

Рис. 1. Масс-спектр метил-2-О-ацетил-4-О-метил-3,6-дезоксид-4-С-(1-метоксиэтил)гексо-
зида

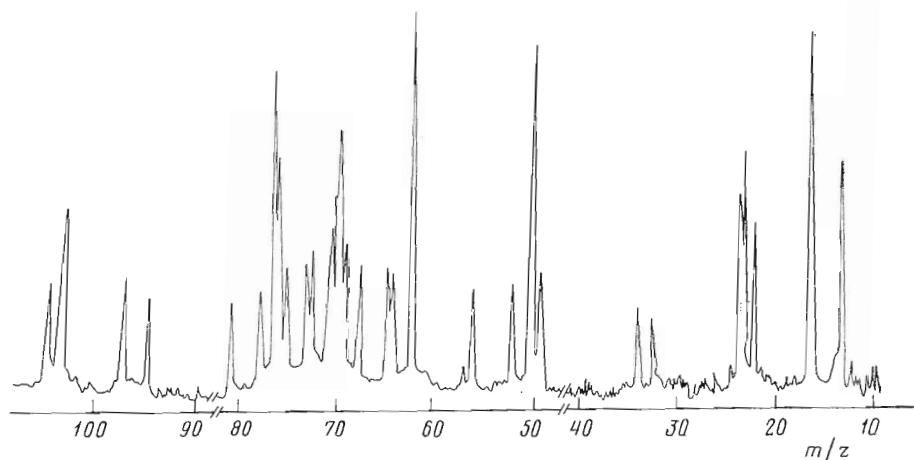
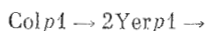


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР О-специфического полисахарида из липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* VI серовара

зы локализована О-ацетильная группа и что персиниоза включена в полисахаридную цепь 1,2-гликозидной связью.

Для установления последовательности моносакхаридных звеньев полисахарид был подвергнут частичному кислотному гидролизу. Препаративной хроматографией на бумаге из гидролизата полисахарида выделен дисахарид, состоящий из остатков колитозы и персиниозы. Для определения моносакхаридов, находящегося на восстанавливающем конце, дисахарид восстанавливали боргидридом натрия, гидролизовали, ацетилировали и исследовали методом хроматомасс-спектрометрии. В гидролизате идентифицированы в виде ацетатов аномеры колитозы и полиол персинит. Таким образом, из данных частичного гидролиза и результатов метилирования полисахарида следует, что в полисахариде имеется дисахаридный фрагмент



В спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида (рис. 2) в области резонанса аномерных атомов углерода наблюдаются четыре сигнала (один из них двойной интегральной интенсивности) с химическими сдвигами 94,4; 96,8; 103,0 и 104,3 м.д. Это указывает на то, что специфический полисахарид построен из регулярно повторяющихся пентасакхаридных звеньев. Отнесение некоторых сигналов в спектре очевидно из общих закономерностей в спектрах ^{13}C -ЯМР углеводов [6]. Так, сигнал двойной интегральной интенсивности с химическим сдвигом 16,7 м.д. относится к С-атомам метильных групп 6-дезоксисахаров, а сигнал при 13,6 м.д. принадлежит С-атому

Отнесение сигналов атомов углерода в спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида
Y. pseudotuberculosis VI серовара

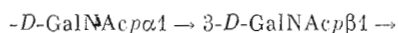
Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C'1	C'2
A	103,0 (102,2) *	55,6 (54,4)	80,4 (83,6)	70,2 (69,4)	77,2 (76,2)	62,0 (61,4)		
B	94,4 (98,7)	49,1 (49,2)	76,0 (77,2)	68,8 (65,1)	69,7 (69,1)	72,1 (72,3)		
C	103,0 (103,0)	51,8 (51,7)	77,5 (80,7)	64,4 (64,4)	76,0 (75,6)	62,0 (61,7)		
D	104,3 (106,3)	74,6 (70,1)	32,6 (34,9)	72,6 (72,3)	75,5 (75,9)	16,6 (16,3)	69,4 (69,1)	13,6 (13,3)
E	96,8 (100,2)	67,3 (67,2)	34,2 (34,2)	69,4 (69,4)	63,9 (64,1)	16,6 (16,6)		

* В скобках приведены химические сдвиги для заведомых образцов метил-2-ацетиамидо-2-дезоксис-3-О-метил- β -D-глюкопиранозидов (А), метил-2-ацетиамидо-2-дезоксис-3,6-ди-О-метил- α -D-галактопиранозидов (В), метил-2-ацетиамидо-2-дезоксис-3-О-метил- β -D-галактопиранозидов (С), метил-3,6-дидезокси-4-С-(1-оксиэтил)- β -D-гексопиранозидов (D) и метил-3,6-дидезокси- α -L-ксило-гексопиранозидов (E).

метильной группы в боковой цепи персиниозы. Два сигнала при 32,6 и 34,2 м.д. принадлежат С-атомам метиленовых групп в цикле. О наличии трех остатков 2-ацетиамидо-2-дезоксигексоз свидетельствуют сигналы С2-атомов, связанных с ацетиамидной группой (49,1; 51,8; 55,6 м.д.), а также сигналы с химическими сдвигами 23,3; 23,4; 22,1 и 174,0; 174,8 м.д. (двойной интенсивности), относящиеся к CH_3 - и CO -атомам ацетиамидных групп соответственно. В области резонанса С-атомов оксиметильных групп наблюдается один сигнал двойной интенсивности при 61,9 м.д. Общее количество сигналов С6-атомов (6-дезоксис- и оксиметильных) соответствует четырем. Это означает, что в составе повторяющегося звена имеется 1,6-замещенный углеводный остаток. Общее количество сигналов в спектре (не считая сигналов CH_3CO -) составляет 32, что отвечает четырем гексозам и одной октозе и соответствует приведенным выше результатам анализа моносахаридного состава полисахарида.

Более подробный анализ спектра позволяет определить конфигурацию гликозидных связей. Конфигурация аномерного центра колитозы следует из химического сдвига С3-атома, равного 34,2 м.д., который может отвечать только α -колитозе в пиранозной форме [7]. Величины химических сдвигов С2-атомов аминоксахаров с учетом замещения по С3 доказывают, что β -конфигурацию имеет остаток 2-ацетиамидо-2-дезоксис-D-глюкозы (55,6 м.д.), а остатки 2-ацетиамидо-2-дезоксис-D-галактозы имеют α - (49,1 м.д.) и β -конфигурацию (51,8 м.д.). В спектре в области 75–85 м.д. [6] имеется семь сигналов: четыре из них соответствуют неаномерным кольцевым С-атомам, участвующим в образовании гликозидной связи, и два — С5-атомам остатков 2-ацетиамидо-2-дезоксис- β -D-глюкозы и 2-ацетиамидо-2-дезоксис- β -D-галактозы. Следовательно, оставшийся сигнал относится к С5-атому остатка β -D-персиниозы.

Анализ аномерной области показывает, что сигнал с химическим сдвигом 94,4 м.д. отвечает α -D-моносахаридному остатку, гликозилирующему D-моносахаридный остаток с галакто-конфигурацией в положение 3 [8]. Отсюда следует, что в составе повторяющегося звена полисахарида имеется фрагмент



Сигналы с химическим сдвигом 103 м.д. обусловлены С1-атомами 2-ацетиамидо-2-дезоксис- β -D-глюкозы и 2-ацетиамидо-2-дезоксис- β -D-галактозы на основании их положения в спектрах ^{13}C -ЯМР соответствующих метиловых эфиров метилгликозидов [9, 10].

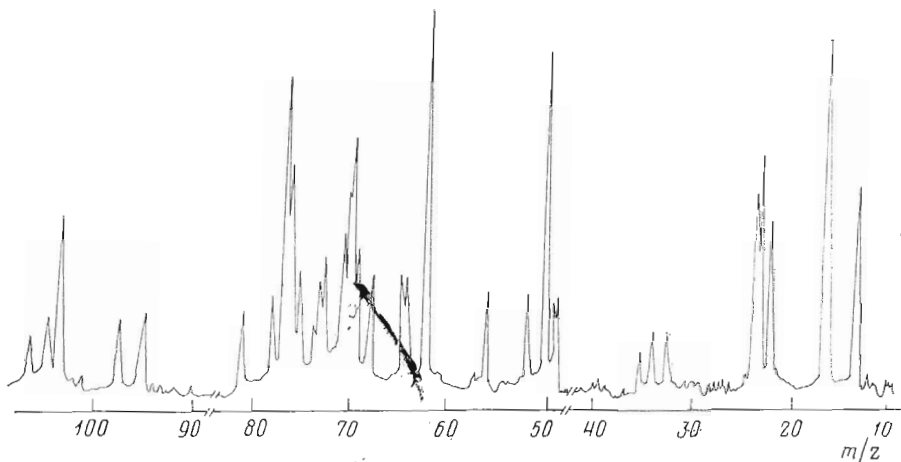
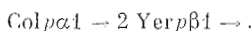


Рис. 3. Спектр ^{13}C -ЯМР полисахарида I липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* VI серовара

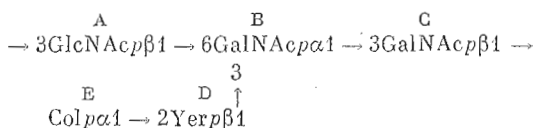
Сигнал с химическим сдвигом 96,8 м.д. может относиться только к α -моносахаридному остатку, в нашем случае — к α -колитозе. Следовательно, сигнал с химическим сдвигом 104,3 м.д. относится к β -персиниозе. Сопоставление данных спектров метилгликозидов персиниозы и колитозы и спектра полисахарида позволяет выделить сигналы, относящиеся к остаткам персиниозы и колитозы (таблица). Сигнал с химическим сдвигом 34,2 м.д. относится к С3-атому α -колитозы, а сигнал с химическим сдвигом 32,6 м.д. — к С3 β -персиниозы. Сдвиг сигналов С1- и С3-атомов персиниозы в спектре полисахарида на 2 и 2,3 м.д. соответственно в сильное поле (β -эффект) относительно их положения в спектре метилгликозида указывает на гликозилирование остатка β -персиниозы по С2.

Для получения дополнительных сведений о последовательности моносахаридных остатков О-специфический полисахарид был подвергнут мягкому гидролизу 1% уксусной кислотой. В результате был получен полисахарид I, в состав которого входят остатки колитозы, персиниозы, 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы и 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы в соотношении 0,5 : 1 : 1 : 2. В спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида I (рис. 3) наблюдаются дополнительные сигналы с химическими сдвигами 106 и 35,3 м.д., практически совпадающие с химическими сдвигами С1- и С3-атомов метилгликозида персиниозы. Их появление объясняется частичным удалением при гидролизе остатков колитозы и подтверждает наличие в исходном полисахариде фрагмента



В то же время незначительное расщепление сигнала в области 49 м.д., относящегося к С2-атому остатка 2-ацетамидо-2-дезоксид- α -*D*-галактозы, позволяет сделать вывод о присоединении дисахаридного фрагмента по С3-атому данного моносахаридного остатка.

Таким образом, на основании вышеуказанных результатов для повторяющегося звена О-специфического полисахарида из липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* VI серовара предложена следующая структура:



В таблице сделана попытка отнесения всех сигналов в спектре ^{13}C -ЯМР

полисахарида O-специфических боковых цепей липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* VI серовара в соответствии с предложенной структурой и основными закономерностями по влиянию структурных факторов на химические сдвиги сигналов в ^{13}C -ЯМР-спектрах углеводов.

Экспериментальная часть

Аналитическую и препаративную хроматографию выполняли на бумаге Filtrak FN-3 в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода, 6:4:3. Обнаружение моносахаридов и олигосахарида осуществляли щелочным раствором серебра. Гель-хроматографию проводили на колонке с сефадексом G-50 в пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5 (4 мл уксусной кислоты и 10 мл пиридина на 1 л воды).

ГЖХ выполняли на хроматографе Pye Unicam-104 на стеклянной колонке (150×0,4 см), используя жидкую фазу OF-1, 3% на газхроме Q (100—120 меш), в режиме температур 125—225°С (5°/мин) для ацетатов частично метилированных метилглюкозидов и 175—225°С для ацетатов поллюлов. Хроматомасс-спектрометрию проводили на приборе LKB-9000s, используя стеклянную колонку (200×0,4 см), заполненную указанной выше фазой. Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin-Elmer-141. Спектры ^{13}C -ЯМР снимали на приборе Bruker-Physics HX-360 с рабочей частотой по углероду 90,55 МГц в D₂O, внутренний стандарт — метанол (50,1 м.д. относительно тетраметилсилана).

Выделение специфического полисахарида и полисахарида I. Липополисахарид (800 мг) нагревали с 1% уксусной кислотой (80 мл, 2 ч, 100°С), осадок липида отделяли центрифугированием, супернатант лиофилизovali и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Выход специфического полисахарида 80 мг. Полисахарид I получали при гидролизе 75 мг специфического полисахарида 1% уксусной кислотой (2 ч, 100°С). Гидролизат лиофилизovali и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Выход полисахарида I 65 мг.

Определение моносахаридного состава. Полисахариды (3 мг) гидролизovali 1 н. трифторуксусной кислотой (3 ч, 100°С), гидролизат упаривали с метанолом (3×0,5 мл) и исследовали с помощью хроматографии на бумаге. Часть гидролизата восстанавливали боргидридом натрия (10 мг, 4 ч, 20°С), добавляли разбавленную уксусную кислоту и упаривали с метанолом (3×0,5 мл), ацелилировали уксусным ангидридом в пиридине (30 мин, 90°С), упаривали и анализировали методом ГЖХ.

Выделение олигосахарида. Полисахарид (40 мг) гидролизovali 0,1 н. HCl (100°С, 30 мин). Гидролизат упаривали с метанолом и хроматографировали препаративно на бумаге. Получили олигосахарид, выход 3 мг, R_{Gal} 0,6; $[\alpha]_{578}^{20}$ +62,6° (с 0,5; вода).

Метилирование полисахарида (7 мг) осуществляли иодистым метилом в присутствии метилсульфинилкарбаниона по методу [3], смесь разбавляли водой, диализовали и упаривали. Сполна метилированный полисахарид нагревали с 1 н. HCl в метаноле (100°С, 20 ч), упаривали, ацелилировали уксусным ангидридом в пиридине и исследовали методом ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gorshkova R. P., Zubkov V. A., Ovodov Yu. S. *Immunochemistry*, 1976, v. 13, № 2, p. 581—583.
2. Zubkov V. A., Gorshkova R. P., Isaakov V. B., Ovodov Yu. S. Тез. докл. VII Всес. конф. по химии и биохимии углеводов. Пушкино, 1982, с. 88.
3. Nakomori S. J. *Biochem.*, 1964, v. 55, № 2, p. 205—208.
4. Fournet B., Strecher G., Leroy J., Montreuil J. *Analyt. Biochem.*, 1981, v. 116, № 3, p. 489—502.
5. Елькин Ю. Н., Толмич С. В., Горшкова Р. П. *Химия природ. соединений*, 1982, № 5, с. 569—575.

