

**Химические сдвиги атомов углерода в полимерах (I) и (II)
и модельных соединениях***
Растворы в $^2\text{H}_2\text{O}$, внутренний эталон — CH_3OH , 50,15 м.д.

Соединение	Остаток	Химические сдвиги					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6
(I)	<i>L</i> -Rha α	101,75	70,85	79,4	72,2	70,85	17,9
	<i>D</i> -GlcNAc β	103,9	57,2	75,2	78,9	75,8	62,5
	<i>L</i> -Rha β	99,2	77,3	83,7	72,6	73,5	17,5
	<i>D</i> -GlcUA β	104,8	73,0	75,8	80,3	74,7	175,1
	<i>D</i> -Glc α	98,9	71,6	74,0	70,85	72,6	61,6
(II)	<i>L</i> -Rha α	101,5	70,9	79,2	72,2	70,9	17,9
	<i>D</i> -GlcNAc β	103,8	57,3	75,0	78,75	75,65	62,2
	<i>L</i> -Rha β	99,2	76,8	83,4	72,6	72,8	17,7
	<i>D</i> -Glc β	104,85	72,8	75,6	78,75	75,0	61,7
	<i>D</i> -Glc α	98,6	71,7	74,1	70,9	72,8	61,7
(III)	<i>L</i> -Rha α	101,75	70,7	81,3	72,1	70,55	17,9
	<i>D</i> -GlcNAc β	103,9	57,2	74,8	78,1	75,65	62,0
	<i>L</i> -Rha β	102,1	72,0	74,1	73,5	73,35	17,9
	<i>D</i> -EryA	62,0	76,2	72,8	179,2		
(IV)	<i>L</i> -Rha α	101,75	70,7	81,2	72,1	70,5	17,95
	<i>D</i> -GlcNAc β	103,95	57,1	75,0	71,1	76,9	66,8
	<i>D</i> -EryA	61,8	76,25	72,7	179,3		
(V)	<i>L</i> -Rha α, β	{ 94,5	72,3	83,4	73,4	73,3	18,0
		{ 94,8	71,8	81,0	72,3	69,8	18,0
	<i>D</i> -GlcNAc β	103,9	57,0	74,9	71,0	76,9	61,8
(VI)	<i>L</i> -Rha α	102,3	71,4	71,7	73,4	69,6	18,0
(VII)	<i>L</i> -Rha β	102,4	71,8	74,1	73,4	73,4	17,9

* Атомы углерода N-ацетильной группы остатка GlcNAc резонируют при 23,4 м.д. (CH_3CON) и 175,6—176,1 м.д. (CH_2CON). EryA — эритроновая кислота.

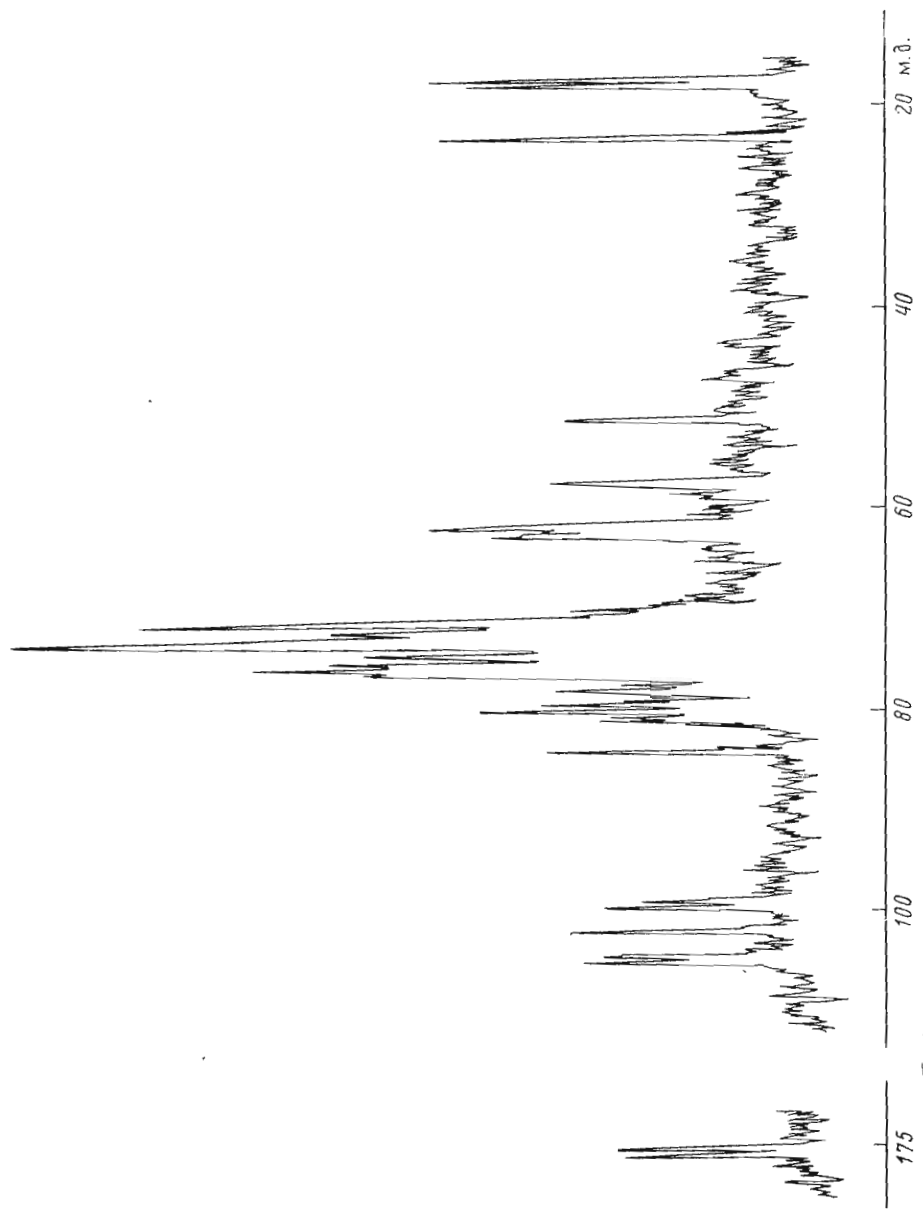
В настоящей работе мы приводим данные и полную интерпретацию ^{13}C -ЯМР-спектра антигенного полисахарида *Sh. boydii* тип 4, которые подтверждают установленную ранее структуру (I).

Анализ спектра ^{13}C -ЯМР полисахарида *Sh. boydii* тип 4 (рисунок) позволяет непосредственно определить, что в состав повторяющегося звена полисахарида входят пять моносахаридных остатков, поскольку в области резонанса аномерных атомов углерода имеются пять сигналов с соотношением интегральных интенсивностей, близких к единичным (см. таблицу).

Учитывая, что в состав повторяющегося звена полисахарида входят три остатка моносахаридов с глюко-конфигурацией (*D*-глюкоза, *D*-глюкуроновая кислота и 2-ацетида-2-дезоксид-*D*-глюкоза), и предполагая, что все они находятся в пиранозной форме можно заключить, что два из этих остатков присоединены β -гликозидными связями [5, 6] и им принадлежат два слабopольных сигнала в аномерной области (104,8 и 103,9 м.д.). О наличии остатка 2-ацетида-2-дезоксид-*D*-глюкозы свидетельствуют сигналы метильного углерода ацетида-группы (23,4 м.д.) и атома C2, связанного с ацетида-группой (57,2 м.д.), причем последний сигнал может соответствовать только остатку β -связанного 4- или 6-О-замещенного N-ацетил-*D*-глюкозамина [6, 7], поскольку в случае 3-О-замещенного N-ацетил-*D*-глюкозамина сигнал C2 вследствие β -эффекта находился бы в более сильном поле.

Два сигнала (17,9 и 17,5 м.д.) принадлежат C6-атомам двух остатков *L*-рамнозы, сигналы в самом слабом поле (175,65 и 175,1 м.д.) относятся к карбонильным атомам ацетида-группы глюкозамина и карбоксильной группы глюкуроновой кислоты, а два сигнала незамещенных НОСН₂-

Спектр ^{13}C -ЯМР специфического
го полисахарида из *Shigella*
boydii тип 4



групп (62,5 и 61,6 м.д.) принадлежат остаткам *D*-глюкозы и *N*-ацетилглюкозамина. Таким образом, число C1- и C6-атомов соответствует пяти моносахаридным остаткам повторяющегося звена специфического полисахарида. Кроме того, как показано выше, данные спектра свидетельствуют о типе замещения остатка *N*-ацетилглюкозамина и конфигурации его гликозидной связи.

Следующая деталь структуры повторяющегося звена полисахарида вытекает из спектра восстановленного по карбоксильным группам полисахарида (II). В спектре восстановленного полисахарида в области резонанса CO-атомов остается один сигнал (175,5 м.д.) и появляется новый пик незамещенной оксиметильной группы (сигнал при 61,7 м.д. приобретает удвоенную интенсивность), что говорит о полном превращении остатка глюкуроновой кислоты в глюкозу. Заметное изменение в спектре восстановленного полисахарида происходит также и в области замещенных атомов углерода. Так, вместо сигнала с химическим сдвигом 80,3 м.д. появляется сигнал при 78,75 м.д., имеющий удвоенную интенсивность по сравнению с сигналом при 78,9 м.д. в спектре нативного полисахарида. Таким образом, в результате восстановления остатков урановой кислоты сигнал одного из замещенных атомов углерода сместился на 1,5 м.д. в более сильное поле. Такое смещение сигнала характерно только для атома C4 при переходе от глюкуроновой кислоты к глюкозе [8]. Следовательно, остаток *D*-глюкуроновой кислоты замещен в полисахаридной цепи в положении 4.

Дальнейший анализ спектров затруднен необходимостью выбора из большого числа различных вариантов замещения конфигурации и последовательности моносахаридных остатков в повторяющихся звеньях полисахаридов. Хотя число таких вариантов несколько ограничивается уже известными сведениями о характере замещения остатков 2-ацетида-2-дезоксид-β-*D*-глюкозы и глюкуроновой кислоты, тем не менее оно остается чрезвычайно большим. Поэтому альтернативным путем является рассмотрение спектров ¹³C-ЯМР олигосахаридных фрагментов — продуктов избирательного расщепления полисахаридной цепи.

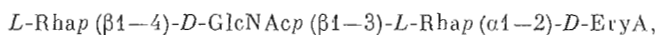
В связи с этим специфический полисахарид был подвергнут двум последовательным распадам по Смитсу. В результате первого расщепления был выделен олигосахарид (III), построенный из остатков *L*-рамнозы, *N*-ацетил-*D*-глюкозамина и эритроновой кислоты в соотношении 2:1:1. Повторный распад привел к олигосахариду (IV), построенному из эквивалентных количеств *L*-рамнозы, *N*-ацетил-*D*-глюкозамина и эритроновой кислоты [4].

Моносахаридный состав олигосахаридов (III) и (IV) подтверждается данными их спектров ¹³C-ЯМР. Очевидно, что соединение (IV) содержит два моносахаридных остатка, поскольку в его спектре имеются две линии единичной интегральной интенсивности, соответствующие аномерным атомам углерода (103,5 и 101,75 м.д.). Общее число линий в спектре олигосахаридов (IV) 18. Две из них с хим. сдвигом 23,4 и 176,0 м.д. принадлежат ацетидагруппе аминсахара. Следовательно, в состав олигосахаридов (IX) входят два гексозных остатка и агликон, содержащий четыре атома углерода. Наличие в спектре соединения (IV) сигнала со сдвигом 17,85 м.д. указывает на присутствие остатка *L*-рамнозы, а обнаружение сигналов со сдвигами 176,0; 57,1 и 23,4 м.д. подтверждает наличие остатка 2-ацетида-2-дезоксид-*D*-глюкозы; сигналы со сдвигами 179,3 и 61,8 м.д. соответствуют терминальным атомам углерода остатка *D*-эритроновой кислоты.

Аналогичным образом подтверждается моносахаридный состав олигосахаридов (III). Наличие сигнала удвоенной интегральной интенсивности со сдвигом 17,9 м.д. и появление третьего сигнала в области резонанса аномерных атомов углерода (102,1 м.д.) в спектре соединения (III) указывают на то, что моносахаридный состав олигосахаридов (III) отличается от состава соединения (IV) присутствием второго остатка *L*-рамнозы.

Детальный анализ спектров олигосахаридов (III) и (IV) позволил установить последовательность входящих в их состав моносахаридных остатков, а также характер их замещения и конфигурации гликозидных связей. Отнесение сигналов в спектре олигосахаридов (IV) было проведено на основании литературных данных спектра 3-О-(2-ацетидамо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид)-L-рамнозы (V) [9]. При сопоставлении спектров соединений (IV) и (V) обнаружилось, что восемью линиями, соответствующим остатку 2-ацетидамо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид в спектре соединения (V), соответствуют восемь линий в спектре олигосахаридов (IV) с точностью ±0,1 м.д. (см. таблицу). Следовательно, в олигосахариде (IV) остаток N-ацетид-D-глюкозамина расположен на невозстанавливаемом конце и присоединен к остатку L-рамнозы. Выяснение типа замещения остатка L-рамнозы и конфигурации ее связи облегчается тем, что в спектре олигосахаридов (IV) имеется сигнал (81,2 м.д.), совпадающий с сигналом атома C3 α-L-рамнопиранозидного остатка в модельном соединении (V). Отсюда можно заключить, что остаток L-рамнозы в соединении (IV) находится в пиранозидной форме, присоединен к эритроновой кислоте α-рамнозидной связью и замещен в положение 3. Далее становится возможным выделить остальные пять линий спектра, соответствующих этому остатку. Сигнал C1 отнесен методом исключения. Химический сдвиг C2 найден с учетом поправки на замещение по C1, которая представляет собой разность величин химических сдвигов сигналов C2 в α-L-рамнопиранозиде и метид-α-L-рамнопиранозиде (0,9 м.д.) [5]. Таким образом, сопоставляя спектры олигосахаридов (IV) и (V) и вводя необходимые поправки в значения химических сдвигов, можно считать доказанным, что олигосахарид (IV) имеет структуру D-GlcNAc(β1-3)-L-Rha(α1-2)-DEryA. Величины химических сдвигов приведены в таблице.

Данные спектра дисахаридного фрагмента (IV) позволяют определить структуру трисахаридов (III), в составе которых имеются два остатка L-рамнозы. Моделями для определения конфигурации C1 второго остатка L-рамнозы служили α- и β-метид-L-рамнопиранозиды (VI и VII соответственно). Набор из трех линий, имеющийся в спектре олигосахаридов (III) (73,3-74,1 м.д.), оказался характерным и для метид-β-L-рамнопиранозидов [5], что указывает на β-конфигурацию остатка L-рамнопиранозид, расположенного на невозстанавливаемом конце олигосахаридов (III). Спектр этого остатка наряду с указанными сигналами 73,35; 73,5 и 74,1 м.д. (сигналы атомов C4, C5 и C3) содержит также сигналы C1 (102,1 м.д.), C2 (72,0 м.д.) и C6 (17,9 м.д.). Место присоединения остатка β-L-рамнопиранозид определяется по изменению химических сдвигов сигналов 2-ацетидамо-2-дезоксид-D-глюкопиранозидного остатка. В спектре олигосахаридов (III) вместо сигнала со сдвигом 71,1 м.д., отнесенного к атому C4 глюкозамидного остатка, появляется сигнал при 81,1 м.д. Сигналы, соответствующие атомам C3 и особенно C5 глюкозамидного остатка, смещены в сильное поле в спектре соединения (III) по сравнению со спектром олигосахаридов (IV) в соответствии с ожидаемыми β-эффектами при замещении по C4. Остальные сигналы в спектрах олигосахаридов (III) и (IV) совпадают. Таким образом, олигосахарид (III) в соответствии с данными ¹³C-ЯМР-спектра имеет структуру



причем она полностью совпадает со структурой, определенной ранее химическими методами [4].

Детальный анализ спектров соединений (III) и (IV) позволил однозначно определить конфигурации гликозидных связей трех из пяти моносахаридных остатков повторяющегося звена полисахарида. Конфигурации остатков D-глюкозы и D-глюкуроновой кислоты определяли, сопоставляя спектры олигосахаридов (III) и полисахаридов (I) и (II). В спектре соеди-

нения (I) присутствуют две новые по сравнению со спектром соединения (III) резонансные линии в области аномерных атомов углерода с хим. сдвигами 104,8 и 98,8 (или 99,2) м.д., которые несомненно принадлежат атомам C1 β - и α -глюкопиранозидных остатков соответственно.

Тогда имеется только два варианта структуры повторяющегося звена полисахарида: а) остаток глюкуроновой кислоты имеет α -конфигурацию (тогда остаток глюкозы присоединен β -связью), б) остаток глюкуроновой кислоты имеет β -конфигурацию (остаток глюкозы присоединен α -связью). Согласно литературным данным [8], химический сдвиг атома C5 несколько смещается в сильное поле при переходе от глюкозы к глюкуроновой кислоте. Резонансные линии атомов C5 остатков α -D-глюкуроновой кислоты и α -D-глюкозы, замещенных по C4, должны располагаться в области 70–73 м.д., а аналогичные сигналы β -связанных остатков — в области 74–76 м.д. [10–12]. Следовательно, если реализуется первый вариант, то изменения в спектре соединения (II) по сравнению со спектром соединения (I) должны затронуть только область 70–73 м.д., оставив неизменной область 74–76 м.д. Во втором варианте ситуация обратная. Анализ спектров соединений (I) и (II) показывает, что изменения в спектре соединения (II) по сравнению со спектром (I) (см. таблицу) происходит в области 74–76 м.д., т.е. сигнал атома C5 остатка глюкозы, образующейся при восстановлении глюкуроновой кислоты, находится именно в этой области спектра. Следовательно, остаток D-глюкуроновой кислоты в соединении (I) имеет β -конфигурацию гликозидного центра, а D-глюкозы — α -конфигурацию.

Проведенный детальный анализ спектров ^{13}C -ЯМР оставляет тем не менее невыясненной последнюю деталь структуры полисахарида, а именно положение α -D-глюкопиранозного остатка. Набор спектров поли- и олигосахаридов, имевшийся в нашем распоряжении или описанный в литературе, был недостаточен для решения этого вопроса. Поэтому на последнем этапе установления структуры соединения (I) мы, воспользовавшись данными химического анализа [4], можем лишь констатировать непротиворечивость его результатов и данных ^{13}C -ЯМР. Действительно, привлекая спектры подходящих модельных соединений для остатков 4-O-замещенной β -D-глюкопиранозидуроновой кислоты [12] и α -D-глюкопиранозиды [10], мы находим соответствующие линии в спектре соединения (I) (см. таблицу). Для 2,3-ди-O-замещенного остатка β -L-рамнопиранозы мы не обнаружили в литературе спектра подходящего модельного соединения. Поэтому отнесение сигналов ^{13}C -ЯМР этого остатка в спектре соединения (I) сделано из общих соображений о влиянии замещения на химические сдвиги сигналов атомов углерода в пиранозидах [6].

Экспериментальная часть

Спектры ^{13}C -ЯМР соединений (I)–(IV) снимали в растворе $^2\text{H}_2\text{O}$ при комнатной температуре с добавлением CH_3OH в качестве внутреннего эталона. Спектры записаны на спектрометре «Bruker-Physik WP-60» (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой по углероду 15,08 МГц и объемом памяти 8 к. Частота повторения импульсов 0,6 с, длительность импульса 4,5 мкс для олигосахаридов и 11 мкс для полисахаридов.

Выделение полисахарида из клеток *Sh. boydii* тип 4, а также получение восстановленного полисахарида и олигосахаридных фрагментов описаны в работе [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Книрель Ю. А., Шерemet О. К., Кочетков Н. К. Спектр ^{13}C -ЯМР специфического полисахарида *Shigella dysenteriae* тип 10. — Биоргав. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 583–587.

2. Шашков А. С., Книрель Ю. А., Кочарова Н. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. Спектр ^{13}C -ЯМР специфического полисахарида *Pseudomonas aeruginosa* тип 7а, b.— Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 9, 1332–1337.
3. Laffite C., Nguyen Phuoc Du A. M., Wiuternitz F., Wylde R., Pratviel-Sose F. Spectres de R. M. N. ^{13}C de disaccharides et trisaccharides contenant du D-glucose, D-galactose et L-rhamnose.— Carbohydr. Res., 1978, v. 67, № 1, p. 105–115.
4. Львов В. Л., Тохтамышева Н. В., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. Антигенные полисахариды бактерий. 10. Структура полисахаридной цепи липо-полисахарида *Shigella boydii* тип 4.— Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1842–1849.
5. Gorin P. A. J., Mazurek M. Carbon-13 and proton nuclear magnetic resonance studies on methyl aldofuranosides and their O-alkyl derivatives.— Carbohydr. Res., 1976, v. 48, № 1, p. 171–186.
6. Шашков А. С., Чижов О. С. Спектроскопия ^{13}C -ЯМР в химии углеводов и родственных соединений.— Биоорг. химия, 1976, т. 2, № 4, с. 437–497.
7. Шашков А. С., Евстигнеев А. Ю., Деревицкая В. А. Синтез и спектры ^{13}C -ЯМР моно- и диметилловых эфиров метил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкопиранозидов.— Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1495–1506.
8. Gorin P. A. J., Mazurek M. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C -N.M.R. of aldoses and derived methyl glycosides.— Can. J. Chem., 1975, v. 53, № 8, p. 1212–1223.
9. Colson P., King R. R. The ^{13}C -N. M. R. spectra of disaccharides of D-glucose, D-galactose, and L-rhamnose as models for immunological polysaccharides.— Carbohydr. Res., 1976, v. 47, № 1, p. 1–13.
10. Usui T., Yamaoka N., Matsuda K., Tuzimura K., Sugiyama H., Seto S. ^{13}C -N. M. R. spectra of glucobioses, glucotrioses, and glucans.— J. Chem. Soc., Perkin Trans 1, № 20, p. 2425–2432.
11. Shashkov A. S., Sviridov A. F., Chizhov O. S., Kovas P. The ^{13}C -N. M. R. spectra of methyl(methyl-O-methyl- α -D-glucopyranosid)uronats.— Carbohydr. Res., 1978, v. 62, № 1, p. 11–17.
12. Шашков А. С., Свиридов А. Ф., Горин С. Е., Джикия О. Д., Чижов О. С., Гуляев Н., Кочетков Н. К. Полисахариды *Lipomyces*. 7. Установление строения выклеточных полисахаридов, продуцируемых *Lipomyces tetrasporus*.— Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 6, с. 752–759.

Поступила в редакцию
21.X.1980

STRUCTURE AND ^{13}C NMR SPECTRUM OF *Shigella boydii* TYPE 4 SPECIFIC POLYSACCHARIDE

SHASHKOV A. S., L'VOV V. L., TOKHTAMYSHEVA N. V.,
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 *Shigella boydii* type 4 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.