



УДК 547.458.02:543.422.23

**СПЕКТР ^{13}C -ЯМР СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА
PSEUDOMONAS AERUGINOSA ТИП 7a, b****Шашков А. С., Кириель Ю. А., Бочарова Н. А.,
Дмитриев Б. А., Еочетков Н. К.***Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва*

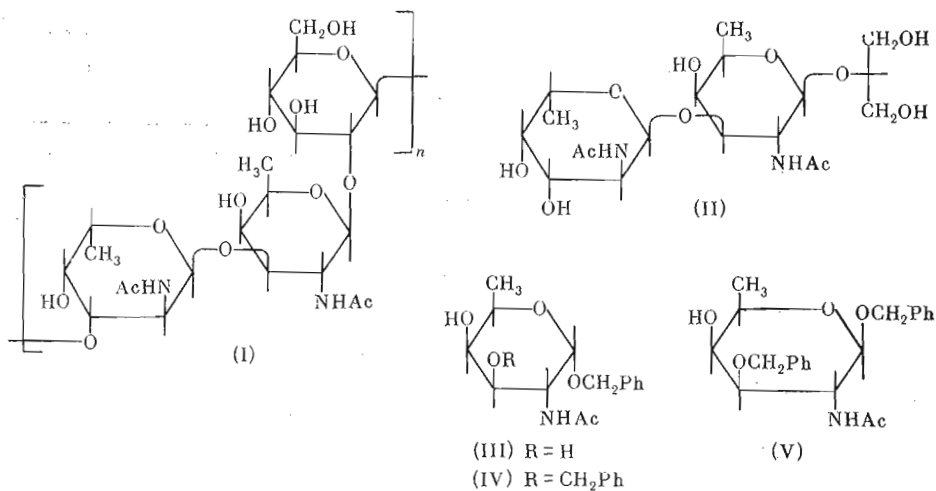
Полностью расшифрован ^{13}C -ЯМР спектр О-специфического полисахарида *Pseudomonas aeruginosa* О-серотип 7a, b. Последовательность моносахаридных остатков в повторяющемся олигосахаридном звене полисахарида и конфигурация всех гликозидных связей однозначно вытекали из результатов сравнительного исследования ^{13}C -ЯМР спектров модельных фукозаминидов, дисахаридного фрагмента, полученного из полисахарида распадом по Смитту, и самого полисахарида. Спектральные данные полностью подтверждают результаты проведенного ранее структурного исследования.

При исследовании специфического полисахарида *Shigella dysenteriae* тип 10 методом спектроскопии ^{13}C -ЯМР мы применили сравнительный анализ спектров исходного полимера и полученных из него олигосахаридных фрагментов и показали плодотворность такого подхода к установлению строения регулярных полисахаридов [1].

В настоящем сообщении мы приводим данные, подтверждающие эффективность такого подхода на примере доказательства строения другого бактериального полисахарида, а именно специфического полисахарида *Pseudomonas aeruginosa* О-серотип 7a, b (по классификации Лани). Структурной особенностью этого полисахарида, построенного из остатков D-глюкозы, N-ацетил-D-фукозамина и N-ацетил-L-фукозамина, является присутствие в составе повторяющегося трисахаридного звена обеих энантиомерных форм N-ацетилфукозамина [2], как показано на формуле (1).

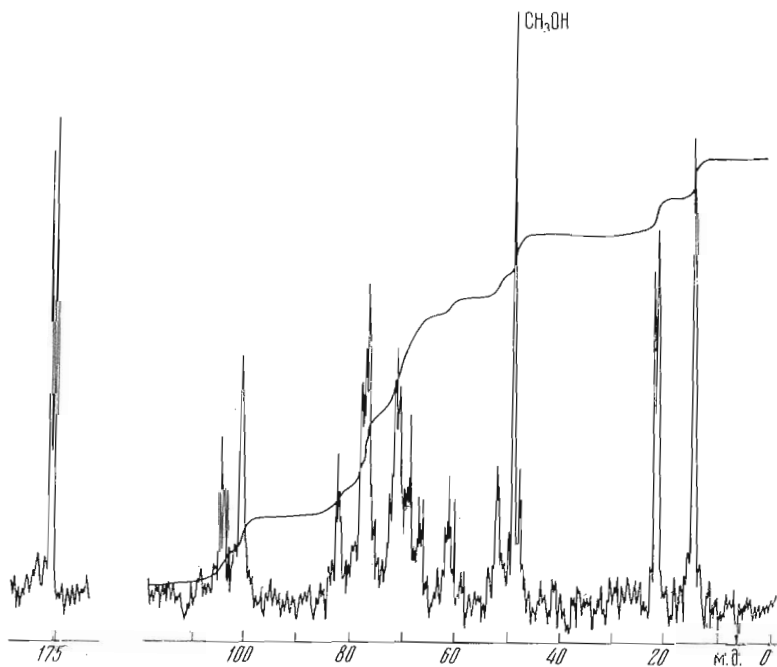
Анализ первого порядка спектра ^{13}C -ЯМР полисахарида, приведенного на рисунке, непосредственно позволяет идентифицировать сигналы трех аномерных атомов углерода (104,0 и 100,3 м.д. в соотношении 1:2), двух 6-дезоксигрупп (16,6 м.д.), двух N-ацетильных групп (23,4 и 175,4; 23,6 и 175,8 м.д.), а также сигналы двух атомов углерода, несущих ацетамидные группы (49,2 и 52,9 м.д.). Из приведенных данных следовало, что полисахарид построен из моносахаридных остатков трех типов, два из которых являются 2-ацетамидо-2,6-дидезоксигексозами, т. е. спектральные данные находились в полном соответствии с данными по химическому составу полисахарида, полученными ранее [2].

Для полной расшифровки спектра полисахарида был привлечен спектр олигосахаридного фрагмента (II), полученного из исследуемого полисахарида с помощью распада по Смитту [2], а также спектры модельных бензилфукозаминидов (III) и (IV). Анализ спектров был значительно



облегчен использованием химических данных [2] о типах замещения моносахаридных остатков в полисахаридной цепи.

Отнесение сигналов в спектрах модельных фукозаминидов было осуществлено исходя из предположения, что наличие ацетамидной группы в положении 2 вызывает те же изменения химических сдвигов в производных фукозы, что и при переходе от производных галактозы к производным N-ацетилгалактозамина. Так, простое алгебраическое сложение величин химических сдвигов C1—C6 метил- α -L-фукопиранозида [3] с инкрементами, представляющими собой разность между величинами химических сдвигов C1—C6 в α -D-галактопиранозе [3] и N-ацетил- α -D-галактозамине [4], позволило отнести сигналы в спектре фукозаминида (III) (табл. 1); сигнал при 70,8 м.д. методом исключения был отнесен к метиленовой группе бензильного агликона. Аналогично, исходя из разности величин



Спектр ¹³C-ЯМР специфического полисахарида *Pseudomonas aeruginosa* тип 7a, b

Экспериментальные и расчетные химические сдвиги в спектрах ^{13}C -ЯМР модельных соединений

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Ссылка
α -D-Галактоза	93,6	69,8	70,5	70,6	71,7	62,5	[3]
N-Ацетил-D-галактозамин	92,2	51,4	68,6	69,7	71,6	62,4	[4]
Инкремент	-1,4	-18,4	-1,9	-0,9	-0,1	-0,1	
α -Метил-L-фукопиранозид (III), расчетный	100,5	69,0	70,6	72,9	67,5	16,5	[3]
(III), экспериментальный	99,1	50,6	68,7	72,0	67,4	16,4	
α -Метил-D-галактопиранозид	101,4	70,2	70,9	70,5	72,1	62,65	[5]
Метил-3-О-метил- α -D-галактопиранозид	101,3	69,15	81,05	66,9	71,9	62,65	[5]
Инкремент (IV), расчетный исходя из (III)	-0,1	-1,05	+10,15	-3,6	-0,2	0	
(IV), экспериментальный	98,25	49,4	80,15	69,5	67,4	16,7	
α -Метил-L-фукопиранозид	98,1	49,8	77,65	69,5	67,6	16,8	[3]
β -Метил-L-фукопиранозид	100,5	69,0	70,6	72,9	67,5	16,5	[3]
Инкремент (V), расчетный исходя из (IV)	104,8	71,5	74,1	72,4	71,9	16,5	
	+4,3	+2,5	+3,5	-0,5	+4,4	0	
	102,4	52,3	81,15	69,0	72,0	16,8	

Таблица 2

Химические сдвиги в спектрах ^{13}C -ЯМР полисахарида (I), олигосахарид (II) и модельных соединений *

Соединение	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
(I)	β -D-Glc	100,3	82,45	77,05	71,3	77,05	62,4
	α -L-FucNAc	100,3	49,2	77,05	71,5	67,4	16,6
	β -D-FucNAc	104,0	52,9	78,1	69,3	72,1	16,6
(II)	Глицерин	62,6	78,25	62,6			
	α -L-FucNAc	100,4	50,8	68,4	72,25	67,7	16,6
	β -D-FucNAc	102,4	52,95	77,9	68,9	71,9	16,6
(III) ^{2*}	α -D-FucNAc	98,35	50,45	70,0	73,1	67,6	16,7
(IV) ^{3*}	α -D-FucNAc	98,1	49,8	77,65	69,5	67,6	16,8
(V)	β -D-FucNAc	102,4	52,3	81,15	69,0	72,0	16,8
β -Софороза ^{4*}	β -D-Glc	95,8	82,8	77,2	71,1	77,2	62,4

* В спектрах (I)–(V) присутствуют также сигналы ацетамидогрупп (CH_3 в области 22,6–23,6 м. д. и CO в области 173,3–175,8 м. д.).

^{2*} В спектре присутствуют сигналы бензильного остатка при 129 м. д. (C_6H_5) и 70,8 м. д. (CH_2).

^{3*} В спектре присутствуют сигналы бензильных остатков при 128,5–129,3 м. д. (C_6H_5 , 70,4 и 72,0 м. д. (CH_2)).

^{4*} Данные работы [8].

химических сдвигов метил- α -D-галактопиранозид и метил-3-О-метил- α -D-галактопиранозид [5], можно вычислить инкремент для оценки изменений химических сдвигов при переходе от фукозаминида (III) к 3-О-замещенному фукозаминиду (IV). Отнесенные таким образом величины химических сдвигов приведены в табл. 1; сигналы при 70,4 и 72,0 м. д. методом исключения отнесены на счет резонанса метиленовых атомов углерода бензильных остатков. Расхождение расчетных и экспериментальных данных (80,15 и 77,65 м. д.) для химического сдвига C3-атома в 3-О-замещенном фукозаминиде (IV) в данном случае несущественно и

вызвано различием в α -эффектах соответственно метильной и бензильной групп.

Далее, не имея в своем распоряжении модели 3-О-замещенного остатка N-ацетил- β -D-фукозаминида, мы определили величины химических сдвигов для бензил-N-ацетил-3-О-бензил- β -D-фукозаминида (V), исходя из предположения, что переход от соединения (IV) к соединению (V) будет сопровождаться такими же изменениями в химических сдвигах атомов C1—C6, как и в случае ($\alpha \rightarrow \beta$)-перехода у метилфукопиранозидов [3]. Полученные расчетные величины приведены в табл. 1 и были использованы для полной расшифровки спектра олигосахарида (II).

В соответствии с химическими данными олигосахарид (II) состоит из энантиомерных остатков N-ацетилфукозамина и глицерина, причем один из остатков N-ацетилфукозамина замещен в положение 3 [2]. Анализ спектра олигосахарида (II) показывает наличие в его составе двух пиранозных остатков, которым отвечают два сигнала равной интенсивности в области резонанса аномерных атомов углерода при 100,4 и 102,4 м.д., причем оба они несомненно являются остатками N-ацетилфукозамина. На это указывают два сигнала в области резонанса атомов углерода C2, связанных с аминогруппой (при 50,8 и 52,95 м.д.), а также сигналы двух N-ацетильных групп (CH₃ при 23,5 м.д. и CO при 175,4 и 175,8 м.д.) и двух 6-дезоксигрупп при 16,6 м.д. Значительная разность в химических сдвигах сигналов C2 в остатках N-ацетилфукозаминов (2,15 м.д.) указывает на различную конфигурацию аномерных центров этих сахаров, причем по аналогии с галактозаминовыми производными [6] более высокопольный сигнал при 50,8 м.д. обусловлен резонансом атома C2 α -связанного остатка N-ацетилфукозамина. При переходе от спектра олигосахарида (II) к спектру полисахарида (I) положение резонанса атома C2 β -связанного остатка N-ацетилфукозамина (52,95 м.д.) не меняется, в то время как сигнал атома C2 α -связанного остатка смещается на 1,6 м.д. в высокое поле, т. е. в направлении и на величину, характерные для β -эффекта гликозилирования [7]. Согласно этим данным, в олигосахариде (II) на невозстанавливаемом конце находится остаток N-ацетил- α -фукозамина, другими словами, вытекает последовательность остатков N-ацетил- α - и - β -фукозамина в полисахариде и подтверждается их замещение в положение 3.

Сигнал при 100,4 м.д. в спектре олигосахарида (II) вызван резонансом атома C1 остатка N-ацетил- α -фукозамина, тогда как более слабопольный сигнал при 102,4 м.д. принадлежит аномерному атому углерода остатка N-ацетил- β -фукозамина [7]. Низкопольное смещение сигнала C1 остатка N-ацетил- β -фукозамина от 102,4 до 104,0 м.д. при переходе от спектра (II), где заместитель при C1 — глицерин, к спектру полисахарида (I), где заместитель при C1 — глюкопираноза, подтверждает, что с остатком глицерина в олигосахариде (II) связан остаток N-ацетил- β -фукозамина. Отнесение сигналов аномерных атомов углерода в спектре полисахарида не вызывает сомнений, так как сигнал при 104,0 м.д. заведомо относится к атому C1 β -связанного остатка N-ацетил-фукозамина и, следовательно, сигнал двойной интенсивности при 100,3 м.д. принадлежит атомам C1 остатков N-ацетил- α -фукозамина и β -глюкопиранозы; вывод о конфигурации гликозидной связи последней будет обсужден ниже.

В области замещенных атомов углерода в спектре олигосахарида (II) имеются два сигнала при 77,9 и 78,25 м.д., один из которых следует отнести на счет резонанса C2 остатка глицерина (для C2 глицерина в 2-О-гликозилглицерине, выделенном из специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 10, найден химический сдвиг 78,4 м.д. [1]), а второй — на счет C3 остатка N-ацетил- β -фукозамина. Отнесение других линий спектра олигосахарида (II) было проведено с использованием спектральных характеристик производных (III) и (IV), а линий спектра полисахарида — срав-

нением со спектрами соединений (II) и (IV), а также с привлечением литературных данных для β -софорозы [8] (табл. 2). При этом обязательным требованием было достаточно точное совпадение резонансных линий атомов C2—C6 остатков N-ацетил- α -фукозамина в спектрах (III) и (II) и в спектрах (IV) и полисахарида, остатков N-ацетил- β -фукозамина в спектрах олигосахаридов (II) и полисахарида, а также остатков β -глюкопиранозы в спектрах β -софорозы и полисахарида, а также остатков β -глюкопиранозы на незначительную величину, определяемую различиями в условиях съемки спектров (растворитель, температура, концентрация).

Обращает на себя внимание необычное положение сигнала C1 β -связанного остатка глюкопиранозы в спектре полисахарида при 100,3 м.д., находящегося в области резонанса C1 α -глюкопиранозных остатков, тогда как сигналы аномерных атомов углерода β -глюкопиранозидов обычно находятся в области 103—104 м.д. [7, 8]. Однако α -конфигурация остатка глюкопиранозы в полисахариде исключается в связи с отсутствием в спектре сигналов атомов C3 и C5, характерных для 2-О-замещенных остатков α -глюкопиранозы, присутствующих в спектре α -софорозы (73,2 и 72,5 м.д.) [8]. С другой стороны, привлечение обычной поправки на β -эффект гликозилирования по C2 (~1,5 м.д.) [7] недостаточно для объяснения столь сильного (на 3,7 м.д.) сдвига в высокое поле. Ранее уже отмечался необычайно большой высокспольный сдвиг сигнала C1 (до 99,9 м.д.) для 2-О-замещенного остатка β -галактопиранозы в филоферине А [9], причиной которого было, по-видимому, влияние агликона. Мы полагаем, что дополнительное смещение сигнала C1 остатка 2-О-замещенной β -глюкопиранозы в сильное поле в спектре исследуемого полисахарида также обусловлено влиянием заместителя при C1, которым является остаток N-ацетил- α -фукозамина, имеющий аксиальную OH-группу при C4 и ацетамидогруппу при C2, т. е. в непосредственной близости к месту присоединения глюкозного остатка.

Аномальным кажется также химический сдвиг другого атома углерода, расположенного вблизи узла связи β -глюкопиранозы с N-ацетил- α -фукозамином, а именно атома C4 остатка N-ацетил- α -фукозамина в спектре полисахарида (71,5 м.д.) по сравнению со сдвигом C4 остатка N-ацетил- α -фукозамина в спектре фукозаминида (IV) (69,5 м.д.), так как ранее считалось, что химические сдвиги соседних по отношению к замещенному атомов углерода мало зависят от природы заместителя [7] (в данном случае бензил в гликозиде (IV) и остаток глюкопиранозы в полисахариде). Полученные данные показывают, что β -эффекты от замещения моносахаридных остатков в углеводах нельзя рассматривать вне связи со структурой присоединяемого моносахарида.

Таким образом, из анализа спектров полисахарида и олигосахаридов (II) следует, что повторяющееся звено полисахарида *Ps. aeruginosa* состоит из трех моносахаридных остатков, два из которых являются N-ацетилфукозаминами и один глюкозой, а также вытекает их последовательность в цепи и конфигурации их гликозидных связей. Эти данные полностью подтверждаются результатами установления строения полисахарида, проведенного ранее химическими методами, и могут быть использованы при расшифровке спектров ^{13}C -ЯМР и установлении строения других гексааминогликанов.

Экспериментальная часть

Выделение О-специфического полисахарида из клеток *Ps. aeruginosa* О-серотип 7a, b и получение олигосахаридного фрагмента (II) описаны в работе [2]. Бензил-2-ацетамидо-2,6-дидезокси-3-О-бензил- α -D-галактопиранозид (IV) синтезировали из N-ацетил-D-глюкозамина по методике [10].

Бензил-2-ацетамидо-2,6-дидезокси- α -D-галактопиранозид (III). 130 мг соединения (IV) в метаноле (10 мл) гидрировали 6 ч над 10% палладием

на угле при обычном давлении и температуре, катализатор отделяли фильтрованием, промывали метанолом (3×2 мл), объединенный фильтрат упаривали в вакууме, остаток (94 мг) хроматографировали на колонке с силикагелем в системе хлороформ – метанол и получали 74 мг производного (III) (выход 78%, т.пл. 202–205° С (из этанола), $[\alpha]_D^{20} +226,0^{\circ}$ (с 0,55, вода)), а также 18 мг 2-ацетамидо-2,6-дидезокси-*D*-галактозы. Для соединения (III) найдено, %: С 61,22; Н 6,99; N 4,72. $C_{15}H_{21}NO_5$. Вычислено, %: С 61,01; Н 7,17; N 4,74. Данные ПМР-спектра (δ , м.д.): 7,25 (5 Н, синглет, Ph), 1,87 (3 Н, синглет, CH_3CO), 1,14 (3 Н, дублет, J 6 Гц, CH_3CH).

ПМР-спектр снимали на приборе BS-497 при 100 МГц для раствора в дейтерометаноле с гексаметилдисилоксаном в качестве внутреннего стандарта. Спектры ^{13}C -ЯМР записаны на спектрометре Bruker WP-60 при 15,08 МГц при 20° С. Спектры соединений (I) и (II) получали для растворов в 2H_2O при использовании метанола в качестве внутреннего стандарта, химические сдвиги даны в м.д. после пересчета относительно тетраметилсилана по соотношению $\delta_{TMS} = \delta_{метанол} + 50,15$ м.д. Спектры (III) и (IV) получали для растворов в дейтерометаноле с использованием гексаметилдисилоксана в качестве внутреннего стандарта, относительно которого и приведены химические сдвиги.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Книрель Ю. А., Шермет О. К., Кочетков Н. К. (1979) Биоорган. химия, 5, 583–587.
2. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kocharova N. A., Kochetkov N. K., Stanislawski E. S., Mashilova G. M. (1980) Eur. J. Biochem., in press.
3. Gorin P. A. J., Mazurek M. (1975) Can. J. Chem., 53, 1212–1223.
4. Bhattacharjee A. K., Jennings H. J., Kenny C. P. (1978) Biochemistry, 17, 645–651.
5. Шашков А. С., Усов А. И., Яроцкий С. В., Рабовский А. Б. (1978) Биоорган. химия, 4, 1489–1494.
6. Yamaoka N., Usui T., Sugiyama H., Seto S. (1974) Chem. and Pharm. Bull., 22, 2196–2200.
7. Шашков А. С., Чижев О. С. (1976) Биоорган. химия, 2, 437–497.
8. Usui T., Yamaoka N., Matsuda K., Sugiyama H., Seto S., Tsumura K. (1973) J. Chem. Soc., Perkin I, 2425–2432.
9. Lemieux R. U., Ratcliffe R. M., Arrequin B., de Vivar A., Castillo M. J. (1977) Carbohydr. Res., 55, 113–120.
10. Liav A., Hildesheim J., Zehavi U., Sharon N. (1974) Carbohydr. Res., 33, 217–227.

Поступила в редакцию
24.XII.1979

^{13}C NMR SPECTRUM OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* O-SEROTYPE 7a, b SPECIFIC POLYSACCHARIDE

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

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

The ^{13}C NMR spectrum of the *Pseudomonas aeruginosa* O-serotype 7a, b specific polysaccharide was fully interpreted. The sequence of monosaccharide residues in the repeating oligosaccharide unit of the polysaccharide as well as the configuration of glycosidic linkages followed unequivocally from the comparative analysis of ^{13}C NMR spectra of model fucosaminides, disaccharide fragment produced from the title polysaccharide by Smith's degradation and the polysaccharide. The spectral data confirmed the results of earlier structural investigation of the polysaccharide.