



УДК 547.458.2.02 : 577.114.012.7

**СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛИСАХАРИДОВ С ЛИНЕЙНЫМ
ПОВТОРЯЮЩИМСЯ ЗВЕНОМ НА ЭВМ ПО ДАННЫМ
СПЕКТРОВ ^{13}C -ЯМР***Липкин Г. М., Шапков А. С., Кочетков Н. Б.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва*

Предложен способ анализа первичных структур полисахаридов с известным моносахаридным составом на ЭВМ с привлечением данных по спектрам ^{13}C -ЯМР и средним значениям α - и β -эффектов гликозилирования. С использованием аддитивной схемы эффектов гликозилирования были получены теоретические спектры ^{13}C -ЯМР для всевозможных структур ряда линейных полисахаридов. Найдено, что в каждом случае структура с наименьшей суммой квадратов отклонений химических сдвигов сигналов расчетного и экспериментального спектров ^{13}C -ЯМР соответствует найденным независимым путем последовательности и типам связей моносахаридных остатков в полисахариде.

В дисахаридном фрагменте олиго- или полисахаридов различают гликозилирующую (Hexp1) и гликозилированную (Hexp2) пиранозы. В результате образования гликозидной связи между остатками их спектры ^{13}C -ЯМР будут существенно отличаться от спектров исходных сахаров. Разность химических сдвигов соответствующих атомов углерода в спектрах ^{13}C -ЯМР остатка пиранозы в составе дисахаридного фрагмента и той же пиранозы в виде свободного моносахарида называют эффектом гликозилирования. α -Эффекты гликозилирования относят к изменению химических сдвигов атомов углерода, непосредственно участвующих в образовании гликозидной связи, β -эффекты — к изменению химических сдвигов соседних с ними атомов углерода. Терминологию, касающуюся α - и β -эффектов гликозилирования, можно распространить на любой дисахаридный фрагмент в составе олиго- или полисахаридов, если указать, какой остаток относится к Hexp1 и Hexp2.

Ранее [1—3] было показано, что эффекты гликозилирования в пиранозах с конформационно устойчивыми циклами существенно зависят от ряда структурных факторов, среди которых особенно важны: а) аномерная конфигурация Hexp1; б) абсолютная конфигурация Hexp1 и Hexp2; в) ориентация (аксиальная или экваториальная) гидроксила в Hexp2, непосредственно участвующего в образовании гликозидной связи, и двух соседних с ним заместителей; г) положение этого гидроксила в Hexp2. Последние два фактора определяются природой пиранозы Hexp1 и типом связи в дисахаридном фрагменте.

Вместе с тем эффекты гликозилирования (см. [3]) практически не зависят от природы и ориентации заместителей у атомов C2 — C5 остатка Hexp1, слабо зависят от природы заместителей у атомов C2 — C5 остатка Hexp2, аномерной конфигурации Hexp2 (естественное исключение составляет связь 1 → 2 согласно изложенному в пунктах «в» и «г»).

В случае линейных олиго- и полисахаридов эффекты гликозилирования во всех дисахаридных фрагментах практически совпадают с таковыми в соответствующих дисахаридах. Поэтому эффекты гликозилирования для какой-либо конкретной ситуации, указанной в пунктах «а—г», практически могут быть описаны инвариантными и переносимыми параметрами. Более того, анализ имеющихся данных по эффектам гликозилирования в трисахаридных фрагментах с 1,2-замещением в среднем остатке [4] показывает, что в тех случаях, когда на атомах углерода следует учитывать несколько эффектов гликозилирования, они оказываются (с точностью до $\pm 0,5$ м. д.) аддитивными величинами, т. е. учет эффектов гликозилирования можно проводить по аддитивной схеме.

Учитывая зависимость эффектов гликозилирования от характерных структурных факторов углеводной цепи (пункты «а» и «г»), можно поставить обратную задачу нахождения моносахаридных последовательностей олигосахаридов и регулярных полисахаридов по спектру ^{13}C -ЯМР, моносахаридному составу и известным α - и β -эффектом гликозилирования. Отметим, что эффекты гликозилирования успешно используются для бездеструктивного определения абсолютной конфигурации шпраноз по спектрам ЯМР олиго- и полисахаридов [5].

Располагая информацией по эффектам гликозилирования и спектрам ^{13}C -ЯМР незамещенных моносахаридов [6], для заданного моносахаридного состава можно построить теоретические спектры ^{13}C -ЯМР всех теоретически возможных первичных структур полисахарида. Вероятно, что структура, теоретический спектр которой в наименьшей степени отличается от экспериментального спектра, является искомой. Решение задачи, связанной с перебором большого числа вариантов структур углеводной цепи, наиболее естественно проводить на электронно-вычислительных машинах. В качестве критерия сопоставления мы выбрали сумму квадратов отклонений положений сигналов с одинаковым номером в теоретическом и экспериментальном спектрах (сигналы располагаются в порядке убывания величин химических сдвигов).

Алгоритм решения задачи на ЭВМ состоит из трех этапов: 1) генерация по моносахаридному составу всевозможных структур углеводной цепи; 2) вычисление спектра ^{13}C -ЯМР для каждой структуры; 3) сравнение расчетного и экспериментального спектров и нахождение структуры с наименьшим отклонением.

На первом этапе данной работы мы ограничились рассмотрением неразветвленных регулярных полисахаридных цепей, включающих только простые родоначальные сахара (глюкозу, маннозу и галактозу) и их модификации по С5 (например, рамнозу). Такой выбор обусловлен тем, что имеется богатая информация по спектрам ^{13}C -ЯМР дисахаридов и дисахаридных звеньев с *глюко*-, *манно*- и *галакто*-конфигурацией гликозилированного остатка (см. обзоры [4, 7]), которая позволяет определить α - и β -эффекты гликозилирования (более дальними эффектами мы пренебрегаем, так как они не являются диагностическими) и их средние значения в зависимости от указанных в пунктах «а—г» факторов. Разброс значений α - и β -эффектов гликозилирования не превышает $\pm 0,5$ — ± 1 м. д. Для большей статистической достоверности крайнее большое и крайнее малое значения эффектов при оценке среднего отбрасывались. При расчете α - и β -эффектов гликозилирования данные о химических сдвигах сигналов [4, 6] приводились к единому стандарту, при котором сигнал группы NH_2 рамнозы соответствует 17,9, CH_2OH — 61,5—62,5, группы CH_3 в NHCOSCH_3 — 23,1—23,8 м. д.

Важно отметить, что для линейных полисахаридов применение аддитивной схемы эффектов гликозилирования оправдано в наибольшей степени, тогда как в случае разветвленных полисахаридов этот вопрос требует специального рассмотрения.

Найденные средние значения эффектов гликозилирования для остатков с *манно*-, *галакто*- и *глюко*-конфигурацией в зависимости от абсолютной конфигурации гликозилирующего остатка Hexr1 (L или D) приведены в табл. 1 в виде матриц. В каждой матрице столбцы соответствуют номерам атомов углерода углеводного остатка, а строки — типам связей остатков ($\alpha 1$ -2, $\alpha 1$ -3... $\beta 1$ -6). Так как при связывании по типу 1-2 эффекты гликозилирования также зависят от аномерной конфигурации Hexr2 , соответствующие эффекты в табл. 1 приведены дважды. Поэтому матрицы включают по 10 строк. В зависимости от типа связи (1-2, 1-3, 1-4 или 1-6) α -эффект гликозилирования находится на 2,3,4-м или 6-м месте нужной строки соответственно, остальные члены матриц представляют собой β -эффекты гликозилирования. Для расчета спектров ^{13}C -ЯМР также необходимо учитывать α -эффекты гликозилирования для атома C1 гликозилирующего остатка Hexr1 . Эти характеристики в зависимости от конфигурации гликозилированного остатка приведены в табл. 2.

Матрицы эффектов гликозилирования для С-атомов 1–6 остатков
 Нех р 2 с манно-, галакто- и глюко-конфигурацией *

Связь **	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
манно-Конфигурация												
	<i>L-D(D-L) *</i>						<i>D-D(L-L)</i>					
$\alpha 1-2, \alpha$	-2,0	6,6	-1,6	0	0	0	-1,0	8,2	-0,2	0	0	0
$\alpha 1-2, \beta$	0	6,4	0	0	0	0	0,2	6,4	0	0	0	0
$\alpha 1-3$	0	-3,5	5,2	-1,7	0	0	0	-0,2	7,8	-1,1	0	0
$\alpha 1-4$	0	0	-1,3	7,6	-0,9	0	0	0	0,3	7,7	-1,5	0
$\alpha 1-6$	0	0	0	0	-1,0	6,8	0	0	0	0	-1,0	6,3
$\beta 1-2, \alpha$	-1,5	9,0	-0,2	0	0	0	-3,1	6,6	-1,6	0	0	0
$\beta 1-2, \beta$	-0,7	10,0	-0,5	0	0	0	0	10,0	0	0	0	0
$\beta 1-3$	0	-0,2	9,9	-1,1	0	0	0	-3,5	7,1	-1,7	0	0
$\beta 1-4$	0	0	0	7,3	-0,9	0	0	0	-1,3	9,7	-1,0	0
$\beta 1-6$	0	0	0	0	-1,0	7,6	0	0	0	0	-1,0	7,6
галакто-Конфигурация												
	<i>L-D(D-L)</i>						<i>D-D(L-L)</i>					
$\alpha 1-2, \alpha$	-1,0	8,0	-1,2	0	0	0	-2,5	3,8	-1,5	0	0	0
$\alpha 1-2, \beta$	-1,3	6,0	0,5	0	0	0	0	4,7	-1,5	0	0	0
$\alpha 1-3$	0	-1,5	7,8	0,6	0	0	0	-2,0	4,4	-3,5	0	0
$\alpha 1-4$	0	0	0	9,0	0	0	0	0	-0,6	9,0	0	0
$\alpha 1-6$	0	0	0	0	-1,0	5,6	0	0	0	0	-1,0	5,3
$\beta 1-2, \alpha$	-2,5	3,8	-1,5	0	0	0	0	9,2	-1,3	0	0	0
$\beta 1-2, \beta$	0	4,7	-1,5	0	0	0	-1,3	7,0	0,5	0	0	0
$\beta 1-3$	0	-2,0	6,4	-3,5	0	0	0	-1,5	8,2	0,6	0	0
$\beta 1-4$	0	0	-0,6	9,0	-1,4	0	0	0	0,3	9,0	-1,4	0
$\beta 1-6$	0	0	0	0	-1,0	7,6	0	0	0	0	-1,0	7,6
глюко-Конфигурация												
	<i>L-D(D-L)</i>						<i>D-D(L-L)</i>					
$\alpha 1-2, \alpha$	-1,0	8,0	-1,2	0	0	0	-2,5	3,8	-1,5	0	0	0
$\alpha 1-2, \beta$	-1,3	6,0	0,5	0	0	0	0	4,7	-1,5	0	0	0
$\alpha 1-3$	0	-0,2	7,7	-1,4	0	0	0	-1,6	6,1	-0,2	0	0
$\alpha 1-4$	0	0	-1,3	9,1	-0,9	0	0	0	0,1	7,7	-1,1	0
$\alpha 1-6$	0	0	0	0	-1,0	6,8	0	0	0	0	-1,0	5,3
$\beta 1-2, \alpha$	-2,5	6,0	-1,5	0	0	0	0	9,2	-1,3	0	0	0
$\beta 1-2, \beta$	0	4,7	-1,5	0	0	0	-1,3	7,0	0,5	0	0	0
$\beta 1-3$	0	-1,6	6,1	-0,2	0	0	0	-0,2	9,1	-1,4	0	0
$\beta 1-4$	0	0	-0,4	-9,0	-0,9	0	0	0	-1,3	9,7	-1,0	0
$\beta 1-6$	0	0	0	0	-1,0	7,6	0	0	0	0	-1,0	7,6

* Над матрицами указаны абсолютные конфигурации связанных остатков.

** Второй конфигурационный параметр относится к гликозилированному остатку.

Таблица 2

α -Эффекты гликозилирования для атомов С1 гликозилирующих остатков,
 когда гликозилированными являются остатки с манно-, галакто- и
 глюко-конфигурацией

Связь *	манно-		галакто-		глюко-	
	<i>L-D(D-L)</i>	<i>D-D(L-L)</i>	<i>L-D(D-L)</i>	<i>D-D(L-L)</i>	<i>L-D(D-L)</i>	<i>D-D(L-L)</i>
$\alpha 1-2, \alpha$	4,4	8,1	7,4	4,0	7,4	4,0
$\alpha 1-2, \beta$	7,0	6,6	6,8	6,0	6,8	6,0
$\alpha 1-3$	4,2	7,7	8,2	3,5	6,8	6,8
$\alpha 1-4$	7,2	7,8	7,8	8,6	7,2	7,8
$\alpha 1-6$	6,8	5,9	6,8	5,9	6,8	5,9
$\beta 1-2, \alpha$	8,1	4,4	4,0	7,4	4,0	7,4
$\beta 1-2, \beta$	7,8	7,8	6,8	6,8	6,0	6,8
$\beta 1-3$	7,7	4,2	3,5	8,2	6,8	6,8
$\beta 1-4$	7,5	6,9	6,8	7,8	7,5	6,9
$\beta 1-6$	6,6	6,8	6,6	6,8	6,6	6,8

* См. примечание к табл. 1.

При изменении абсолютной конфигурации обоих остатков в дисахаридном звене эффекты гликозилирования сохраняются. Поэтому данные табл. 1 и 2 можно распространить на случаи, когда гликозилированный остаток имеет *L*-конфигурацию (например, как *L*-рамноза или *L*-фруктоза). При этом для комбинации остатков *L-L* следует воспользоваться матрицей, соответствующей случаю *D-D*, а для комбинации остатков *D-L* — матрицей типа *L-D*, как, например, для звеньев *D-Glc-L-Rha*. Поэтому для анализа и расчета спектров ^{13}C -ЯМР углеводных цепей, включающих простые сахара, достаточно ограничиться только 6 матрицами эффектов гликозилирования (табл. 1), а также данными табл. 2.

Введение матриц эффектов гликозилирования позволяет формализовать исходные данные в виде, удобном для расчетов спектров ^{13}C -ЯМР на ЭВМ. Если матрицы табл. 1 обозначить как $B(k, l)$ (k — символ типа связи, принимает значения от 1 до 10, l — номер атома углерода, изменяется от 1 до 6), матрицы табл. 2 — $A(m)$ (m — символ связи), а спектры ^{13}C -ЯМР свободного моносахаридного остатка и этого же остатка в углеводной цепи представить в виде матриц $\delta^0(l)$ и $\delta(l)$, то формулы для расчета спектра ^{13}C -ЯМР принимают следующий вид:

$$\delta(l) = \delta^0(l) + B(k, l) + A(m) \quad (l = 1),$$

$$\delta(l) = \delta^0(l) + B(k, l) \quad (l = 2 \dots 6)$$

(здесь k и m — типы связей перед и за данным остатком в цепи). Для концевых невозстанавливающих остатков олигосахаридов эти формулы таковы:

$$\delta(l) = \delta^0(l) + A(m) \quad (l = 1),$$

$$\delta(l) = \delta^0(l) \quad (l = 2 \dots 6).$$

Предлагаемый способ расшифровки первичной структуры углеводных цепей по спектрам ^{13}C -ЯМР был опробован нами на целом ряде *O*-антигенных полисахаридов бактерий с известной первичной последовательностью, для которых имеется отнесение спектров ^{13}C -ЯМР. Были рассмотрены линейные гомо- и гетерополисахариды. В случае гетерополисахаридов задача осложняется необходимостью учитывать всевозможные перестановки остатков в повторяющемся звене.

Предварительный анализ спектров ^{13}C -ЯМР предоставляет прямую информацию, которая позволяет резко ограничить число перебираемых вариантов. Во-первых, число α - и β -аномеров обычно известно из спектра ^{13}C -ЯМР на основе значений констант спин-спинового взаимодействия $^1J_{\text{C1-H1}}$. Во-вторых, можно легко установить число 6-дезоксисахаров (по сигналам при 16—18 м. д.). В-третьих, можно определить число сахаров со свободной группой CH_2OH (61—62 м. д.) или замещенной группой CH_2OR (65—70 м. д.).

Для проверки предложенного подхода в качестве гомополисахаридов нами были выбраны три рамнана с трисахаридными повторяющимися звеньями:



(*P. syringae*, *натовар morsprunorum*, штамм C28 [8]),



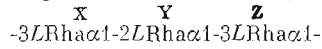
(*Bacillus stearothermophilus*, штамм NRS 2004/3a [9]),



(*P. sepacia*, штамм IMV 3181 [10]).

Учитывая, что рамноза является 6-дезоксисахаром, на каждом звене мы ограничились перебором 6 типов связей: $\alpha 1-2$, $\alpha 1-3$, $\alpha 1-4$, $\beta 1-2$, $\beta 1-3$ и $\beta 1-4$, т. е. в данных примерах для проверки метода какие-либо дополнительные ограничения на число остатков с α - и β -конфигурацией в повторяющемся звене не вводились. Поэтому было рассмотрено 288 вариантов в каждом случае.

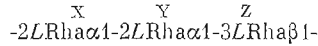
Химические сдвиги (м. д.) в рассчитанном и экспериментальном [8] (в скобках) спектрах ^{13}C -ЯМР полисахарида *P. syringae*



Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
X	103,1 (103,0)	71,7 71,3	78,9 79,0	72,2 72,8	69,4 70,4	18,0 17,8)
Y	101,7 (101,9)	80,1 79,3	70,9 71,4	73,3 73,7	69,4 70,5	18,0 17,9)
Z	102,7 (103,0)	71,7 71,3	78,9 79,0	72,2 72,7	69,4 70,4	18,0 17,8)

Таблица 4

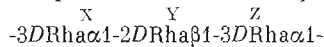
Химические сдвиги (м. д.) в рассчитанном и экспериментальном [9] (в скобках) спектрах ^{13}C -ЯМР полисахарида *B. stearothermophilus*



Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
X	100,1 (101,1)	78,5 78,4	69,5 70,8	73,3 73,3	69,4 70,5	18,0 17,9)
Y	101,7 (102,0)	80,1 79,8	70,9 71,1	73,3 73,5	69,4 70,6	18,0 17,9)
Z	99,0 (99,4)	72,2 72,1	81,6 81,0	71,8 72,9	73,1 73,7	18,0 17,9)

Таблица 5

Химические сдвиги (м. д.) в рассчитанном и экспериментальном [10] (в скобках) спектрах ^{13}C -ЯМР полисахарида *P. serpens*



Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
X	101,6 (102,6)	71,7 71,3	78,9 79,0	72,2 72,7	69,4 70,2	18,0 17,9)
Y	99,0 (98,1)	78,8 78,8	73,8 74,5	72,9 73,5	73,1 73,8	18,0 17,9)
Z	102,7 (103,2)	68,4 68,7	78,2 78,5	71,6 71,7	69,4 70,3	18,0 18,0)

Для всех трех полисахаридов найдено, что структура с минимальной суммой квадратов отклонений сигналов от наблюдаемого спектра ^{13}C -ЯМР точно соответствует экспериментальной. Параметры рассчитанных спектров ^{13}C -ЯМР для таких оптимальных структур вместе с экспериментальными данными приведены в табл. 3—5. Ниже для каждого полисахарида приводится ряд предлагаемых последовательностей в порядке возрастания квадратичных отклонений (в скобках):

P. syringae

- 3LRha α 1-2LRha α 1-3LRha α 1- (5,4),
- 3LRha α 1-3LRha α 1-3LRha α 1- (7,5),
- 3LRha α 1-2LRha α 1-2LRha α 1- (8,1),
- 2LRha α 1-2LRha α 1-2LRha α 1- (9,6)*;

* Для других вариантов квадратичное отклонение > 20.

B. stearothermophilus

-2LRha α 1-2LRha α 1-3LRha β 1- (7,0),

-2LRha α 1-2LRha α 1-4LRha β 1- (8,0),

-2LRha α 1-3LRha α 1-4LRha β 1- (10,0),

-2LRha α 1-3LRha α 1-3LRha β 1- (10,5)*;

P. cepacia

-3DRha α 1-2DRha β 1-3DRha α 1- (5,4),

-3DRha α 1-4DRha β 1-3DRha α 1- (9,6),

-2DRha α 1-2DRha β 1-3DRha α 1- (11,0),

-2DRha α 1-4DRha β 1-3DRha α 1- (11,3)*.

На примере трех рамнанов мы видим, что в двух случаях квадратичное отклонение от наблюдаемого спектра ^{13}C -ЯМР существенно меньше для расчетной структуры, соответствующей реальной последовательности. Далее, расчет правильно выделяет число α - и β -аномеров в структурах полисахаридов, так как во всех вариантах с небольшими величинами квадратичных отклонений эти числа сохраняются. Из данного анализа вполне определенно следует присутствие связи β 1-2 в *B. stearothermophilus* и связи β 1-3 в *P. cepacia*. Вместе с тем наличие вариантов с близкими значениями квадратичных отклонений, как, например, в случае полисахарида *P. syringae*, для которого, согласно расчету, в одноименных дисахаридных звеньях LRha-LRha высока вероятность присутствия как связей α 1-2, так и α 1-3, отражает вполне реальную ситуацию, когда по одним только химическим сдвигам в спектре ^{13}C -ЯМР действительно трудно отличить один тип связывания от другого.

Один из выбранных нами примеров гетерополисахарида — полисахарид *Shigella flexneri* (вариант Y) [11, 12].

-2LRha α 1-2LRha α 1-3LRha α 1-3DGlcNAc β 1-

фактически примыкает к разобранной выше группе рамнанов, так как в этом случае последовательность остатков в повторяющемся звене (без учета типа связей) можно задать только одним способом. Эффекты гликозилирования для остатка N-ацетилглюкозамина совпадают с эффектами для глюкозы, за исключением того, что β -эффект для атома C2 в матрице L-D (Glc) в случае связи α 1-3 и в матрице D-D (Glc) в случае связи β 1-3 (табл. 1) следует брать равным $-1,0$ м. д. При переборе вариантов в соответствии с данными о $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ [12] мы ограничились последовательностями, включающими три α -аномера и один β -аномер сахаров. При этом допускалось, что как остатки рамнозы, так и N-ацетилглюкозамин могут иметь α - и β -конфигурацию. Вновь структура с минимальным квадратичным отклонением соответствует экспериментальной последовательности (табл. 6). Ниже приводится несколько последовательностей в порядке возрастания отклонений (в скобках):

-2LRha α 1-2LRha α 1-3LRha α 1-3DGlcNAc β 1- (6,6),¹

-2LRha α 1-3LRha α 1-3LRha α 1-3DGlcNAc β 1- (8,3),

-3LRha α 1-3LRha α 1-3LRha α 1-3DGlcNAc β 1- (9,9),

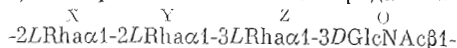
-2LRha α 1-3LRha α 1-2LRha α 1-3DGlcNAc β 1- (10,2)

-3LRha α 1-2LRha α 1-3LRha α 1-4DGlcNAc β 1- (10,2).

Очевидно, что наблюдаемому спектру ^{13}C -ЯМР может удовлетворять только структура, в которой все остатки рамнозы имеют α -конфигурацию, а N-ацетилглюкозамин — β .

* Для других вариантов квадратичное отклонение > 15 .

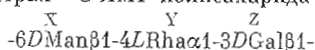
Химические сдвиги (м. д.) в рассчитанном и экспериментальном [12]
(в скобках) спектрах ^{13}C -ЯМР полисахарида *Sh. flexneri*



Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
X	101,6 (102,1)	80,9 79,9	70,9 71,1	73,3 73,7	69,4 70,2	18,0 17,9
Y	101,7 (101,9)	80,1 79,3	70,9 71,3	73,3 73,5	69,4 69,8	18,0 17,8
Z	101,8 (102,2)	71,7 71,8	78,9 78,6	72,2 72,8	69,4 70,4	18,0 17,6
Q	104,3 (103,3)	57,0 56,7	82,9 82,7	69,8 70,2	77,2 77,1	62,0 62,1

Таблица 7

Химические сдвиги (м. д.) в рассчитанном и экспериментальном [13]
(в скобках) спектрах ^{13}C -ЯМР полисахарида *S. newington*

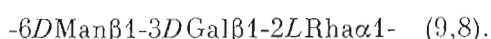
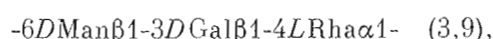
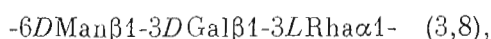
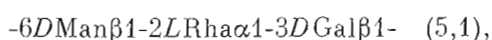
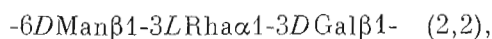
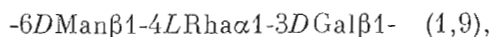


Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
X	102,1 (101,8)	72,3 71,6	74,1 74,3	67,8 68,0	76,2 76,3	69,7 70,3
Y	103,2 (103,4)	71,9 71,4	71,4 71,6	80,6 80,8	68,5 69,1	18,0 18,5
Z	104,5 (104,3)	71,8 71,4	82,0 81,8	70,7 69,7	76,3 76,5	62,3 62,1

В случае гетерополисахарида *Salmonella newington*, в котором повторяющееся звено включает три различных остатка [13],



задача осложняется тем, что при наличии только данных по его моносахаридному составу можно предположить два варианта последовательности в повторяющемся звене: Man-Rha-Gal и Man-Gal-Rha. Располагая спектром ^{13}C -ЯМР этого полисахарида [13], в котором имеются сигналы в графиках 16—18, 61—62 и 65—70 м. д., сразу можно заключить, что повторяющееся звено включает один дезоксисахар, один сахар со свободной CH_2OH -группой и один сахар, замещенный по этой группе. Поэтому при рассмотрении каждой возможной последовательности мы ограничились вариантами, в которых в одном случае замещены по положению 6 остатки маннозы, а в другом — остатки галактозы. В результате расчета найдено, что структура с минимальным квадратичным отклонением точно соответствует экспериментальной последовательности (табл. 7). Среди вариантов, для которых квадратичное отклонение незначительно превосходит отклонение в оптимальной структуре (в пределах 10):



во всех случаях аномерная конфигурация остатков является истинной, а замещенной по 6-положению оказывается только манноза (а не галактоза), что также соответствует действительности. Вместе с тем наряду с последовательностью Man-Rha-Gal высока вероятность последовательности Man-Gal-Rha. Это не случайно, так как эффекты гликозилирования, например для остатка галактозы, в звеньях $LRha\alpha 1-3DGal$ и $DMan\beta 1-3DGal$ равны (см. табл. 1). Однако число альтернативных структур, отобранных расчетом, невелико (не больше 5), если учесть, что перебор был проведен для 288 мыслимых вариантов.

Таким образом, расчетный способ, предложенный в данной работе, позволяет определить единственную структуру повторяющегося звена полисахарида, отвечающую данному моносахаридному составу и экспериментальному спектру ^{13}C -ЯМР, как, например, для полисахарида *P. serasia*, или отобрать ограниченный набор (как правило, не более 5) альтернативных структур. В последнем случае выбор между вариантами может быть осуществлен после применения специальных методик (химических или спектроскопических) или же по дополнительным (помимо эффектов гликозилирования) спектральным признакам. Следует отметить, что матрицы гликозилирования (табл. 1) составлены на основании сопоставления спектров ^{13}C -ЯМР ограниченного числа ди- и олигосахаридов [4, 7]. Дальнейшие исследования спектров ^{13}C -ЯМР у полисахаридов с известной структурой могут существенно уточнить средние величины эффектов гликозилирования, а следовательно, повысить предсказательную силу предложенную в настоящей работе способа анализа первичных структур полисахаридов.

Удовлетворительные результаты анализа по спектрам ^{13}C -ЯМР первичной последовательности линейных полисахаридов, включающих простые родоначальные сахара, позволяют надеяться на расширение круга рассматриваемых объектов после подробного изучения конкретных эффектов гликозилирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шашков А. С., Усов А. И., Книрель Ю. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 9. С. 1364—1371.
2. Шашков А. С. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 2. С. 246—253.
3. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. № 2. P. 173—185.
4. Bock K., Pedersen C., Pedersen H. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1984. V. 42. P. 193—225.
5. Shashkov A. S., Knirel Yu. A., Kasyanchuk N. V., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. № 2. P. C9—C11.
6. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27—65.
7. Bradbury J. H., Jenkins G. A. // Carbohydr. Res. 1984. V. 126. № 1. P. 125—126.
8. Smith A. R. W., Zamze S. E., Munro S. M., Carter K. J., Hignett R. C. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 149. № 1. P. 73—78.
9. Christian R., Schulz G., Unger F. M., Messner P., Küpcü Z., Sleytr U. B. // Carbohydr. Res. 1986. V. 150. P. 265—272.
10. Shashkov A. S., Knirel Yu. A., Tanatar N. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1986. V. 146. № 2. P. 346—349.
11. Bock K., Josephson S., Bundle D. R. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1982. № 1. P. 59—70.
12. Kochetkov N. K., Byramova N. E., Tselkov Yu. E., Backinowsky L. V. // Tetrahedron Lett. 1985. V. 41. № 16. P. 3363—3375.
13. Kochetkov N. K., Betanelli V. I., Ovchinnikov M. V., Backinowsky L. V. // Tetrahedron. 1981. V. 37. № 9. P. 149—156.

Поступила в редакцию
10.IX.1986

COMPUTERISED ANALYSIS OF LINEAR POLYSACCHARIDES ON THE BASIS OF
¹³C NMR DATA

LIPKIND G. M., SHASHKOV A. S., KOCHETKOV N. K.

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

The possibility of computerised analysis of primary structures of polysaccharides on the basis of ¹³C NMR data and average values of α - and β -effects of glycosidation was evaluated. Theoretical ¹³C NMR spectra for all possible structures of some linear polysaccharides were calculated by using additive scheme of glycosidation effects. In each case it was found that the structure characterised by the least sum of squared deviations of chemical shifts for the signals in the calculated and experimental spectra corresponds to the sequence and modes of linkages between monosaccharide residues in polysaccharides determined by an independent way.