





Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР специфического полисахарида из липополисахарида *Y. bercovieri* серовара 0 : 10

растворе с помощью БХ и ГЖХ обнаружили иерсиниозу и кетодезоксиоктоновую кислоту. Иерсиниоза выделена препаративной БХ и очищена ВЭЖХ на колонке с Silasorb SPH  $\text{C}_{18}$  (LC),  $[\alpha]_D +6,3^\circ$  ( $c$  0,5, вода). Масс-спектры ацетатов полиола и метилгликозида иерсиниозы идентичны масс-спектрам соответствующих производных выделенных ранее иерсиниоз [3, 4]. По времени удерживания при ГЖХ ацетат полиола совпадает с ацетатом полиола иерсиниозы А, выделенной из ЛПС *Y. pseudotuberculosis* серовара VI [3].

В спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР полученной иерсиниозы А преобладают сигналы  $\beta$ -пиранозной формы: аномерного протона (4,71 м. д., д,  $J_{1,2}$  8,2 Гц), протонов дезоксишвена (H-3a при 1,70 м. д., дд,  $J_{3a,3e}$  13,3 Гц,  $J_{3a,2}$  11,6 Гц; H-3e при 2,09 м. д., дд,  $J_{3e,2}$  5,2 Гц) и двух метильных групп (H-6 при 1,22 м. д., 3H, д,  $J_{5,6}$  6,7 Гц; H-2' при 1,24 м. д., 3H, д,  $J_{1',2'}$  6,5 Гц).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр иерсиниозы А содержит сигналы аномерных атомов углерода при 91,7 и 98,7 м. д. (для  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномерных форм соответственно) в соотношении 1 : 3, сигналы дезоксишвена при 29,9 и 35,9 м. д. (C3 $\alpha$  и C3 $\beta$  соответственно), двух метильных групп при 15,9; 16,4; 13,4 и 13,8 м. д. (C2' $\alpha$ , C2' $\beta$ , C6 $\alpha$  и C6 $\beta$  соответственно), а также еще 8 сигналов в области 66,4—75,5 м. д., относящихся к атомам, связанным с кислородом (C2, C4, C5 и C1'). Сигналы для C4 $\alpha$  и C4 $\beta$  (75,5 и 75,8 м. д.) были идентифицированы с помощью метода неселективного переноса поляризации [5].

Таким образом, по данным ЯМР-спектроскопии, в выделенном нами образце иерсиниозы А присутствует преимущественно пиранозная форма, полученный образец полностью идентичен заводомым образцам природной и синтетической [6] иерсиниозы А и, следовательно, в углеводную цепь липополисахарида входят остатки иерсиниозы А, представляющей собой 3,6-дидезокси-4-С-(L-глицеро-1-гидроксиэтил)-D-ксило-гексозу.

При гель-фильтрации полисахаридной фракции на сефадекс G-50 сразу за свободным объемом выходит резервный глюкан,  $[\alpha]_D +180^\circ$  ( $c$  0,5, вода), в гидролизате которого с помощью БХ и ГЖХ идентифицирована только глюкоза. В спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР этого полисахарида наблюдаются шесть сигналов с химическими сдвигами 100,4; 78,0; 74,0; 72,3; 72,0 и 61,3 м. д., значения которых характерны для  $\alpha$ -1,4-связанного глюкана [7].

Второй фракцией выходит специфический полисахарид с примесью глюкана и кора, третья фракция представляет собой олигосахарид кора, в гидролизате которого идентифицированы рамноза, иерсиниоза, галактоза, глюкоза, D- и L-глицеро-D-манно-гептоза и глюкозамин в соотношении 1,6 : 1,6 : 1,2 : 2,7 : 0,3 :

Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1'	C2'
-3 <i>D</i> Rha $\rho\alpha$ 1-	103,4	71,3	79,0	73,2	70,8	18,0		
-2,3 <i>D</i> Rha $\rho\alpha$ 1-	102,0	79,5	78,5	72,9	70,8	18,0		
YerA $\rho\alpha$ 1-	100,5	66,3	31,4	76,2	68,5	13,7	72,6*	16,6

\* Отнесение сигналов в спектре полисахарида проведено на основании литературных данных [10, 14] в соответствии с общими закономерностями расшифровки  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров.

3,2 : 1,0 соответственно. При этом содержание *D*-глицеро-*D*-манно-гептозы было значительно ниже, чем во всех изученных нами ранее видах *Yersinia* [8, 9].

Специфический полисахарид после дополнительной очистки хроматографией на TSK-50 и TSK-40 имел  $[\alpha]_D +104,0^\circ$  (с 0,4, вода), однако выделить его полностью свободным от примеси олигосахарида кора не удалось. В гидролизате специфического полисахарида идентифицированы рамноза и иерсиниоза в соотношении 2,5 : 1 с незначительной примесью глюкозы, гептозы и глюкозамина. Из гидролизата ЛПС с помощью препаративной БХ выделили рамнозу, которую превратили в  $\alpha$ -метилрамнопиранозид и очистили с помощью ВЭЖХ. Его оптическое удельное вращение —  $[\alpha]_D +60,0^\circ$  (с 0,2, вода) — указывает на *D*-конфигурацию остатка рамнозы в полисахариде.

В спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР полисахарида наблюдаются три сигнала аномерных протонов при 4,96; 5,05 и 5,22 м. д. с КССВ  $J_{1,2}$  3 Гц и четыре дублетных сигнала метильных групп при 1,05; 1,13; 1,25 и 1,28 м. д. с КССВ 6 Гц. Кроме того, в спектре присутствуют сигналы дезоксишвена в пиранозном цикле с центром при 1,85 м. д. В спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахарида (рисунок, таблица) наблюдаются три сигнала аномерных атомов углерода при 103,4; 102,0 и 100,5 м. д. с КССВ  $J_{\text{C,H}}$  170 Гц, сигналы метильных групп при 13,7; 16,6 и 18,0 (двойной) м. д. и дезоксишвена при 31,4 м. д. Эти данные указывают на то, что полисахарид имеет трисахаридное повторяющееся звено, в состав которого входят один остаток иерсиниозы и два остатка рамнозы, причем все моносахаридные остатки соединены  $\alpha$ -гликозидными связями [7].

Расчет с учетом данных метилирования и эффектов гликозилирования [10] показывает, что сигналы при 103,4 и 102,0 м. д. относятся к аномерным атомам углерода остатков *D*-рамнозы. Величина химического сдвига С1-атома иерсиниозы (100,5 м. д.) подтверждает ее *D*-конфигурацию, так как в случае *L*-конфигурации величина химического сдвига С1-атома должна составлять около 97 м. д. [10]. Сигналы в спектре полисахарида в области 94—97 и 23,5 м. д. характерны для С-атомов 2-ацетамидо-2-дезоксиглюкозы, входящей в состав кора, от примеси которого полностью освободиться не удалось.

При обработке периодатом иерсиниоза окисляется до 3,6-дидезокси-*D*-эритро-гексоз-4-улопиранозы; дальнейшее восстановление боргидридом натрия приводит к партозу [11]. В гидролизате модифицированного по методу Смита полисахарида с помощью БХ и ГЖХ сравнением с заводскими образцами идентифицировали рамнозу и партозу ( $R_{\text{Rha}}$  1,38). В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре модифицированного полисахарида исчезает сигнал при 13,7 м. д., а сигнал дезоксишвена при С3 смещается в слабое поле на 4,2 м. д., что характерно для  $\alpha$ -партозы [11]. Сигналы, относящиеся к остаткам рамнозы, не изменяются, что однозначно указывает на то, что один из остатков рамнозы замещен в положение 3, а другой является точкой разветвления.

Порядок замещения моносахаридных остатков в полисахаридной цепи установлен на основании данных метилирования ЛПС и полисахарида. Метилирование проводили по методу Хакомори [12]. Частично метилированные моносахариды анализировали ГЖХ-масс-спектрометрией в виде ацетатов полиолов. В результате



