	$J_{2,3}$ 9,1	
	H3	5,13	т	$J_{3,4}$ 9,1	
	H4	5,19	ддд	$J_{4,5}$ 9,1	
	H5	3,71	ддд	$J_{5,6}$ 3,0 $J_{5,6}$ 5,1	
B	H1	4,89	д	$J_{1,2}$ 3,9	
	H2	4,34	дт	$J_{2,3}$ 9,2	
	NH2	6,07	д	$J_{\text{NH}_2}$ 2 <sup>9</sup> ,2	
	H3 + H4	5,18	м	$J_{3,4}$ 9,3 $J_{4,5}$ 9,3	
C	H1	5,01	д	$J_{1,2}$ 3,5	
	H2	4,48	дт	$J_{2,3}$ 9,5	
	NH2	5,87	д	$J_{\text{NH}_2}$ 2 <sup>9</sup> ,5	
	H3	3,79	дд	$J_{3,4}$ 2,5	
D	H4	4,00	дд	$J_{4,5}$ 1,0	
	D	H1	5,04	д	$J_{1,2}$ 8,4
		H2	3,40	ддд	$J_{2,3}$ 9,2
		NH2	6,34	д	$J_{\text{NH}_2}$ 7,6
H3		4,28	дд	$J_{3,4}$ 8,9	
E	H4	5,10	дд	$J_{4,5}$ 10,0	
	E	H1	5,70	дд	$J_{1,F}$ 49,7
		H2	3,82	ддд	$J_{1,2}$ 2,8
		H3	5,39	т	$J_{2,F}$ 24,3
H4		5,08	т	$J_{2,3}$ 10,0 $J_{3,3}$ 10,0 $J_{4,5}$ 10,0	

три-О-метил-2-(N-метил)ацетидамо-2-дезоксиглюкоза. Это означает, что 3-аминосахар замещает 2-ацетидамо-2-дезоксиглюкозу в положение 6.

О-Ацетильная группа была локализована с помощью метилирования по методу Према [9], при котором в отличие от метода Хакомори не происходит снятия О-ацетильных групп. В гидролизате олигосахаридов, метилированного по Прему, по сравнению с данными метилирования по Хакомори вместо 4,6-ди-О-метил-2-(N-метил)ацетидамо-2-дезоксиглюкозы была идентифицирована 4-О-метил-2-(N-метил)ацетидамо-2-дезоксиглюкоза. Это означает, что О-ацетильная группа локализована при С6 2-ацетидамо-2-дезоксиглюкозы, причем данный аminosахар включен в полисахаридную цепь  $\beta$ -гликозидной связью.

Для определения структуры олигосахаридов использована  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопия. Протонные спектры пентасахаридов и его полного ацетата расшифрованы с использованием двумерной спектроскопии COSY в сочетании с одно- и двуступенчатой релейной спектроскопией (рис. 3). После нахождения химических сдвигов сигналов H1—H4 с помощью одномерной спектроскопии гомоядерного двойного резонанса (разностный вариант) были найдены КССВ, необходимые для установления размера окисных циклов и конфигурации заместителей в них. Результаты расшифровки приведены в табл. 3 и 4.

Таблица 5

ЯЭО, возникающие при предоблучении аномерных протонов в олигосахариде

Остаток, аномерный протон которого облучается	Наличие сигналов в разностном спектре ЯЭО
A	H2-A, H3-A, H5-A
B	H4-C, H2-B
C	H2-C, H3-D
D	H5-D, H2-D, H3-D, H2-E

Таблица 6

ЯЭО, возникающие при предоблучении аномерных протонов в ацетилированном олигосахариде

Остаток, протон которого облучается	Наличие сигналов в разностном спектре ЯЭО
A	H2-A, H3-A, H5-A, H3-C
B	H2-B, H4-C
C	H2-C, H3-D
D	H2-D, H3-D, H5-D, H2-E

Необычным в спектре олигосахариде (I) был сигнал аномерного протона глюкозы, находящейся на восстанавливающем конце. Этот сигнал имеет химический сдвиг 5,86 м. д. и представляет собой дублет дублетов с малой и большой константами (3,5 и 53,0 Гц). Это могло означать, что при сольволизе произошло фторирование остатка глюкозы. В  $^{19}\text{F}$ -ЯМР-спектре олигосахариде при  $-148,2$  м. д. присутствует сигнал в виде дублета дублетов. Это подтверждает предположение, что при сольволизе произошло образование фторгликозида.

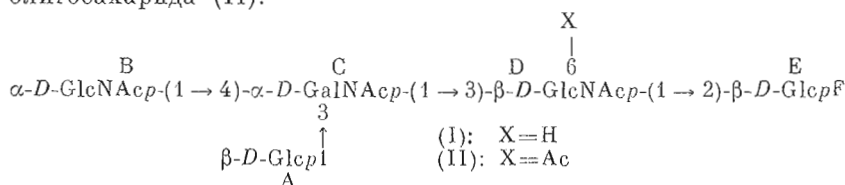
Для определения последовательности моносахаридных остатков исследованы ядерные эффекты Оверхаузера, возникающие при предоблучении аномерных протонов каждого моносахаридного остатка, входящего в состав олигосахариде. Данные по эффектам Оверхаузера приведены в табл. 5.

При ударе по H1 звена A одновременно происходит насыщение сигнала H2-C, поэтому в разностном спектре есть искаженный сигнал H3-C. Это обстоятельство не позволяет строго доказать замещение остатка C в положение 3 остатка A.

Однако привлечение данных метилирования олигосахариде и полисахариде позволяет сделать такой вывод.

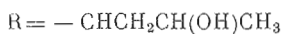
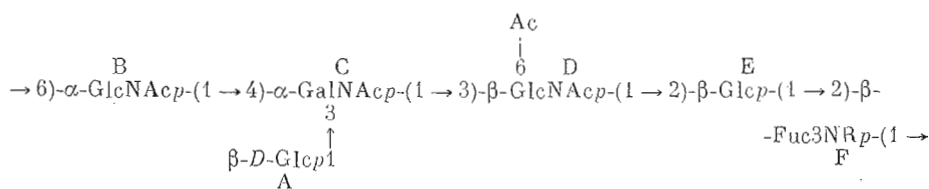
Анализ ядерных эффектов Оверхаузера в сполна ацетилированном олигосахариде (табл. 6) подтверждает полученные данные.

На основании вышеизложенного можно предложить следующую структуру олигосахариде (II):



Как указывалось выше, в полисахариде только два моносахарида имеют  $\alpha$ -конфигурацию гликозидной связи. Следовательно, остатки глюкозы и 3-аминосахара, входящие в основную углеводную цепь, имеют  $\beta$ -конфигурацию гликозидного центра. Из данных метилирования полисахариде следует, что этот остаток глюкозы замещает 3-аминосахар в положение 2, а тот, в свою очередь, замещает остаток 2-ацетида-2-дезоксид-*D*-глюкозы в положение 6.

Таким образом, повторяющееся звено O-специфического полисахариде *Y. aldovae* представляет собой гексасахарид структуры



## Экспериментальная часть

Аналитическую и препаративную хроматографию проводили на бумаге FN-15 в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3. Для обнаружения нейтральных моносахаридов использовали щелочной раствор азотнокислого серебра, а для обнаружения аминсахаров — 0,2% раствор нингидрина в ацетоне.

Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer, модель 141. ГЖХ проводили на хроматографе Pye-Unicam 104 с пламенно-ионизационным детектором на стеклянной колонке (0,4 × 130 см), содержащей 3% QF-1 на газхроме Q (100—120 меш.). Моносахариды анализировали в виде ацетатов полиолов (175—225° С, 5 град/мин) и ацетатов частично метилированных полиолов (120—225° С, 5 град/мин).

ВЭЖХ проводили на колонке (0,4 × 25 см) с сорбентом Silasorb SPH C<sub>18</sub> (LC; 7,5 мкм) в 5% водном метаноле. Элюционные кривые строили с помощью дифференциального рефрактометра RIDK-101 (ЧСФР).

Спектры <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР снимали на приборе Bruker-Physics HX-360; растворители — D<sub>2</sub>O и CDCl<sub>3</sub>. Химические сдвиги приведены относительно метанола (50,1 м. д.).

Спектры COSY в сочетании с одно- и двумерной релейной спектроскопией снимались по стандартной методике матобеспечения фирмы Bruker к ЭВМ Aspect 2000 (COSY-RCT и COSY-RCT2). В стандартную методiku было внесено единственное изменение — во время релаксационной задержки D1 = 1 с подавлялся сигнал H<sub>2</sub>O. Остальные условия следующие: матрица 512 × 512, спектральное окно 1000 Гц, D2 и D3 0,032 с (оптимально для KCCB 9,0 Гц), 90°-ному импульсу отвечала длительность 5,8 с. При обработке данных использовалась синусоидальная функция с нулевым сдвигом. В качестве примера приведен рисунок двумерного спектра COSY RCT свободного олигосахарида.

Использовали микроорганизм *Yersinia aldovae* (типовой штамм 6005), полученный из института Пастера (Париж). Выращивание бактерий проводили как описано ранее [10].

**Выделение ЛПС и O-специфического полисахарида.** Сухой измельченный ацетоновый порошок бактериальных клеток (90 г) экстрагировали 45% горячим водным фенолом. Обработку повторяли трижды. Нуклеиновые кислоты осаждали цетавлоном. Выход ЛПС 2 г.

ЛПС (1,5 г) нагревали в 1% уксусной кислоте (150 мл) 3 ч на кипящей водяной бане. Осадок липида А (600 мг) отделяли центрифугированием. Супернатант упаривали до 30 мл и осаждали 200 мл этанола. Полисахаридную фракцию (700 мг) подвергали гель-хроматографии на сефадексе G-50, выделяли O-специфический полисахарид (300 мг) и олигосахарид кора (250 г).

**Полный сольволиз.** Полисахарид (50 мг) обрабатывали безводным фтористым водородом (10 мл, 3 ч, 20° С), свежеперегнанным над кобальттрифторидом, фтористый водород удаляли в вакууме, поглощая его в ловушке с натрийгидроксидом. Из сольволизата препаративной ВЭЖХ были выделены 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкоза (2 мг),  $[\alpha]_D^{20} +70^\circ$  С, 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-галактоза (2 мг),  $[\alpha]_D^{20} +90^\circ$ , и 3,6-дидезокси-3-[(*R*)-3-гидроксипиридинидо]-*D*-галактоза (2 мг),  $[\alpha]_D^{20} +80^\circ$  (с 0,2, вода).

**Частичный сольволиз.** Полисахарид (50 мг) обрабатывали безводным фтористым водородом 0,5 ч при —80° С. Раствор выливали в холодный эфир, фильтровали, осадок растворяли в 5% метаноле (0,5 мл) и делили с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе C<sub>18</sub>. Выделили 10 мг олигосахарида (I),  $[\alpha]_D^{20} +90^\circ$ , и 11 мг олигосахарида (II),  $[\alpha]_D^{20} +99^\circ$  (с 0,3, вода).

**O-Дезацетилирование полисахарида.** Полисахарид (50 мг) выдерживали в 4 мл 1 М раствора натрийгидроксида при 20° С (6 ч), нейтрализовали концентрированной HCl, деионизовали гель-фильтрацией на сефадексе G-25, лиофилизовали. Получили O-дезацетилированный полисахарид (40 мг).

**Определение моносахаридного состава.** Полисахарид (3 мг) гидролизировали 2 н. трифторуксусной кислотой (1 мл, 100° С, 3 ч), гидролизат упаривали, превращали в ацетаты полиолов и анализировали ГЖХ.

**Метилирование полисахарида и олигосахарида.** I. Полисахарид (5 мг) и олигосахарид (3 мг) метилировали по Хакомори [7]. Метилированные полисахарид и олигосахарид гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (1 ч, 120° С), моносахариды превращали в ацетаты полиолов и исследовали ГЖХ-масс-спектрометрией. II. Олигосахарид (5 мг) растворяли в 1 мл триметилфосфата, прибавляли 0,15 мл 2,6-ди-(*трет*-бутил)пиридина и 0,1 г метилтрифторметансульфоната [9], перемешивали 2 ч при 50° С. К раствору прибавляли 5 мл воды и экстрагировали хлороформом (3 × 5 мл). Хлороформную вытяжку упаривали и делили на сефадексе LH-20. Выделяли метилированный олигосахарид (4 мг) и исследовали как описано выше.

**Выделение гидроксипутановой кислоты.** Полисахарид (100 мг) гидролизовали 2 М HCl (2 мл, 100° С, 4 ч), упаривали. Остаток растворяли в воде (5 мл), экстрагировали этилацетатом (2 × 3 мл), экстракт упаривали, растворяли в 5% метаноле в воде, пропускали через колонку (0,5 × 3 см) с обращенной фазой С-18 и упаривали. Выход (*R*)-3-гидроксипутановой кислоты 3 мг,  $[\alpha]_D^{20}$  -23° (с 0,3, вода).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bercovier H., Steigerwalt A. G., Guiyoule A., Huntley-Carter G., Brenner D. J. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1984. V. 34. № 2. P. 166—172.
- Westphal O., Lüderitz O., Bister F. // Z. Naturforsch. 1952. B. 7B. № 1. S. 148—155.
- Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 157. P. 129—138.
- Doddrell D. M., Pegg D. D., Bendal M. P. // J. Org. Res. 1982. V. 48. P. 323—327.
- Шашков А. С., Чушков О. С. // Биоорган. химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437—497.
- Кочиш П., Шандула Й., Усов А. И., Шашков А. С., Яроцкий С. В. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 4. С. 536—543.
- Hakomori G. J. // Biochem. J. (Tokyo). 1964. V. 55. № 2. P. 205—208.
- Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Wilkinson S. G., Tahara Y., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 155. № 3. P. 659—669.
- Prehm P. // Carbohydr. Res. 1980. V. 78. P. 372—374.
- Gorshkova R. P., Kalmykova E. N., Isakov V. V., Ovodov Yu. S. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 150. № 3. P. 527—531.

Поступила в редакцию  
17.VII.1990

После доработки  
2.I.1991

V. A. ZUBKOV, R. P. GORSHKOVA, E. L. NAZARENKO, A. S. SHASHKOV \*,  
Yu. S. OVODOV

#### STRUCTURE OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF THE *YERSINIA ALDOVAE* LIPOPOLYSACCHARIDE

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

O-specific polysaccharide has been isolated on mild hydrolysis of lipopolysaccharide from *Yersinia aldovae* and shown to consist of 2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose, *D*-glucose, 2-acetamido-2-deoxy-*D*-galactose, and 3,6-dideoxy-3-[(*R*)-3-hydroxybutyramido]-*D*-galactose in molar ratio 2 : 2 : 1 : 1. Acid hydrolysis, methylation, solvolysis with anhydrous hydrogen fluoride, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR studies indicated the polysaccharide to be composed of hexasaccharide repeating units of the following structure:

