



УДК 547.458.02+543:42.23

СПЕКТР ^{13}C -ЯМР СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА
SHIGELLA DYSENTERIAE ТИП 10Шашков А. С., Дмитриев В. А., Книрель Ю. А.,
Шеремет О. К., Бочетков Н. К.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

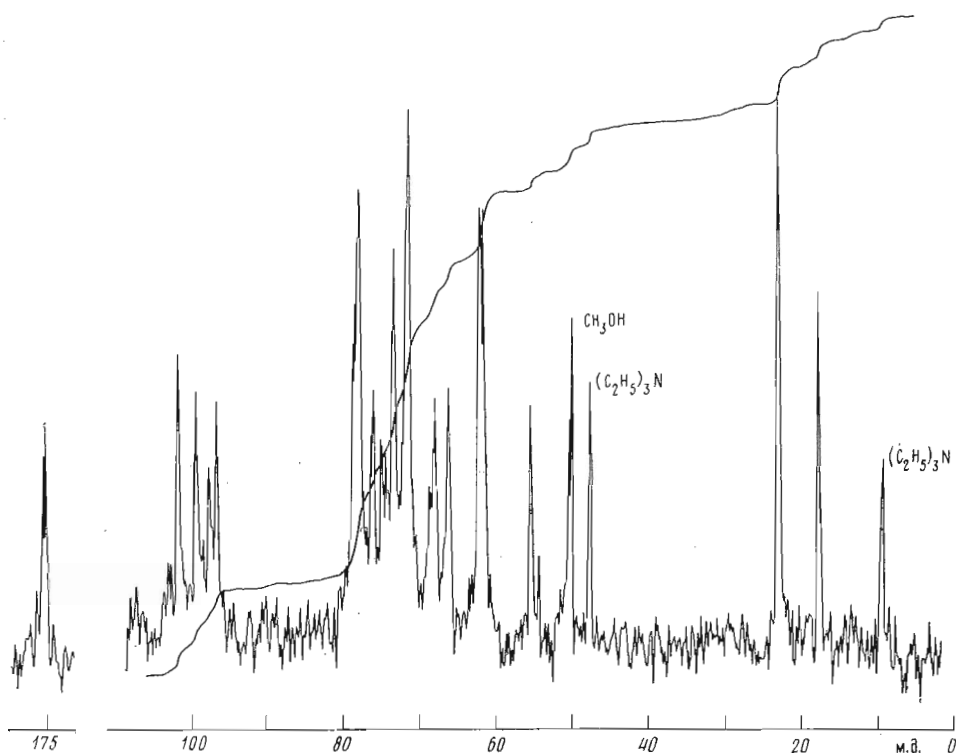
Полностью расшифрованы спектры ^{13}C -ЯМР специфического полисахарида из *Shigella dysenteriae* тип 10 и двух олигосахаридов, образующихся из полисахарида в результате последовательных распадов по Смигу. Полученные данные окончательно подтвердили структуру повторяющегося звена полисахарида, установленную ранее независимым путем.

Спектры ^{13}C -ЯМР несут важную информацию о структуре полисахаридов благодаря высокой чувствительности химических сдвигов сигналов атомов углерода углеводных остатков к ближайшему и дальнему окружению, а также к пространственным взаимодействиям [1]. Однако расшифровка спектров гетерополисахаридов с относительно сложным строением (включающих три и более различных моносахаридных остатков) представляет собой достаточно сложную задачу даже для регулярных полисахаридов с известной структурой повторяющегося звена. Во многом это связано с тем, что привлекаемые для расшифровки спектров полимеров мономерные модели (чаще всего метиловые эфиры моносахаридов) недостаточно точно имитируют гликозидные связи полисахаридов. Вследствие существенного различия α -эффектов O-гликозилирования и O-метилирования [1] особенно трудно осуществить правильное отнесение сигналов атомов углерода, участвующих в образовании гликозидных связей.

Этого недостатка лишены олигомерные модели, широкому использованию которых препятствует, однако, их ограниченная доступность. В связи с этим применение методов избирательного расщепления полисахаридов по различным гликозидным связям может привести к созданию рационального подхода к установлению строения полисахаридов, состоящего в сравнительном изучении полимера и продуктов его избирательного расщепления с помощью спектроскопии ^{13}C -ЯМР. Эффективность такого подхода подтверждается результатами настоящей работы на примере специфического полисахарида из *Sh. dysenteriae* тип 10.

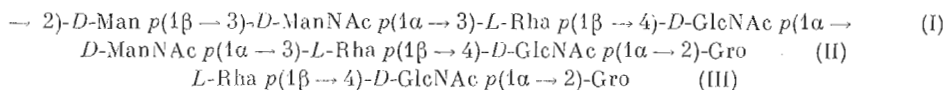
Повторяющееся звено этого полисахарида, строение которого было установлено нами недавно с помощью химических методов [2], представляет собой тетрасахарид (I), построенный из остатков 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-маннозы, *D*-маннозы, *L*-рамнозы и 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глю-

Сокращения приведены в соответствии с рекомендациями IUPAC; Rha — рамноза, Gro — глицерин.



Спектр ^{13}C -ЯМР специфического полисахарида из *Sh. dysenteriae* тип 10

kozy. Сравнительное изучение спектров ^{13}C -ЯМР самого полисахарида (I) и двух олигосахаридов (II) и (III), полученных при последовательных распадах полисахарида по Смиту [2], позволило однозначно расшифровать спектр полисахарида, из которого следовало строение его повторяющегося звена.



Предварительный анализ спектра полисахарида (рисунок) показал присутствие четырех сигналов в области резонанса аномерных атомов углерода (96,65; 97,7; 99,4 и 101,7 м.д.) с равным соотношением интегральных интенсивностей, а также сигналов атомов углерода, соответствующих трем оксиметильным группам и одной 6-дезоксигруппе (61,8–62,2 и 17,9 м.д. соответственно). О наличии остатков 2-ацетида-2-дезоксигексоз свидетельствовали сигналы атомов C2, связанных с ацетида-группами (55,55 и 50,4 м.д.), а также сигналы с химическими сдвигами 23,2 м.д. (двойной интенсивности по сравнению с сигналом атома углерода 6-дезоксигруппы), 175,4 и 175,1 м.д., относящиеся к CH_3 - и CO -атомам ацетида-групп соответственно [1]. Из этих данных следовало, что полисахарид построен из регулярно повторяющихся тетрасахаридных звеньев, причем два из четырех моносахаридных остатков, входящих в состав повторяющегося звена, являются 2-ацетида-2-дезоксигексозами, а один — 6-дезоксигексозой.

Полная расшифровка спектра полисахарида была осуществлена с помощью данных спектров ^{13}C -ЯМР олигосахаридов (II) и (III). Отнесение сигналов в спектре олигосахаридов (III) было проведено на основе литературных данных спектров глицерил-2-фосфата (IV) [3], метил-2-ацетида-

Химические сдвиги спектров ¹³C-ЯМР полисахарида, олигосахаридов (II) и (III) и модельных мономеров (IV)–(VIII)

Соединение	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Лит. источник
(I) *	<i>β</i> -D-Man	99,4	78,7	74,9	68,0	78,1	62,2	
	<i>α</i> -D-GlcNAc	97,7	55,55	71,6	78,1	71,6	61,8	
	<i>β</i> -L-Rha	101,7	68,0	78,1	71,6	73,4	17,9	
	<i>α</i> -D-ManNAc	96,65	50,4	76,2	66,3	73,4	62,2	
(II) *	Gro	61,6	77,9	61,6				
	<i>α</i> -D-GlcNAc	97,75	55,1	72,1	77,9	72,1	61,0	
	<i>β</i> -L-Rha	101,9	67,8	77,9	71,5	73,5	18,0	
	<i>α</i> -D-ManNAc	96,5	54,0	70,1	67,8	73,5	61,6	
(III) *	Gro	62,05	78,4	62,05				
	<i>α</i> -D-GlcNAc	98,1	55,3	71,9	78,0	72,2	61,1	
	<i>β</i> -L-Rha	102,0	72,2	73,5	72,9	73,5	17,85	
(IV)	Gro	62,5	75,1	62,5				[3]
(V)	<i>α</i> -D-GlcNAc	98,4	54,2	71,25	80,2	71,25	61,1	[4]
(VI)	<i>β</i> -L-Rha	94,6	72,4	73,8	72,9	73,1	18,0	[5]
(VII)	<i>β</i> -D-ManNAc	94,5	55,7	70,3	68,1	73,3	61,9	[6]
(VIII)	<i>β</i> -D-Man	95,0	82,6	74,5	68,0	77,5	62,1	[7]

* Сигналы CH₂CO и CH₃CO в спектре полисахарида (I) лежат при 175,4, 175,1 м.д. и 23,2 м.д., в спектре (II) — при 176,8, 176,2 и 23,1 м.д., в спектре (III) — при 176,5 и 22,9 м.д. соответственно. В спектре полисахарида присутствуют сигналы триэтиламина при 9,7 и 47,7 м.д.

2-дезоксид-4-О-метил-*α*-D-глюкопиранозида (V) (атомы C2, C3, C5 и C6) [4] и *β*-L-рамнопиранозы (VI) (атомы C2—C6) [5]. После расшифровки спектра олигосахаридов (III) (таблица) стало возможным отнесение сигналов в спектре олигосахаридов (II). Действительно, все сигналы остатков N-ацетилглюкозамина и глицерина в спектрах (II) и (III) должны были совпадать; из шести сигналов рамнопиранозного остатка лишь для трех, принадлежащих к атомам C2, C3 и C4, следовало ожидать смещения положения резонанса в спектре (II) по сравнению со спектром (III), причем сигнал C3 за счет *α*-эффекта гликозилирования должен был сместиться в спектре (II) на 4—8 м.д. в низкое поле, тогда как для C4 и C2 смещение в высокое поле должно было составить 1—2 и 3—4 м.д. соответственно (различные по величине *β*-эффекты за счет гликозилирования по C3 для атомов углерода, несущих экваториальный и аксиальный заместители [1]). Оставшиеся шесть сигналов в спектре (II) (не считая сигналов двух ацетамидогрупп) были отнесены за счет резонанса атомов C1—C6 остатка N-ацетилманнозамина; три из них (C1, C2 и C6) находились в аналитических областях спектров углеводов, а остальные три сигнала были отнесены на основании литературных данных по химическим сдвигам атомов C3—C5 2-ацетамидо-2-дезоксид-*α*-D-маннопиранозы (VII) [6].

Аналогичный анализ был проведен при переходе от спектра олигосахаридов (II) к спектру полисахарида. При этом мы исходили из предположения о совпадении всех сигналов остатков рамнозы, N-ацетилглюкозамина и трех сигналов (C1, C5 и C6) N-ацетилманнозаминидного остатка; ожидалось также аналогичное описанному выше для рамнозного остатка смещение трех сигналов атомов C2—C4 N-ацетилманнозамина (*α*- и *β*-эффекты гликозилирования по C3) и, естественно, исчезновение сигналов глицерина. Положение сигналов маннопиранозного остатка в спектре полисахарида было найдено методом исключения, а их отнесение было выполнено на основании данных, опубликованных для 2-О-метил-*β*-D-маннопиранозы (VIII) [7].

Таким образом, спектры полисахарида и олигосахаридов (II) и (III) были полностью расшифрованы, исходя из предположения о том, что ранее установленная структура повторяющегося звена полисахарида правильна. В действительности спектры ^{13}C -ЯМР не только не противоречат этой структуре, но и позволяют исключить любое альтернативное строение. Так, несмотря на то что из четырех моносахаридных остатков в случае трех, имеющих *манно*-конфигурацию (манноза, рамноза и N-ацетилманнозамиш), химические сдвиги аномерных атомов углерода не дают информации о конфигурациях гликозидных связей [1, 5], последние были однозначно подтверждены на основании следующих рассуждений. α -Конфигурация остатка N-ацетилманнозамина следовала из величины химического сдвига атома C5 (73,4 м.д. в спектре полисахарида или 73,5 м.д. в спектре олигосахаридов (II), ср. 73,3 м.д. для C5 2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-маннозы и 77,9 м.д. для C5 2-ацетамидо-2-дезоксид- β -D-маннозы [6]), а также из положения резонанса атома C2 при 54,0 м.д. в спектре олигосахаридов (II) (для сигнала C2 в 2-ацетамидо-2-дезоксид- β -D-маннопиранозе найден химический сдвиг 56,7 м.д. [6]). α -Конфигурация рамнозного остатка должна быть отвергнута из-за отсутствия характерного сигнала C5 при 69,5 м.д. [5] во всех трех спектрах. На β -конфигурацию остатка маннозы указывало положение линии резонанса C5 при 78,1 м.д. и сигнала C3 при 74,9 м.д. (в 2-O-метил- α -D-маннопиранозе C5 и C3 резонируют при 73,3 и 71,0 м.д. соответственно [7]). И наконец, α -конфигурация остатка N-ацетилглюкозамина следовала из величины химического сдвига сигнала C1 во всех трех спектрах, лежащего в области 98 м.д., т. е. там же, где и сигнал C1 в спектре метил-2-ацетамидо-2-дезоксид-4-O-метил- α -D-глюкопиранозидов (V) [4], тогда как атом C1 в спектре β -аномера последнего дает сигнал при 102,3 м.д. [4]. Кроме того, величина и направление α - и β -эффектов гликозилирования при переходе от спектра олигосахаридов (II) к спектру полисахарида позволили подтвердить замещение остатка N-ацетилманнозамина в положение 3 (слабополюсный сдвиг сигнала C3 за счет α -эффекта и сильнополюсные сдвиги сигналов C2 и C4 за счет β -эффектов). Аналогично при переходе от спектра (III) к спектру (II) может быть сделан вывод о замещении остатка рамнозы в положение 3. Типы замещения остатков маннозы и N-ацетилглюкозамина следовали из рассмотрения совокупности величин химических сдвигов сигналов C1—C5-атомов этих остатков.

Таким образом, расшифровка спектра полисахарида полностью подтвердила независимым образом правильность установленной ранее структуры повторяющегося звена специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 10, включая конфигурации гликозидных связей и типы замещения моносахаридных остатков. Кроме того, полученные данные могут быть использованы при анализе спектров ^{13}C -ЯМР других полисахаридов, содержащих аналогичные остатки сахаров.

Экспериментальная часть

Выделение полисахарида из клеток *Sh. dysenteriae* тип 10 и получение олигосахаридов (II) и (III) описаны в работе [2].

Спектры ^{13}C -ЯМР записаны на спектрометре Bruker-Physik WP-60 при 15,08 МГц для растворов в D_2O при использовании метанола в качестве внутреннего стандарта; химические сдвиги даны в миллионных долях после пересчета по соотношению $\delta_{\text{TMS}} = \delta_{\text{MeOH}} + 50,15$ м.д., полученному в отдельном эксперименте; спектр полисахарида записан при 80° в присутствии триэтиламина ($\sim 5\%$), резко снижающего вязкость раствора (в отсутствие триэтиламина удовлетворительный спектр полисахарида получить не удалось); спектры олигосахаридов записаны при 20° .

Химические сдвиги спектров ^{13}C -ЯМР полисахарида, олигосахаридов (II) и (III) и модельных мономеров (IV)–(VIII)

Соединение	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Лит. источник
(I) *	β -D-Man	99,4	78,7	74,9	68,0	78,1	62,2	
	α -D-GlcNAc	97,7	55,55	71,6	78,1	71,6	61,8	
	β -L-Rha	101,7	68,0	78,1	71,6	73,4	17,9	
	α -D-ManNAc	96,65	50,4	76,2	66,3	73,4	62,2	
(II) *	Gro	61,6	77,9	61,6				
	α -D-GlcNAc	97,75	55,1	72,1	77,9	72,1	61,0	
	β -L-Rha	101,9	67,8	77,9	71,5	73,5	18,0	
	α -D-ManNAc	96,5	54,0	70,1	67,8	73,5	61,6	
(III) *	Gro	62,05	78,4	62,05				
	α -D-GlcNAc	98,1	55,3	71,9	78,0	72,2	61,1	
	β -L-Rha	102,0	72,2	73,5	72,9	73,5	17,85	
(IV)	Gro	62,5	75,1	62,5				[3]
(V)	α -D-GlcNAc	98,4	54,2	71,25	80,2	71,25	61,1	[4]
(VI)	β -L-Rha	94,6	72,4	73,8	72,9	73,1	18,0	[5]
(VII)	β -D-ManNAc	94,5	55,7	70,3	68,1	73,3	61,9	[6]
(VIII)	β -D-Man	95,0	82,6	74,5	68,0	77,5	62,1	[7]

* Сигналы CH_2CO и CH_3CO в спектре полисахарида (I) лежат при 175,4, 175,1 м.д. и 23,2 м.д., в спектре (II) — при 176,8, 176,2 и 23,1 м.д., в спектре (III) — при 176,5 и 22,9 м.д. соответственно. В спектре полисахарида присутствуют сигналы триэтиламина при 9,7 и 47,7 м.д.

2-дезоксн-4-О-метил- α -D-глюкопиранозид (V) (атомы C2, C3, C5 и C6) [4] и β -L-рамнопиранозы (VI) (атомы C2—C6) [5]. После расшифровки спектра олигосахарид (III) (таблица) стало возможным отнесение сигналов в спектре олигосахарид (II). Действительно, все сигналы остатков N-ацетилглюкозамина и глицерина в спектрах (II) и (III) должны были совпадать; из шести сигналов рамнопиранозного остатка лишь для трех, принадлежащих к атомам C2, C3 и C4, следовало ожидать смещения положения резонанса в спектре (II) по сравнению со спектром (III), причем сигнал C3 за счет α -эффекта гликозирования должен был сместиться в спектре (II) на 4—8 м.д. в низкое поле, тогда как для C4 и C2 смещение в высокое поле должно было составить 1—2 и 3—4 м.д. соответственно (различные по величине β -эффекты за счет гликозирования по C3 для атомов углерода, несущих экваториальный и аксиальный заместители [1]). Оставшиеся шесть сигналов в спектре (II) (не считая сигналов двух ацетамидогрупп) были отнесены за счет резонанса атомов C1—C6 остатка N-ацетилманнозамина; три из них (C1, C2 и C6) находились в аналитических областях спектров углеводов, а остальные три сигнала были отнесены на основании литературных данных по химическим сдвигам атомов C3—C5 2-ацетамидо-2-дезоксн- α -D-маннопиранозы (VII) [6].

Аналогичный анализ был проведен при переходе от спектра олигосахарид (II) к спектру полисахарида. При этом мы исходили из предположения о совпадении всех сигналов остатков рамнозы, N-ацетилглюкозамина и трех сигналов (C1, C5 и C6) N-ацетилманнозаминидного остатка; ожидалось также аналогичное описанному выше для рамнозного остатка смещение трех сигналов атомов C2—C4 N-ацетилманнозамина (α - и β -эффекты гликозирования по C3) и, естественно, исчезновение сигналов глицерина. Положение сигналов маннопиранозного остатка в спектре полисахарида было найдено методом исключения, а их отнесение было выполнено на основании данных, опубликованных для 2-О-метил- β -D-маннопиранозы (VIII) [7].

Таким образом, спектры полисахарида и олигосахаридов (II) и (III) были полностью расшифрованы, исходя из предположения о том, что ранее установленная структура повторяющегося звена полисахарида правильна. В действительности спектры ^{13}C -ЯМР не только не противоречат этой структуре, но и позволяют исключить любое альтернативное строение. Так, несмотря на то что из четырех моносахаридных остатков в случае трех, имеющих *манно*-конфигурацию (манноза, рамноза и *N*-ацетилманнозамин), химические сдвиги аномерных атомов углерода не дают информации о конфигурациях гликозидных связей [1, 5], последние были однозначно подтверждены на основании следующих рассуждений. α -Конфигурация остатка *N*-ацетилманнозамина следовала из величины химического сдвига атома C5 (73,4 м.д. в спектре полисахарида или 73,5 м.д. в спектре олигосахаридов (II), ср. 73,3 м.д. для C5 2-ацетамидо-2-дезоксид- α -*D*-маннозы и 77,9 м.д. для C5 2-ацетамидо-2-дезоксид- β -*D*-маннозы [6]), а также из положения резонанса атома C2 при 54,0 м.д. в спектре олигосахаридов (II) (для сигнала C2 в 2-ацетамидо-2-дезоксид- β -*D*-маннопиранозе найден химический сдвиг 56,7 м.д. [6]). α -Конфигурация рамнозного остатка должна быть отвергнута из-за отсутствия характерного сигнала C5 при 69,5 м.д. [5] во всех трех спектрах. На β -конфигурацию остатка маннозы указывало положение линии резонанса C5 при 78,1 м.д. и сигнала C3 при 74,9 м.д. (в 2-*O*-метил- α -*D*-маннопиранозе C5 и C3 резонируют при 73,3 и 71,0 м.д. соответственно [7]). И наконец, α -конфигурация остатка *N*-ацетилглюкозамина следовала из величины химического сдвига сигнала C1 во всех трех спектрах, лежащего в области 98 м.д., т. е. там же, где и сигнал C1 в спектре метил-2-ацетамидо-2-дезоксид-4-*O*-метил- α -*D*-глюкопиранозидов (V) [4], тогда как атом C1 в спектре β -аномера последнего дает сигнал при 102,3 м.д. [4]. Кроме того, величина и направление α - и β -эффектов гликозилирования при переходе от спектра олигосахаридов (II) к спектру полисахарида позволили подтвердить замещение остатка *N*-ацетилманнозамина в положение 3 (слабополюсный сдвиг сигнала C3 за счет α -эффекта и сильнополюсные сдвиги сигналов C2 и C4 за счет β -эффектов). Аналогично при переходе от спектра (III) к спектру (II) может быть сделан вывод о замещении остатка рамнозы в положение 3. Типы замещения остатков маннозы и *N*-ацетилглюкозамина следовали из рассмотрения совокупности величин химических сдвигов сигналов C1—C5-атомов этих остатков.

Таким образом, расшифровка спектра полисахарида полностью подтвердила независимым образом правильность установленной ранее структуры повторяющегося звена специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 10, включая конфигурации гликозидных связей и типы замещения моносахаридных остатков. Кроме того, полученные данные могут быть использованы при анализе спектров ^{13}C -ЯМР других полисахаридов, содержащих аналогичные остатки сахаров.

Экспериментальная часть

Выделение полисахарида из клеток *Sh. dysenteriae* тип 10 и получение олигосахаридов (II) и (III) описаны в работе [2].

Спектры ^{13}C -ЯМР записаны на спектрометре Bruker-Physik WP-60 при 15,08 МГц для растворов в D_2O при использовании метанола в качестве внутреннего стандарта; химические сдвиги даны в миллионных долях после пересчета по соотношению $\delta_{\text{TMS}} = \delta_{\text{MeOH}} + 50,15$ м.д., полученному в отдельном эксперименте; спектр полисахарида записан при 80° в присутствии триэтиламина (~5%), резко снижающего вязкость раствора (в отсутствие триэтиламина удовлетворительный спектр полисахарида получить не удалось); спектры олигосахаридов записаны при 20°.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шашков А. С., Чижов О. С. (1976) Биоорган. химия, **2**, 437-497.
2. Дмитриев Б. А., Книрель Ю. А., Шеремет О. К., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. (1977) Биоорган. химия, **3**, 1219-1225.
3. De Voer W. R., Krugssen F. Y., Wouters J. T. M., Kruk C. (1976) Eur. J. Biochem., **62**, 1-6.
4. Шашков А. С., Евстигнеев А. А., Деревницкая В. А. (1978) Биоорган. химия, **4**, 1495-1506.
5. Gorin P. A. J., Mazurek M. (1975) Can. J. Chem., **53**, 1212-1223.
6. Yamaoka N., Usui T., Sugiyama H., Seto S. (1974) Chem. and Farm. Bull., **22**, 2196-2200.
7. Gorin P. A. J. (1975) Carbohydr. Res., **39**, 3-10.

Поступила в редакцию
28.IX.1978

THE ^{13}C NMR SPECTRUM OF *SHIGELLA DYSENTERIAE*
TYPE 10 SPECIFIC POLYSACCHARIDE

SHASHKOV A. S., DMITRIEV B. A., KNIREL Yu. A.,
SHEREMET O. K., KOCHETKOV N. K.

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

The ^{13}C NMR spectrum of *Shigella dysenteriae* type 10 specific polysaccharide, as well as the spectra of oligosaccharide fragments produced from the title polysaccharide by two consecutive Smith's degradations were interpreted. The data fully confirmed the structure of the repeating unit of the specific polysaccharide which was earlier established by the other methods.
