



УДК 577.144.5:543.422.23:579.842.15

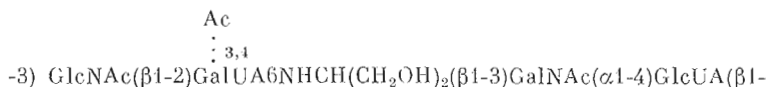
АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

12*. УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ СПЕКТРА ¹³С-ЯМР СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *SHIGELLA BOYDII* ТИП 8

Львов В. Л., Тохтамышева Н. В., Шапков А. С.,
Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К.

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

Кислотной деградацией антигенного полисахарида *Shigella boydii* тип 8 получен полисахарид, построенный из остатков 2-ацетида-2-дезоксид-*D*-глюкозы, 2-ацетида-2-дезоксид-*D*-галактозы, *D*-глюкуроновой кислоты, *D*-галактуроновой кислоты, 2-аминопропандиола-1,3 и уксусной кислоты в соотношении 1:1:1:1:1:0,9. На основании данных метилирования, частичного кислотного гидролиза и избирательного расщепления по Смуту установлено строение повторяющегося звена полисахарида, которое представляет собой линейный тетрасахарид:



где все моносахариды *D*-конфигурации. Локализация *O*-ацетильных групп проведена методом метилирования в мягких условиях и подтверждена анализом спектров ¹³С-ЯМР нативного и *O*-деацетилированного полисахарида. Проведена полная интерпретация спектра ¹³С-ЯМР полисахарида, подтверждающая его строение.

Серологическая специфичность многих бактерий определяется химическим строением полисахаридных цепей их соматических и капсульных антигенов [2]. Вследствие этого микроорганизмы, продуцирующие химически сходные полисахаридные антигены, проявляют родственную серологическую специфичность, обнаруживаемую с помощью перекрестных серологических реакций. Это явление хорошо известно в иммунохимии и широко используется в качестве критерия при химических структурных исследованиях бактериальных антигенов. Проведенное нами ранее сравнительное структурное исследование антигенных липополисахаридов серологически идентичных типов *Sh. dysenteriae* и *Escherichia coli* позволило впервые доказать, что микроорганизмы, относящиеся к разным родам, могут продуцировать химически идентичные антигены [3, 4].

Настоящей работой мы продолжаем структурные исследования полисахаридных антигенов бактерий группы *Sh. boydii* и серологически родственных с ней бактерий других родов и приводим данные о строении специфической полисахаридной цепи липополисахарида *Sh. boydii* тип 8. Бактерии *Sh. boydii* тип 8 дают серологическую перекрестную реакцию с клетками *E. coli* 0:114. Эта реакция является частичной, что указывает на определенные различия в структурах соответствующих специфических полисахаридов.

Липополисахарид был выделен из сухих бактериальных клеток *Sh. boydii* тип 8 экстракцией горячим водным фенолом с последующим осаждением пуклеиновых кислот в виде соли с цетавлоном [5]. Липополисахарид нагревали с разбавленной уксусной кислотой и супернатант после отделения нерастворимого осадка липида хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Полученный таким образом полисахарид был по дан-

* Сообщение 11 см. [1].

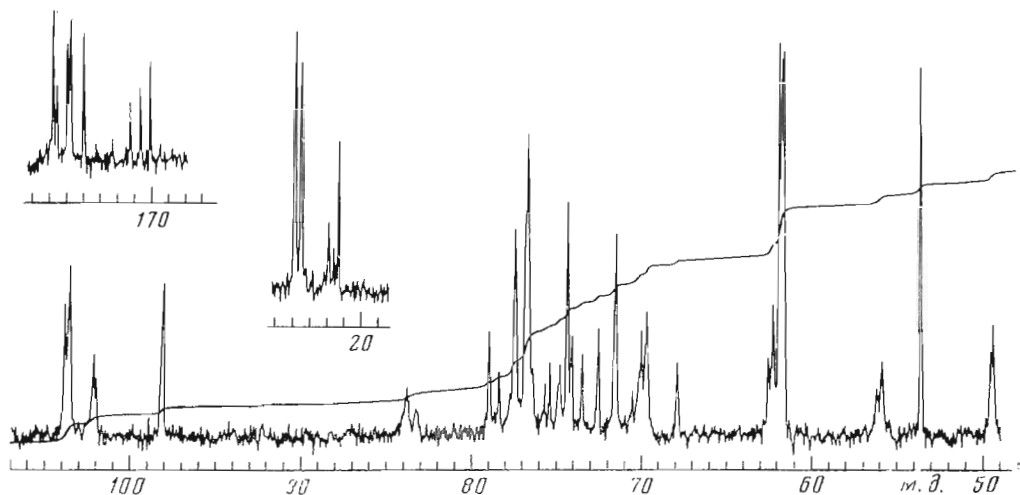


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР специфического полисахарида из *Sh. boydii* тип 8

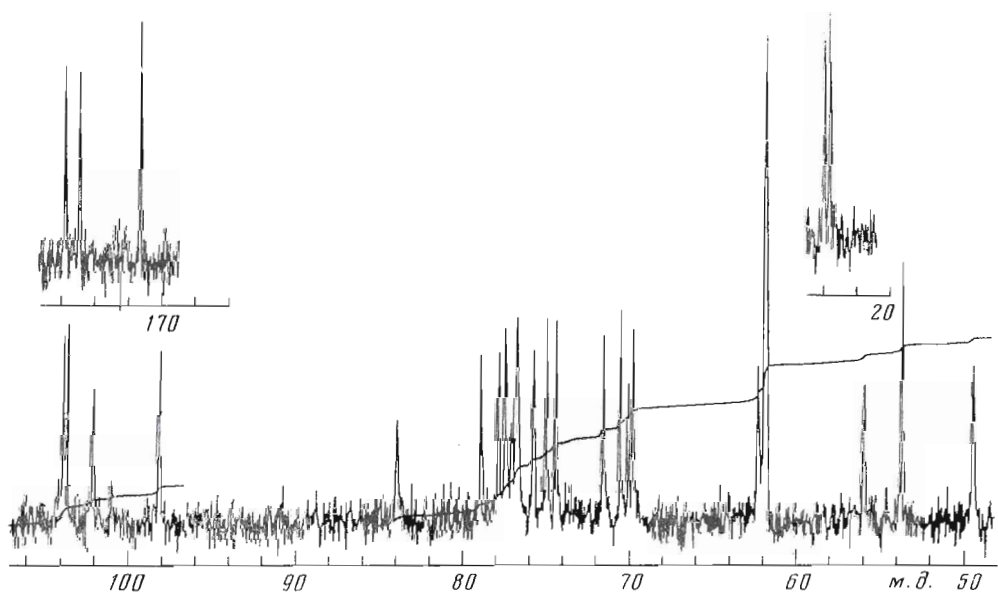


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР O-деацетилированного полисахарида из *Sh. boydii* тип 8

ным электрофореза на бумаге кислым ($E_{\text{GlcUA}} 0,62$). Хроматография на колонке с QAE-сефадексом А-25 показала, что кислый полимер содержит примесь нейтрального полисахарида, который был отделен и представлял собой глюкан (данные анализа гидролизата с помощью углеводного анализатора). Глюканы обычно сопутствуют липополисахаридам музейных штаммов.

Очищенный кислый полисахарид I, $[\alpha]_D +28^\circ$ (с 1, вода), был индивидуальным по данным хроматографии на колонке с QAE-сефадексом А-25. В его ИК-спектре имелись полосы поглощения амидной (1660 и 1550 см^{-1}) и сложноэфирной (и возможно, карбоксильной) группы (1740 и 1250 см^{-1}).

В спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида I были обнаружены сигналы O- и N-ацетильных групп с соотношением интегральных интенсивностей 0,9:2 (см. рис. 1). Наличие двух сигналов в области резонанса O-ацетильных групп с соотношением интегральных интенсивностей 2:3 указывало на то, что O-ацетилированы по меньшей мере два положения одного или различных моносахаридов, входящих в состав полисахаридной цепи. Поскольку

наличие нестехиометрического количества О-ацетильных групп существенно затрудняло интерпретацию спектра ^{13}C -ЯМР, полисахарид был омылен триэтиламинем в водном метаноле. Спектр ПМР О-дезацетилированного полисахарида (полисахарид II) содержал сигналы двух N-ацетильных групп (2,08 м.д., 3H; 2,14 м.д., 3H) и четырех аномерных протонов (4,54 м.д., 1H; 4,67 м.д., 1H; 4,91 м.д., 1H; 5,48 м.д., 1H). В его спектре ^{13}C -ЯМР (рис. 2) имелись сигналы четырех аномерных атомов углерода при 98,2; 102,2; 103,75 и 104,0 м.д. Из этих данных следовало, что полисахарид *Sh. boydii* тип 8 построен из повторяющихся тетрасахаридных звеньев.

Обращали на себя внимание следующие наблюдения. Спектр ^{13}C -ЯМР полисахарида II содержал три сигнала атомов углерода, несущих аминогруппы при 49,4; 53,6 и 55,9 м.д., но только два сигнала ацетамидогрупп при 23,5 и 23,85 м.д. Отнести этот факт за счет наличия в полисахариде компонента со свободной аминогруппой невозможно, так как полисахарид II не давал реакции с нингидрином. Рассмотрение аналитических областей спектра позволило определить наличие четырех незамещенных оксиметильных групп (61,8 м.д., 2C; 61,9 м.д., 1C; 62,3 м.д., 1C) и четырех СО-групп (171,25 м.д., 2C; 174,95 м.д., 1C; 175,8 м.д., 1C). Кроме того, общее число сигналов (31) в спектре ^{13}C -ЯМР явно превышало количество, рассчитанное на четыре гексозидных остатка. Изложенное выше указывало на наличие в составе полисахаридной цепи необычного углеродсодержащего компонента.

Для определения аминокислотных компонентов полисахарид был подвергнут жесткому кислотному гидролизу (4 н. HCl, 100° С, 17 ч) и гидролизат был исследован с помощью аминокислотного анализатора. При этом были идентифицированы глюкозамин (23%) и галактозамин (20%). Эти данные были также подтверждены методом ГЖХ после превращения аминокислот в ацетаты соответствующих 2,5-ангидрогекситов [6]. Величины оптического вращения выделенных препаративной хроматографией на бумаге аминокислот указывали на их D-конфигурацию.

Наряду с глюкозамином и галактозамином в гидролизате полисахарида присутствовал третий нингидрин-положительный компонент, имеющий при аминокислотном анализе время удерживания 1,7 относительно глюкозамина. Данный компонент, выделенный препаративным электрофорезом на бумаге ($E_{\text{GlcN}} 1,85$), не обнаруживался щелочным нитратом серебра и кислым фталатом анилина. Его строение было установлено следующим образом. Масс-спектр его полностью ацетилированного производного содержал две серии пиков. Первая, включающая четыре интенсивных пика с m/z 144, 102, 84 и 60, могла быть объяснена образованием первичного фрагмента $[\text{AcOCH}_2\text{CHNHAc}]^+$ с m/z 144 и последующим отрывом от него молекул кетена и уксусной кислоты. Вторая, более слабая серия содержала пики с m/z 175 и 157, которые, по всей видимости, отвечали отрыву молекул кетена и уксусной кислоты соответственно от молекулярного иона с m/z 217 (в масс-спектре не обнаружен). Очевидно, к той же серии относились пики с m/z 115 (175—AcOH или 157— $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$) и 97 (157—AcOH).

Из этих данных можно было предположить, что наиболее подвижный при электрофорезе компонент гидролизата полисахарида представляет собой 2-аминопропандиол-1,3. Для подтверждения этого был синтезирован заведомый образец данного аминокислота из N-ацетата глюкозаминитола путем периодатного окисления с последующим восстановлением боргидридом натрия. Ацетилирование полученного таким образом образца привело к 2-ацетиламино-1,3-диацетоксипропану. Совпадение времен удерживания заведомого и полученного из полисахарида образцов при ГЖХ (на двух фазах), а также идентичность их масс-спектров окончательно доказали строение данного компонента полисахарида как 2-аминопропандиола-1,3 (данные его спектра ^{13}C -ЯМР приведены в таблице).

Для идентификации нейтральных и кислых компонентов полисахарида был подвергнут гидролизу в более мягких условиях (2 н. HCl, 100° С, 3 ч). Из данных анализа гидролизата с помощью анализатора углеводов следовало, что в составе полисахарида нейтральные сахара отсутствуют,

**Химические сдвиги атомов углерода в дезацетилированном и
восстановленном полисахаридах, триозиде (5) и модельных соединениях ***
Растворы в $^2\text{H}_2\text{O}$, внутренний эталон — CH_3OH , 50,15 м. д.

Соединение	Остаток	Химические сдвиги						Ссылка
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	
Полимер II	-3GlcNAc β 1-	102,2	55,9	84,0	70,0	77,0	61,9	
	-2GalUA β 1**	104,0	78,9	75,0	70,5	75,7	171,2	
	-3GalNAc α 1-	98,2	49,4	77,8	69,7	71,5	62,3	
	-4GlcUA β 1-	103,7	74,7	77,4	76,7	76,7	174,9	
Полимер III	-3GlcNAc β -	102,1	55,9	84,5	70,1	77,0	62,3	
	-2GalUA β 1**	104,2	79,1	75,0	70,5	75,8	171,1	
	-3GalNAc α 1-	99,1	49,6	77,7	69,8	72,3	62,3	
	-4Glc β 1-	103,7	74,6	77,3	75,9	76,6	62,1	
Триозид (5)	GlcNAc β 1-	102,7	57,1	75,3	71,4	77,2	62,3	
	-2GalUA β 1**	104,2	79,5	75,2	70,7	75,9	171,6	
	-3GalNAc α 1-	99,1	49,8	77,7	69,9	72,2	62,3	
	-3EryA	175,3	71,4	81,7	61,1			
AcNHCH(CH ₂ OH) ₂		61,0	53,4					
β -GlcUA6NHCH(CH ₂ OH) ₂		97,5	72,6	73,6	70,4	75,9	171,9	
β -Me-GlcNAc		103,0	56,7	75,2	71,3	77,1	62,1	[15]
β -Me-GlcNAc3Me		102,9	55,0	84,2	69,8	77,0	62,0	[15]
α -Me-Gal		99,4	51,1	69,1	69,8	71,9	62,4	[14]
α -Me-GalNAc3Me		99,3	49,5	78,0	65,8	71,8	62,5	[14]
β -Me-GlcUA		104,3	73,8	76,5	72,3	75,6	?	[18]
β -Me-GalUA		104,2	70,9	73,0	70,4	74,9	171,2	[20]

* Атомы углерода N-ацетильной группы остатков аминсахаров резонируют при 23,6—23,9 м. д. (CH_3CON) и 175,6—176,1 м. д. (CH_2CON). EryA — эритроновая кислота. Символы замещенных моносахаридных остатков приведены в соответствии с рекомендациями Комиссии по номенклатуре IUPAC — IUB (см. J. Biol. Chem.; 1982, v. 257, № 7, p. 3347—3351).

** GalUA в виде 1,3-диоксипропил-2-амида.

поскольку обнаруженные незначительные количества (1,5—2%) глюкозы и галактозы явно происходили из кора. При изучении гидролизата методом электрофореза на бумаге в буфере с pH 4,5 оказалось, что наряду с идентифицированными выше компонентами гидролизат содержит вещество кислой природы с подвижностью гексуроовой кислоты и нейтральный продукт, который обнаруживался как щелочным нитратом серебра, так и нингидрином. Кислый и нейтральный компоненты гидролизата были выделены препаративным электрофорезом на бумаге. При исследовании вещества, имеющего кислый характер, методом хроматографии на бумаге были идентифицированы глюкуроновая и галактуроновая кислоты. Обе кислоты были выделены препаративной хроматографией на бумаге и подвергнуты метанолизу с последующим восстановлением боргидридом натрия в боратном буфере [7] и гидролизом. При этом с помощью углеводного анализатора были идентифицированы глюкоза и галактоза, D-конфигурация которых следовала из данных ферментативного окисления глюкозооксидазой и галактозооксидазой соответственно. Из этих результатов следовало, что в состав полисахарида входят остатки D-глюкуроновой и D-галактуроновой кислот.

Необходимо отметить, что при проведении гидролиза полисахарида 2 н. HCl (100° С, 3 ч) освобождалось лишь 13—14% обоих аминсахаров и наблюдалось появление двух новых компонентов с существенно меньшим временем удерживания (при хроматографии на аминокислотном анализаторе), чем у аминсахаров. Именно эти два компонента и были обнаружены при исследовании с помощью аминокислотного анализатора нейтрального вещества стартовой зоны электрофореза (см. выше). Оба соединения приобретали подвижность (E_{GlcUA} 0,85) при электрофорезе в щелочном буфере с pH 9,5. При препаративной хроматографии на бумаге веществ, соответствующих нейтральной зоне электрофореза, было выделено два дисахарида (1 и 2, см. схему) с R_{Glc} 0,35 и 0,55 (система В).

При жестком кислотном гидролизе дисахарид (1) высвобождал глюкозамин, а (2) — галактозамин (данные анализатора аминокислот). Метано-

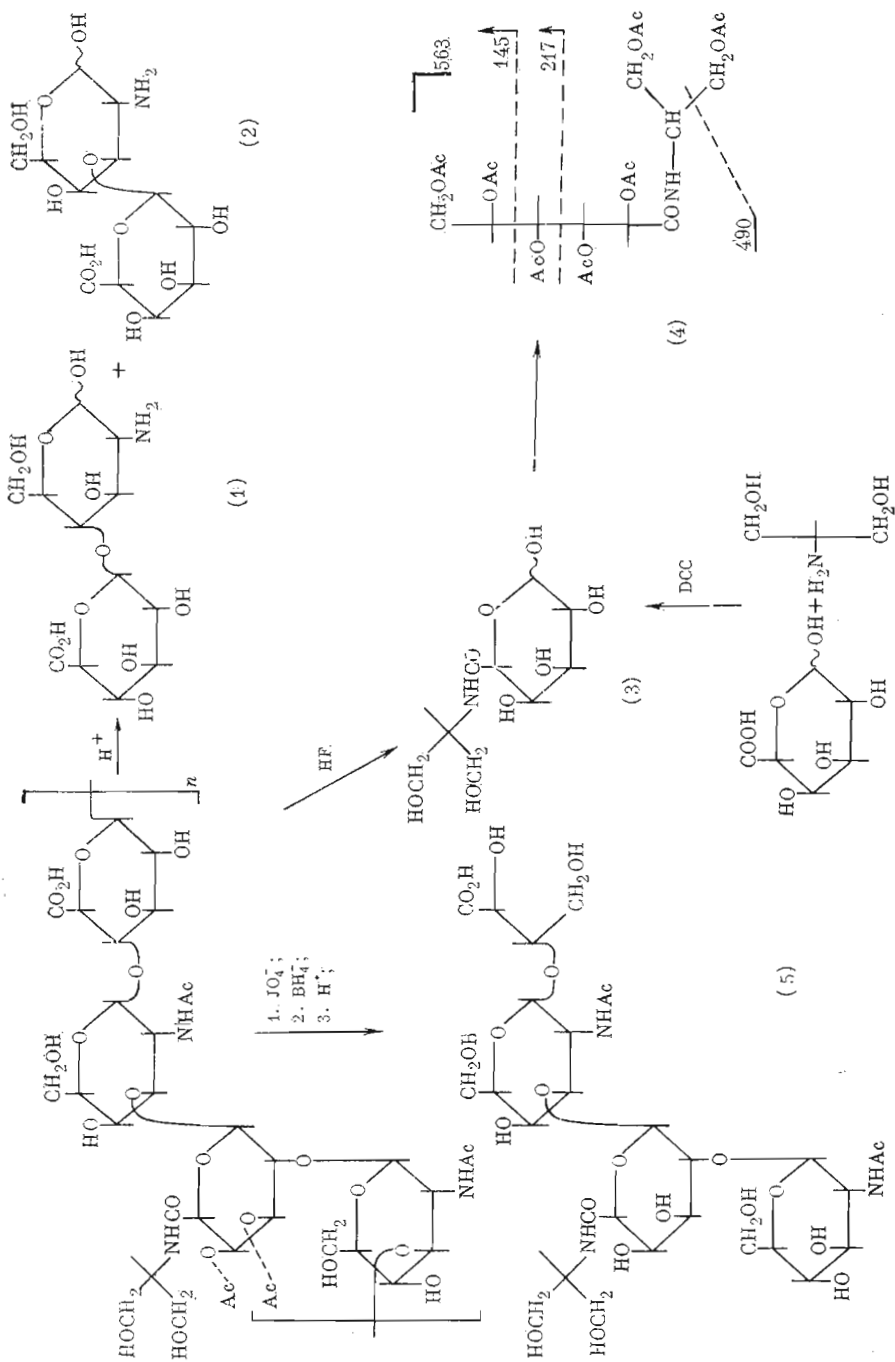
лиз дисахаридов (1) и (2) с последующим восстановлением боргидридом натрия в боратном буфере [7] и гидролизом привел в случае соединения (1) к глюкозе и в случае (2) — к галактозе (данные углеводного анализатора). Из приведенных данных следовало, что в состав дисахаридов (1) входят глюкозамин и глюкуроновая кислота, а дисахарид (2) содержит галактозамин и галактуроновую кислоту. Анализ метанолизатов выделенных дисахаридов (1) и (2) методом ГЖХ в виде ацетатов метилгликозидов показал, что они содержат аминсахар и уроновую кислоту в эквимольных количествах. Для идентификации моносахарида, расположенного на восстанавливаемом конце дисахаридов (1) и (2), каждый из них был подвергнут дезаминированию азотистой кислотой [6] с последующим восстановлением боргидридом натрия и метанолизом. Изучение продуктов данных превращений методом ГЖХ в виде ацетатов показало наличие наряду с ацетатами соответствующих 2,5-ангидрогексеновых ацетатов метиловых эфиров метилгликозидов соответствующих уроновых кислот; образование последних возможно только в случае, если остатки уроновых кислот расположены на невосстанавливаемом конце дисахаридов. Из этих данных следовало, что дисахарид (1) представляет собой глюкуронилглюкозамин, а (2) — галактуронилгалактозамин.

Аналогичная амфотерная биоуроновая кислота была идентифицирована нами ранее [8] при изучении специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 8. Как в более раннем исследовании, так и в данной работе заниженное содержание гексозаминов и уроновых кислот в гидролизатах полисахаридов (2 н. HCl, 100°С, 3 ч) обусловлено образованием трудно гидролизующихся дисахаридов. Более полной деполимеризации с целью определения соотношения компонентов полисахарида II удалось достичь при метанолизе данного полимера. Анализ смеси метилгликозидов методом ГЖХ в виде полных O,N-ацетатов показал, что глюкуроновая кислота, галактуроновая кислота, глюкозамин, галактозамин и 2-аминопропандиол-1,3 входят в состав полисахарида II в эквимольных количествах.

Таким образом, из приведенных выше данных непосредственно следовало, что повторяющееся звено полисахарида *Sh. boydii* тип 8 представляет собой комбинацию двух дисахаридных фрагментов: GlcUA→GlcN (1) и GalUA→GalN (2), причем к одному из остатков уроновой кислоты, по видимому, присоединен амидной связью остаток 2-аминопропандиола-1,3.

Вопрос о локализации остатка 2-аминопропандиола-1,3 был решен следующим образом. Восстановление полисахарида II по карбоксильным группам остатков уроновых кислот [7] привело к нейтральному полисахариду III. В его гидролизате (2 н. HCl, 100°С, 3 ч) с помощью углеводного анализатора была обнаружена только глюкоза. Анализ аминокислотных компонентов гидролизата с использованием аминокислотного анализатора показал наличие эквимольного относительно глюкозы количества глюкозамина, тогда как содержание галактозамина (относительно глюкозамина) составило лишь 45%. В гидролизате также присутствовал дисахарид (2), в то время как дисахарид (1) обнаружен не был. Все эти факты однозначно доказывали, что остаток глюкуроновой кислоты подвергся восстановлению и, следовательно, 2-аминопропандиол-1,3 присоединен амидной связью к остатку галактуроновой кислоты.

Вывод о локализации остатка 2-аминопропандиола-1,3 был независимо доказан выделением из полисахарида и идентификацией 1,3-диоксипропил-2-амида галактуроновой кислоты (3) (см. схему). С этой целью полисахарид был подвергнут сольволизу безводным жидким фтористым водородом в условиях, предполагающих расщепление гликозидных, но не амидных связей [9]. Несмотря на жесткие условия сольволиза (3—4 ч, 30—35°С), в продуктах расщепления наблюдалось значительное количество олигосахаридного материала. Этим был обусловлен низкий выход амида (3), который был выделен препаративной хроматографией на бумаге. Для подтверждения его структуры было проведено восстановление боргидридом натрия и ацетилирование. Масс-спектр полученного таким образом ацетата полиола (4) (см. схему) содержал пик молекулярного иона с m/z 563, а также интенсивные пики с m/z 490 (разрыв связей C'1—C'2 и



C'2—C'3 в остатке 2-аминопропандиола-1,3; $M - 73$) и 443 ($M - 2\text{AcOH}$). В масс-спектре имелись также пики с m/z 430, 370 и 310, характеризующие отрыв молекул уксусной кислоты от иона с m/z 490, и пики с m/z 145, 217, соответствующие первичным фрагментам, образующимся при расщеплении связей C2—C3 и C3—C4 основной цепи полиола.

Для окончательного подтверждения строения соединения (3) был предпринят его встречный синтез по методике, близкой к описанной ранее [10] для синтеза аминокислотных производных галактуроновой кислоты. Прямая конденсация 2-аминопропандиола-1,3 с галактуроновой кислотой в водном пиридине в присутствии дидиклогексилкарбодимида с последующим разделением реакционной смеси препаративной хроматографией на бумаге привела к амиду (3), идентичному выделенному из полисахарида образцу (3) по данным хроматографии на бумаге и ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетата полиола. Данные спектра ^{13}C -ЯМР синтетического образца (3) приведены в таблице.

Необходимо отметить, что как 2-аминопропандиол-1,3, так и его *D*-галактуронат впервые обнаружены в качестве компонентов природных полисахаридов.

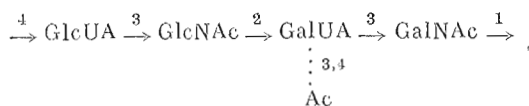
Для выяснения характера замещения моносахаридных остатков *O*-дезацетилованный полисахарид II был подвергнут анализу методом метилирования [11]. Метилированный в условиях Хакомори [11] полимер был очищен гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-50 и далее обработан HCl в метаноле (1 М, 100° С, 17 ч). Часть метанолизата после ацетилирования исследовали методом ГЖХ-масс-спектрометрии. При этом были идентифицированы 2-(*N*-метил) амидо-2-дезоксид-4,6-ди-*O*-метил-3-*O*-ацетил- α , β -метилглюко- и галактопиранозиды, масс-спектры которых совпали с описанными в литературе [12]. Другую часть метанолизата восстанавливали по карбоксиметильным группам боргидридом натрия в боратном буфере [7] и далее гидролизовали. Полученные при этом частично метилированные моносахариды были идентифицированы как 2,3-ди-*O*-метилглюкоза и 3,4-ди-*O*-метилгалактоза в виде ацетатов полиолов с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии. Таким образом, из результатов анализа методом метилирования следовало, что полисахарид *Sh. boydii* тип 8 является линейным, а также, что остатки аминсахаров замещены в положение 3, остаток глюкуроновой кислоты замещен в положение 4*, а остаток галактуроновой кислоты — в положение 2.

Характер распределения *O*-ацетильных групп в повторяющемся звене полисахарида был также установлен методом метилирования. Предварительные эксперименты по метилированию *O*-дезацетилованного полисахарида II по методу Хакомори [11] при времени контакта раствора полисахарида в диметилсульфоксиде с метилсульфиниланионом 15 мин, а не, как обычно, 1—2 ч показали, что метилирование, несмотря на малое время обработки анионом, протекает практически полностью. Об этом свидетельствовало отсутствие пиков недометилированных моносахаридов при анализе метанолизата метилированного таким образом полисахарида II методом ГЖХ, как описано выше. Можно было ожидать, что при метилировании нативного полисахарида в этих мягких условиях не произойдет существенного расщепления сложноэфирных связей и, следовательно, метилирования гидроксильных групп, несущих *O*-ацетильные остатки. Раствор полисахарида I в диметилсульфоксиде был обработан метилсульфиниланионом в течение 15 мин и далее сразу иодистым метилом. Метилированный таким образом полимер был подвергнут метанолизу с последующим восстановлением метиловых эфиров метилгликозидов урновых кислот, как описано выше. Дальнейший гидролиз, восстановление бордейтеридом натрия и ацетилирование привели к смеси частично метилированных ацетатов полиолов. Сопоставление результатов метилирования *O*-дезацетилованного и нативного полисахаридов в мягких условиях показало, что величина пика ацетата 3,4-ди-*O*-метилдальциты, соответствующего в полисахариде II остатку 2-*O*-замещенной галактуроновой кислоты,

* Относительно доказательства его пиранозной формы см. ниже.

уменьшается приблизительно на 50% в случае метилирования полимера I с одновременным появлением пика ацетата 3(4)-О-метилдульцита. Анализ масс-спектра этого пика показал присутствие ацетатов 3-О-метил-[1-²H]дульцита и 4-О-метил-[1-²H]дульцита в соотношении 2 : 3. Из этих данных следовало, что именно в таком соотношении распределяются О-ацетильные группы между положениями 4 и 3 в остатках галактуронопой кислоты, содержащихся в нативном полисахариде.

Таким образом, из результатов анализа методом метилирования вытекал вывод о линейности полисахаридной цепи и, следовательно, с взаимном расположении двух дисахаридных фрагментов (1) и (2) в повторяющемся звене:



Для получения независимого доказательства последовательности моносахаридных остатков в полимерной цепи, а также для проведения полной интерпретации спектра ¹³C-ЯМР нативный полисахарид был подвергнут избирательному расщеплению по Смиту. Как и следовало ожидать из характера замещения (и О-ацетилирования) моносахаридов, периодатное окисление полисахарида I затронуло лишь остаток глюкуроновой кислоты. Кислотный гидролиз окисленного и далее восстановленного боргидридом натрия полимера в стандартных условиях (0,5 н. HCl, 20° С) даже при продолжительном времени гидролиза не привел к расщеплению модифицированного полисахарида на олигосахаридные фрагменты. Лишь повышение температуры обработки до 37° С позволило получить олигосахарид (5), который был выделен гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-15.

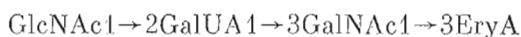
В метанолизате олигосахарид (5) после ацетилирования были идентифицированы методом ГЖХ-масс-спектрометрии эквимольные количества ацетата 2-аминопропандиола-1,3 и тех же гликозидов, что и в случае метанолиза полисахарида I, с тем отличием, что вместо производного глюкуроновой кислоты присутствовал метиловый эфир триацетата эритроновой кислоты. Жесткий кислотный гидролиз олигосахарид (5) привел к идентификации с помощью аминокислотного анализатора эквимольных количеств 2-аминопропандиола-1,3 и обоих аминсахаров. Из этих данных следовало, что в состав олигосахарид (5) входят остатки 2-аминопропандиола-1,3, глюкозамина, галактозамина, а также галактуроновой и эритроновой кислот.

Анализ спектра ¹³C-ЯМР триозида (5) также подтверждал его состав (отпесение сигналов в спектре см. в таблице). Действительно, в аномерной области спектра имелись три сигнала равной интегральной интенсивности с химическими сдвигами 99,15; 102,7 и 104,2 м.д., что доказывало трисахаридную природу олигосахарид (5). Присутствие в спектре сигналов двух N-ацетильных групп (23,5 и 23,9, а также 175,3 и 176,1 м.д.) и трех единичных сигналов атомов углерода, связанных с азотом (49,4; 53,6 и 55,9 м.д.), указывало на то, что в его состав входят остатки N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина и 2-аминопропандиола-1,3. В спектре имелся также сигнал удвоенной интегральной интенсивности с химическим сдвигом 171,25 м.д., соответствующий двум СО-группам остатков галактуроновой и эритроновой кислот. И наконец, число резонансных линий в спектре соответствовало общему количеству атомов углерода в триозиде (5).

Для установления последовательности моносахаридных остатков в трисахариде (5) было проведено его периодатное окисление, что привело к полному исчезновению из метанолизата глюкозамина и галактуроновой кислоты. Из этих данных непосредственно следовало, что остаток глюкозамина расположен на невозстанавливаемом конце олигосахарид (5). Для определения последовательности других остатков был использован гидролиз 2 М HCl, в результате которого из трисахарид (5) полностью

высвобождались лишь 2-аминопропандиол-1,3 и глюкозамин, тогда как галактозамин присутствовал в гидролизате в количестве 30–35% (в расчете на глюкозамин). Одновременная идентификация в смеси аминокомпонентов значительного количества дисахарида (2) (при отсутствии (1)) указывала на наличие в составе триозида (5) фрагмента GalUA → GalNAc.

Таким образом, последовательность моносахаридных остатков в данном олигосахариде может быть представлена следующим образом:



Независимое подтверждение взаимного расположения моносахаридных остатков в триозиде (5) следовало из данных спектра ^{13}C -ЯМР, которые будут приведены ниже.

Последним этапом в установлении строения полисахарида было определение конфигурации гликозидных связей в повторяющемся звене полисахарида с использованием метода ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. Съемка спектра ^{13}C -ЯМР полисахарида II без подавления взаимодействия углерода с протонами позволила определить константы $J_{^{13}\text{C}-^1\text{H}}$ для всех аномерных атомов углерода [13]. Эти константы оказались равными 164,6; 162,8; 162,8 и 173,9 Гц для сигналов 104,0; 103,75; 102,2 и 98,2 м.д. соответственно. Отсюда следовало, что три низкочастотных сигнала С1 (104,0; 103,75 и 102,2 м.д.) соответствовали β -связанным моносахаридным остаткам, а высокочастотный сигнал при 98,2 м.д. отвечал атому С1 моносахарида с α -конфигурацией. Из анализа области резонанса атомов углерода, несущих аминогруппы, следовало, что из двух сигналов С2 аминосахаров с химическими сдвигами 55,9 и 49,4 м.д. (сигнал при 53,6 м.д. принадлежит атому С2 остатка 2-аминопропандиола-1,3, см. таблицу) последний можно отнести только за счет резонанса С2 α -связанного остатка галактозамина, замещенного по С3 [14]. Следовательно, единственным остатком с α -конфигурацией являлся остаток галактозамина, а все остальные присоединялись β -гликозидными связями. Сопоставление аномерной области спектров полисахарида и триозида (5) показывает исчезновение в спектре последнего сигнала с химическим сдвигом 103,75 м.д., что доказывает принадлежность данного сигнала β -связанному остатку глюкуроновой кислоты, трансформированному в процессе деградации по Смитсу. Сигналы С1 β -связанных остатков галактуроновой кислоты и глюкозамина (104,0 и 102,1 м.д.) не могут быть однозначно отнесены из-за отсутствия в литературе спектральных данных для модельного соединения, имитирующего 2-О-замещенный остаток галактуроновой кислоты.

После определения конфигураций гликозидных связей стало возможным, с одной стороны, получение независимых спектральных доказательств некоторых деталей структуры полисахаридной цепи, а с другой — проведение полного отнесения сигналов в спектрах ^{13}C -ЯМР триозида (5), а затем полисахаридов II и I.

Из сопоставления спектров полисахарида II и триозида (5) видно, что сигнал С2 β -связанного остатка глюкозамина имеет более высокочастотный сдвиг в спектре полисахарида (55,9 м.д.), чем в спектре триозида (5) (57,1 м.д.), из чего следует, что в полисахариде остаток глюкозамина замещен в положение (3), а в олигосахариде находится на невозстанавливаемом конце (сдвиг за счет исчезновения β -эффекта замещения по С3 [15]). Обращает на себя внимание также различие в химических сдвигах С1 остатка галактозамина (98,2 м.д. в полисахариде II и 99,15 м.д. в триозиде (5)). Такое смещение объясняется изменением структуры «агликона» у остатка галактозамина, который в полисахариде присоединен к глюкуроновой, а в триозиде (5) — к эригроновой кислоте. Таким образом, подтверждается взаимное расположение аминосахарных остатков в триозиде (5) и, следовательно, в полисахаридной цепи.

Анализ спектра ^{13}C -ЯМР восстановленного по карбоксильным группам полисахарида III позволил определить размер окисного цикла остатка глюкуроновой кислоты, что невозможно было установить из результатов анализа методом метилирования. Для глюко- и галактофуранозидов ха-

рактен сигнал от пезамещенной оксиметильной группы в области резонанса 63,6—64,7 м.д. [16]. В спектре полисахарида III все сигналы оксиметильных групп имеют более высокопольные сдвиги (61,75—62,3 м.д.), свойственные оксиметильным группам пиранозных остатков [17]. Следовательно, остаток глюкуроновой кислоты находится в полисахаридной цепи в пиранозной форме.

Кроме того, сравнительный анализ спектров ^{13}C -ЯМР полисахаридов II и III позволил подтвердить характер замещения остатка глюкуроновой кислоты. Изменение в спектре полимера III происходит в области резонанса замещенных атомов углерода: вместо сигнала при 76,7 м.д. в спектре восстановленного полисахарида появляется сигнал при 75,8 м.д. Такое смещение характерно только для атома C4 при переходе от глюкуроновой кислоты к глюкозе [18]. Следовательно, остаток глюкуроновой кислоты замещен в полисахаридной цепи в положение 4.

Полная интерпретация спектров триозида (5), а затем и полисахаридов II и III была сделана с привлечением спектров модельных соединений. С использованием литературных спектральных данных для метил-2-ацетидамо-2-дезоксид-3-О-метил- α -D-галактопиранозида [14] и метил-2-ацетидамо-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозида [15], имитирующих 3-О-замещенный остаток N-ацетил- α -галактозамина и незамещенный остаток β -связанного N-ацетилглюкозамина соответственно, было проведено отнесение сигналов данных остатков в спектре ^{13}C -ЯМР триозида (5). Оставшиеся сигналы в спектре соединения (5) относились к атомам углерода остатков галактуруновой и эритроновой кислот. Отнесение этих сигналов в спектре было проведено с использованием полученных нами ранее спектральных данных для 3-О-замещенного остатка эритроновой кислоты [19], а также при сопоставлении спектра триозида (5) со спектром метилового эфира метил- β -D-галактурунопиранозида [20] с учетом возможных α - и β -эффектов замещения по C2 [17]. После интерпретации спектра триозида (5) стало возможным проведение отнесения сигналов в спектре полисахарида II, которое было сделано с использованием спектра модельного соединения — метил- β -D-глюкоурунопиранозида [18] (см. таблицу).

Сравнительный анализ спектров ^{13}C -ЯМР нативного и O-ацетилированного полисахаридов дал также возможность независимым путем подтвердить характер локализации O-ацетильных групп в полисахаридной цепи. Сопоставление спектров полисахаридов I и II показало, что в наиболее значительной степени O-ацетилирование затронуло химическое окружение атомов C2, C3, C4 и C5 остатка галактуруновой кислоты, что нашло свое выражение в существенном смещении сигналов этих атомов в высокое поле при переходе от спектра I к спектру II. Наиболее отчетливо эти изменения выразились в появлении в спектре полисахарида I сигналов, не наблюдавшихся в спектре полимера II. Так, в спектре I появились сигналы с химическими сдвигами 67,9; 72,6 и 73,5 м.д. с одновременным уменьшением интенсивности сигналов с химическими сдвигами 70,55; 75,0 и 75,75 м.д., соответствующих атомам C4, C3 и C5 остатка галактуруновой кислоты. Аналогично в области замещенных атомов углерода сигнал, отнесенный к резонансу атома C2 остатка галактуруновой кислоты, также сместился в спектре полимера I в высокое поле (78,9 м.д. \rightarrow \rightarrow 76,7 м. д.). Такое существенное смещение сигналов атомов углерода остатка галактуруновой кислоты в высокое поле спектра (2,25—2,65 м.д.) с учетом того, что изменения химических сдвигов сигналов других атомов углерода не превышало 0,5 м.д., однозначно указывало на то, что каждый остаток галактуруновой кислоты несет O-ацетильный заместитель в положении 3 или 4, так как только в этом случае β -эффекты O-ацетилирования сказывались бы на химических сдвигах атомов C2, C2, C4 и C5 данного остатка (γ -эффекты O-ацетилирования незначительны).

Следовательно, спектральные характеристики полисахарида полностью согласуются со структурой, установленной химическими методами. Таким образом, совокупность всех приведенных выше данных доказывает структуру повторяющегося звена специфического полисахарида *Sh. boydii* тип 8, приведенную на схеме.

В ближайшем будущем мы предполагаем опубликовать результаты структурного исследования специфического полисахарида, выделенного из серологически родственного микроорганизма *E. coli* 0114 и привести сравнительный анализ обоих полисахаридов.

Экспериментальная часть

ГЖХ выполняли на приборе «Pye-Uniscam», модель 64, с пламенно-ионизационным детектором (Англия) с использованием стеклянной колонки (0,4×90 см) с 3% ECNSS-M Gas-Chrom Q 100—120 меш (колонка А) и стальной колонки (0,6×150 см) с 3% SE-30 на диатомите CQ (колонка Б). Хромато-масс-спектрометрию выполняли на приборе «Varian MAT Gnom-111» с использованием тех же фаз. Анализ аминокислот проводили на автоматическом анализаторе аминокислот BC-200 (Bio-cal-LKB) на колонке с катионитом хромекс UA-8 (0,9×27 см) при последовательном элюировании натрий-цитратными буферами с pH 3,5 (0,2 М, 15 мин) и далее с pH 5,28 (0,35 М, 85 мин) при 65° С. Анализ нейтральных сахаров выполнен на анализаторе углеводов «Technicon SC-2» в 0,5 М боратном буфере, pH 9. Хроматографию проводили на бумаге FN-11 в системах *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3 (система А) и этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 5 : 5 : 3 : 1 (система Б). Для хроматографии на бумаге уроновых и биоуроновых кислот использовали систему ацетон — этанол — изопропанол — 0,005 М натрий-боратный буфер, pH 12, с соотношением компонентов 3 : 1 : 1 : 2 (система В). Гель-хроматографию проводили на колонках с сефадексом G-50 (3,5×67 см) и G-15 (1,7×70 см). Электрофорез выполнен на бумаге FN-11 в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5 (27 В/см). Оптическое вращение определяли на автоматическом поляриметре «Perkin-Elmer 141». Спектры ПМР полисахаридов снимали на приборе «Bruker-Physik WP-250» в D₂O при 90° С с ацетоном в качестве внутреннего стандарта, спектры ¹³C-ЯМР сняты на том же приборе в D₂O при 40° С с метанолом в качестве внутреннего стандарта (химические сдвиги приведены после пересчета по соотношению $\delta_{TMS} = \delta_{MeOH} + 50,15$ м.д.). ИК-спектр снимали на приборе «UR-2» в таблетке с KBr. Растворы упаривали в вакууме при 40° С.

Выделение специфического полисахарида. Сухие клетки *Sh. boydii* тип 8 экстрагировали 45% водным фенолом при 65° С с последующим осаждением нуклеиновых кислот цетавлоном по стандартной методике [5]. Выход липополисахарида составил 1,5% в расчете на сухие клетки. Липополисахарид (1,5 г) нагревали 1,5 ч в 100 мл 1% уксусной кислоты при 100° С. Осадок липида отделяли центрифугированием, супернатант лиофилизировали, остаток хроматографировали на колонке с сефадексом G-50; получено 300 мг полисахарида, раствор которого в 5 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера, pH 6,1, наносили на колонку (20×1,5 см) с QAE-сефадексом А-25, уравновешенным тем же буфером. Колонку промывали в течение 40 мин при скорости подачи буфера 1 мл/мин, после отделения нейтрального глюкоана элюцию продолжали 1 М NaCl в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 6,1, и выделяли фракцию кислого полисахарида. После лиофилизации продукт обессоливали гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-50 и получили 230 мг полисахарида I [α]_D+28° (с 1; вода).

Идентификация компонентов гидролизата полисахарида. Полисахарид (100 мг) гидролизовали 2 н. HCl при 100° С в течение 3 ч; гидролизат упаривали, остаток подвергали препаративному электрофорезу на бумаге в течение 45 мин; зону, соответствующую уроновым кислотам, элюировали водой, элюат упаривали, из остатка препаративной хроматографией на бумаге в системе В выделили 5 мг глюкуроновой кислоты, R_{Glc} 0,75, и 4 мг галактуроновой кислоты, R_{Glc} 0,70. Каждый из образцов подвергли метанолизу 1 н. HCl в MeOH (1 мл) при 100° С в течение 17 ч. Метанолизат после упаривания и высушивания в эксикаторе над КОН растворяли в 2 мл воды, к раствору прибавляли H₂BO₃ до насыщения, а затем при охлаждении реакционной смеси до 0° С и перемешивании боргидрид нат-

рия порциями по 3—4 мг в течение 2—3 ч, поддерживая значение pH 7—8 прибавлением небольшого количества H_3BO_3 . Далее смесь обрабатывали избытком боргидрида натрия, охлаждение снимали, через 16 ч перемешивания смесь обрабатывали катионитом КУ-2 в H^+ -форме, фильтрат после отделения смолы упаривали, остаток несколько раз упаривали с MeOH, гидролизовали 2 н. HCl при 100°С в течение 2 ч. В продукте, полученном из глюкуроновой кислоты с использованием анализатора углеводов, констатировано наличие глюкозы и ее полное исчезновение после обработки другой аликвоты гидролизата *D*-глюкозооксидазой. Аналогично из выделенного образца галактуроновой кислоты была получена галактоза, которая полностью исчезала при обработке *D*-галактозооксидазой.

Зону препаративного электрофореза, соответствующую аminosахарам, элюировали 0,01 н. раствором HCl, элюат упаривали, из остатка (после высушивания над КОН) препаративной хроматографией на бумаге в системе В выделили 6,5 мг глюкозамина, $[\alpha]_D + 61^\circ$ (*c* 0,5; вода), ср. [21]: $[\alpha]_D + 72^\circ$ (*c* 1; вода) и 7,5 мг галактозамина, $[\alpha]_D + 84^\circ$ (*c* 0,5; вода), ср. [22]; $[\alpha]_D + 97^\circ$ (*c* 1; вода).

При препаративной хроматографии на бумаге в системе В материала стартовой зоны препаративного электрофореза было выделено 2,3 мг дисахарида (1) и 3 мг дисахарида (2), дополнительное количество которых было получено при частичном гидролизе полисахарида.

Частичный гидролиз полисахарида. Полисахарид I (50 мг) нагревали 1 ч с 10 мл 2 н. HCl при 100°С, гидролизат упаривали, остаток высушивали в вакуумном эксикаторе над КОН. Препаративной хроматографией на бумаге в системе В было выделено 5 мг дисахарида (1), R_{Glc} 0,35, и 7 мг дисахарида (2), R_{Glc} 0,55. В гидролизате дисахаридов (1) и (2) (4 н. HCl, 100°С, 17 ч) с помощью аминокислотного анализатора были идентифицированы глюкозамин и галактозамин соответственно. Метанолит дисахаридов (1) и (2) (1 н. HCl в MeOH, 100°С, 17 ч) с последующим восстановлением боргидридом натрия в боратном буфере, гидролизом и идентификацией глюкозы и галактозы соответственно выполнены как описано выше для уроновых кислот. При дезаминировании [6] дисахарида (1) с последующим восстановлением боргидридом натрия в воде (2 ч), метанолитом и ацетилированием обнаружены с использованием ГЖХ эквивалентные количества ацетатов 2,5-ангидромаанита и метилового эфира метилглюкуропида. При аналогичной обработке дисахарида (2) идентифицированы ацетаты 2,5-ангидроталита и метилового эфира метилгалактуронида в соотношении 1 : 1.

Анализ полисахаридов I и II методом метилирования. Высушенный при 60°С над P_2O_5 полисахарид II (10 мг) метилировали по стандартной методике [11]. Полученную после метилирования реакционную смесь разбавляли небольшим количеством воды, нейтрализовали разбавленной HCl и хроматографировали по колонке с сефадексом G-50. Фракции, соответствующие полисахаридной области (анализ фракций с помощью углеводного анализатора), объединяли и лиофилизовали. Метилированный полисахарид нагревали в запаянной ампуле с 1 мл 1 н. HCl в абсолютном MeOH при 100°С в течение 20 ч, часть метанолизата после упаривания ацетилировали уксусным ангидридом (0,5 мл) в пиридине (0,5 мл) в течение 2 ч при 100°С и далее исследовали методом ГЖХ-масс-спектрометрии (колонка Б, 200°С). При этом в качестве единственного аminosахарного компонента был идентифицирован метил-2-(*N*-метил)ацетамидо-2-дезоксиг-3-О-ацетил-4,6-ди-О-метилгексопирапозид*, масс-спектр которого был идентичен описанному ранее [12]. Другую часть метанолизата восстанавливали боргидридом натрия в водной H_3BO_3 как описано выше, далее подвергали ферментации 85% водной муравьиной кислотой (100°С, 2 ч), упариванию и гидролизу 0,5 н. HCl (100°С, 17 ч), гидролизат упаривали, остаток восстанавливали боргидридом натрия (10 мг) в воде в течение 17 ч. Смесь после обычной обработки ацетилировали уксусным

* Разделения глюко- и галактоизомеров в условиях ГЖХ-масс-спектрометрии достигнуто не было.

ангидридом в пиридине в течение 20 мин при 100°С и далее исследовали методом ГЖХ-масс-спектрометрии (колонка А, 170С) с использованием заведомых образцов ацетатов 2,3-ди-О-метилсорбита и 3,4-ди-О-метилдальциста.

При метилировании пассивного полисахарида обработку его раствора в диметилсульфоксиде метилсульфиниланином проводили в течение 15 мин с последующим прибавлением иодистого метила. Исследование метилированного полисахарида I проводили описанными выше методами.

Избирательное расщепление полисахарида I по Смигу. Полисахарид I (150 мг) обрабатывали 15 мл 0,1 М раствора метапериодата натрия в воде при 20°С в течение 72 ч в темноте, к раствору прибавляли порциями при охлаждении 200 мг боргидрида натрия, через 17 ч смесь подкисляли 0,5 н. HCl до pH 5 и модифицированный полисахарид выделяли на колонке с сефадексом G-50. Полученный таким образом полимер (110 мг) выдерживали 17 ч в 10 мл 0,5 н. HCl при 37°С, лиофилизировали, из остатка гелехроматографией на колонке с сефадексом G-15 было выделено 39 мг триозида (5), $R_{\text{рафиноза}}$ 1,1 (система А).

1,3-Диоксипропил-2-амид галактуроновой кислоты (3). К раствору 1,5 г 2-ацетиамидо-2-дезоксид-Д-глюкозы в 15 мл воды прибавляли при перемешивании и охлаждении до 5—10°С боргидрид натрия (3 г, порциями по 200—300 мг) в течение 30 мин, через 4 ч перемешивания при 20°С раствор наносили на колонку (3,5×40 см) с катионитом КУ-2 (H⁺-форма), колонку промывали 150 мл воды, элюат упаривали, остаток несколько раз упаривали с 50 мл MeOH, растворяли в 70 мл 0,2 М водного раствора метапериодата натрия. Через 8 ч (20°С в темноте) реакционную смесь обрабатывали боргидридом натрия и деионизировали как описано выше. Остаток после удаления H₂BO₃ упариванием с MeOH гидролизовали 2 н. HCl (100°С, 4 ч) и гидролизат упаривали. Получали 0,69 г хлоргидрата 2-аминопропандиола-1,3, т. пл. 94—95°С (из спирта), ср. [23]: т. пл. 95—97°С (из спирта). Раствор 0,5 г полученного продукта в 5 мл воды пропускали через колонку (3×20 см) с дауэксом 1×8 (HCO₃⁻-форма), элюируя водой, нингидрин-положительные фракции объединяли и упаривали. К раствору остатка в 4,4 мл воды прибавляли 950 мг D-галактуроновой кислоты и 2,5 мл пиридина и затем по каплям при перемешивании и охлаждении до 5—10°С раствор 5 г дициклогексилкарбодимида в 10 мл пиридина, через 17 ч перемешивания при 20°С реакционную смесь разбавляли 50 мл воды, осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали, из остатка препаративной хроматографией на бумаге в системе А выделили 115 мг амида (3), $R_{\text{Гlc}}$ 0,95 (система А).

ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Касянчук И. В., Захарова И. Я. Бюорган. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1851—1859.
2. Lüderitz O., Westphal O., Staub A. M., Nikaido H. In: Microbial Toxins. New York: Acad. Press, 1971, v. 4, p. 145—161.
3. Dmitriev B. A., Lvov V. L., Kochetkov N. K., Jann B., Jann K. Eur. J. Biochem., 1976, v. 64, p. 491—498.
4. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Jann B., Jann K. Eur. J. Biochem., 1977, v. 79, p. 111—115.
5. Westphal O., Jann K. In: Methods in Carbohydrate Chemistry. New York—London: Acad. Press, 1965, v. 5, p. 88—91.
6. Дмитриев Б. А., Бакиновский Л. В., Львов В. Л., Книрель Ю. А., Кочетков Н. К., Хоменко Н. А. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1971, № 5, с. 1168—1172.
7. Дмитриев Б. А., Бакиновский Л. В., Книрель Ю. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1974, № 10, с. 2335—2338.
8. Дмитриев Б. А., Львов В. Л., Рамос Э. Л., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. Бюорган. химия, 1978, т. 4, № 6, с. 760—766.
9. Mort A. J., Lampion D. A. Anal. Biochem., 1977, v. 82, p. 289—309.
10. Деревицкая В. А., Молодцов Н. В., Кочетков Н. К. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1964, № 4, с. 677—685.
11. Conrad H. E. In: Methods in Carbohydrate Chemistry. New York—London: Acad. Press, 1972, v. 6, p. 361—364.
12. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. Eur. J. Biochem., 1976, v. 66, p. 559—566.
13. Bock K., Lundt J., Pedersen C. Tetrahedron Lett., 1973, p. 1037—1040.

14. Деревицкая В. А., Шашков А. С., Новикова О. С., Евстигнеев А. Ю. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 410-421.
15. Шашков А. С., Евстигнеев А. Ю., Деревицкая В. А. Биоорган. химия, 1979, т. 4, № 10, с. 1495-1506.
16. Ritchie R. G. S., Syr N., Korsh B., Koch H. J., Perlin A. S. Can. J. Chem., 1975, v. 53, p. 1424-1433.
17. Шашков А. С., Чижев О. С. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 4, с. 437-496.
18. Gorin P. A. J., Mazures M. Can. J. Chem., 1975, v. 53, p. 1212-1223.
19. Шашков А. С., Львов В. Л., Тохтамышева Н. В., Дмитриев В. А., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 5, с. 729-735.
20. Matsuhiro B., Zanlungo A. B. Carbohydr. Res., 1981, v. 97, p. 11-18.
21. Stanek J., Cerny M., Kosourek J., Pasak J. In: The Monosaccharides. Prague: Publishing House Czechoslovak Acad. Sci., 1963, p. 498.
22. Kuhn R., Kirschenlor W. Lieb. Ann. Chem., 1965, B. 600, S. 126-134.
23. Piloty O., Ruff O. Ber., 1897, B. 30, S. 1656-1665.

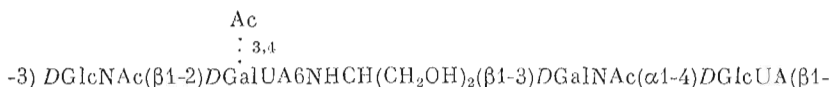
Поступила в редакцию
20.VII.1982

BACTERIAL ANTIGENIC POLYSACCHARIDES. XII. THE STRUCTURE AND ¹³C NMR SPECTRUM OF POLYSACCHARIDE CHAIN OF *SHIGELLA* *BOYDII* TYPE 8 LIPOPOLYSACCHARIDE

L'VOV V. L., TOKHTAMYSHEVA N. V., SHASHKOV A. S.,
DMITRIEV B. A., KOCHETKOV N. K.

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

A specific acidic polysaccharide was isolated from *Sh. boydii* type 8 antigenic lipopolysaccharide after mild hydrolysis followed by chromatography on Sephadex G-50. The polysaccharide consists of *D*-glucuronic acid, *D*-galacturonic acid, 2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose, 2-acetamido-2-deoxy-*D*-galactose and 2-amino-1,3-propanediol residues in 1:1:1:1:1 ratio. From the results of methylation analysis, partial acid hydrolysis and Smith degradation, the structure of the repeating unit of the specific polysaccharide was deduced as:



The ¹³C NMR spectra of native, O-deacetylated and carboxyl-reduced polysaccharides, as well as the spectrum of oligosaccharide produced by Smith degradation were interpreted. The ¹³C NMR data fully confirmed the structure of the polysaccharide repeating unit.