



УДК 547.458.7.02+582.273

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ

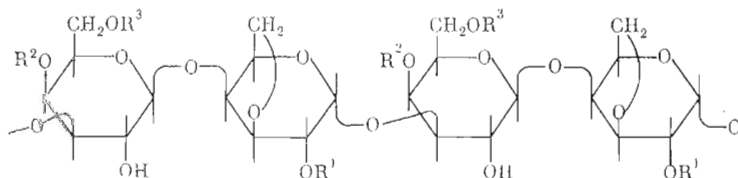
XXX*. МЕТИЛИРОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ ТИПА κ -КАРРАГИНАНА ИЗ КРАСНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ *TICHOCARPUS CRINITUS* (GMEL.) RUPR., *FURCELLARIA FASTIGIATA* (NUDS.) LAM. И *PHYLLOPHOSA NERVOSA* (DE CAND.) GREV.

Усов А. И., Архипова В. С.

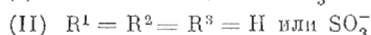
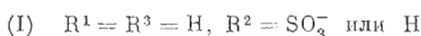
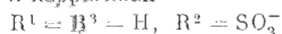
Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Данные о расположении сульфатных групп в молекулах полисахаридов типа κ -каррагинана, полученные ранее при анализе спектров ^{13}C -ЯМР этих соединений, подтверждены методом метилирования. Показано, что κ -полисахарид из *Tichocarpus crinitus* является не полностью сульфатированным κ -каррагинаном, как и κ -полисахарид из *Furcellaria fastigiata*, который дополнительно содержит небольшое количество звеньев типа ι -каррагинана, а также сульфатных групп при С6 3-замещенных остатков *D*-галактозы; такое расположение сульфата у С6 является основным в молекуле филлофорана — κ -полисахарида из *Phyllophora nervosa*.

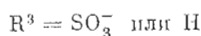
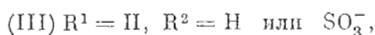
Каррагинаны представляют собой обширную группу сульфатированных полисахаридов красных морских водорослей, молекулы которых построены из производных *D*-галактозы с правильным чередованием α -1 \rightarrow 3- и β -1 \rightarrow 4-связей между ними (см. обзор [2]). 4-Замещенные звенья могут быть остатками галактозы (ξ -, λ -, μ -, ν -каррагинаны) или 3,6-ангидрогалактозы (κ -, ι -каррагинаны); в последнем случае полисахариды образуют гели в присутствии катиона калия. На этом свойстве основано выделение их из смеси с другими каррагинанами. Представители этой группы полисахаридов различаются не только строением углеводной цепи, но и расположением сульфатных групп и степенью регулярности структуры; строго регулярные идеализированные формулы κ - и ι -каррагинанов представлены ниже на схеме:



κ -каррагинан



ι -каррагинан



* Сообщение XXIX см. [1].

В одном из наших предыдущих сообщений [3] для установления основных особенностей строения полисахаридов типа κ - ι -каррагинанов был использован метод спектроскопии ^{13}C -ЯМР. С его помощью удается быстро определять абсолютные конфигурации моносахаридных остатков и расположение сульфатных групп непосредственно в полимере. В тех случаях, когда вещество представляет собой «молекулярный гибрид» между двумя или несколькими идеализированными структурами каррагинанов, спектроскопия ^{13}C -ЯМР позволяет обнаружить эти структуры и оценить относительный вклад каждой из них. Целью данной работы является подтверждение спектроскопических данных о положении сульфатных групп в нескольких полисахаридах типа κ -каррагинана методом метилирования.

В качестве объектов для исследования были выбраны полисахариды из красных водорослей *Tichocarpus crinitus*, *Furcellaria fastigiata* и *Phyllophora nervosa*. Все три полисахарида выделяли осаждением в виде геля при действии KCl по методике, описанной для κ -каррагинана [4]. Строение углеводной цепи κ -полисахарида из *Tichocarpus crinitus* (I) было подробно изучено ранее [5]. Установлено, что оно отвечает структуре κ -каррагинана. Расположение сульфатных групп в полисахариде (I) исследовалось прежде только с помощью ИК- и ^{13}C -ЯМР-спектров [3]. Оба метода свидетельствуют о том, что в молекулах соединения (I) сульфатированы положения 4 в 3-замещенных остатках *D*-галактозы, как в κ -каррагинане, но наряду с ними, как видно из спектра ^{13}C -ЯМР, имеется значительное количество несulfатированных каррабиозных звеньев. Соотношение остатков β -*D*-галактозы и 4-сульфата β -*D*-галактозы, рассчитанное из интегральных интенсивностей сигналов C1 соседних остатков 3,6-ангидро-*D*-галактозы в спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида, составляет 1:1,1–1,5.

κ -Полисахарид из *Furcellaria fastigiata* (II) многократно изучался ранее [6–9]. По структуре углеводной цепи он не отличается от κ -каррагинана [6, 8]. Содержание сульфатных групп в нем ниже, чем в полисахариде (I), но они распределены в молекуле менее регулярно [8], поэтому результаты метилирования полисахарида (II) не позволяют строго доказать линейность его молекул [9]. В спектре ^{13}C -ЯМР этого полисахарида наряду с сигналами, характерными для структурных элементов κ -каррагинана и его десульфатированного аналога, наблюдаются менее интенсивные сигналы, соответствующие фрагментам структуры типа ι -каррагинана [3]; соотношение остатков β -*D*-галактопиранозы, ее 4-сульфата, 3,6-ангидро- β -*D*-галактопиранозы и ее 2-сульфата, рассчитанное из спектра ^{13}C -ЯМР, равно 2 : 1,5 : 2,5 : 0,2.

Принадлежность полисахарида из *Phyllophora nervosa* (III) к типу κ -каррагинана была подтверждена ранее изучением строения его углеводной цепи [10, 11]. Как следует из ИК- и ^{13}C -ЯМР-спектров, главная часть сульфатных групп в полисахариде (III) (~65%) находится у C6 3-замещенных остатков *D*-галактозы, и только меньшая его часть (35%) занимает положение 4 в таких остатках, т. е. расположена как в κ -каррагинане; несulfатированные остатки галактозы практически отсутствуют [3].

Метод метилирования, использованный нами для доказательства расположения сульфатных групп в полисахаридах (I)–(III), неоднократно

Характеристика полисахаридов (I)–(III)

Полисахарид	Галактоза — 3,6-ангидрогалактоза — SO_3Na , моль/моль		Соотношение метиловых эфиров галактозы в метилированных полисахаридах		
	в исходном полисахариде	после обработки щелочью	2,4,6- Me_2	2,6- Me_2	2,4- Me_2
(I)	1 : 0,80 : 0,97	1 : 0,93 : 0,85	1	3	—
(II)	1 : 0,82 : 0,62	1 : 0,90 : 0,56	1	1,6	0,3
(III)	1 : 0,97 : 1,06	1 : 0,99 : 1,03	1	5	9

применяли для аналогичного исследования других каррагинанов (см. например, [9]). Поскольку метилирование осуществляется в присутствии основания, необходимо было вначале определить в полисахаридах количество сульфата, лабильного к щелочным воздействиям. Как известно [2], в полисахаридах типа κ -каррагинана такие сульфатные группы занимают обычно положения в 4-замещенных остатках *D*-галактозы (элементы структуры μ -каррагинана); при действии щелочи в присутствии боргидрида натрия [12] происходит элиминирование этого сульфата с одновременным замыканием 3,6-ангидроциклов. Как видно из таблицы, в полисахариде (I) лабильный к щелочи сульфат составляет $\sim 10\%$ от общего его количества; в полисахаридах (II) и (III) содержание такого сульфата еще ниже. Следовательно, вклад структур типа μ -каррагинана в молекулах (I) — (III) можно признать незначительным.

Модифицированные действием щелочи полисахариды (I) — (III) метилировали в одинаковых условиях, вначале пятикратной обработкой диметилсульфатом и щелочью в водном растворе по методу Хеурора (ср. [9]), а затем подистым метилом в ДМСО по методу Хакомори [13]. В продуктах кислотного гидролиза метилированных полисахаридов методом БХ были обнаружены зоны ди- и три-*O*-метилпроизводных галактозы, а в виде следов — зоны моно- и тетра-*O*-метилпроизводных. Такой результат вместе с резким падением поглощения в области $3400\text{--}3600\text{ см}^{-1}$ в ИК-спектрах полисахаридов и данными количественного определения метоксильных групп свидетельствовал о достаточной полноте метилирования в примененных условиях.

Сравнением с заведомыми образцами методом БХ в области ди-*O*-метилловых эфиров *D*-галактозы идентифицированы 2,6- (более подвижная зона) и 2,4-ди-*O*-метил-*D*-галактоза. Для количественного анализа продукты гидролиза метилированных полисахаридов восстанавливали в полиолы, ацетилювали и исследовали методом ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии [14]. Полученные соотношения 2,4,6-три-, 2,6-ди- и 2,4-ди-*O*-метилпроизводных *D*-галактозы приведены в таблице.

В продуктах гидролиза метилированного полисахарида (I) найдены только 2,4,6-три- и 2,6-ди-*O*-метилловыи эфиры галактозы. Это означает, что сульфатные группы в полисахариде расположены только при С4 в 3-замещенных остатках галактозы. Соотношение три- и ди-*O*-метилловых эфиров свидетельствует, что около $1/3$ 3-замещенных галактозных остатков в полисахариде не имеет сульфатных групп.

Поскольку при окислительном гидролизе [15] метилированного полисахарида (I) 3,6-ангидрогалактоновая кислота не обнаружена, а найдено только ее 2-*O*-метилпроизводное, можно считать, что в положении 2 остатков 3,6-ангидрогалактозы сульфатных групп практически нет. Таким образом, метод метилирования, подтверждая принцип структуры полисахарида (I), выведенной на основании спектра ^{13}C -ЯМР, дает другое соотношение сульфатированных и несульфатированных каррабиозных звеньев в нем, больше соответствующее содержанию сульфатных групп в полимере.

Из набора метилловых эфиров галактозы, образующихся при гидролизе метилированного полисахарида (II), следует, что около трети 3-замещенных остатков галактозы в молекуле фурилларана не имеет сульфатных групп (таблица). Прочие остатки галактозы сульфатированы в основном по С4, но небольшая их часть ($\sim 10\%$ от общего количества), вероятно, сульфатирована по С6. Хотя в ИК-спектре образца (II) и нет полосы поглощения, соответствующей первичной сульфатной группе, в ^{13}C -ЯМР-спектре наблюдается сигнал небольшой интенсивности при $\delta 73,1$ м.д., характерный для С5 3-*O*-замещенного остатка 6-сульфата *D*-галактопиранозы [3]. В продуктах окислительного гидролиза метилированного (II) обнаруживается не только 2-*O*-метил-3,6-ангидрогалактоновая кислота, но и некоторое количество 3,6-ангидрогалактоновой кислоты. Это означает,

что небольшая часть сульфатных групп занимает положение 2 в остатках 3,6-ангидрогалактозы. Таким образом, и в случае фурилларана метод метилирования подтверждает качественные выводы о структуре полисахарида, сделанные по данным спектроскопии ^{13}C -ЯМР, но дает несколько отличные количественные соотношения между различными типами моносахаридных звеньев.

В продуктах гидролиза метилированного полисахарида (III) 2,4-ди-О-метилгалактозы содержится почти вдвое больше, чем 2,6-ди-О-метилгалактозы, а содержание 2,4,6-три-О-метилгалактозы незначительно (таблица). При окислительном гидролизе метилированного (III) найдена только 2-О-метил-3,6-ангидрогалактоновая кислота. Следовательно, в филлофоране гидроксильные группы при С2 в остатках 3,6-ангидрогалактозы не сульфатированы; основная часть сульфата находится при С6, а меньшая — при С4 3-замещенных остатков галактозы. В этом случае данные метилирования практически совпадают со структурой полисахарида (III), предложенной на основании ИК- и ^{13}C -ЯМР-спектров [3].

Таким образом, локализация сульфатных групп в полисахаридах типа κ -каррагинана, установленная по данным спектров ^{13}C -ЯМР, качественно полностью подтверждается результатами метилирования. Несовпадение соотношения различных типов моносахаридных остатков в полисахаридах (I) и (II) может объясняться несколькими причинами. С одной стороны, расчет по соотношению интегральных интенсивностей пары пиков в спектре ^{13}C -ЯМР является достаточно приближенным. С другой, трудности определения полноты метилирования сульфатированных полисахаридов и многостадийность анализа заставляют с известной осторожностью относиться к количественным данным, полученным для смеси ацетатов частично метилированных полиолов. В то же время хорошее соответствие данных двух этих методов для филлофорана (III) надежно доказывает необычный для представителей κ -каррагинанов способ сульфатирования этого интересного и практически важного полисахарида.

Экспериментальная часть

ВХ проводили нисходящим способом на бумаге Filtrak FN-11 и FN-15 (ГДР) в системах растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3 (А), *n*-бутанол — этанол — вода, 5 : 1 : 4 (Б) и этилацетат — метилэтилкетон — уксусная кислота — муравьиная кислота — вода, 17 : 15 : 3 : 1 : 5 (В). Зоны восстанавливающих сахаров обнаруживали кислым фталатом анилина, зоны кислых сахаров — реагентом анилин-кислота.

ГЖХ выполняли на хроматографе «Рхе-104» (Англия) с пламенно-ионизационным детектором, колонка (0,6×120 см) с 3% полинеопентилгликольадипината на диатомите С (205° С, скорость N_2 50 мл/мин). Хроматомасс-спектрометрию проводили на приборе «Varian MAT 111» (ФРГ). ИК-спектры снимали на спектрометре UR-10 (ГДР) в таблетках с КВг и в вазелиновом масле.

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

Для анализа моносахаридного состава методом ВХ 5–10 мг полисахарида нагревали с 1 мл 2 н. H_2SO_4 5 ч при 100° С, нейтрализовали BaCO_3 и хроматографировали в системе А. Окислительный гидролиз исходных или метилированных полисахаридов проводили V_2O_5 и 0,4 н. H_2SO_4 в течение 24 ч при 60° С по методике [15] и после удаления брома и дополнительного гидролиза 2 н. H_2SO_4 кислые продукты анализировали ВХ в системе В.

Выделение полисахаридов. Экстракцию водоросли *Tichocarpus crinitus* проводили как описано ранее [5]; гель К-соли промывали, нагревая с 4% раствором KCl, отделяли центрифугированием и переводили в водорастворимую Na-соль, пропуская горячий водный раствор полисахарида через колонку с катионитом КУ-2 (Na⁺-форма) при 80°С. Полученный раствор диализовали и лиофилизовали; выход Na-соли (I) 11%, считая на сухие водоросли, предварительно экстрагированные метанолом; вещество содержит 38,4% галактозы, 27,3% 3,6-ангидрогалактозы и 23,4% SO₃Na. ИК-спектр: 850 см⁻¹ (вторичный аксиальный сульфат).

Водоросль *Furcellaria fastigiata*, собранную в Балтийском море в 1977 г., обрабатывали аналогичным образом. Выход Na-соли (II) 32,2%; вещество содержит 36,8% галактозы, 27,0% 3,6-ангидрогалактозы и 14,5% SO₃Na. ИК-спектр: 850 см⁻¹ (вторичный аксиальный сульфат).

Для получения α -полисахарида из *Phyllophora nervosa* использовали агароид отечественного производства. 10 г агароида растворяли при 80°С в 2 л воды, прибавляли 0,5 л 20% раствора KCl, после охлаждения гель отделяли центрифугированием, растворяли при нагревании в 2 л 4% KCl, охлаждали, снова центрифугировали и гель диализовали против дистиллированной воды, в результате чего гель переходит в раствор. После лиофилизации получали К-соль (III), выход 6,5 г. Часть вещества растворяли в воде и раствор пропускали через колонку с катионитом КУ-2 (Na⁺-форма); после лиофилизации получали Na-соль (III), содержащую 36,8% галактозы, 31,6% 3,6-ангидрогалактозы, 24,5% SO₃Na. ИК-спектр: 825 см⁻¹ (первичный сульфат), 850 см⁻¹ (вторичный аксиальный сульфат, менее интенсивная полоса).

Выделенные полисахариды (I)–(III) при кислотном гидролизе дали только галактозу (БХ, система А), а при окислительном гидролизе — только 3,6-ангидрогалактоновую кислоту (БХ, система В).

Модификацию полисахаридов (I)–(III) действием щелочи в присутствии NaBH₄ осуществляли, используя 1 г образца, по методу [12], после чего охлаждали, нейтрализовали СН₃COOH, диализовали и лиофилизовали. Приводятся выход модифицированного полисахарида и содержание галактозы, 3,6-ангидрогалактозы и SO₃Na в %: (I) — 82; 36,4; 30; 19,5; (II) — 85; 35; 28; 12,4; (III) — 90; 36,2; 31,9; 23,5. ИК-спектры исходных и модифицированных полисахаридов практически идентичны.

Метилирование модифицированных полисахаридов (I)–(III). 500 мг полисахарида обрабатывали пять раз по модифицированному методу Хеурса [9], после чего смесь нагревали 1 ч при 100°С, охлаждали, нейтрализовали 50% H₂SO₄, диализовали и лиофилизовали. Выходы частично метилированных полисахаридов; (I) — 420 мг (18,5% OMe); (II) — 465 мг (14,3% OMe); (III) — 400 мг (18,2% OMe).

50 мг частично метилированного полисахарида, высушенного в вакууме над P₂O₅ при 40°С, метилировали по методу Хакомори [13], реакционную смесь разбавляли водой и ацетоном, диализовали и лиофилизовали. Выходы метилированных полисахаридов: (I) — 35 мг (21,3% OMe, 15,5% SO₃Na); (II) — 28 мг (21,8% OMe, 10,5% SO₃Na), (III) — 30 мг (20,8% OMe, 20,3% SO₃Na). В ИК-спектрах метилированных полисахаридов сохранились полосы поглощения сульфатных групп, поглощение гидроксильных групп в области 3400–3600 см⁻¹ незначительное.

Гидролиз метилированных полисахаридов (I)–(III) и идентификация метилированных сахаров. 5 мг метилированного полисахарида растворяли при 0°С в 0,15 мг 72% H₂SO₄, через 1 ч прибавляли 1,2 мл воды, нагревали 4 ч при 100°С, затем охлаждали, нейтрализовали BaCO₃, осадок отделяли и раствор упаривали. Во всех гидролизатах с помощью БХ обнаруживали зоны с R_{св} 2,50; 2,85 и 3,50 (система Б), совпадающие по подвижности с 2,4-ди-, 2,6-ди- и 2,4,6-три-О-метилгалактозой соответственно. Свободная галактоза в гидролизатах отсутствовала, а моно-О-метилгалактозы обнаруживались лишь в седловых количествах. Продукты гид-

ролиза восстанавливали NaBH_4 , ацетилювали и анализували методом ГЖХ [19]; идентификацию ацетатов частично метилированных дульци-тов проводили сравнением с заведомыми образцами и хроматомасс-спектрометрически [14]. Результаты количественного определения соотношений этих веществ по площадям пиков на хроматограммах приведены в таблице.

ЛИТЕРАТУРА

1. Усов А. И., Ивалова Е. Г., Макпешко В. Ф. (1979) Биоорган. химия, 5, 1647—1653.
2. Усов А. И. (1979) Успехи биол. химии, 20, 169—191.
3. Яроцкий С. В., Шашков А. С., Усов А. И. (1978) Биоорган. химия, 4, 745—751.
4. Нейнтер Т. Дж. (1967) в сб.: Методы химии углеводов (под ред. Н. К. Кочеткова), с. 339—340, «Мир», М.
5. Усов А. И., Рехтер М. А., Кочетков Н. К. (1970) Ж. общ. химии, 40, 2732—2737.
6. Painter T. J. (1960) Can. J. Chem., 38, 112—118.
7. Painter T. J. (1966) Proc. 5th Internat. Seaweed Symp. (Young E. G., McLachlan J. L., eds), pp. 305—309, Pergamon Press, Oxford.
8. Lawson C. J., Rees D. A., Stancioff D. J., Stanley N. F. (1973) J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 2177—2182.
9. Penman A., Rees D. A. (1973) J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 2182—2187.
10. Козарез Е. И., Дудкин М. С. (1971) Химия древесины, № 8, 59—64.
11. Козарез Е. И. (1975) Канд. дис. «Исследование химического строения галактана черноморской водоросли *Phyllophora nervosa* и его преобразования в 5-оксиметилфульфурол», Рига.
12. Rees D. A. (1961) J. Chem. Soc., 5168—5171.
13. Nakomori S. (1964) J. Biochem., 55, 205—209.
14. Bjoerndal H., Helleqvist C. G., Lindberg B., Svensson S. (1970) Angew. Chem., Internat. Ed., 9, 610—619.
15. Anderson N. S., Dolan T. C. S., Rees D. A. (1968) J. Chem. Soc. (C), 596—601.
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.
19. Джонс Г. Дж. (1975) в сб.: Методы исследования углеводов (под ред. А. Я. Хорлина), с. 26—37, «Мир», М.

Поступила в редакцию
2.VI.1980

POLYSACCHARIDES OF ALGAE. XXX. METHYLATION OF α -CARRAGEENAN
TYPE POLYSACCHARIDES OF THE RED SEAWEEDS
TICHOCARPUS CRINITIUS
(GMEL.) RUPR., *FURCELLARIA FASTIGIATA* (HUDS.) LAM. AND
PHYLLOPHORA NERVOSEA (DE CAND.) GREV

USOV A. I., ARKHIPOVA V. S.

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

Earlier ^{13}C NMR data on the sulphate groups distribution in polysaccharides of the α -carrageenan type are confirmed by methylation. α -Polysaccharide of *Tichocarpus crinitus* is shown to be a partially sulphated α -carrageenan. α -Polysaccharide of *Furcellaria fastigiata* has the same structure with a small inclusion of ι -carrageenan units and 6-sulphates of 3-substituted *D*-galactose residues. Phyllophoran, α -polysaccharide of *Phyllophora nervosa*, is shown to have mainly 6-sulphated 3-linked *D*-galactose residues.