



УДК 547.458.7 : 543.422.25

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРОСЛЕЙ

XXV. ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ ^{13}C -ЯМР ДЛЯ АНАЛИЗА
СТРУКТУРЫ ПОЛИСАХАРИДОВ ТИПА α -КАРРАГИНАНА*Яроцкий С. В., Шапков А. С., Усов А. И.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Получены и интерпретированы спектры ^{13}C -ЯМР ряда галактанов красных водорослей, относящихся к группе κ -каррагинана. Изучено влияние на спектр ^{13}C -ЯМР таких особенностей строения аналогов κ -каррагинана, как полное и частичное сульфатирование положения 4 остатков β -D-галактозы, частичное сульфатирование положения 2 остатков 3,6-ангидро- α -D-галактозы и положения 6 остатков β -D-галактозы. Полученные данные позволяют использовать спектроскопию ^{13}C -ЯМР в качестве цепного метода структурного анализа полисахаридов, входящих в группу κ -каррагинана.

Ранее мы показали [1], что спектры ^{13}C -ЯМР галактанов красных водорослей, содержащих большое количество остатков 3,6-ангидрогалактозы, дают возможность определить абсолютную конфигурацию этого сахара и тем самым отнести изучаемый полисахарид к группе агара или каррагинана [2]. Более подробный анализ спектров ^{13}C -ЯМР полисахаридов группы агара [3] позволил далее установить, что с помощью этого метода можно получить сведения о других важных особенностях структуры таких галактанов, а именно о наличии остатков 6-сульфата *L*-галактозы вместо остатков 3,6-ангидро-*L*-галактозы, о количестве и расположении в молекуле полисахарида *O*-метильных и сульфатных групп.

Целью данной работы является получение и интерпретация спектров ^{13}C -ЯМР нескольких полисахаридов типа κ - или ι -каррагинана. Как известно [4], этими буквами предложено обозначать идеализированные структуры двух полисахаридов, углеводная цепь которых построена из строго чередующихся остатков 3-*O*-замещенной β -D-галактопиранозы и 4-*O*-замещенной α -3,6-ангидро-D-галактопиранозы; в κ -каррагине сульфатированы все положения 4 остатков *D*-галактозы, а в ι -каррагине — дополнительно положения 2 остатков 3,6-ангидрогалактозы. Природные полисахариды могут отличаться от идеализированных структур неполным сульфатированием указанных положений, более произвольным распределением сульфатных групп или наличием некоторого количества остатков 4-*O*-замещенного 6-сульфата *D*-галактозы (или 2,6-дисульфата *D*-галактозы) вместо остатков 3,6-ангидро-*D*-галактозы (или ее 2-сульфата) [5, 6]. Принадлежность галактана к рассматриваемой группе полисахаридов обычно вытекает из метода выделения, поскольку и κ -, и ι -каррагинаны обладают специфическим свойством образовывать гели в присутствии ионов калия. Предварительные данные о положении сульфатных

Таблица 1

Характеристики каррагинатов (I)–(VI)

Полисахарид	Мольное отношение Gal:3,6-ангидро-Gal:SO ₄ ²⁻	ИК-спектр, см ⁻¹ (область 800— 850 см ⁻¹)
(I)	1 : 0,95 : 1,02	850
(II)	1 : 0,83 : 0,84	850
(III)	1 : 0,87 : 1,97	808 и 850
(IV)	1 : 0,67 : 1,21	808 и 850
(V)	1 : 0,88 : 0,79	850
(VI)	1 : 0,94 : 1,00	825 и 850

Таблица 2

Отнесение сигналов атомов углерода в спектрах ¹³C-ЯМР
галактанов типа κ -каррагинана

Поли- сахарид	C ₍₁₎	C ₍₂₎	C ₍₃₎	C ₍₄₎	C ₍₅₎	C ₍₆₎
(I)						
Звено А	102,5	69,9	78,8	74,0	74,8	61,3
» Б	95,1	69,7	78,3	79,1	76,8	69,4
(II)						
Звено А	102,5	70,2	78,9	73,9	74,7	61,3
» Б	95,1	69,9	78,1	79,3	76,8	69,5
» В	102,5	70,2	80,4	66,3	75,3	61,3
» Г	94,6	69,9	78,1	79,3	76,8	69,5
(III)						
Звено А	102,3	70,0	78,8	74,0	74,8	61,3
» Б	95,2	69,5	78,2	79,1	76,8	69,5
» Д	102,3	70,0	78,8	72,0	74,8	61,3
» Е	92,1	75,4	77,9	79,1	76,8	69,5
(VI)						
Звено А	102,6	69,9	78,8	74,0	74,8	61,3
» Б	95,1	69,7	78,4	79,4	76,8	69,4
» Ж	102,6	69,9	80,2	66,0	73,0	67,1
» З	94,6	69,7	78,4	79,4	76,8	69,4

гликозидных атомов углерода в спектре ¹³C-ЯМР полисахарида (I) имеются два сигнала с δ_c 102,5 и 95,1 м.д., отвечающие C₍₁₎ остатков β -D-галактопиранозы (А) и 3,6-ангидро- α -D-галактопиранозы (Б) соответственно. В области резонанса замещенных кольцевых атомов углерода наблюдаются три сигнала с δ_c 79,1; 78,8 и 78,3 м.д. Учитывая влияние сульфатной группы при C₍₄₎ остатка А, их можно отнести к C₍₄₎ остатка Б, C₍₃₎ остатка А и C₍₃₎ остатка Б соответственно. Сам же сигнал C₍₄₎ остатка А находится в более сильном поле (δ_c 74,0 м.д.) из-за влияния гликозилирования по соседнему положению 3. Это влияние продемонстрировано ранее при сравнении спектров ¹³C-ЯМР метил- β -D-галактопиранозиды и его 3-О-метильного производного; в последнем случае сигнал C₍₄₎ смещен на 3,6 м.д. в сильное поле [12].

Полисахарид (II) по строению углеводной цепи и ИК-спектру является типичным κ -каррагинаном [9], но содержание сульфатных групп в его молекуле ниже, чем в полисахаридах (I). Из этого следует, что наряду с сульфатированными дисахаридными звеньями (остатки А и Б) в полимерную цепь полисахарида (II) входят и дисахаридные звенья, не имеющие сульфатных групп (остатки В и Г). В соответствии с этим полисахарид (II) имеет более сложный спектр ¹³C-ЯМР, в котором можно выделить две серии сигналов: одну, совпадающую со спектром полисахарида (I), и вторую, отвечающую звеньям В и Г. При рассмотрении этого и после-

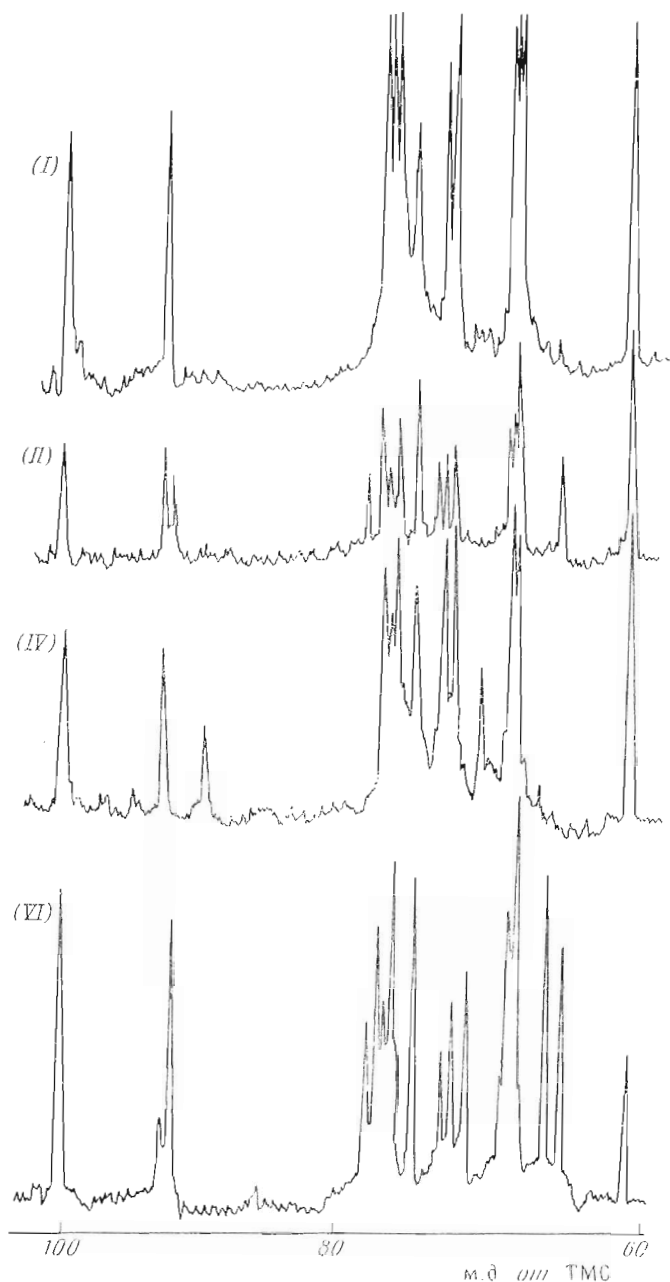
дующих спектров нужно учитывать, что, хотя сигналы различных серий во многих случаях перекрываются, существуют характеристические области спектра, позволяющие надежно выделить наиболее важные резонансные линии. Так, в области сигналов $C_{(1)}$ остатков 3,6-ангидрогалактозы в спектре полисахарида (II) наблюдаются два сигнала с δ_c 95,1 и 94,6 м.д., первый из которых отвечает $C_{(1)}$ звена Б, а второй — $C_{(1)}$ звена Г (влияние сульфатной группы при $C_{(4)}$ остатка β -D-галактозы на положение сигнала $C_{(1)}$ соседнего остатка 3,6-ангидрогалактозы отмечалось нами ранее [3]). Сравнение интегральных интенсивностей сигналов $C_{(1)}$ дает возможность определить, что полисахарид (II) содержит остатки β -D-галактозы и 4-сульфата β -D-галактозы в соотношении 1 : 1,1. В области резонанса замещенных кольцевых атомов углерода в спектре полисахарида (II) по сравнению со спектром полисахарида (I) имеется дополнительный сигнал с δ_c 80,4 м.д., принадлежащий $C_{(3)}$ остатка В; в соответствии с этим сигнал с δ_c 78,9 м.д. ($C_{(3)}$ звена А) имеет меньшую интегральную интенсивность, чем находящиеся рядом сигналы $C_{(3)}$ и $C_{(4)}$ остатков 3,6-ангидрогалактозы. Дополнительным характерным отличием спектра полисахарида (II) от спектра полисахарида (I) является наличие в нем сигналов с δ_c 66,3 м.д., принадлежащего $C_{(4)}$ остатка В, и δ_c 75,3 м.д., отвечающего $C_{(5)}$ остатка В.

Образец ι -каррагинана (III) содержит больше одной сульфатной группы на дисахаридное звено. Из ИК-спектра полисахарида (III) следует, что сульфатные группы в нем расположены у $C_{(4)}$ остатка β -D-галактопиранозы и у $C_{(2)}$ остатка 3,6-ангидро- α -D-галактопиранозы. В соответствии с этим в спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида (III) наблюдаются три сигнала гликозидных атомов углерода с δ_c 102,3; 95,2 и 92,1 м.д., причем интенсивность первого из них, отвечающего звеньям А и Д, равна сумме интенсивностей второго и третьего. Поскольку в спектре нет сигналов в области 68—66 м.д., соответствующих $C_{(4)}$ несulfатированных остатков β -D-галактопиранозы, можно заключить, что все остатки этого сахара в полисахариде существуют только в виде 4-сульфата. Сравнение интенсивностей сигналов с δ_c 95,2 и 92,1 м.д. дает возможность рассчитать, что около 80% остатков 3,6-ангидрогалактозы в полисахариде (III) несет сульфатную группу в положении 2, и определить тем самым, насколько структура реального полисахарида соответствует идеализированной формуле ι -каррагинана. Кроме того, различие интенсивностей сигналов гликозидных атомов углерода $C_{(1)}$ позволяет отнести сигналы кольцевых атомов углерода (табл. 2).

Полисахарид (IV) по аналитическим и спектральным характеристикам напоминает ι -каррагинан. Хотя мы не располагаем пока химическими данными о строении этого вещества, спектр ^{13}C -ЯМР (см. рисунок) наглядно демонстрирует, что молекулы полисахарида (IV) обладают так называемой гибридной структурой, поскольку содержат участки и κ -, и ι -типа в соотношении около 2 : 1 (табл. 2).

Строение κ -полисахарида из *Furcellaria fastigiata* (V) достаточно подробно изучалось химическими методами [5, 6, 10]. Его обычно рассматривают как неполностью сульфатированный κ -каррагинан. Действительно, спектр ^{13}C -ЯМР этого вещества во многом аналогичен спектру полисахарида (II), однако содержит также ряд пиков небольшой интенсивности, характерных для ι -каррагинанов и наблюдаемых в спектрах полисахаридов (III) и (IV). На этом основании можно сделать вывод, что, несмотря на общее невысокое содержание сульфатных групп, они занимают в полисахариде (V) различные положения; соотношение остатков β -D-галактопиранозы, 4-сульфата β -D-галактопиранозы, 3,6-ангидро-D-галактопиранозы и 2-сульфата 3,6-ангидро-D-галактопиранозы, рассчитанное из спектра ^{13}C -ЯМР, составляет 2 : 1,5 : 2,5 : 0,2.

Таким образом, на примере полисахаридов (I) — (IV) мы рассмотрели, как отражаются в спектрах ^{13}C -ЯМР наиболее обычные варианты



Спектры ^{13}C -ЯМР полисахаридов (I), (II), (IV) и (VI)

расположения сульфатных групп в κ - и ι -каррагинанах. Очевидно, что полученные данные (табл. 2) позволяют использовать спектроскопию ^{13}C -ЯМР для изучения новых полисахаридов этого типа. Интересным примером такого подхода является рассмотрение спектра ^{13}C -ЯМР полисахарида (VI), где обнаружены две серии сигналов; одна из них соответствует звеньям А и Б и аналогична спектру κ -каррагинана (I), а другая происходит от остатков Ж и З (схема и рисунок). При отнесении сигналов этой серии для учета влияния 6-сульфата использовались данные по спектрам ^{13}C -ЯМР различных сульфатированных производных моносахаридов [14, 15]. Первая серия сигналов отличается от второй главным образом поло-

жением резонансных линий $C_{(1)}$ звеньев Б и З (δ_c 95,1 и 94,6 м.д. соответственно), а также наличием в более сильном поле сигналов с δ_c 67,1 и 66,0 м.д., принадлежащих $C_{(6)}$ и $C_{(4)}$ остатка Ж. Сравнение интегральных интенсивностей сигналов, принадлежащих разным сериям, показывает, что в полисахариде (VI) преобладающая часть остатков β -D-галактопиранозы имеет сульфатную группу при $C_{(6)}$ и только относительно небольшое их число сульфатировано в положении 4; остатки 4,6-дисульфата галактозы в полисахариде, по всей вероятности, отсутствуют (сигналы $C_{(6)}$ звена А (61,3 м.д.) и $C_{(1)}$ звена Б (95,1 м.д.) равны по величине, а сигналы $C_{(6)}$ звена Ж (67,1 м.д.) и $C_{(4)}$ звена Ж (66,0 м.д.) также равны, но интенсивность каждого из них значительно больше). Следовательно, по данным спектра ^{13}C -ЯМР, полисахарид (VI) обладает неизвестным ранее для каррагинанов распределением сульфатных групп; представляет большой интерес подтверждение этого вывода химическими методами.

Экспериментальная часть

ИК-спектры снимали на приборе UR-10 в таблетках KBr. Спектры ^{13}C -ЯМР получали на спектрометре Bruker-Physik WP-60 при 15,08 МГц с полным подавлением по протонам; применялись 5% растворы полисахаридов в D_2O , температура съемки 80° , среднее число накоплений 70 000. Химические сдвиги измерены относительно диметилсульфоксида как внутреннего стандарта и пересчитаны относительно тетраметилсилана по соотношению $\delta_{\text{TMS}} = \delta_{\text{DMCO}} + 39,45$ м.д., полученному в отдельном эксперименте.

Содержание сульфата в полисахаридах определяли турбидиметрически после кислотного гидролиза по методу Доджсона [16], 3,6-ангидросахаров — по реакции с резорцином — HCl [17], общее содержание сахаров — по реакции с фенолом — H_2SO_4 [18], содержание галактозы вычисляли как разность между общим количеством сахаров и количеством 3,6-ангидрогалактозы.

κ -Полисахарид из *Tichocarpus crinitus* (II) получали по методике [9], очищали повторным осаждением из раствора 4% KCl и переводили в Na -соль диализом против растворов ацетата натрия с последующим пропусканием через колошку с катионитом КУ-2 (Na^+) при 80° и лиофилизацией.

κ -Каррагинан (I) из препарата каррагинана фирмы Sigma (№ C-1013) получен по аналогичной методике В. Я. Гринбергом (Институт элементоорганических соединений АН СССР), которому авторы выражают глубокую благодарность за предоставленное вещество (I) и образец κ -каррагинана фирмы Sigma (№ C-1138).

Для выделения κ -фракции *Phyllophora nervosa* использовали агароид Одесского агарового завода. Кислые полисахариды осаждали избытком бромистого цетилтриметиламмония и вновь переводили в Na -соль многократной обработкой насыщенным спиртовым раствором NaI с последующим диализом и лиофилизацией. К раствору 0,5 г полученного вещества в 200 мл воды прибавляли 50 мл 20% KCl , гель отделяли центрифугированием и диализовали против 1% NaCl до полного растворения, а затем против воды. Раствор фильтровали и лиофилизовали, получали полисахарид (VI), выход 400 мг.

Водоросль *Rhodoglossum hemisphaericum*, собранную в Японском море в мае 1975 г., измельчали, экстрагировали метанолом и высушивали. Экстракцию полисахаридов горячей водой и осаждение KCl проводили по обычной методике [8]; выпавший гель отделяли, промывали, нагревая до 100° с 4% KCl , после охлаждения снова отделяли гель и диализовали против воды; полученный раствор K -соли κ -фракции фильтровали, концентрировали в вакууме и лиофилизовали, получали полисахарид (IV), выход 35% от веса водоросли, экстрагированной метанолом. Аналогично из балтийской водоросли *Furcellaria fastigiata* выделяли κ -фурцелларан (V).

ЛИТЕРАТУРА

1. Яроцкий С. В., Шашков А. С., Усов А. И. (1977) Биоорган. химия, 3, 1135—1137.
2. Anderson N. S., Dolan T. C. S., Rees D. A. (1965) Nature, 1060.
3. Шашков А. С., Усов А. И., Яроцкий С. В. (1978) Биоорган. химия, 4, 74—81.
4. Rees D. A. (1969) Advances Carbohydr. Chem. and Biochem., 24, 267—332.
5. Lawson C. J., Rees D. A., Stancioff D. J., Stanley N. F. (1973) J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 2177—2182.
6. Penman A., Rees D. A. (1973) J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 2182—2187.
7. Anderson N. S., Dolan T. C. S., Penman A., Rees D. A., Mueller G. P., Stancioff D. J., Stanley N. F. (1968) J. Chem. Soc. C, 602—606.
8. Пейнтер Т. Дж. (1967) в сб. Методы химии углеводов (под ред. Кочеткова Н. К.), с. 339—340, «Мир», М.
9. Усов А. И., Рехтер М. А., Кочетков Н. К. (1970) Ж. общ. химии, 40, 2732—2737.
10. Painter T. J. (1966) Can. J. Chem., 38, 112—118.
11. Шашков А. С., Усов А. И., Яроцкий С. В. (1977) Биоорган. химия, 3, 46—49.
12. Усов А. И., Яроцкий С. В. (1977) Биоорган. химия, 3, 746—751.
13. Шашков А. С., Чижев О. С. (1976) Биоорган. химия, 2, 437—497.
14. Honda S., Iuki H., Takiura T. (1973) Carbohydr. Res., 28, 150—153.
15. Усов А. И., Яроцкий С. В., Васянина Л. К. (1975) Биоорган. химия, 1, 1583—1588.
16. Dodgson K. S., Price R. G. (1962) Biochem. J., 84, 106—110.
17. Yaphe W., Arsenault G. P. (1965) Anal. Biochem., 13, 143—148.
18. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956) Anal. Chem., 28, 350—356.

Поступила в редакцию
17.XI.1977

POLYSACCHARIDES OF ALGAE. XXV. APPLICATION OF ^{13}C -NMR SPECTROSCOPY FOR STRUCTURAL ANALYSIS OF α -CARRAGEENAN GROUP POLYSACCHARIDES

YAROTSKY S. V., SHASHKOV A. S., USOV A. I.

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

The ^{13}C -NMR spectra of several red seaweed galactans belonging to the α -carrageenan group were obtained and interpreted. The effects of total or partial sulfation at position 4 or 6 of β -D-galactopyranose as well as position 2 of 3,6-anhydro- α -D-galactopyranose residues were discerned in the spectra of α -carrageenan analogs. The data obtained bear on potency of ^{13}C -NMR for structural analysis of the α -carrageenan-like polysaccharides.