



УДК 547.458.2.02 : 577.114.012.7

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ
КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ О-АНТИГЕННОГО ПОЛИСАХАРИДА
PSEUDOMONAS CERACIA ШТАММА 3181

I. ДИСАХАРИДНЫЕ ЗВЕНЬЯ

Липкинд Г. М., Шапков А. С., Киурель Ю. А.,
Бочетков Н. К.

Институт органической химии им. П. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Для структур L -Rha β 1-3- L -Rha α 1-ОМе и L -Rha α 1-3- L -Rha α 1-ОМе, моделирующих дисахаридные звенья полисахарида *Pseudomonas ceracia* штамма 3181, при предоблучении аномерных протонов гликозидных связей измерены величины ЯЭО, констант спин-спинового взаимодействия $^3J_{C_3, H_1'}$, $^3J_{C_1', H_3}$, а также величины оптического связевого вращения A . В приближении механической модели проведен теоретический конформационный анализ молекул. На основе полученных данных рассмотрено пространственное строение изученных дисахаридов (а также дисахаридов D -Rha α 1-2- D -Rha β 1-ОМе) в водных растворах.

Для понимания функционирования антигенных полисахаридов бактерий важно знание не только первичной структуры, но и пространственной организации, поскольку именно стереохимические факторы могут быть существенными во взаимодействиях антигенов и антител. Наибольший интерес представляет исследование биологически активного полисахарида не в кристаллическом состоянии, а в воде — естественной для него функциональной среде. В этом случае из всех экспериментальных методов метод ЯМР является наиболее плодотворным. Анализ параметров спектров ЯМР в совокупности с данными теоретических расчетов возможных конформаций позволяет отобрать реальную пространственную форму полисахарида в растворе.

В данной работе предпринят анализ пространственного строения О-антигенного полисахарида *Pseudomonas ceracia* штамма 3181 в водном растворе с использованием ЯМР-спектроскопии и расчетов конформаций в приближении механической модели молекулы. Первичная последовательность полисахарида *P. ceracia* 3181 установлена в работах [1, 2]:

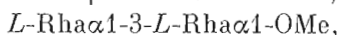
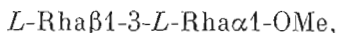


Своеобразие полисахарида *P. ceracia* состоит, во-первых, в том, что этот рамнан содержит только остатки D -рамнозы, а не широко распространенной в природе L -рамнозы. Во-вторых, аномерный центр 1-2-связанной рамнозы оказался в β -конфигурации, тогда как практически во всех случаях в природных полисахаридах 1-2-связанные остатки рамнозы или маннозы имеют α -конфигурацию [3]. Поэтому представляет интерес провести анализ стереохимических особенностей цепи, включающей звенья $-2-D$ -Rha β 1-

В данной работе рассматривается пространственное строение дисахаридов, моделирующих дисахаридные звенья полисахарида *P. ceracia*. Понимание реальной конформационной ситуации в отдельных дисахаридных звеньях позволяет более обоснованно судить о конформационных свойствах всей полисахаридной цепи. Также важно провести сопоставление экспериментальных данных для дисахаридов и полисахаридов в целом, что-

Сокращения: ЯЭО — ядерный эффект Оверхаузера, КСВВ — константы спин-спинового взаимодействия.

бы выявить границы дисахаридного приближения, допустимого для описания конформационных свойств полисахарида *P. seracia*. В связи с этим в качестве первого шага нами проведено экспериментальное исследование конформаций в водных растворах метилгликозидов двух дисахаридов:



являющихся энантиомерными аналогами соответствующих дисахаридных звеньев полисахарида *P. seracia*. Метилгликозид дисахаридов *L-Rha* α 1-2-*L-Rha* β 1-ОМе, моделирующего звено со связью 1-2 полисахарида, в нашем распоряжении отсутствовал.

Для этих двух дисахаридов нами измерены ядерные эффекты Оверхаузера, вызываемые предоблучением аномерного протона Н1' невосстанавливающих остатков рамнозы, а также ряда других протонов. Как известно, величины ЯЭО особенно чувствительны к пространственной структуре молекул. Также определены константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) $^3J_{C,H}$ для ядер углерода и водорода вблизи гликозидной связи во фрагментах Н1'—С1'—О—С3 и С1'—О—С3—Н3 дисахаридов, которые зависят от конформации этих фрагментов, т. е. от углов вращения $\varphi(C1'-O)$ и $\psi(O-C3)$ *; указанные КССВ далее будут обозначаться как J^Ψ и J^Φ . Кроме того, были привлечены данные по оптическому связевому вращению (Λ) дисахаридов. Связевое вращение представляет собой компонент молекулярного вращения, и его величина также зависит от конформации дисахаридов (см. [4]).

В теоретической части работы проведен конформационный анализ дисахаридов: *D-Rha* β 1-3-*D-Rha* α 1-ОМе, *L-Rha* α 1-3-*L-Rha* α 1-ОМе, *D-Rha* α 1-2-*D-Rha* β 1-ОМе. Для структур моносахаридных остатков принимались данные рентгеноструктурного анализа. Так как такие данные по остатку *L*-рамнозы с β -конфигурацией аномерного центра отсутствуют, расчет проводился для дисахаридов *D-Rha* β 1-3-*D-Rha* α 1-ОМе вместо *L-Rha* β 1-3-*L-Rha* α 1-ОМе. Для пространственной структуры остатка β -*D-Rha* принята структура β -*D-Man* [5] с учетом замены гидроксильной группы в положении 6 на атом водорода. Для остатков α -*D-Rha* и α -*L-Rha* мы воспользовались нейтронографическими данными из работ [6] и [7] соответственно. Валентный угол при атоме кислорода гликозидной связи принят равным 117° [8], а для длин связей С—Н использовали значение 1,1 Å. В качестве переменных, определяющих конформацию исследуемых дисахаридов, принимали углы вращения вокруг гликозидных связей $\varphi(C1'-O)$ и $\psi(O-C3)$.

О параметризации силового поля в расчетах конформаций олигосахаридов в водной среде см. работы [9—12]. В потенциальной энергии конформаций дисахаридов учитывались невалентные взаимодействия с помощью функций, предложенных Скоттом и Шерагой [13], а также торсионный вклад с величиной барьера для вращения вокруг гликозидных связей 0,9 ккал/моль [14]. Как показано в работах [10—12], в структурах с невосстанавливающим остатком глюкозы или галактозы учет *экзо*-аномерного эффекта [15] необязателен. Однако в данном случае невосстанавливающий остаток имеет *манно*-конфигурацию. Поэтому была принята во внимание возможность небольшой дестабилизации конформеров с *транс*-ориентацией агликона по отношению к связи С1'—О5' предшествующего остатка, т. е. при углах вращения $\varphi(C1'-O) > 0^\circ$ в случае α -связанных и $\varphi(C1'-O) < 0$ в случае β -связанных остатков *D*-рамнозы, обусловленная *экзо*-аномерным эффектом. Этот дополнительный инкремент неустойчивости *транс*-конформеров нами приравнен величине аномерного эффекта в воде — 0,85 ккал/моль [16].

* Угол φ равен нулю при *цис*-ориентации связей С1'—Н1' и О—С3 в случае 1-3-связанных звеньев и С1'—Н1' и О—С2 в случае 1-2-связанных звеньев; угол ψ равен нулю при *цис*-ориентации связей С1'—О и С3—Н3 в первом случае и С1'—О и С2—Н2 — во втором. Штрихованные номера относятся к атомам «невосстанавливающего» остатка.

Наблюдаемые величины ЯЭО при предоблучении протона Н1'
и констант J^Φ и J^Ψ в дисахариде *L*-Rha β 1-3-*L*-Rha α 1-ОМе

Протоны	ЯЭО, % *	КССВ	Величины (Гц)
Н2	8,5	J^Φ	~3
Н3	11	J^Ψ	~4
Н4	0		
Н3'	~6,0		

* Величины ЯЭО представлены в виде отношения интегральных интенсивностей наблюдаемого и предоблучаемого протонов.

Таблица 2

Параметры (и их средние значения) оптимальных конформаций
А, В, С и D дисахариды *D*-Rha β 1-3-*D*-Rha α 1-ОМе

Параметры	А	В	С	Д	Средние значения
φ, ψ , град	70, 60	20, -50	50, -10	-50, 0	44, 23 *
U , ккал/моль	-3,1	-2,4	-2,3	-1,7	
$f_{\text{Н}2}^{\text{Н}1'}$, %	21	-5	0	-3	13
$f_{\text{Н}3}^{\text{Н}1'}$, »	-1	23	18	15	11
$f_{\text{Н}4}^{\text{Н}1'}$, »	0	1	-1	0	0
J^Φ , Гц	1	4,8	2,7	2,7	2,8
J^Ψ , »	2	2,7	5,1	5,3	3,6
Λ , град	-112	+156	+34	+197	-11
Λ' **, »	+112	-156	-34	-197	+11
Статистический вес, % ***	70	15	10	5	

* Значения углов вращения φ и ψ в среднестатистической конформации дисахариды. $\langle f_{\text{Н}3'}^{\text{Н}1'} \rangle$ 9%.

** Λ' — связевые вращения в конформациях дисахариды *L*-Rha β 1-3-*L*-Rha α 1-ОМе.

*** Определены по данным расчета статистических сумм соответствующих областей конформационной карты.

Нами были рассчитаны с учетом бoльцмановских вероятностей конформеров и всей потенциальной поверхности дисахаридов средние значения ЯЭО, констант J^Φ , J^Ψ и вращения Λ , которые были определены также экспериментальным путем. Очевидно, что сопоставление экспериментальных и расчетных данных позволяет обоснованно судить о форме конформационного равновесия в водных растворах дисахаридов.

Теоретический расчет ЯЭО в определенной конформации на протоне d в условиях насыщения протона s — f_s^d проведен по формуле Ширмера и Ноггла [17]:

$$f_s^d = r_{ds}^{-6} / 2 \sum_{k \neq d} r_{dk}^{-6} - \sum_{k \neq d, s} r_{dk}^{-6} f_s^k / 2 \sum_{k \neq d} r_{dk}^{-6}$$

В таком приближении учитывается «трехспиновый эффект», т. е. зависимость величины ЯЭО на конкретном протоне от ЯЭО на соседних протонах. Следует иметь в виду, что экспериментальные значения ЯЭО также определяются условиями съемки спектра ЯМР, поэтому физический смысл имеет сравнение только относительных расчетных и экспериментальных величин. При расчете средних значений констант $\langle J^\Phi \rangle$ и $\langle J^\Psi \rangle$ была использована зависимость констант $^3J_{C,H}$ от углов вращения φ и ψ , предложенная Перлиным с соавт. [18]. Связь между связевым вращением Λ и кон-

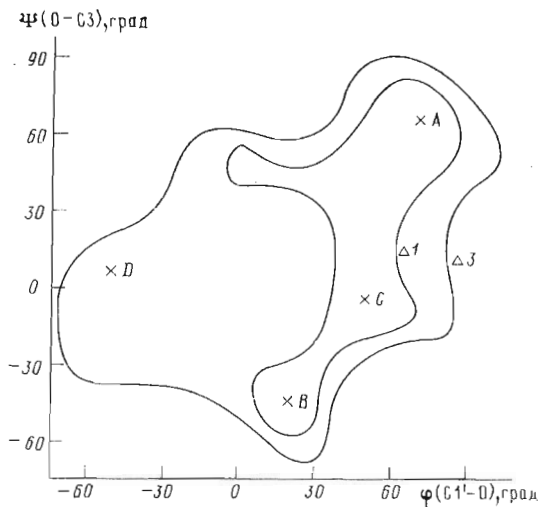


Рис. 1. Конформационная карта $\varphi(C1'-O) - \psi(O-C3)$ дисахарида $D-Rha\beta 1-3-D-Rha\alpha 1-OMe$. Эквипотенциали $\Delta 1$ и $\Delta 3$ ккал/моль проведены относительно энергии конформера А (табл. 2). Крестиком помечены положения локальных минимумов

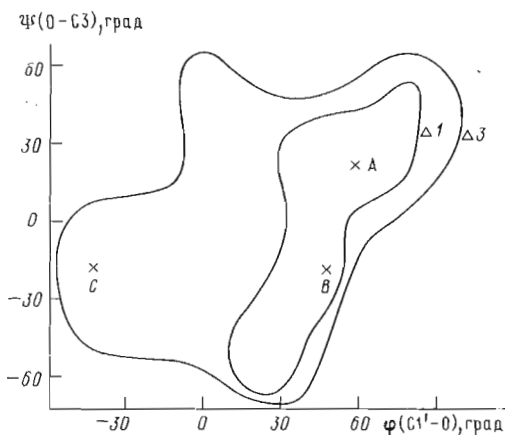


Рис. 2. Конформационная карта $\varphi(C1'-O) - \psi(O-C3)$ дисахарида $L-Rha\alpha 1-3-L-Rha\alpha 1-OMe$ (см. подпись к рис. 1)

формацией дисахаридов (углами вращения φ и ψ) дана Рисом [4]. Так, в случае $\alpha 1-2-$ и $\alpha 1-3-$ связанных остатков D -рамнозы

$$\Delta\varphi, \psi = -105^\circ + 120^\circ (\sin \varphi + \sin \psi).$$

Звено $D-Rha\beta 1-3-D-Rha$. В спектре 1H -ЯМР модельного дисахарида $L-Rha\beta 1-3-L-Rha\alpha 1-OMe$ при преобладании $H1'$ наблюдались приблизительно равные усиления сигналов протонов $H3$ и $H2$ (11 и 8,5% соответственно, табл. 1). КССВ $J^\varphi J^\psi$ составляют ~ 3 и 4 Гц. Связевое вращение дисахарида А, найденное по его оптическому вращению $[\alpha]$ (см. «Экспериментальную часть»), равно $+5^\circ$.

На конформационной карте $\varphi(C1'-O) - \psi(O-C3)$ дисахарида $D-Rha\beta 1-3-D-Rha$ выделяются четыре локальных минимума А, В, С и D (рис. 1 и табл. 2). В самом низкоэнергетическом конформере А ($\varphi, \psi 70, 60^\circ$) оказываются сближенными протоны $H1'$ и $H2$ до расстояния 2,2 Å, поэтому он обуславливает сильный ЯЭО прежде всего на протоне $H2$ (по расчетным данным, 21%, табл. 2). Напротив, в двух других допустимых конформерах, В и С, на расстоянии 2,2 Å оказываются протоны $H1'$ и $H3$, что должно обуславливать ЯЭО уже на протоне $H3$ (табл. 2). В теоретическом расчете средних значений $\langle f_{H1'}^{H2} \rangle$ и $\langle f_{H1'}^{H3} \rangle$ получены близкие

Наблюдаемые величины ЯЭО и констант J^{Φ} и J^{Ψ} в дисахариде $L\text{-Rha}\alpha 1\text{-}3\text{-}L\text{-Rha}\alpha 1\text{-}0\text{Me}$

Предоблучение Н1'		Предоблучение Н2		КССВ	Величины (Гц)
Протоны	ЯЭО, %	Протоны	ЯЭО, %		
Н2	0	Н3+Н5'	13	J^{Φ}	$4 \pm 0,5$
Н3	11			J^{Ψ}	$4,6 \pm 0,3$
Н4	1				

Таблица 4

Параметры (и их средние значения) оптимальных конформаций А, В и С дисахирида $L\text{-Rha}\alpha 1\text{-}3\text{-}L\text{-Rha}\alpha 1\text{-}0\text{Me}$

Параметры	А	В	С	Средние значения *
φ, ψ , град	60, 20	50, -20	-40, -20	45, -8
U , ккал/моль	-3,4	-3,6	-2,0	
$f_{\text{H1}'},^{\text{H2}}$, %	-1	-1	13	1,5
$f_{\text{H1}'},^{\text{H3}}$, »	9	19	8	16
$f_{\text{H1}'},^{\text{H4}}$, »	3	-1	-1	1
$f_{\text{H1}'},^{\text{H5}'}$, »	14	19	0	10
J^{Φ} , Гц	2	2,7	3,5	3,5
J^{Ψ} , »	4,8	4,8	4,8	4,3
Λ , град	-40	+54	+223	+35
Статистический вес, %	42	55	3	

* $\langle f_{\text{H1}'},^{\text{H3}} \rangle$ 12%.

величины (табл. 2), т. е. соотношение указанных ЯЭО составляет $\sim 1 : 1$. Таким образом, равновесие различных конформеров должно приводить к выравниванию ЯЭО на протонах Н2 и Н3 при предоблучении протона Н1'. Именно такую картину мы имеем по экспериментальным данным (табл. 1).

На наличие конформационного равновесия в водном растворе дисахирида $L\text{-Rha}\beta 1\text{-}3\text{-}L\text{-Rha}\alpha 1\text{-}0\text{Me}$ указывают также данные по связевому вращению Λ . В самой низкоэнергетической структуре А этого дисахирида расчетная величина Λ составляет $+112^\circ$ (табл. 2), однако, поскольку экспериментальное значение Λ равно всего лишь $+5^\circ$, очевидно, что в растворе имеются конформеры с отрицательной величиной Λ , т. е. В, С и D (табл. 2). С учетом этих конформеров среднее значение $\langle \Lambda \rangle$ ($+11^\circ$, табл. 2) оказывается очень близким к опытной величине. Расчетные значения констант $\langle J^{\Phi} \rangle$ и $\langle J^{\Psi} \rangle \sim 3$ и ~ 4 Гц соответственно (табл. 2) также равны экспериментальным величинам (табл. 1). Хорошая воспроизводимость экспериментальных данных по ЯЭО, КССВ и Λ свидетельствует о достоверности предложенного нами описания конформационного распределения пространственных форм А, В, С и D ($\sim 70, 15, 10$ и 5% , табл. 2) в водных растворах дисахирида $L\text{-Rha}\beta 1\text{-}3\text{-}L\text{-Rha}\alpha 1\text{-}0\text{Me}$ ($D\text{-Rha}\beta 1\text{-}3\text{-}D\text{-Rha}\alpha 1\text{-}0\text{Me}$).

Зеено D-Rha $\alpha 1\text{-}3\text{-}D\text{-Rha}$. В модельном дисахириде $L\text{-Rha}\alpha 1\text{-}3\text{-}L\text{-Rha}\alpha 1\text{-}0\text{Me}$ при предоблучении Н1' сильный ЯЭО наблюдается только на протоне Н3 (табл. 3). Аналогичные результаты были получены Бриссоном и Карвером [19] для дисахирида $D\text{-Man}\alpha 1\text{-}3\text{-}D\text{-Man}\alpha 1\text{-}0\text{Me}$. Поскольку из модельных построений следует возможность сближения протонов Н2 и Н5', был проведен эксперимент по предоблучению Н2, при этом определено суммарное усиление сигналов как Н5', так и Н3 (13%, табл. 3).

Константы J^Φ и J^Ψ оказались довольно значительными: $4 \pm 0,5$ и $4,6 \pm 0,3$ Гц соответственно. Связевое вращение в водном растворе равно $+25^\circ$.

По данным расчета, в дисахариде *L*-Rha α 1-3-*L*-Rha α 1-ОМе реальные только две пространственные формы, *A* и *B* (рис. 2 и табл. 4), статистические вклады которых в растворе могут быть соизмеримы. Структура *A* обуславливает ЯЭО как на протоне Н3, так и на протоне Н4 (соотношение $f_{\text{Н1}}^{\text{H4}}/f_{\text{Н1}}^{\text{H3}}$ составляет 1 : 3), тогда как структура *B* — только на протоне Н3 (табл. 4). Поскольку экспериментальное соотношение ЯЭО на протонах Н4 и Н3 равно 1 : 10, можно сделать вывод о наличии равновесия в водном растворе дисахарида двух пространственных форм, *A* и *B*. Теоретические средние величины $\langle f_{\text{Н1}}^{\text{H3}} \rangle$ и $\langle f_{\text{Н1}}^{\text{H4}} \rangle$ равны 16 и 1% (табл. 4).

Расчет предсказывает небольшой положительный ЯЭО на протоне Н2 ($\langle f_{\text{Н1}}^{\text{H2}} \rangle = 1,5\%$, табл. 4), который, однако, экспериментально не обнаружен (табл. 3). Этот факт вызывает удивление, поскольку помимо конформера *C* (табл. 4) возможны структуры при значениях углов $\varphi > 0^\circ$ и $\psi < -30^\circ$ (рис. 2) со сближенными протонами Н1' и Н2 и с положительными величинами $f_{\text{Н1}}^{\text{H2}}$. Однако следует учитывать, что предсказываемые величины ЯЭО на Н2 в конформациях *A* и *B* являются отрицательными (табл. 4). Именно поэтому с учетом небольшого вклада указанных выше конформеров ЯЭО на Н2 оказывается близким нулю.

Согласно экспериментальным данным, преобладание Н2 приводит к ЯЭО на Н5' (табл. 3). В нашем расчете среднее значение $\langle f_{\text{Н2}}^{\text{H5}} \rangle$ оценено в 10% (табл. 4). Отметим, что в работах [19, 20] значительные ЯЭО на Н5' в условиях преобладания Н2 рассматриваются в качестве доказательства конформационной жесткости дисахаридных звеньев *D*-Man α 1-3-*D*-Man и *L*-Rha α 1-3-*L*-Rha. Однако как в конформации *A*, так и в конформации *B* дисахарида *L*-Rha α 1-3-*L*-Rha α 1-ОМе протоны Н2 и Н5' находятся на расстоянии суммы ван-дер-ваальсовых радиусов, т. е. обе конформации обуславливают наблюдаемый эффект (табл. 4). Далее, при учете всей потенциальной поверхности дисахарида (рис. 2) найдено, что величины $\langle f_{\text{Н2}}^{\text{H5}} \rangle$ и $\langle f_{\text{Н2}}^{\text{H3}} \rangle$ близки (10 и 12%), причем $\langle f_{\text{Н2}}^{\text{H3}} \rangle > \langle f_{\text{Н2}}^{\text{H5}} \rangle$. Такое же соотношение для указанных ЯЭО дано в работе [19]. Далее, в соответствии с данными табл. 3 сумма средних значений ЯЭО на протонах Н3 и Н5' при преобладании Н2 превосходит величину $\langle f_{\text{Н1}}^{\text{H3}} \rangle$ (табл. 4).

Наличие в водном растворе дисахарида *L*-Rha α 1-3-*L*-Rha α 1-ОМе конформационного равновесия, в основном между формами *A* и *B*, также следует из данных по величине Λ , поскольку опытная величина ($+25^\circ$, табл. 3) оказывается промежуточной между значениями Λ в оптимальных конформерах *A* и *B* (-40 и $+54^\circ$ соответственно, табл. 4). При учете всей поверхности потенциальной энергии дисахарида (рис. 2) получено среднее значение ($+35^\circ$), практически совпадающее с опытной величиной. Поэтому можно заключить, что низкоэнергетические эквипотенциалы на рис. 2 определяют допустимые границы изменения углов вращения φ и ψ данного дисахарида в водном растворе ($0-80^\circ$ для φ и $-60-+60^\circ$ для ψ).

Найденные довольно значительные величины КССВ J^Φ и J^Ψ ($4 \pm 0,5$ и $4,6 \pm 0,3$ Гц соответственно, табл. 3) также указывают на заметную конформационную гибкость дисахарида *L*-Rha α 1-3-*L*-Rha α 1-ОМе, прежде всего по углу φ . Так, в оптимальных конформациях *A* и *B* угол φ близок к 60° , т. е. им соответствует значение $J^\Phi \sim 2$ Гц. То, что экспериментальная величина J^Φ заметно выше (~ 4 Гц), можно объяснить существенным вкладом конформаций, в которых значения φ близки к 0° (при $0^\circ J^\Phi = 5,3$ Гц [18]).

Описание пространственной структуры звеньев *D*-Man α 1-3-*D*-Man и *L*-Rha α 1-3-*L*-Rha одним конформером, найденным по расчетной модели HSEA [21], как это делается в работах [19, 20], не является полностью адекватным реальной ситуации. Так, в случае дисахарида *L*-Rha α 1-3-*L*-Rha α 1-ОМе такому конформеру с углами φ и ψ 50 и 20° соответствует Λ

Параметры (и их средние значения) оптимальных конформаций *A*, *B* и *C* дисахарида *D-Rhaα1-2-D-Rhaβ1-OMe*

Параметры	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	Средние значения *
φ, ψ, град	-40, -20	-10,40	30, 20	-30, 0
<i>U</i> , ккал/моль	-2,8	-2,5	-1,8	
$f_{H1'}^{H1}$, %	-1	-2	-1	-2
$f_{H1'}^{H2}$, »	23	24	14	23
$f_{H1'}^{H3}$, »	-2	-2	-2	-2
<i>J^φ</i> , Гц	3,5	5,1	4,3	3,9
<i>J^ψ</i> , »	4,8	3,5	4,8	4,5
Λ, град	+13	-160	-206	-50
Статистический вес, %	53	40	7	

* $\langle f_{H1'}^{H2} \rangle$ 18%.

Таблица 6

Химические сдвиги в спектрах ¹³C-ЯМР дисахаридов *

Дисахариды	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<i>L-Rhaβ1-3-L-Rhaα1-OMe</i>	101,8	68,4	78,4	71,6	69,3	17,9
<i>L-Rhaα1-3-L-Rhaα1-OMe</i>	101,8	70,8	79,0	72,4	69,6	17,6
Дисахариды	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'
<i>L-Rhaβ1-3-L-Rhaα1-OMe</i>	98,3	72,1	73,7	73,4	73,1	17,8
<i>L-Rhaα1-3-L-Rhaα1-OMe</i>	103,3	71,1	71,1	73,0	70,0	17,6

* Штрихами отмечены атомы «невосстанавливающих» остатков.

—28°, тогда как наблюдается положительное связевое вращение. Более того, все конформеры, имеющие положительный знак Λ с углами вращения φ > 0° и ψ < 0° (рис. 2), в расчетной модели HSEA оказываются энергетически запрещенными.

Звено D-Rhaα1-2-D-Rha. В оптимальных конформерах *A*, *B* и *C* дисахарида *D-Rhaα1-2-D-Rhaβ1-OMe* (табл. 5) расстояния между протонами H1' и H2 практически равны (2,2 Å), поэтому они должны обуславливать сильные ЯЭО на протоне H2, превосходящие ЯЭО на протоне агликона в 1-3-связанных дисахаридах (табл. 2 и 4). Значительная величина ЯЭО на протоне H2 приводит к тому, что значения $\langle f_{H1'}^{H1} \rangle$ и $\langle f_{H1'}^{H3} \rangle$ оказываются малыми отрицательными числами, несмотря на то что расстояния между протонами H1' и H1, а также H1' и H3 близки к 4 Å. Отметим, что из-за существенного сближения протонов H1' и H2 величина $\langle f_{H1'}^{H2} \rangle > \langle f_{H1'}^{H2'} \rangle$ (табл. 5). Именно такое соотношение ЯЭО наблюдается в звеньях *L-Rhaα1-2-L-Rha* ряда олигосахаридов [20].

Таким образом, сопоставление экспериментальных и расчетных данных по ЯЭО, *J^φ*, *J^ψ* и Λ позволяет сделать вывод о наличии конформационного распределения в водных растворах рассматриваемых дисахаридов, которое задается всей поверхностью потенциальной энергии невалентных взаимодействий молекул.

Экспериментальная часть

Спектры ¹H-ЯМР записаны на приборе AM-300 МГц (Bruker) для 3% растворов дисахаридов в D₂O с использованием натрий-сульфоната 4,4-диметил-4-силапентана в качестве внутреннего стандарта. Ключевые сигналы

отнесены с использованием селективного гомоядерного резонанса как в обычном, так и разностном варианте. Величины ЯЭО измерены по методике ТОЕ [22], при этом временные константы составляли t_1 0,5 с (время предоблучения) и t_2 0,8 с (время прослушивания). ^{13}C -ЯМР-спектры сняты на том же приборе в D_2O при 30°C , внутренний стандарт — метанол (δ_{C} 50,15).

Дисахариды $L\text{-Rha}\beta\text{1-3-}L\text{-Rha}\alpha\text{1-OМе}$ и $L\text{-Rha}\alpha\text{1-3-}L\text{-Rha}\alpha\text{1-OМе}$ были получены из метил-2,4-ди- O -бензоил-3- O -(3,4-ди- O -бензоил- β - L -рамнопиранозил)- α - L -рамнопиранозида и метил-2,4-ди- O -бензоил-3- O -(2- O -ацетил-3,4-ди- O -бензоил- α - L -рамнопиранозил)- α - L -рамнопиранозида соответственно, синтез которых будет описан позднее. 150 мг первого производного обрабатывали 5 мл смеси 0,1 М раствора метилата натрия в метаноле и пиридине с соотношением 1 : 3 в течение 16 ч при 20°C , разбавляли 10 мл воды, обрабатывали 10 мг катионита КУ-2 (H^+ -форма), фильтрат упаривали, остаток упаривали трижды с водой, высушивали в вакууме при 60°C , в результате получили дисахарид $L\text{-Rha}\beta\text{1-3-}L\text{-Rha}\alpha\text{1-OМе}$ с выходом 95%, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +17^\circ$ (c 1,5, вода). Аналогично получен $L\text{-Rha}\alpha\text{1-3-}L\text{-Rha}\alpha\text{1-OМе}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -67^\circ$ (c 1,3, вода), по литературным данным [23] $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -78^\circ$ (вода). Строение полученных дисахаридов подтверждено данными ^{13}C -ЯМР-спектров (табл. 6).

Авторы выражают благодарность Н. Э. Байрамовой и Ю. Е. Цветкову за предоставление образцов защищенных дисахаридов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Касянчук П. В., Захарова И. Я. Биоорганич. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1851—1859.
2. Shashkov A. S., Knirel Y. A., Tanatar N. V., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1986, v. 146, № 2, p. 346—349.
3. Липкин Г. М., Кочетков Н. К. Биоорганич. химия, 1984, т. 10, № 12, с. 1670—1679.
4. Rees D. A. J. Chem. Soc. (B), 1970, № 5, p. 877—884.
5. Warin V., Baert F., Fouret R., Strecker G., Spik G., Fournet B., Montreuil J. Carbohydr. Res., 1979, v. 76, p. 11—22.
6. Jeffrey G. A., McMullan R. K., Takagi S. Acta crystallogr., 1977, v. B33, № 3, p. 728—737.
7. Takagi S., Jeffrey G. A. Acta crystallogr., 1979, v. B35, № 2, p. 902—906.
8. Arnott S., Scott W. E. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1972, № 3, p. 324—335.
9. Липкин Г. М., Кочетков Н. К. Биоорганич. химия, 1983, т. 9, № 3, с. 407—418.
10. Липкин Г. М., Веровский В. Е., Кочетков Н. К. Биоорганич. химия, 1983, т. 9, № 9, с. 1269—1284.
11. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1985, v. 141, № 2, p. 191—197.
12. Shashkov A. S., Lipkind G. M., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1986, v. 147, № 2, p. 175—182.
13. Scott R. A., Scheraga H. A. J. Chem. Phys., 1966, v. 44, № 8, p. 3054—3068.
14. Tvaroška I., Bleha T. Tetrahedron Lett., 1975, № 4, p. 249—252.
15. Lemieux R. U. Chem. Soc. Rev., 1978, v. 7, № 4, p. 423—452.
16. Стоддарт Д. Стереохимия углеводов. М.: Мир, 1975, с. 94.
17. Shirmer R. E., Noggle J. H., Davis J. P., Hart P. A. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 11, p. 3266—3273.
18. Hamer G. K., Balza F., Cyr N., Perlin A. S. Can. J. Chem., 1978, v. 56, № 24, p. 3109—3116.
19. Brisson J.-R., Carver J. P. Biochemistry, 1983, v. 22, № 6, p. 1362—1368.
20. Bock K., Josephson S., Bundle D. R. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1982, № 1, p. 59—70.
21. Thøgersen H., Lemieux R. U., Bock K., Meyer B. Can. J. Chem., 1982, v. 60, № 1, p. 44—57.
22. Wagner G., Wüthrich K. J. Magn. Reson., 1979, v. 33, № 3, p. 675—680.
23. Liptak A., Neszmélyi A., Wagner H. T. Tetrahedron Lett., 1979, № 8, p. 741—744.

Поступила в редакцию
18.XI.1985

EXPERIMENTAL AND THEORETICAL CONFORMATIONAL ANALYSIS OF THE
ANTIGENIC POLYSACCHARIDE OF *PSEUDOMONAS CEPACIA* STRAIN 3181.
I. DISACCHARIDE UNITS

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

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

Nuclear Overhauser effects, with preirradiation of glycoside bond anomeric protons, coupling constants ${}^3J_{C_3, H_1'}$ and ${}^3J_{C_1', H_4}$ and linkage optical rotations Λ were measured for *L*-Rha β 1-3-*L*-Rha α 1-OMe and *L*-Rha α 1-3-*L*-Rha α 1-OMe which are the models of the disaccharide units of the *Pseudomonas cepacia* polysaccharide. Theoretical conformational analysis was carried out in terms of a mechanical molecular model approximation. The spatial structures of these disaccharides as well as of *D*-Rha α 1-2-*D*-Rha β 1-OMe in aqueous solutions were discussed basing on the obtained results.