



УДК 582.273-119.2.088:577.114.5

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРОСЛЕЙ

XXXVIII*. ПОЛИСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ
LIAGORA sp. И СТРОЕНИЕ СУЛЬФАТИРОВАННОГО КСИЛОМАННАНА

Усов А. И., Добкина И. М.

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

Из красной морской водоросли *Liagora* sp. выделены сульфатированный ксилломаннан и несколько фракций нейтральных полисахаридов. С помощью спектра ^{13}C -ЯМР показано, что водорастворимый нейтральный ксилан является обычным для красных водорослей линейным полимером с $\beta 1 \rightarrow 4$ - и $\beta 1 \rightarrow 3$ -связями между остатками *D*-ксилопиранозы. Строение сульфатированного полисахарида изучено методами частичного гидролиза, метилирования до и после десульфатирования, расщепления по Смигу после десульфатирования, а также с помощью спектроскопии ^{13}C -ЯМР. Ксилломаннан содержит *D*-маннозу и *D*-ксилозу в соотношении 7 : 1 и 22% сульфатных групп. В основе его молекул лежит линейная цепь из $\alpha 1 \rightarrow 3$ -связанных остатков *D*-маннопиранозы, в которой на каждые 14 остатков приходится два боковых ответвления в положении 2 (в виде единичных остатков β -*D*-ксилопиранозы или коротких цепей из остатков *D*-ксилопираноз с $1 \rightarrow 4$ -связями между ними) и 7 сульфатных групп, расположенных в положениях 6 и 2 главной цепи в соотношении около 2 : 1.

В отличие от подавляющего большинства красных водорослей, в состав которых входят сульфатированные галактаны [2], представители порядка немалиевых могут содержать сульфатированные ксилломаннаны. Так, из водоросли *Nemalion vermiculare* Sur., относящейся к семейству гельминтокладиевых, был выделен полисахарид, имеющий главную цепь из $1 \rightarrow 3$ -связанных остатков α -*D*-маннопиранозы, в которой каждый третий моносахаридный остаток сульфатирован в положения 4 или 6 и на каждые 50 звеньев приходится одно ответвление в виде единичного остатка β -*D*-ксилопиранозы, присоединенного в положение 2 [3—6]. Из представителя семейства хетангиевых *Chaetangium fastigiatum* была получена серия $(1 \rightarrow 3)$ - α -*D*-маннанов, сульфатированных в положения 2 и 6 и содержащих в положении 2 остатки β -*D*-ксилозы [7]. В другом представителе того же семейства, *Galaxaura squalida*, также обнаружен сульфатированный ксилломаннан [8]; предположено, что его главная цепь представляет собой $(1 \rightarrow 3)$ - β -*D*-маннан, хотя конфигурация гликозидных центров строго не доказана и нуждается в подтверждении. Настоящая работа посвящена изучению нового представителя этой группы полисахаридов, выделенного из красной водоросли *Liagora* sp., которая принадлежит к тому же семейству гельминтокладиевых, что и *N. vermiculare*.

Водоросль *Liagora* sp. была собрана на о-ве Куба. Ее талломы в значительной степени минерализованы, однако деминерализация действием триэтиламмониевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты [9], успешно примененная для обработки *G. squalida* [8], в данном случае оказалась неэффективной. Минеральные примеси удаляли, перемешивая измельченную и обезжиренную водоросль с водной уксусной кислотой, а затем проводили многократную экстракцию водой при нагревании. Из объединенных водных экстрактов осаждением бромистым цетилтриметиламмонием (цетавлонсм) с последующим переводом в Na-соль была получена фракция кислого полисахарида I, который содержал 22% сульфатных групп, а в качестве главных моносахаридных компонентов — маннозу и ксилозу в соотношении 7 : 1 (табл. 1). Кроме того, из водных экстрактов осаждением этанолом и ацетоном были получены две фрак-

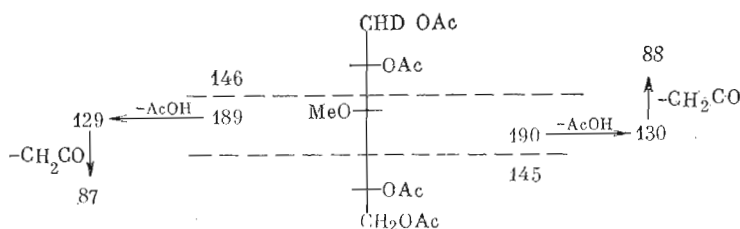
* Сообщение XXXVII см. [1].

Выходы и моносахаридный состав полисахаридных фракций из *Liagora* sp.

Фракция	Выход, %	Моносахаридный состав, моль/моль XyI					
		манноза	ксилоза	арабиноза	3-О-метил-ксилоза	галактоза	глюкоза
I	7,5	7	1	0,09	0,14	0,6	0,19
II	1,1	—	1	0,17	Следы	—	—
III	0,2	Следы	1	9	»	—	Следы
IV	14,4	0,5	1	0,1	0,28	—	—
V	3,5	0,25	1	0,2	Следы	—	—
VI	17,0	Следы	1	0,5	—	—	—

ции нейтральных полисахаридов, в одной из которых (II) преобладала ксилоза, а в другой (III) — арабиноза. Остаток водоросли после водной экстракции обрабатывали 1 н. NaOH при комнатной температуре. Из щелочных экстрактов после нейтрализации и диализа были выделены три фракции ксиланов (IV—VI), различающиеся по растворимости в воде. Выходы и моносахаридный состав фракций I—VI приведен в табл. 1.

Для идентификации моносахаридов, входящих в состав сульфатированного полисахарида I, был проведен его полный кислотный гидролиз с последующим разделением моносахаридов препаративной БХ. С помощью измерения оптической активности показано, что главными компонентами гидролизата являются *D*-манноза и *D*-ксилоза, а галактоза, как и в кислом полисахариде из *G. squalida* [8], представляет собой смесь *D*- и *L*-форм с преобладанием последней. Моносахарид с наибольшей хроматографической подвижностью оказался 3-О-метил-*D*-ксилозой: его деметилирование действием хлористого бора [10] приводило к образованию ксилозы, наличие и положение метильной группы следовало из масс-спектра ацетата полиола, полученного при восстановлении моносахарида NaBD₄ и ацетилировании (схема), а абсолютная конфигурация — из величины оптической активности. Следует отметить, что небольшие количества метиловых эфиров ксилозы (4-О-метил- и 3,4-ди-О-метилпроизводные) ранее были найдены в составе сульфатированного ксиломаннана из *G. squalida*; 3-О-метил-*D*-ксилоза в полисахаридах этого типа обнаружена впервые.



Происхождение главных пиков в масс-спектре 1,2,4,5-тетра-О-ацетил-3-О-метилксилита-1d

Для изучения однородности сульфатированного полисахарида I было предпринято разделение его с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе А-50. Одновременно было установлено, что полисахарид I не растворяется полностью в 4 М NaCl; при обработке соевым раствором были получены растворимая в 4 М NaCl фракция I-1, а из остатка — фракция I-2, растворимая в воде, и труднорастворимая в воде фракция I-3. Из данных табл. 2 следует, что фракция I-1 содержит несколько меньше сульфата и обогащена ксилозой по сравнению с фракцией I-2; во фракции I-3 концентрируются галактоза и глюкоза, вероятно принадлежащие полисахаридам другой химической природы. Этот вывод подтверждается результатами хроматографического разделения растворимой в NaCl фракции I-1. Как видно из той же таблицы, эта фракция содержит незначительное количество нейтрального и низкосульфатированного ком

Характеристика фракций, полученных при фракционном растворении полисахарида I в 4 М NaCl и хроматографии фракции I-1 на DEAE-сефадексе А-50

Фракция	Элюент (концентрация NaCl, М)	Выход, % *	SO ₃ Na, %	Моносахаридный состав, моль/моль Xy1			
				манноза	ксилоза	галактоза	глюкоза
I-1		45	17	4	1	0,16	—
I-2		25	24	10	1	—	—
I-3		13	13	5,5	1	1,2	0,35
I-11	0,01	1,5	0	1,6	1	—	0,6
I-12	0,5	4	7	2,8	1	3,4	1,9
I-13	1	17	14,5	3,4	1	0,35	0,1
I-14	2	50	18	6	1	—	—
I-15	3	14	17	5	1	0,37	0,16

* Для фракций I-1 — I-3 приведен выход от исходного полисахарида I, для фракций I-11 — I-15 — от фракции I-1.

Таблица 3

Характеристика манноолигосахаридов, полученных при частичном гидролизе полисахарида I

Вещество	Степень полимеризации	R _{Man}	[α] _D ²⁰ (с 1; вода), град	[α] _D ²⁰ , град [13]
VII	2	0,49	+32	+30
VIII	3	0,25	+17,5	+23, +12 *
IX	4	0,11	+28	+29
X	5	0,04	+48,6	+51

* Данные работы [13].

понентов I-11 и I-12; главная часть полисахарида (I-14) вымывается с DEAE-сефадекса 2 М NaCl и по содержанию сульфата, маннозы и ксилозы близка к исходному полисахариду I, но практически не содержит остатков галактозы и глюкозы. Таким образом, на основании данных фракционирования кислый полисахарид водоросли *Liagora* sp. представляет собой сульфатированный ксиломаннан, отдельные молекулы которого могут несколько различаться по содержанию сульфата и остатков ксилозы.

Известно, что при установлении строения сульфатированных галактанов красных водорослей, обладающих регулярной или замаскированной регулярной структурой, неоценимую помощь оказывает спектроскопия ¹³C-ЯМР [2, 11]. Однако полная расшифровка спектров ¹³C-ЯМР сульфатированных ксиломаннанов все еще встречает серьезные затруднения. В нашем случае спектры ¹³C-ЯМР фракций I-1 и I-2 имели сложный характер и содержали большое количество сигналов; в то же время на основании этих спектров можно было заключить, что обе фракции состоят из однотипно построенных полимерных молекул.

Исследование строения сульфатированного ксиломаннана химическими методами мы начали с выяснения структуры продуктов частичного гидролиза нефракционированного полисахарида I. Были подобраны условия его обработки муравьиной, а затем разбавленной серной кислотой (по аналогии с частичным гидролизом глюкоана из *Aspergillus niger* [12]), обеспечивающие максимальный выход олигосахаридов; одновременно происходило полное отщепление остатков сульфата. В продуктах гидролиза методом ВХ были обнаружены все моносахаридные компоненты I, а также олигосахариды VII—X (табл. 3), которые были выделены препаративной ВХ. Из хроматографических данных можно было полагать, что соединения VII—X представляют собой олигомергомолочные манноолигосаха-

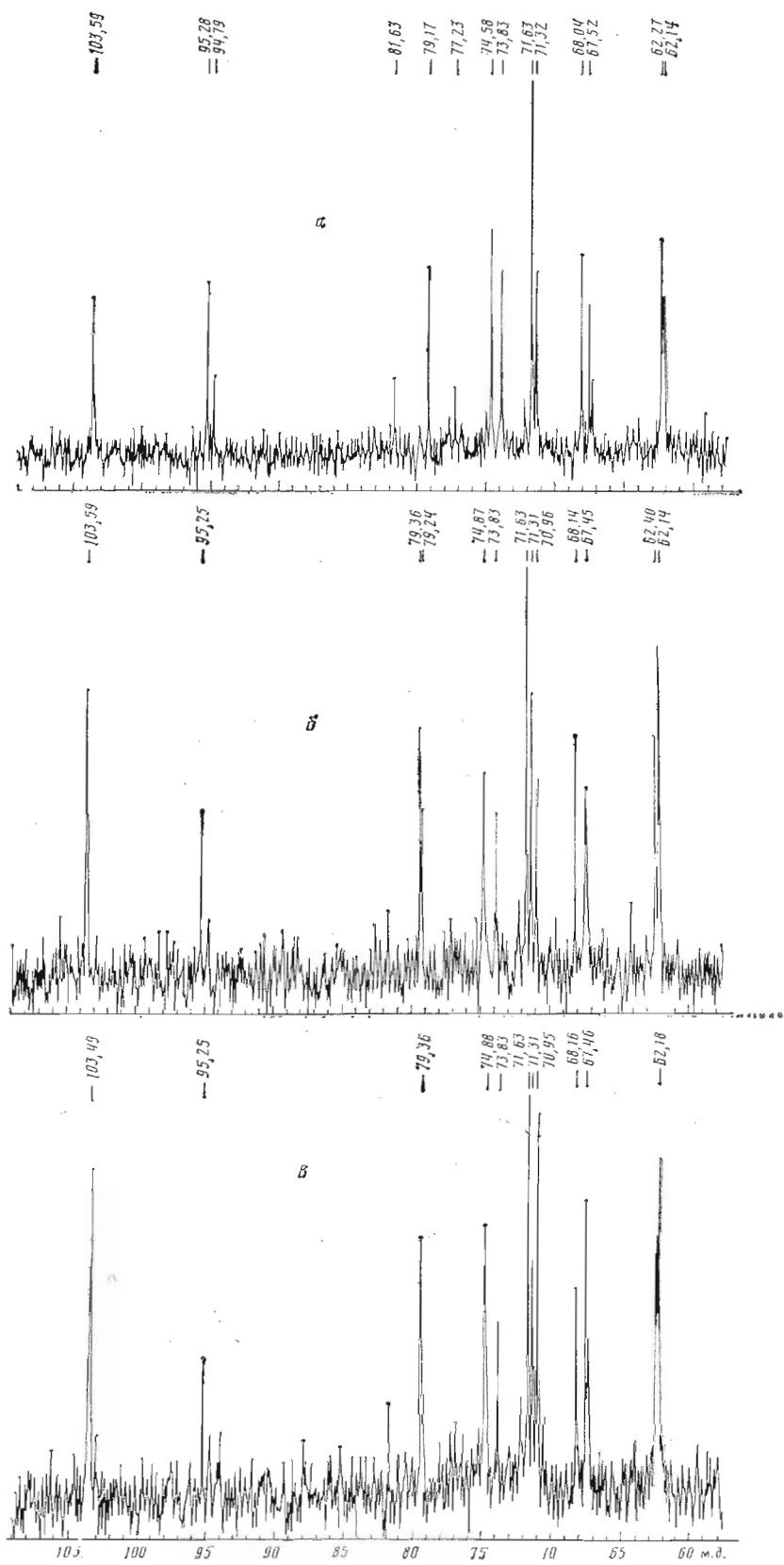


Рис. 1. Спектры ^{13}C -ЯМР α -1 \rightarrow 3-связанных *D*-манноолигосахаридов: дисахари, а VII (а), трисахарида VIII (б), тетрасахарида IX (в)

Результаты метилирования полисахаридов XI и I-14
Мольные отношения ацетатов метилированных
полиолов по данным ГЖХ

Полиол	Полисахарид	
	XI	I-14
2,3,4-Три-О-метилксилит	1	1
2,3-Ди-О-метилксилит	0,6	1,36
2,3,4,6-Тетра-О-метилманнит	0,13	—
2,3,4,6-Тетра-О-метилдальцит	Следы	—
2,4,6-Три-О-метилманнит	20	4,54
4,6-Ди-О-метилманнит	1,2	2,3
2,4-Ди-О-метилманнит	0,3	2,6

риды со степенью полимеризации от 2 до 5. Это предположение было подтверждено прямым определением молекулярных масс олигосахаридов с помощью масс-спектрометрии методом SIMS* ($M + Na^+$ 365, 527, 689 и 851 соответственно); зависимость

$$R'_M = \lg \left(\frac{1}{R_{Man}} - 1 \right)$$

от степени полимеризации представляла собой прямую линию (ср. [5]). Спектр ^{13}C -ЯМР дисахарида VII полностью совпал с описанным в литературе спектром 3-О- α -D-маннопиранозил-D-маннопиранозы [14]. Спектры ^{13}C -ЯМР высших олигомеров VIII и IX свидетельствовали, что эти вещества являются линейными олигосахаридами с α -1 \rightarrow 3-связями между остатками D-маннопиранозы (рис. 1). Величины удельного вращения соединений VII—IX удовлетворительно совпали с литературными данными для α -1 \rightarrow 3-связанных манноолигосахаридов.

Дальнейшие сведения о строении углеводных цепей полисахарида I были получены при исследовании его десульфатирования. Для удаления сульфатных групп был использован кислотный метанолиз [15]. Четырехкратной обработкой полисахарида 0,1 M раствором HCl в абсолютном метаноле удалось полностью отщепить остатки сульфата при сравнительно небольшом отщеплении моносахаридных остатков (главным образом ксилозы и галактозы). Продукт десульфатирования был разделен на две приблизительно равные фракции: нерастворимую в воде (XI) и растворимую (XII). По соотношению моносахаридов фракция XII практически не отличалась от исходного полисахарида I; во фракции XI соотношение маннозы и ксилозы составляло 12 : 1, заметно снижено было и содержание галактозы.

Строение полисахаридов XI и XII было изучено методом метилирования. Вследствие плохой растворимости в диметилсульфоксиде вещества (после предварительной обработки $NaBH_4$ для предотвращения деградации под действием щелочи) метилировали вначале диметилсульфатом в водной щелочи по методу Хеурса [16] и лишь затем дважды — в диметилсульфоксиде по методу Хакомори [17]. Метилированные полисахариды подвергали формолизу, гидролизу, смесь метилированных моносахаридов восстанавливали, ацетилировали и полученные вещества идентифицировали методом хроматомасс-спектрометрии [18]. Полученные данные для полисахаридов XI и XII были качественно идентичны; количественные соотношения для полисахарида XI приведены в табл. 4.

Результаты метилирования десульфатированных полисахаридов XI и XII, а также частичного гидролиза полисахарида I свидетельствуют, что основой этих полимеров служит линейная главная цепь из 1 \rightarrow 3-связанных остатков α -D-маннопиранозы. Остатки D-ксилопиранозы в виде единичных ответвлений или коротких цепочек с 1 \rightarrow 4-связями присоеди-

* Масс-спектрометрия вторичных ионов.

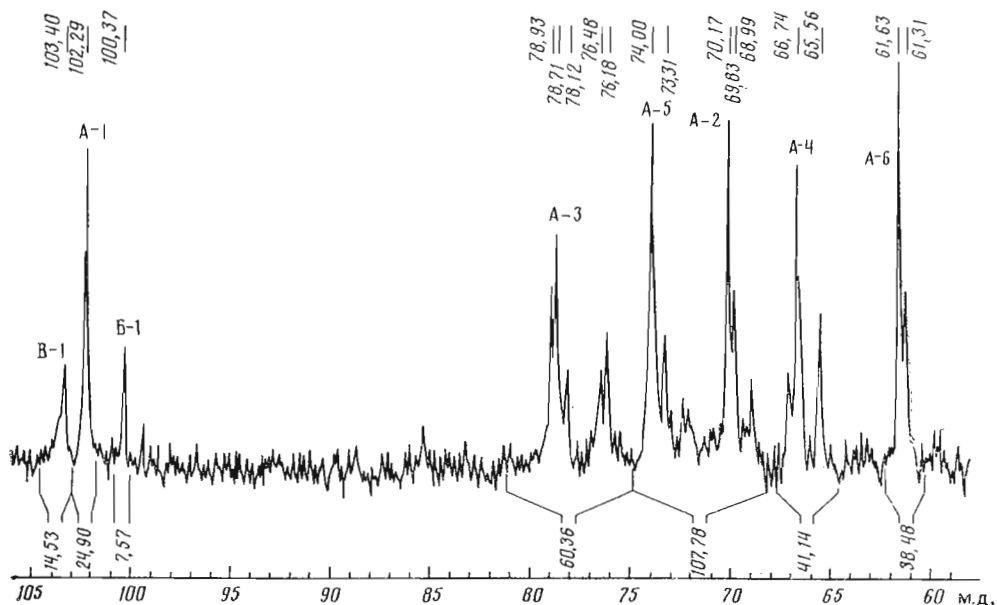
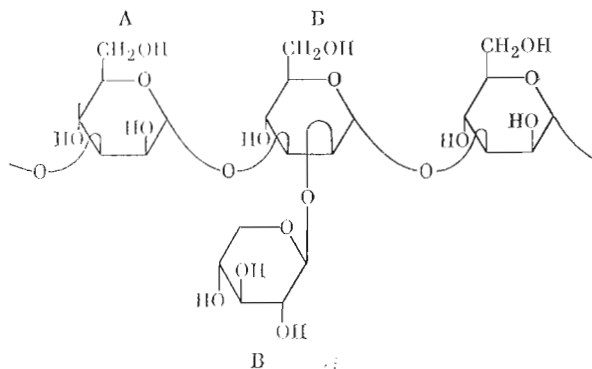


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР десульфатированного полисахарида XII

нены к главной цепи преимущественно в положения 2 маннозных звеньев; в качестве единичных ответвлений находится также небольшое количество галактопиранозы. Средняя длина главной цепи составляет около 150 маннозных остатков.

Такое строение согласуется с данными спектра ^{13}C -ЯМР десульфатированного полисахарида XII (рис. 2). Положение серии главных сигналов, относящихся к атомам углерода 3-О-замещенного остатка α -D-маннопиранозы (А), совпадает с сигналами описанного в литературе спектра (1 \rightarrow 3)- α -D-маннана из гриба *Dictiophora indusiata* [19]. Среди сигналов меньшей интенсивности имеется серия, относящаяся к углеродным атомам ксилозилированного в положение 2 остатка α -D-маннопиранозы главной цепи (сигнал соответствующего аномерного атома углерода при 100,4 м. д. сдвинут в сильное поле вследствие β -эффекта гликозилирования по С-2 [20]) (звено Б), и сигналы, отвечающие концевым остаткам β -D-ксилопиранозы (звено В) (сигнал С-1 при 103,4 м. д., ср. [21]).



Дополнительное подтверждение строения главной цепи и расположения боковых ответвлений в десульфатированных полисахаридах XI и XII было получено с помощью периодатного окисления. После расщепления по Смитсу [22] оба полисахарида давали нерастворимый в воде продукт, образующий при кислотном гидролизе только маннозу, а в результате метилирования и гидролиза — только 2,4,6-три-О-метилманнозу.

Таким образом, периодатное окисление полисахаридов XI и XII приводило к полному удалению боковых ответвлений с образованием линейного (1 → 3)- α -D-маннана, соответствующего главной цепи полисахарида I.

Для определения положения сульфатных групп в сульфатированном ксиломаннани был применен метод метилирования. Предварительно с помощью щелочной обработки [23] было показано, что щелочелabileный сульфат в полисахариде I практически отсутствует. Метилированию в описанных выше условиях (по Хеурсу и затем дважды по Хакомори) подвергали исходный полисахарид I и его фракцию 1-14, полученную после хроматографии на DEAE-сефадексе. Результаты метилирования для обоих образцов качественно совпадают; количественные соотношения для фракции I-14 приведены в табл. 4. Принимая, что все боковые ответвления из остатков ксилоты присоединены в положения 2 звеньев главной цепи, можно заключить, что сульфатные группы расположены главным образом при C-6 и C-2 остатков D-маннопиранозы в соотношении около 2 : 1. Небольшие количества 4-O-метилманнозы, также обнаруженные в гидролизатах метилированных полисахаридов I и I-14, вероятно, образуются из остатков маннозы, одновременно несущих разветвления и сульфатированных по C-6.

Строение нейтральных полисахаридов, полученных при экстракции водоросли, в данной работе подробно не изучалось. Однако исходя из спектра ^{13}C -ЯМР водорастворимого ксилана II, можно заключить, что этот полисахарид является представителем обычного для красных водорослей типа линейных (1 → 3), (1 → 4)- β -D-ксилопирананов [2, 21] и содержит связи 1 → 3 и 1 → 4 в соотношении 1 : 4,5.

Таким образом, сравнивая полисахариды *Liagora* sp. с изученными ранее полисахаридами из *N.vermiculare* и *Ch.fastigiatum*, можно сделать вывод, что красные водоросли, относящиеся к близкородственным семействам гелминтокладиевых и хетангиевых, имеют сходный полисахаридный состав. Они содержат однотипные ксиланы и сульфатированные полисахариды, в основе которых лежит линейная цепь (1 → 3)- α -D-маннана. Различия между сульфатированными полисахаридами из разных видов водорослей, вероятно, сводятся к количеству ответвлений от главной цепи в виде остатков β -D-ксилопиранозы, а также к количеству и расположению сульфатных групп.

Экспериментальная часть

Аналитическую БХ выполняли нисходящим способом на бумаге Filtrak FN-11 и FN-15 (ГДР) в системах растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3 (А) и метилэтилкетон — уксусная кислота — насыщ. водн. H_2VO_3 , 9 : 1 : 1 (Б). Препаративную БХ проводили на бумаге Whatman ЗММ (Англия) в системе А. Восстанавливающие сахара на бумаге обнаруживали анилинфталатом. ТСХ выполнена на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Merck) в системе хлороформ — метанол, 49 : 1,5. Вещества на пластинках обнаруживали опрыскиванием концентрированной H_2SO_4 .

ГЖХ проводили на хроматографе Pye 104 (Англия) с пламенно-ионизационным детектором; колонки (0,6 × 150 см) с 3% ECNSS—М на газхроме Q, 180° С (условия «а») и с 3% OV-1 на диатомите С, 185° С (условия «б»); скорость азота 50 мл/мин.

Масс-спектры в режиме SIMS и ГЖХ-масс-спектрометрии (при ионизации электронным ударом) получали на масс-спектрометре с двойным фокусированием М-80 А (Hitachi, Япония) при разрешающей силе 1000, ускоряющем напряжении 3 кВ и диапазоне массовых чисел 0—1500. Сбор и обработку данных проводили с помощью компьютерной системы М-003. Для хроматографирования использовали колонку с 2% OV-1 на газхроме Q, скорость гелия 20 мл/мин, при программируемой температуре 150° С (5 мин), далее нагрев 10° С/мин до 250° С; ионизация электронами 70 эВ, температура гелиевого сепаратора 250° С, ионизационной камеры 200° С, скорость сканирования 8 с/спектр. Для режима SIMS в качестве жидкой матрицы использовали глицерин или тиоглицерин с добавкой следовых количеств водного раствора NaCl; 1 мкл водного раствора, содержащий 1—10 мкг исследуемого вещества, прибавляли к 1 мкл матрицы, помещали на держатель-мишень из серебра и бомбардировали пучком ионов Xe^+ с энергией 8 кэВ.

Спектры ^{13}C -ЯМР получали на спектрометре Bruker WM-250 с рабочей частотой по углероду 62,9 МГц для растворов веществ в D_2O при 80° С, внутренний стандарт — диметилсульфоксид (39,5 м.д.) или метанол (50,1 м.д.).

Оптическую активность измеряли на автоматическом поляриметре Perkin—Elmer 141. Спектрофотометрические измерения выполняли на спектрофотометре СФ-4А.

Для качественного и количественного анализа моносахаридного состава 2—5 мг полисахарида в 1 мл 2 н. H_2SO_4 нагревали 5—6 ч при $100^\circ C$, нейтрализовали $BaCO_3$, осадок отфильтровывали, промывали водой, раствор концентрировали и анализировали методом БХ. Для превращения моносахаридов в ацетаты полиолов смесь растворяли в 1 мл 1 М NH_4OH , прибавляли избыток $NaBH_4$, оставляли на 14 ч при $20^\circ C$, обрабатывали катионитом КУ-2 (H^+) до pH 3, фильтровали, смолу промывали водой, раствор упаривали, H_3BO_3 удаляли многократной отгонкой с метанолом. Остаток обрабатывали 20 ч 1,5 мл смеси уксусной ангидрида — пиридина — пиридин (1 : 2) при $20^\circ C$, избыток уксусного ангидрида и пиридина удаляли многократной отгонкой с *n*-гептаном и толуолом, остаток растворяли в хлороформе и использовали для ГЖХ (условия «а»).

Количественное определение сахаров проводили по реакции с фенолом и конц. H_2SO_4 [24], сульфата — турбидиметрическим методом Доджсона [25], расход периодата контролировали спектрофотометрически по поглощению при 305 нм [26].

Выделение полисахаридов. Водоросли заготавливали летом 1977 г. в районе г. Сантьяго-де-Куба, промывали пресной водой, метанолом, ацетоном и высушивали. Затем водоросли измельчали и перемешивали 4 ч с 0,2 М раствором триэтиламмониевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты в 90% этаноле при $80^\circ C$ [9]. После четырех таких обработок водоросли исчерпывающе экстрагировали этанолом в аппарате Сокслета.

Полученный материал (42,4 г) перемешивали с 300 мл воды, прибавляя по каплям в течение 6 ч 100 мл $AsON$. Смесь перемешивали еще 3 ч, оставляли на 16 ч, нейтрализовали $NaOH$ и диализовали. Затем осадок отделяли, прибавляли половину надосадочной жидкости, перемешивали 2,5 ч при нагревании ($\sim 90^\circ C$), центрифугировали, экстракт отделяли, а к осадку прибавляли вторую половину надосадочной жидкости и вновь перемешивали при нагревании 2,5 ч. Далее остаток водоросли перемешивали 3 ч с 400 мл воды при $100^\circ C$; такую обработку повторяли 5 раз. Все водные экстракты объединяли (последние три концентрировали в вакууме) и прибавляли 10% раствор цетавлона до полного осаждения кислых полисахаридов. Осадок цетавлоновой соли отделяли центрифугированием, промывали водой, а затем тщательно растирали с 300 мл 20% этанольного раствора NaI и перемешивали несколько дней; такую обработку осадка повторяли трижды. Осадок Na -соли отделяли, промывали этанолом, растворяли в воде, диализовали и лиофилизировали, получали полисахарид I. Выход 3,2 г, содержание SO_3Na 22%, $[\alpha]_D^{20} +42,6^\circ$ (с 0,25; вода).

Маточный раствор, полученный после отделения цетавлоновых солей от водного экстракта водоросли, диализовали, концентрировали в вакууме до небольшого объема и приливали четырехкратный объем этанола. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали последовательно этанолом, ацетоном и сушили в вакууме над P_2O_5 , получали фракцию II с выходом 0,45 г. При добавлении ацетона к водноспиртовому раствору получали фракцию III с выходом 0,1 г.

Остаток водоросли после экстракции водой перемешивали с 300 мл 1 н. $NaOH$ в течение нескольких дней; такую обработку повторяли трижды. Объединенные щелочные экстракты нейтрализовали $AsON$. Осадок, выпавший при нейтрализации, отделяли центрифугированием, промывали водой, ацетоном, сушили в вакууме над P_2O_5 , получали фракцию IV с выходом 6,1 г.

Прозрачный нейтральный раствор диализовали. Образовавшийся при этом осадок отделяли, как описано выше, получали фракцию V с выходом 1,5 г.

Раствор упаривали до небольшого объема, приливали четырехкратный объем этанола и несколько капель 20% KCl . Выпавший осадок отделяли, получали фракцию VI с выходом 7,2 г. Незначительный остаток водоросли промывали водой, сушили смесью растворителей. Выход 0,55 г (1,2%).

Моносахаридный состав фракций I—VI приведен в табл. 1.

Гидролиз сульфатированного полисахарида I. 300 мг полисахарида I нагревали 10 ч при $100^\circ C$ в 35 мл 1 н. H_2SO_4 , нейтрализовали $BaCO_3$, осадок отделяли и промывали водой, объединенные растворы упаривали досуха и из остатка препаративной БХ выделяли зоны, соответствующие по подвижности и окрашиванию галактозе, маннозе и ксилозе, а также зону с $R_{Gal} = 2,2$. Маннозу, ксилозу и галактозу дополнительно очищали рехроматографией на бумаге FN-15 в системе А. Зоны элюировали водой, растворы упаривали досуха. Перед измерением оптической активности водные растворы моносахаридов фильтровали через слой угля; концентрацию моносахарида в растворе определяют по реакции с фенолом и конц. H_2SO_4 . Получали *D*-маннозу, выход 24 мг, $[\alpha]_D^{20} +14,6^\circ$ (с 0,17, вода), по данным [27]: $[\alpha]_D^{20} +14,2^\circ$ (вода); *D*-ксилозу, выход 20 мг, $[\alpha]_D^{20} +18,4^\circ$ (с 0,45, вода), по данным [27]: $[\alpha]_D^{20} +18,8^\circ$ (вода); галактозу, выход 6 мг, $[\alpha]_D^{20} -17^\circ$ (с 0,15, вода), что соответствует смеси *D*- и *L*-изомеров, в которой содержание *D*-формы $\sim 40\%$, по данным [27] для *D*-изомера $[\alpha]_D^{20} +80,2^\circ$ (вода); вещество с $R_{Gal} = 2,2$, выход 20 мг, $[\alpha]_D^{20} +19^\circ$ (с 0,42; вода), по данным [28] для 3-*O*-метил-*D*-ксилозы $[\alpha]_D^{20} +17,2$. Последнее вещество разделяли на две части. Одну из них восстанавливали $NaBD_4$ в D_2O и ацетилировали, после чего методом хроматомасс-спектрометрии идентифицировали ацетат 3-*O*-метилпентита, масс-спектр, *m/z* (*I*, %): 87 (94), 88 (93), 99 (25), 100 (50), 103 (37), 104 (38), 114 (48), 129 (95), 130 (95), 131 (55), 146 (15), 147 (14), 159 (7), 160 (6), 189 (99), 190 (100), 234 (2,5, *M*-59-42), 276 (8,5, *M*-49), 336 (0,05, *M*+1). Другую часть вещества суспендировали в 2 мл сухого CH_2Cl_2 , охлаждали до $-70^\circ C$, быстро прибавляли 2 мл охлажденного до $-70^\circ C$ BCl_3 , выдерживали 30 мин при $-70^\circ C$, затем медленно повышали температуру до комнатной и оставляли на 18 ч.

Раствор упаривали досуха, несколько раз отгоняли метанол, в остатке методами БХ (системы А и Б) и ГЖХ обнаруживали только ксилозу.

Фракционирование полисахарида I на DEAE-сефадексе А-50. 300 мг полисахарида I перемешивали с 75 мл 4 М NaCl в течение недели. Осадок отделяли центрифугированием, раствор диализовали и лиофилизовали, получали фракцию I-1 с выходом 135 мг. Осадок перемешивали 7 ч с 70 мл воды, нерастворенный остаток отделяли, суспендировали в воде, диализовали и лиофилизовали. Выход фракции I-3 40 мг. Раствор диализовали и лиофилизовали, получали фракцию I-2 с выходом 75 мг. 135 мг фракции I-1 растворяли в 20 мл 0,01 М NaCl и наносили на колонку (2 × 20 см) с DEAE-сефадексом А-50 (Cl⁻-форма). Колонку промывали 0,01 М NaCl, затем последовательно 0,5; 1, 2, 3 и 4 М растворами NaCl, каждый раз до отрицательной реакции на сахара. Фракции, соответствующие различным концентрациям NaCl, объединяли, диализовали и лиофилизовали. Выходы и характеристики всех фракций указаны в табл. 2; главная фракция 1—14 имела $[\alpha]_D^{20} +36,5^\circ$.

Частичный гидролиз полисахарида I. К 400 мг полисахарида I прибавляли 6 мл 98% муравьиной кислоты, выдерживали 50 мин при 100° С, затем приливали 60 мл 0,4 н. H₂SO₄ и нагревали 10 мин при 100° С. Полученный раствор обрабатывали анионитом АВ-17 (HCO₃⁻-форма) до нейтральной реакции, затем катионитом КУ-2 (H⁺) и упаривали до небольшого объема. По данным БХ, в гидролизате содержались 3-О-метилксилоза, ксилоза, манноза, галактоза и олигосахариды VII—X; после препаративной БХ получали 28 мг VII, 25 мг VIII, 22 мг IX и 19 мг X. Характеристика олигосахаридов приведена в табл. 3, спектры ¹³C-ЯМР — на рис. 1.

Десульфатирование полисахарида I. 1 г полисахарида I перемешивали 24 ч в 150 мл 0,1 М раствора HCl в абсолютном метаноле при 20° С, осадок отделяли центрифугированием и прибавляли к нему свежую порцию HCl в метаноле, а раствор нейтрализовали PbCO₃, фильтровали и упаривали досуха. Остаток гидролизовали и анализировали методами БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов. Такую обработку повторяли 4 раза, после чего остаток отделяли центрифугированием, промывали метанолом, суспендировали в воде и диализовали, осадок и раствор обрабатывали отдельно. Осадок суспендировали в воде и лиофилизовали, получали десульфатированный полисахарид XI с выходом 300 мг. Содержание SO₃Na 1,4%, моносахаридный состав: манноза и ксилоза 12 : 1, следы галактозы. Раствор упаривали до небольшого объема и лиофилизовали, получали десульфатированный полисахарид XII с выходом 250 мг. Содержание SO₃Na 0%, моносахаридный состав: манноза, ксилоза и галактоза, 7 : 1 : 0,9.

Действие щелочи на полисахарид I. 150 мг полисахарида I (22% SO₃Na) растворяли в 75 мл воды, прибавляли 100 мг NaBH₄, через 24 ч раствор нейтрализовали AcOH, диализовали и лиофилизовали. Восстановленный полисахарид (22% SO₃Na) растворяли в 50 мл 1 н. NaOH, прибавляли 300 мг NaBH₄, нагревали 5 ч при 80° С, охлаждали, нейтрализовали AcOH, диализовали и лиофилизовали. Выход полисахарида 100 мг, содержание SO₃Na 20%.

Метилирование полисахаридов. 30—50 мг полисахарида растворяли или суспендировали в 1—2 мл воды, прибавляли 25 мг NaBH₄, перемешивали 4—5 ч, затем приливали 2 мл 30% раствора NaOH и обрабатывали диметилсульфатом и щелочью в атмосфере аргона по методике [16]. После разложения избытка диметилсульфата вещества выделяли диализом и лиофилизацией. Частично метилированные полисахариды высушивали в вакууме над P₂O₅ и дважды метилировали по Хакомори [17], выделяя продукты после каждой обработки с помощью диализа и лиофилизации. 2—5 мг метилированного полисахарида нагревали 4 ч в запаянной ампуле с 3 мл 98% HCOOH при 100° С, упаривали с водой, к остатку прибавляли 3 мл 0,7 М H₂SO₄, нагревали 16 ч при 100° С, нейтрализовали BaCO₃, раствор обрабатывали NaBH₄ или NaBD₄, полученную смесь полиолов ацетилировали и использовали для ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии.

Расщепление по Смуту десульфатированных полисахаридов XI и XII. К суспензии 100 мг полисахарида XI в 70 мл воды приливали 70 мл 8 мМ раствора NaIO₄ и перемешивали при 20° С, контролируя расход окислителя по поглощению надосаточной жидкости при 305 нм. Реакция заканчивалась через 48 ч; избыток периодата разлагали этиленгликолем, осадок отделяли, промывали водой, суспендировали в 70 мл воды, прибавляли 50 мг NaBH₄, перемешивали 16 ч, раствор нейтрализовали AcOH, осадок отделяли и промывали водой. Далее его обрабатывали 48 ч 40 мл 2 М CF₃COOH при перемешивании, суспензию выливали в 200 мл этанола, осадок промывали этанолом, суспендировали в воде, повторно обрабатывали NaBH₄ и после нейтрализации и промывания водой лиофилизовали. Выход расщепленного полисахарида 38 мг, при гидролизе вещество дает только маннозу.

Полисахарид XII, растворимый в воде, окисляли в тех же условиях, но для выделения применяли осаждение этанолом; расщепленный полисахарид давал при гидролизе маннозу и ксилозу в соотношении 50 : 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Usov A. I., Ivanova E. G. // Bot. Mar. 1987. V. 30. № 5. P. 365—370.
2. Усов А. И. // Прогресс химии углеводов / Ред. Торгов И. В. М.: Наука, 1985. С. 77—96.
3. Usov A. I., Adamyants K. S., Yarotsky S. V., Anoshina A. A., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1973. V. 26. № 1. P. 282—283.
4. Усов А. И., Адамянц К. С., Яроцкий С. В., Аношина А. А. // Журн. общ. химии. 1975. Т. 45. № 4. С. 916—921.
5. Усов А. И., Адамянц К. С., Яроцкий С. В. // Журн. общ. химии. 1975. Т. 45. № 6. С. 1377—1381.

6. Усов А. И., Яроцкий С. В. // Биоорганич. химия. 1975. Т. 1. № 7. С. 919—922.
7. Matulewicz M. C., Cerezo A. S. // Carbohydr. Polym. 1987. V. 7. № 2. P. 121—132.
8. Усов А. И., Яроцкий С. В., Эстебес М. Л. // Биоорганич. химия. 1981. Т. 7. № 8. С. 1261—1270.
9. Scott J. E., Kyffin T. W. // Biochem. J. 1978. V. 169. № 3. P. 697—701.
10. Bonner T. J., Bourne E. L., McNally S. // J. Chem. Soc. 1960. № 7. P. 2929—2934.
11. Usov A. I. // Bot. Mar. 1984. V. 27. № 5. P. 189—202.
12. Johnston I. R. // Biochem. J. 1965. V. 96. № 3. P. 659—664.
13. Gorin P. A. J., Spencer J. F. // Can. J. Chem. 1967. V. 45. № 13. P. 1543—1549.
14. Awad L. F., El Ashry E. S. H., Schuerch C. // Carbohydr. Res. 1983. V. 122. № 1. P. 69—79.
15. Kantor T. G., Schubert M. // J. Amer. Chem. Soc. 1957. V. 79. № 1. P. 152—153.
16. Херст Е. Л., Персиваль Е. // Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967. С. 85—89.
17. Конрад Г. Е. // Методы исследования углеводов/Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975. С. 276—278.
18. Bjorndal H., Hellerqvist C. G., Lindberg B., Svensson S. // Angew. Chem., Internat. Ed. 1970. V. 9. № 8. P. 610—619.
19. Hara C., Kiho T., Ukai S. // Carbohydr. Res. 1982. V. 111. № 1. P. 143—150.
20. Чижов О. С., Шапков А. С. // Прогресс химии углеводов/Ред. Торгов И. В. М.: Наука, 1985. С. 30—54.
21. Kovač P., Hirsch J., Shashkov A. S., Usov A. I., Yarotsky S. V. // Carbohydr. Res. 1980. V. 85. № 2. P. 177—185.
22. Гольдштейн И. Дж., Хэй Г. В., Льюис Б. А., Смит Ф. // Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967. С. 471—478.
23. Rees D. A. // J. Chem. Soc. 1961. № 12. P. 5168—5171.
24. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 3. P. 350—356.
25. Dodgson K. S., Price R. G. // Biochem. J. 1962. V. 84. № 1. P. 106—110.
26. Marinetti G. V., Rouser G. // J. Amer. Chem. Soc. 1955. V. 77. № 20. P. 5345—5349.
27. Isbell H. S., Pigman W. W. // J. Org. Chem. 1937. V. 1. № 6. P. 505—539.
28. Levene P. A., Raymond A. L. // J. Biol. Chem. 1933. V. 102. № 1. P. 331—346.

Поступила в редакцию
4.XI.1987

POLYSACCHARIDES OF ALGAE. XXXVIII.
POLYSACCHARIDE COMPOSITION
OF THE RED SEAWEED *LIAGORA* sp. AND THE STRUCTURE
OF SULPHATED XYLOMANNAN

USGV A. I., DOBKINA I. M.

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

A sulphated xylomannan and several fractions of neutral polysaccharides have been isolated from the red seaweed *Liagora* sp. According to ^{13}C -NMR spectrum, the water-soluble neutral xylan is a representative of well-known red algal linear xylans with $\beta 1 \rightarrow 4$ and $\beta 1 \rightarrow 3$ linkages between *D*-xylopyranose residues. Structure of the sulphated polysaccharide was investigated by partial hydrolysis, methylation before and after desulphation, Smith degradation after desulphation, and ^{13}C -NMR spectroscopy. Xylomannan was shown to contain *D*-mannose and *D*-xylose (7 : 1) and 22% of sulphate. It has a linear backbone built of $\alpha 1 \rightarrow 3$ -linked *D*-mannopyranose residues. On the average, there are two branching points (bearing single *D*-xylopyranose or very short chains of $1 \rightarrow 4$ -linked *D*-xylopyranose residues) and 7 sulphate groups attached to positions 6 and 2 at a ratio about 2 : 1 on every 14 mannopyranose residues of the main chain.