



УДК 547.458.5

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ

XIX. ЧАСТИЧНЫЙ МЕТАНОЛИЗ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ
КРАСНОЙ ВОДОРΟΣЛИ *RHODOMELA LARIX* (TURN.) C. AG.

Усов А. И., Иванова Е. Г.

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

Сравнением набора веществ, образующихся при частичном метанолизе, показано, что гелеобразующий полисахарид и сульфатированный негелеобразующий полисахарид (модифицированный щелочью) из красной водоросли *Rhodomela larix* содержат повторяющиеся звенья агаробиозы и 2-0-метилагаробиозы. Из продуктов частичного метанолиза полисахаридов *Rhodomela larix* выделен и охарактеризован новый дисахарид — диметилацеталь 2-0-метил-4-0-β-D-галактопиранозил-3,6-ангидро-L-галактозы.

В предыдущей работе [1], посвященной изучению полисахаридного состава красной водоросли *Rhodomela larix*, было показано, что присутствующие в ней сульфатированные галактаны легко удается разделить на два компонента, один из которых (А) при охлаждении водного раствора образует гель, а другой (Б) — не образует. На основании данных о моносахаридном составе было высказано предположение, что полисахариды А и Б, несмотря на различие в физических свойствах, близки по химической природе.

Это предположение подтверждено в данной статье, посвященной анализу веществ, полученных из гелеобразующего и негелеобразующего полисахаридов при частичном метанолизе. Полисахариды получали из водоросли *Rhodomela larix* как описано ранее [1]; их состав приведен в табл. 1.

Частичный метанолиз галактанов красных водорослей дает возможность получить олигосахаридные фрагменты в основном за счет расщепления гликозидных связей 3,6-ангидрогалактозы. Однако, как видно из данных таблицы, содержание этого моносахарида в Б недостаточно велико. Поэтому предварительно была проведена обработка полисахаридов щелочью в присутствии боргидрида натрия [2], позволяющая отщепить остатки сульфата, связанные с первичными гидроксильными группами 4-замещенных звеньев галактозы с образованием эквивалентного количества остатков 3,6-ангидрогалактозы. При этом полисахарид А практически не претерпевает изменений; напротив, полисахарид Б отщепляет около одной четверти содержащегося в нем сульфата, причем соответствующим образом увеличивается количество остатков 3,6-ангидрогалактозы. Состав обработанных щелочью полисахаридов АЩ и БЩ приведен в табл. 1.

При действии раствора HCl в метаноле на полисахарид А в условиях, обычно применяемых для частичного расщепления агароподобных поли-

Таблица 1

Состав полисахаридов из *Rhodomela larix*

Полисахарид	Содержание, %			
	галактоза *	3,6-ангидрогалактоза **	SO ₃ Na	ОСН ₃
А	48,7	33,6	6,4	2,47
АЩ	51,2	34,5	6,2	
Б	55,7	8,0	20,6	1,74
БЩ	55,3	14,6	15,8	

* Разность между общим количеством сахаров по реакции с орцином [3] и количеством 3,6-ангидрогалактозы.

** Результат суммарного определения 3,6-ангидрогалактозы и ее 2-О-метилпроизводного по реакции с резорцином [4] без учета различия в реакционной способности этих соединений.

Таблица 2

Разделение продуктов частичного метанолиза полисахаридов А и БЩ

Полисахарид	Выход, мг во фракции				
	1	2	3	4	5
А	506	340	202	107	551
БЩ	199	240	219	93	207

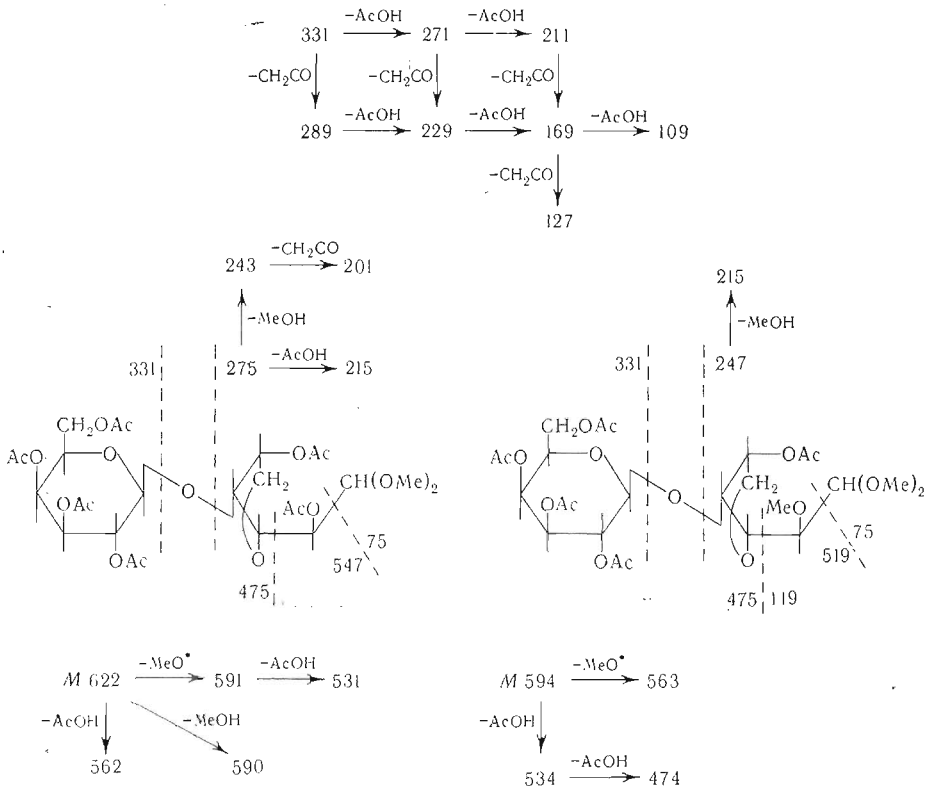
сахаридов [5], была получена сложная смесь веществ. В соответствии с данными аналитической ВХ эта смесь методом препаративной ВХ была разделена на 5 фракций, из которых фракция 1 совпадала по подвижности с метил- α , *D*-галактопиранозидом, фракция 2 — с диметилацетатом агаробиозы, а фракция 5 — с диметилацетатом 3,6-ангидро-*D*-галактозы. По данным ГЖХ триметилсилил(ТМС)-производных, вещество фракции 1 представляет собой смесь метил- α - и β -галактопиранозидов. Из фракции 2 кристаллизацией из метанола — ацетона удалось выделить диметилацетат агаробиозы, константы которого, а также константы его гексаацетата, удовлетворительно совпадают с описанными в литературе. Кроме того, ацетилированный диметилацетат агаробиозы имеет характерный масс-спектр (см. рисунок), подтверждающий строение этого дисахарида (ср. [6]).

Вещество фракции 3 является новым дисахаридом — диметилацетатом 2-О-метил-4-О- β -*D*-галактопиранозил-3,6-ангидро-*L*-галактозы, т. е. агаробиозы, содержащей 0-метильную группу в положении 2 остатка 3,6-ангидро-*L*-галактозы. Его строение подтверждено следующими данными. Наличие диметилацетальной группы и расположение заместителей при С₂ и С₄ остатка 3,6-ангидро-*L*-галактозы однозначно следует из масс-спектра ацетилированного дисахарида (см. схему), а β -конфигурация галактозидной связи вытекает из близости величин удельного вращения обоих выделенных дисахаридов и их ацетатов. (По предварительным данным, оба дисахарида расщепляются β -галактозидазой из *Escherichia coli*).

Фракция 4 содержит главным образом метил- α - β -галактофуранозид, идентифицированный по ГЖХ и масс-спектру его ацетата. Ранее [7] мы показали, что довольно значительные количества этого вещества образуются в условиях частичного метанолиза сульфатированных галактанов. Наконец, фракция 5 состоит из нескольких веществ, главными из которых по данным ВХ являются диметилацетаты 3,6-ангидро-*L*-галактозы и 2-О-метил-3,6-ангидро-*L*-галактозы, а также метилгликозиды этих сахаров. После мягкого кислотного гидролиза фракции 5, боргидридного восстанов-

С х е м а

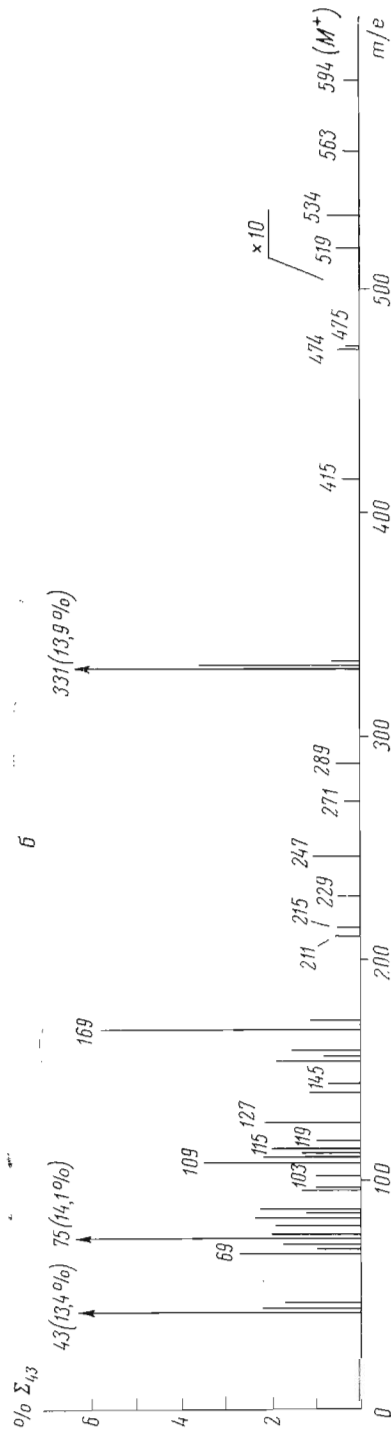
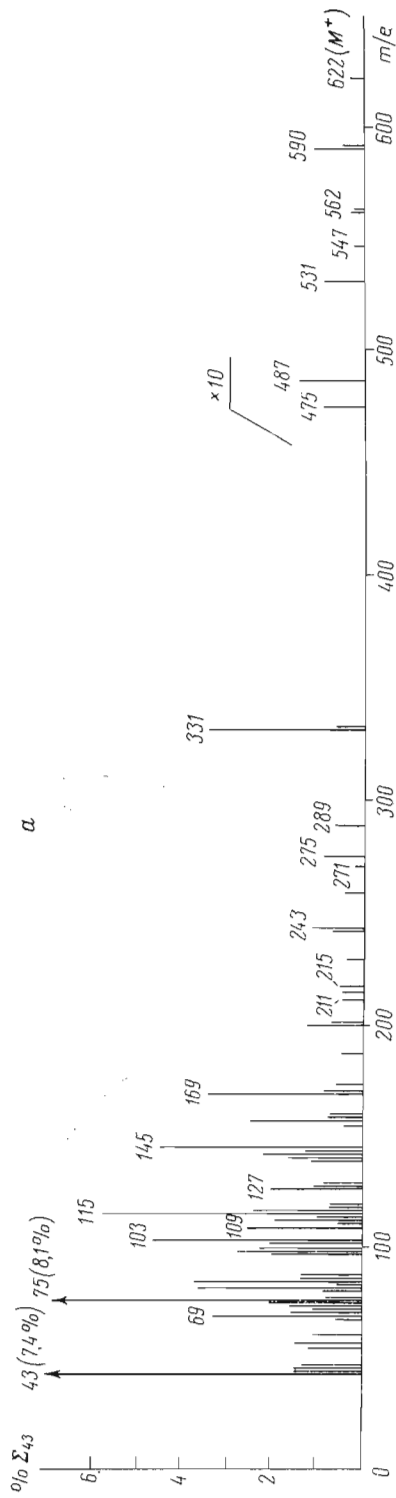
масс-спектрометрической фрагментации ацетилированных диметилацеталей агаробиозы и 2-0-метилагаробиозы



ления и ацетилирования была получена смесь ацетатов 2-0-метил-3,6-ангидро-*L*-дульцита и 3,6-ангидро-*L*-дульцита, идентифицированных методом ГЖХ. Одновременно было определено соотношение между этими веществами (0,5 : 1), которое несколько отличается от соотношения этих соединений в аналогичной фракции, полученной при полном метанолизе полисахарида А (0,88 : 1).

Таким образом, из данных частичного метанолиза следует, что полисахарид А, подобно другим представителям группы агара, построен в основном из звеньев агаробиозы. Особенностью его структуры является то, что значительная часть этих звеньев имеет метильную группу при C₂ остатка 3,6-ангидро-*L*-галактозы.

Смесь веществ, получающая при частичном метанолизе полисахарида БЩ, качественно идентична продуктам метанолиза полисахарида А. Как и в предыдущем случае эта смесь препаративной БХ была разделена на 5 фракций, из которых первая по данным ГЖХ ТМС-производных содержала только метил- α - и β -галактопиранозиды. Диметилацеталь агаробиозы из фракции 2 не был получен в кристаллическом состоянии, однако он идентичен заводскому образцу по БХ, по ГЖХ в виде ТМС-производного и по масс-спектру полного ацетата. То же можно сказать и о диметилацетале 2-0-метилагаробиозы из фракции 3. Фракция 4 представляет собой в основном м метил- α - и β -галактофуранозиды, а фракция 5 содержит ацетали и гликозиды 3,6-ангидрогалактозы и ее 2-0-метилпроизводного, которые мягким кислотным гидролизом, восстановлением и ацетилированием были переведены в ацетаты полиолов; соотношение (2-0-метил-3,6-ангидродульцит) — (3,6-ангидродульцит), определенное методом ГЖХ, составило



Масс-спектры ацетилированных диметилацеталей агаробозы (а) и 2-0-метилагаробозы (б)

для этой фракции 0,6 : 1 (в соответствующей фракции продуктов полного метанолиза полисахарида Б 0,96 : 1).

Результаты показали, что гелеобразующий полисахарид А и негелеобразующий полисахарид БЩ содержат значительные участки углеводных цепей, построенные сходным образом. Различия в их способности к гелеобразованию определяются, по-видимому, существенной разницей в степени сульфатирования и регулярности строения их молекул.

Экспериментальная часть

Аналитическая БХ выполнена нисходящим способом на бумаге FN11 в системе растворителей бутанол-1 — пиридин — вода (6 : 4 : 3); препаративная БХ проведена в той же системе на бумаге FN 18 («Filtrak», ГДР). Для обнаружения на хроматограммах невосстанавливающих сахаров использовали реакцию с AgNO_3 и KOH после периодатного окисления [8], а производных 3,6-ангидросахаров — реакцию с *o*-аминофенолом и H_3PO_4 [9]. ТСХ проводили на пластинках с закрепленным слоем силикагеля КСК в системе растворителей CHCl_3 — ацетон (9 : 1); зоны обнаруживали конц. H_2SO_4 .

ГЖХ проводили на хроматографе «Pye 104» (Англия) (пламенно-ионизационный детектор) с интегратором «Kent Chromalog 2» (Англия); колонки 1,5 м с 3% полинеопентилгликольдипината на целите при 205° (для ацетатов полиолов) или с 3% SE—30 при 180° (для ТМС-производных метилгалактозидов) или 250° (для ТМС-производных дисахаридов); скорость N_2 50 мл/мин. ТМС-производные получили по методике [10]. Масс-спектры сняты на масс-спектрометре «Varian CH-6 MAT» (США). Оптическое вращение определяли на поляриметре «Perkin-Elmer 141» (США).

Количество сахаров определяли по реакции с орцином [3] и калибровочному графику для галактозы, 3,6-ангидросахаров — по реакции с резорцином [4] и калибровочному графику для метил-3,6-ангидро- α -D-галактопиранозида, сульфата — по методу Доджсона [11].

Экстракция и выделение полисахаридов. Водоросль *Rhodomela larix* экстрагировали горячей водой, как описано ранее [1]. Гелеобразующий полисахарид А очищали многократным замораживанием — оттаиванием его водного раствора и сушили лиофилизацией. Полисахарид Б осаждали из маточных растворов цетавлоном, переводили в Na-соль растворением в концентрированном NaCl и осаждением спиртом, диализовали и лиофилизовали. Результаты анализа полученных веществ приведены в табл. 1.

Действие боргидрида натрия и щелочи на полисахариды А и Б. К раствору 1 г полисахарида А или Б в 200 мл воды прибавляли 0,13 г NaBH_4 , через 24 ч прибавляли еще 1,9 г NaBH_4 и 8 г NaOH, нагревали 4 ч при 80°, после охлаждения раствор нейтрализовали AcOH , диализовали и лиофилизовали, получили 0,8 г АЩ и 0,83 г БЩ; результаты анализа модифицированных полисахаридов даны в табл. 1.

Частичный метанолиз полисахаридов А и БЩ. 2 г высушенного полисахарида в 50 мл 0,5%-ного раствора HCl в абсолютном метаноле кипятили 2 ч, охлаждали, нейтрализовали PbCO_3 , осадок отделяли и тщательно промывали метанолом. Объединенные растворы упаривали, остаток нагревали с 50 мл 0,2 н. Ba(OH)_2 2 ч при 60°, нейтрализовали CO_2 , фильтровали и упаривали. Остаток экстрагировали метанолом, экстракт разделяли препаративной БХ на фракции с R_f 0,45 (1); 0,49 (2); 0,55 (3); 0,64 (4) и 0,75 — 0,78(5). Зоны 2, 3 и 5 окрашивались *o*-аминофенольным реагентом; зона 1 совпадала по подвижности с заведомым образцом метил- α -D-галактопиранозида, а зона 2 — с образцом диметилацетата агаробиозы. Выходы фракций для полисахаридов А и БЩ приведены в табл. 2.

Фракции 1 в виде ТМС-производных анализировали методом ГЖХ, обнаружили метил- α - и β -галактопиранозиды. Фракцию 2—А кристаллизовали из метанола — ацетона, получили диметилацетат агаробиозы,

т. пл. 165—166°, $[\alpha]_D^{21} - 29,3^\circ$ (C 0,83; вода); $-39,8^\circ$ (C 0,75; MeOH); по данным работы [12], т. пл. 165—166° (из спирта — ацетона), $[\alpha]_D^{20} - 29,3^\circ$ (C 1,5; вода); $-38,7^\circ$ (C 1,5; MeOH). Вещество ацетилировали As_2O в пиридине и очищали препаративной ТСХ, получили гексаацетат диметилацетала агаробиозы, $[\alpha]_D^{20} - 5,4^\circ$ (C 0,88; $CHCl_3$); $-12,4^\circ$ (C 0,88; бензол); по данным работы [13], $[\alpha]_D^{10} - 5,76^\circ$ (C 1,22; $CHCl_3$); $-12,5^\circ$ (C 1,2; бензол); масс-спектр ацетата приведен на рисунке.

Фракция 2-БЩ, сироп, $[\alpha]_D^{20} - 22,6^\circ$ (C 0,51; вода), $-32,7^\circ$ (C 0,51; MeOH), была идентична фракции 2-А и заведомому образцу диметилацетала агаробиозы по БХ и ГЖХ в виде ТМС-производного; гексаацетат, $[\alpha]_D^{20} - 5,25^\circ$ (C 0,8; $CHCl_3$), $-12,9^\circ$ (C 1,04; бензол); идентичен гексаацетату, полученному из 2-А, по масс-спектру.

Фракция 3-А представляет собой диметилацеталь 2-0-метилагаробиозы, сироп, $[\alpha]_D^{20} - 17,8^\circ$ (C 1,07; вода), $-22,4^\circ$ (C 1,07; MeOH); пентаацетат, т. пл. 164—165° (из водного MeOH), $[\alpha]_D^{22} - 21,6^\circ$ (C 0,51; $CHCl_3$), $-31,1^\circ$ (C 0,54; бензол); масс-спектр приведен на рисунке.

Фракция 3-БЩ, $[\alpha]_D^{20} - 13,2^\circ$ (C 0,7; вода); $-16,0^\circ$ (C 0,7; MeOH), идентична фракции 3-А по БХ и ГЖХ в виде ТМС-производного; пентаацетат, т. пл. 163—164° (из водного MeOH), $[\alpha]_D^{20} - 18,3^\circ$ (C 0,72; $CHCl_3$), $-31,7^\circ$ (C 0,85; бензол), идентичен пентаацетату, полученному из 3-А, по масс-спектру.

Фракции 4 ацетилировали, главную зону выделяли препаративной ТСХ и идентифицировали как ацетат метил- α, β -галактофуранозида сравнением с заведомым образцом по ГЖХ и масс-спектру (ср. [7]).

Фракции 5 нагревали с 0,02 н. щавелевой кислотой 2 ч при 100°. Одновременно в тех же условиях гидролизovali смеси известных количеств синтетических 3, 6-ангидро- α -метил-*D*-галактопиранозида и 2-0-метил-3,6-ангидро- α -метил-*D*-галактопиранозида для вычисления поправочного коэффициента при определении соотношений методом ГЖХ. Растворы нейтрализовали $CaCO_3$, фильтраты обрабатывали $NaBH_4$ 20 ч при 20°, прибавляли избыток катионита КУ-2 (H^+), фильтровали, упаривали, остаток трижды упаривали с метанолом, ацетилировали As_2O в пиридине и смесь ацетатов исследовали ГЖХ; идентифицировали ацетаты 2-0-метил-3,6-ангидродульцита и 3,6-ангидродульцита в соотношении 0,5 : 1 (5-А) и 0,6 : 1 (5-БЩ).

Полный метаноллиз полисахаридов А и Б. К 0,3 г полисахарида приливали 25 мл 3%-ного раствора HCl в абсолютном метаноле и оставляли на ночь, затем кипятили в течение 20 ч и обрабатывали, как описано для частичного метанолиза. Препаративной БХ выделяли фракции диметилацеталей 3,6-ангидросахаров, которые обрабатывали, как описано для фракций 5. Соотношение 2-0-метил-3,6-ангидродульцита и 3,6-ангидродульцита по данным ГЖХ их ацетатов для А составляло 0,88 : 1 и для Б — 0,96 : 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Усов А. И., Лотов Р. А., Кочетков Н. К. (1971) Ж. общ. химии, 41, 1154—1160.
2. Anderson N. S., Rees D. A. (1965) J. Chem. Soc., 5880—5887.
3. Hewitt L. F. (1937) Biochem. J., 31, 360—366.
4. Yaphe W., Arsenault G. P. (1965) Anal. Biochem., 13, 143—148.
5. Бемиллер Дж. Н. (1967) Методы химии углеводов, «Мир», 314—317.
6. Chizhov O. S., Zolotarev B. M., Usov A. I., Rechter M. A., Kochetkov N. K. (1971) Carbohydr. Res., 16, 29—38.
7. Усов А. И., Рехтер М. А., Кочетков Н. К. (1970) Ж. общ. химии, 40, 2732—2737.
8. Усов А. И., Рехтер М. А. (1969) Ж. общ. химии, 39, 912—913.
9. Hirase S., Araki C., Nakanishi S. (1953) Bull. Chem. Soc. Jap., 26, 183—184.
10. Sweely C. C., Bentley R., Makita M., Wells W. W. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 2497—2507.

11. Dodgson K. S. (1964) *Biochem. J.*, 78, 312—319; Dodgson K. S., Price R. G. (1962) *Biochem. J.*, 84, 106—110.
12. Hirase S., Araki C., Ito T. (1958) *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 31, 418—431.
13. Araki C., Hirase S. (1954) *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 27, 109—112.

Поступила в редакцию *
19.XI.1974

POLYSACCHARIDES OF ALGAE. XIX. PARTIAL METHANOLYSIS
OF SULFATED POLYSACCHARIDES OF THE RED ALGA
RHODOMELA LARIX (TURN.) C.AG.

USOV A. I., IVANOVA E. G.

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

Partial acid methanolysis of a gel-forming polysaccharide and a non-gelling sulfated (alkali-treated) polysaccharide from the red alga *Rhodomela larix* was performed. The results indicate that both polysaccharides contain the repeating agarobiose and 2-O-methyl-agarobiose residues. From the partial methanolysate, a new disaccharide, 2-O-methyl-4-O- β -D-galactopyranosyl-3,6-anhydro-L-galactose dimethyl acetal, was isolated and characterized.

* Статья из портфеля редакции «Журнал общей химии»; дата поступления — 18.VII.1974 г.