



УДК 577.114.5 : 582.273.119.2.088

© 1991 г.

А. И. Усов, М. Я. Элашвили

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 3,6-АНГИДРОГАЛАКТОЗЫ И СПЕЦИФИЧЕСКОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ГАЛАКТАНОВ КРАСНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ В УСЛОВИЯХ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ГИДРОЛИЗА

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

Показано, что полный кислотный гидролиз галактанов красных водорослей в присутствии 4-метилморфолинборана приводит к количественному восстановлению производных 3,6-ангидрогалактозы в производные 3,6-ангидродульцита, тогда как другие моносахариды, входящие в состав этих галактанов, практически не восстанавливаются. Это позволяет осуществлять полный анализ моносахаридного состава галактанов в одной пробе гидролизата с помощью ГЖХ и отдельно определять 2-О-метил-3,6-ангидрогалактозу и 3,6-ангидрогалактозу не только в галактанах, но и в биомассе водорослей до выделения полисахаридных препаратов. Гидролиз в присутствии того же восстановителя в более мягких условиях приводит к расщеплению полисахаридов по гликозидным связям 3,6-ангидрогалактозы и дает набор олигосахаридов, содержащих на восстанавливаемом конце остаток 3,6-ангидродульцита; сульфатные группы при этом существенно не затрагиваются. Эти олигосахариды устойчивы, удобны для хроматографического разделения и имеют важное значение для структурного анализа полисахаридов. Строение олигосахаридов, включая положение сульфатных групп, может быть надежно установлено с помощью спектров ^{13}C -ЯМР. Частичный восстановительный гидролиз биомассы водорослей позволяет на микроуровне отнести содержащийся в ней галактан к группе агара или каррагинана по образованию соответственно агаробита или каррабинта, ацетаты которых можно уверенно идентифицировать с помощью ГЖХ.

3,6-Ангидрогалактоза — уникальный природный моносахарид. В виде остатков 4-О-замещенной 3,6-ангидро- α -галактопиранозы, часто с метильной или сульфатной группой в положении 2, он входит в состав многочисленных галактанов красных водорослей [1]. При этом в полисахаридах группы каррагинана остатки 3,6-ангидрогалактозы принадлежат к D-ряду, а в полисахаридах группы агара — к L-ряду. Количественный анализ и полная идентификация этого моносахарида, включающая в себя определение абсолютной конфигурации, являются важными этапами установления строения сульфатированных галактанов красных водорослей.

3,6-Ангидрогалактоза чувствительна к кислотам и полностью разрушается в обычных условиях гидролиза гликозидных связей. На повышенной лабильности к кислотным воздействиям основан наиболее распространенный метод количественного спектрофотометрического определения 3,6-ангидрогалактозы в присутствии других моносахаридов — реакция с резорцином-HCl [2], а также ряд аналогичных методик, находящих меньшее применение [3, 4]. Однако методики [2—4] применимы только для анализа растворов полисахаридов и не дают возможности исследовать нерастворимые объекты, а также отдельно определять 3,6-ангидрогалактозу и ее 2-О-метилловый эфир. Естественно, что для определения прочих моносахаридов, входящих в состав полисахарида, необходимо параллельно использовать другие методики, на которые не влияет присутствие производных 3,6-ангидрогалактозы (например, количественную ГЖХ после полного гидролиза), а при спектрофотометрических определениях вводить соответствующие поправки.

Чтобы определять абсолютную конфигурацию остатков 3,6-ангидрогалактозы, в последние годы почти исключительно используют спектроскопию ^{13}C -ЯМР олиго- и полисахаридов [5]. Химический подход к реше-

нию той же проблемы предполагает выделение и поляриметрическое исследование подходящего производного 3,6-ангидрогалактозы при таком расщеплении полисахарида, когда деструкция этого сахара происходит в незначительной степени. Наиболее популярен кислотный метанолиз, хотя он и приводит к достаточно сложным смесям: наряду с диметилацетатами 3,6-ангидрогалактозы и ее 2-О-метилового эфира образуется заметное количество их метилгликозидов, а прочие сахара также превращаются в смеси метилгликозидов. Тем не менее с помощью метанолиза неоднократно удавалось определить абсолютную конфигурацию 3,6-ангидрогалактозы и оценить соотношение 3,6-ангидрогалактозы и 2-О-метил-3,6-ангидрогалактозы в полисахаридах (см., например, [6]).

Кислотолабильность гликозидных связей 3,6-ангидрогалактозы позволяет проводить частичное расщепление полисахаридных молекул до соответствующих олигосахаридов с остатком 3,6-ангидрогалактозы на восстанавливаемом конце. При регулярном чередовании остатков *D*-галактозы и 3,6-ангидрогалактозы в молекулах галактанов продуктами частичного расщепления служат диастереомерные 4-О-β-*D*-галактопиранозил-3,6-ангидро-*D*-галактоза (каррабиоза) или 4-О-β-*D*-галактопиранозил-3,6-ангидро-*L*-галактоза (агаробиоза), идентификация которых позволяет относить исходные полисахариды к агарам или каррагинанам, а количественное определение дает возможность оценить степень регулярности полимерных молекул [7]. Для такого частичного расщепления используют мягкий гидролиз водными кислотами [8, 9], иногда с последующим восстановлением [10], метанолиз [11], меркаптолиз [12] или окислительный гидролиз [13], но все эти методики экспериментально трудны и дают много побочных продуктов.

Надавно было предложено проводить кислотный гидролиз ряда олиго- и полисахаридов, в том числе агарозы, в присутствии 4-метилморфолинборана [14], способствующего немедленному восстановлению освобождающихся кислотолабильных моносахаридов. В настоящей работе мы излагаем результаты использования такого восстановительного гидролиза для количественного определения производных 3,6-ангидрогалактозы в галактанах красных водорослей и для частичного расщепления этих полисахаридов (предварительные результаты см. в работе [15]). В качестве модельных соединений для подбора условий восстановительного гидролиза мы использовали метил-β-*D*-ксилопиранозид, метил-α-*D*-галактопиранозид и метил-3,6-ангидро-α-*D*-галактопиранозид. Реакцию проводили в 2 М трифторуксусной кислоте при 100°С в присутствии инозита в качестве внутреннего стандарта. Как и следовало ожидать, нагревание смеси указанных гликозидов без восстановителя в течение 8 ч приводило к образованию ксилозы и галактозы; 3,6-ангидрогалактоза при этом полностью разрушалась, вследствие чего гидролизат окрашивался в ярко-желтый цвет. Аналогичная обработка в присутствии избытка 4-метилморфолинборана давала бесцветный гидролизат, содержащий 3,6-ангидродульцит, ксилозу и галактозу; в реакционной смеси были обнаружены лишь следы продуктов восстановления двух последних моносахаридов. Для количественного определения методом ГЖХ эту смесь можно переводить в ацетаты полиолов [16] или ацетаты альдононитрилов [17]. В данной работе использовался последний прием, дающий лучшее разделение производных ксилозы и 3,6-ангидрогалактозы. Из многочисленных опытов были рассчитаны средние величины молярного отклика для названных сахаров и показано, что метод их количественного определения с помощью восстановительного гидролиза и ГЖХ обладает вполне удовлетворительной точностью и воспроизводимостью.

Далее восстановительный гидролиз был использован для анализа моносахаридного состава нескольких известных галактанов красных водорослей (табл. 1). Было показано, что в случае галактанов с низким содержанием сульфата (бакто-агар Дифко, агар из *Rhodomela larix* [6]) в сумме этим методом определяется около 80% углеводов (влажность препаратов составляет 12–15%), причем количество 3,6-ангидрогалактозы практически совпадает с данными резорцинового метода. Более низкое суммарное

Моносахаридный состав (в процентах, считая на ангидроузено) некоторых галактанов красных водорослей (по данным восстановительного гидролиза и ГЖХ)

Моносахаридный компонент	Время удерживания, мин *	Бакто-агар Дифко	Агар из <i>R. larix</i> , ср. [6]	Одонгалан, ср. [18]	<i>L. nipponica</i>		<i>T. crinitus</i>		κ-Каррагинан
					галактан, ср. [19]	биомасса	κ-полисахарид, ср. [20]	биомасса	
Xyl	5,2 **	—	—	1,0	3,0	2,0	—	1,3	—
2Me3,6AGal	5,7 ***	—	8,7	2,1	3,2	2,6	—	0,3	0,5
6MeGal	6,4 **	—	—	32,8	1,4	—	—	1,0	0,9
3,6AGal	6,6 ***	35,7	25,3	31,5	15,3	9,8	25,4	5,7	28,7
2MeGal	6,8 **	—	—	—	1,4	—	—	—	—
Gal	7,5 **	41,6	46,8	13,1	32,7	21,6	43,1	16,8	32,0
Производные моль/моль	3,6AGal/Gal,	0,96 : 1	0,87 : 1	0,87 : 1	0,59 : 1	0,63 : 1	0,67 : 1	0,37 : 1	0,96 : 1

* Условия А (см. «Экспер. часть»). Время удерживания гекса (гала и гала) (внутренний стандарт) 8,5 мин.

** Ацетат альдоноингирила.

*** Ацетат полиола.

Таблица 2

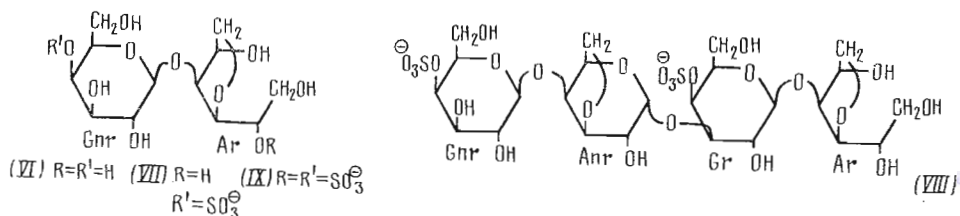
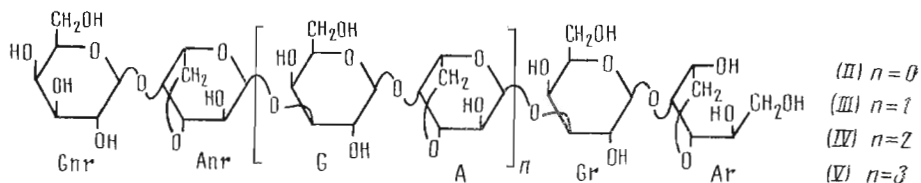
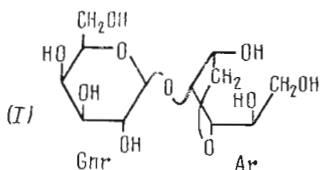
Выходы и характеристика продуктов частичного восстановительного гидролиза бакто-агара Дифко

Восстановленный олигосахарид	Выход, %			RGal	τ*, мин	Масс-спектр, m/z	[α] _D ²⁵ (с 1,5, вода), град
	65° С, 8 ч	65° С, 1 ч	55° С, 20 ч				
Агаробит (I)	45	20	37	0,90	5	349(M + Na)	-10,5 **
Агаротетраит (II)	9,5	16	12,5	0,40	8	655(M + H) 677(M + Na)	-18
Агарогексат (III)	3,5	8,5	4	0,18	15	939(M + H) 961(M + Na) 983(M - H + 2Na)	-23
Агарооктаит (IV)	0,5	7	0,7	0,08	35	1267(M + Na) 1289(M - H + 2Na)	—
Агародекант (V)	Следы	3	Следы	0,03	—	—	—
Высокомолекулярная фракция	15	30	26	—	—	—	—

* Обращенно-фазовая хроматография на силасорбе С-18.

** По литературным данным, кристаллический агаробит имеет [α]_D²² -15° (с 1,2, вода) [10].

содержание углеводов в прочих объектах табл. 1 объясняется наличием в полисахаридах сульфатных групп. В соответствии с имеющимися литературными данными, агар из *R. larix* [6] характеризуется сравнительно высоким содержанием остатков 2-О-метил-3,6-ангидрогалактозы, а одонгалан [18] — остатков 6-О-метилгалактозы. В галактанах из *Laurencia nipponica* [19] и *Tichocarpus crinitus* [20] соотношение производных 3,6-ангидрогалактозы и галактозы заметно отличается от единицы, что соответствует не вполне регулярной структуре их углеводных цепей. Метод позволяет легко обнаружить и определить минорные компоненты, такие, как 2-О-метил-3,6-ангидрогалактоза, 6-О-метилгалактоза и 2-О-метилгалактоза, в полисахаридах из *L. nipponica*, *T. crinitus* и в образце kappa-каррагинана из *Eucheima cottonii*. Следует особо подчеркнуть, что анализ можно проводить не только с выделенными из водорослей и очищенными полисахаридами, но и с навесками биомассы водорослей. Получаемые сведения о содержании галактанов в биомассе и о соотношении 3,6-ангидрогалактозы и галактозы, как показывают примеры с *L. nipponica* и *T. crinitus*, хорошо согласуются с данными по экстракции и очистке сульфатированных галактанов из этих водорослей [19, 20].



Под моносахаридными остатками приведены их обозначения, предложенные в работе [22] и используемые в нашей работе при описании ЯМР-спектров

Снижение концентрации кислоты до 0,5 М и температуры до 65° С. позволило проводить частичный восстановительный гидролиз галактанов только по гликозидным связям остатков 3,6-ангидрогалактозы. В этих условиях главным продуктом, полученным из бакто-агара Дифко за 8 ч, оказался агаробиит (I) (4-О-β-D-галактопиранозил-3,6-ангидро-L-дульцит). Строение этого вещества следовало из его хроматографического поведения, масс-спектра и спектров ¹H- и ¹³C-ЯМР. Кроме агаробиита в продуктах реакции была обнаружена относительно высокомолекулярная фракция, содержащая значительно меньше 3,6-ангидрогалактозы по сравнению с исходным полисахаридом. Дальнейшее смягчение условий частичного гидролиза (сокращение времени нагревания до 1 ч или снижение температуры до 55° С) позволило получить набор олигомергомологов (I) — (V) с четными степенями полимеризации от 2 до 10, построенных из остатков агаробиозы и содержащих 3,6-ангидродульцит на восстанавливаемом конце. Тем самым было показано, что при гидролизе в очень мягких условиях в продуктах реакции может сохраняться значительное количество гликозидных связей остатков 3,6-ангидрогалактозы. Разделение полученной смеси олигосахаридов было проведено с помощью гель-хроматографии, а их строение подтверждено масс-спектрами и спектрами ¹³C-ЯМР (табл. 2, рис. 1).

Частичный гидролиз нескольких каррагинанов был проведен при 65° С. Результатом такой обработки каппа-полисахарида из *T. crinitus*, который представляет собой не полностью сульфатированный каппа-каррагинан [22], было получение каррабиита (4-О-β-D-галактопиранозил-3,6-ангидро-D-дульцита (VI)) и его 4'-сульфата (VII). Последнее вещество оказалось главным продуктом частичного гидролиза каппа-каррагинана фирмы Sigma, а иота-каррагинан в этих условиях дал также 2,4'-дисульфат каррабиита (IX). Для разделения сульфатированных олигосахаридов использовали ионообменную хроматографию (табл. 3). Таким образом, было показано, что сульфатные группы, присутствующие в молекулах исходных галактанов, в значительной степени устойчивы в условиях восстановительного частичного гидролиза.

Как и в случае олигосахаридов, получаемых из галактанов красных водорослей с помощью других методов расщепления [23—25], главным методом установления строения восстановленных фрагментов явилась спектроскопия ЯМР. Протонные спектры агаробиита (I), агаротетраита

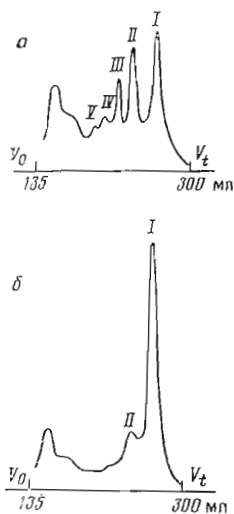


Рис. 1

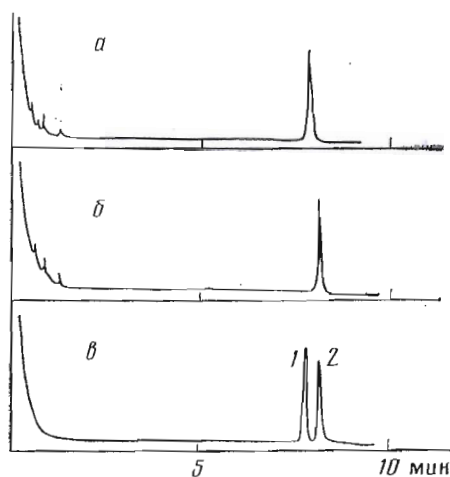


Рис. 2

Рис. 1. Гель-хроматография продуктов частичного восстановительного гидролиза бакто-агара Дифко на колонке с TSK HW-40S. Гидролиз при 65° С в течение 1 (а) и 8 ч (б)

Рис. 2. ГЖХ продуктов частичного восстановительного гидролиза (условия Б, см. «Экспер. часть») вещества из биомассы *L. nipponica* (а), из биомассы *T. crinitus* (б); в — заведомые образцы ацетатов агаробииита (1) и каррабииита (2)

(II), каррабииита (VI) и 4'-сульфата каррабииита (VII) были расшифрованы с помощью селективного гомоядерного двойного резонанса, в том числе с применением двумерной техники COSY RCT; интерпретация этих спектров приведена в табл. 4. Можно отметить хорошее совпадение ряда сигналов в спектрах названных олигосахаридов и соответствующих сигналов в протонных спектрах исходных галактанов, описанных в литературе [26]. Спектры ^{13}C -ЯМР агаробииита и каррабииита были расшифрованы с помощью селективного гетероядерного двойного резонанса, а для интерпретации спектров ^{13}C -ЯМР прочих олигосахаридов учитывались дополнительно общие закономерности углеродных спектров веществ этого класса, известные из литературы [5, 21, 27]. Химические сдвиги сигналов атомов углерода для восстановленных фрагментов (I)–(V) молекулы агара приведены в табл. 5, а для аналогичных фрагментов молекулы каррагинанов — в табл. 6.

Интересно отметить разницу в положении сигналов А4, А5 и G1 в спектрах агаробииита (I) и каррабииита (VI). Эта разница хорошо соответствует известным представлениям о влиянии абсолютной конфигурации моносахаридного остатка в дисахариде на величину эффекта гликозилирования [28, 29] и, как и в случае спектров ^{13}C -ЯМР полисахаридов, может использоваться для установления абсолютной конфигурации 3,6-

Таблица 3

Выход (%) продуктов частичного восстановительного гидролиза каррагинанов (65° С, 8 ч) *

Продукты	τ, мин **	%-Каррагинан (Sigma)	%-Полисахарид <i>T. crinitus</i>	ι-Каррагинан (Sigma)
Каррабииит (VI)	—	— (—)	25	—
4'-Сульфат каррабииита (VII)	5	40 (30)	18	15
4',4''-Дисульфат карратетраита (VIII)	10	5 (20)	—	—
2,4'-Дисульфат каррабииита (IX)	15	— (—)	—	10

* В скобках приведены данные для 24-часового гидролиза при 55° С.

** Колонка с ДЭА-силасорбом.

Спектры ¹H-ЯМР агаробинита (I), агаротетраита (II), каррабинита (VI) и 4'-сульфата каррабинита (VII)*

Протоны	I		II				VI		VII	
	Gnr	Ar	Gnr	Gr	Anr	Ar	Gnr	Ar	Gnr	Ar
Химические сдвиги, м.д.										
H-1	4,56	3,69— 3,78**	4,46	4,60	5,16		4,56	3,69— 3,78**	4,59	3,84— 3,91**
H-2	3,51	3,93	3,48	3,63	4,14		3,61		3,60	
H-3	3,66	3,90	3,65	3,82	4,55	3,90	3,74	3,98	3,84	3,96
H-4	3,96	4,33	3,92	4,14	4,66	4,34	4,00	4,23	4,72	4,22
H-5		5,00			4,1—4,3	4,00		4,57	3,92	4,56
H-6		3,99			4,24	3,98		4,08	3,76	4,05
H-6'		3,86			4,02	3,85		3,91	3,67	3,89

Константы спин-спинового взаимодействия, Гц

J _{1,2}	7,7		7,5	7,5	2,5		7,5		7,0	
J _{2,3}	10,0	7,0	10,0	9,5	5,0	8,0	9,7		10,0	8,0
J _{3,4}	3,5	2,0	3,0	3,2	0,5	0,5	3,5	2,5	3,5	2,5
J _{4,5}	0,5	4,2	0,5	0,5	1,5	4,2	0,5	4,5	1,0	4,5
J _{5,6}		4,5			0,5			5,0	4,0	5,0
J _{5,6'}		2,5			3,5			2,5	6,7	2,3
J _{6,6'}		10,0			10,5			10,0	11,7	10,0

* Обозначения моносахаридных остатков как в работе [21].

** В этом интервале находятся сигналы H-1 и H-1' остатка 3,6-ангидродульцита.

Таблица 5

Спектры ¹³C-ЯМР агаробинита (I) и его олигомергомологов (II) — (V) (химические сдвиги сигналов, м.д.)

Атом углерода*	I	II	III	IV	V
G1nr, G1, G1r	102,9	102,7 102,8	102,6 102,7 102,8	102,5 102,7	102,4 102,6
G2, G2r		70,5	70,4 70,5	70,4 70,5	70,3 70,4
G2nr	71,3	71,4	71,1	71,1	71,1
G3, G3r		82,4	82,4 82,5	82,3 82,5	82,3
G3nr	73,3	73,3	73,3	73,3	73,3
G4, G4r		68,9	68,9	68,7	68,8
G4nr	69,2	69,2	69,2	69,2	69,2
G5nr, G5, G5r	75,9	75,7 76,0	75,6 75,9	75,7 75,9	75,7 75,8
G6nr, G6, G6r	61,7	61,6	61,6 61,7	61,5 61,6	61,5
A1nr, A1		98,6	98,7	98,5	98,4
A1r	63,5	63,5	63,5	63,5	63,5
A2nr, A2		69,9	69,9	69,9	69,7
A2r	71,6	71,6	71,6	71,5	71,5
A3nr, A3		80,2	80,3	80,2	80,1
A3r	84,2	84,1	84,2	84,1	84,1
A4nr, A4		77,5	77,5	77,5	77,4
A4r	86,1	86,1	86,1	86,1	86,1
A5nr, A5		75,5	75,5	75,5	75,4
A5r	75,9	75,9	75,6	75,7	75,7
A6nr, A6		69,5	69,6	69,5	69,4
A6r	73,6	73,6	73,7	73,6	73,5

* Номеру атома углерода в сахарном остатке соответствует цифра в обозначении этого остатка соответственно работе [21] (см. формулы).

Таблица 6

Спектры ¹³C-ЯМР каррабинита (VI), его 4'-сульфата (VII) и 2,4'-дисульфата (IX), а также 4',4''-дисульфата карратетраита (VIII) (химические сдвиги сигналов, м.д.)

Атом углерода*	VI	VII	VIII	IX
G1nr, G1r	104,0	103,9	103,5 103,0	103,5
G2nr	71,5	71,5	71,4	71,6
G2r			69,8	
G3nr	75,4	72,4	72,4	72,4
G3r			78,5	
G4nr	69,3	77,2	77,2	77,2
G4r			74,0	
G5nr, G5r	76,0	75,3	75,3	75,3
G6nr, G6r	61,7	61,7	61,7 61,6	61,7
A1nr			95,0	
A1r	63,4	63,4	63,4	63,4
A2nr			69,9	
A2r	72,0	72,0	71,9	78,6
A3nr			79,5	
A3r	83,9	84,0	83,9	82,3
A4nr			78,6	
A4r	87,8	88,0	87,9	87,3
A5nr			76,9	
A5r	76,4	76,3	76,3	77,9
A6nr			69,8	
A6r	75,4	73,4	73,4	73,4

* См. примечание к табл. 5.

ангидрогалактозы. Эффекты сульфатирования для сигналов атомов углерода, несущих сульфатную группу, достигают $+10$ м. д. (ср. [27]) и служат доказательством положения этих групп в молекулах олигосахаридов.

Ацетаты агаробииита и каррабииита, различающиеся абсолютной конфигурацией остатка 3,6-ангидродульцита, хорошо разделяются с помощью ГЖХ (рис. 2). Это позволяет использовать частичный восстановительный гидролиз с последующей хроматографической идентификацией образующегося дисахарида для отнесения изучаемого полисахарида к группе агара или каррагинана, для чего достаточно микроколичеств исходного вещества. Более того, это отнесение можно проводить без выделения полисахарида, путем частичного восстановительного гидролиза биомассы водоросли. Действительно, на примере двух водорослей с известным полисахаридным составом (*L. nipponica* и *T. crinitus*) было показано, что в продуктах частичного восстановительного гидролиза и ацетилирования первой из них обнаруживается только ацетат агаробииита, а в продуктах второй водоросли — ацетат каррабииита, как и следовало ожидать.

Предложенный метод количественного определения 3,6-ангидрогалактозы с помощью восстановительного гидролиза и ГЖХ обладает рядом преимуществ перед имеющимися спектрофотометрическими способами. Не уступая им по точности, он позволяет отдельно определять остатки 3,6-ангидрогалактозы и ее 2-О-метилового эфира, одновременно проводить анализ прочих сахаров, присутствующих в гидролизате (в частности, галактозы, ее метиловых эфиров и ксилозы, обычно входящих в состав галактанов красных водорослей), а также анализировать не только водорастворимые полисахариды, но и непосредственно исходное сырье, препараты клеточных стенок, труднорастворимые соли и т. д.

Частичный восстановительный гидролиз представляет интерес как новый метод получения олигосахаридных фрагментов из молекул галактанов. Эти фрагменты несут на восстанавливаемом конце остатки 3,6-ангидродульцита, поэтому устойчивы и весьма удобны для хроматографического разделения. Сохранение сульфатных групп в условиях частичного гидролиза делает эти олигосахариды ценными веществами, несущими информацию о строении и степени регулярности исходных полимеров. В частности, идентификация методом ГЖХ агаробииита или каррабииита в продуктах частичного гидролиза биомассы исследуемой водоросли позволяет на микроуровне относить содержащийся в ней галактан (до его выделения) к группе агара или каррагинана соответственно. Тем самым новая методика количественного определения и установления абсолютной конфигурации остатка 3,6-ангидрогалактозы имеет большое значение для скрининга, поскольку позволяет установить тип и количество содержащегося в водоросли полисахарида, используя небольшие навески биомассы (1—10 мг), доступные из гербарных образцов. Другие возможности применения частичного восстановительного гидролиза для структурного анализа сульфатированных галактанов красных водорослей будут рассмотрены в наших последующих работах.

Экспериментальная часть

Хроматографию на бумаге выполняли нисходящим методом с использованием бумаги Filtrak FN-11 и системы растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3, зоны веществ обнаруживали AgNO_3 — NaOH после предварительного периодатного окисления на бумаге [30]. ГЖХ выполняли на хроматографе Hewlett — Packard 5890A с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой Ultra-I и интегратором 3393A; условия А — градиент температуры от 175 до 290° С, 10° С/мин; условия Б — 290° С. ВЭЖХ проводили с применением насоса «Жильсон 303» (Франция), для гель-хроматографии использовали перистальтический насос той же фирмы, детектирование осуществляли дифференциальным рефрактометром Knauer (ФРГ). Гель-хроматографию выполняли на колонке (2,6 × 87 см) с Toyopearl TSK HW-40S (Япония), $V_0 =$

= 135 мл, элюент — вода, 0,75 мл/мин при 20 или 40° С (повышенная температура использовалась для частичных гидролизатов агара). Аналитическую ионообменную хроматографию проводили на колонке (0,4 × 25 см) с ДЭА-силасорбом, 7 мкм («Диагностикум», СССР), элюент — 0,075 М NaCl, 0,75 мл/мин. Выделение сульфатированных олигосахаридов осуществляли на полупрепаративной колонке (1 × 25 см) с тем же сорбентом («Диагностикум», СССР), элюент — 0,075 М NaCl, 4 мл/мин. Фракции обессоливали на колонке (2,6 × 30 см) с сефадексом G-10 при промывании водой. Обратенно-фазовую хроматографию выполняли на колонке (1 × 25 см) с силасорбом C-18, 7 мкм («Диагностикум», СССР), элюент — вода, 3 мл/мин.

Спектры ¹H-ЯМР получали на спектрометре Bruker WM-250 для растворов олигосахаридов в D₂O при 30° С с использованием техники COSY RST. Спектры ¹³C-ЯМР получали на спектрометре Bruker AM-300 с рабочей частотой по углероду 75 МГц для тех же растворов веществ, внутренний стандарт — метанол, 50,15 м. д. Для отнесения сигналов C-1 остатка 3,6-ангидродульцита и C-6 остатков прочих сахаров использовали технику АРТ [31]. Для отнесения сигналов в спектрах ¹³C-ЯМР агаробииита (I) и каррабииита (VI) применяли также технику селективного гетероядерного двойного резонанса.

Масс-спектры в режиме SIMS получали на масс-спектрометре M-80A (Hitachi, Япония), в качестве матрицы использовали глицерин с добавкой водного раствора NaCl, бомбардировку проводили пучком ионов Хе⁺ с энергией 8 кэВ.

Оптическую активность измеряли на поляриметре Jasco Dip-360 (Япония).

Использовали метил-β-D-ксилопиранозид и метил-α-D-галактопиранозид (Reanal, Венгрия), синтетический метил-3,6-ангидро-α-D-галактопиранозид [32], бакто-агар (Difco Labs., США), кашпа- и иота-каррагинаны (Sigma, США), 4-метилморфолинборан (Aldrich, США). Выделение и характеристика полисахаридов из *R. larix* [6], *Odonthalia corymbifera* [18], *L. nipponica* [19] и *T. crinitus* [20] описаны нами ранее.

Полный восстановительный гидролиз. К точной навеске полисахарида (2—5 мг) или биомассы водоросли (10—15 мг) прибавляли 4-метилморфолинборан (35—40 мг) и 1 мл 2 М CF₃COOH, содержащей инозит (0,9 мг в 1 мл). Смесь нагревали в закрытой колбе 8 ч при 100° С, затем охлаждали, кислоту отгоняли в вакууме, трижды прибавляли и упаривая по 10 мл этанола, к остатку приливали 1 мл 6% раствора хлоргидрата гидроксил-аминна в пиридине, нагревали 30 мин при 100° С, охлаждали, прибавляли 1 мл As₂O и нагревали 1 ч при 100° С. Далее к смеси трижды прибавляли и упаривали в вакууме по 10 мл толуола, остаток распределяли между 5 мл хлороформа и 5 мл воды, хлороформный слой отделяли, концентрировали и использовали для ГЖХ.

Точные количества метил-β-D-ксилопиранозидна, метил-3,6-ангидро-α-D-галактопиранозидна и метил-α-D-галактопиранозидна, по отдельности или в смеси в различных соотношениях, обрабатывали в тех же условиях, получали ацетаты D-ксилононитрила, 3,6-ангидро-D-дульцита и D-галактононитрила, коэффициенты молярного отклика по отношению к ацетату инозита при ГЖХ в условиях А 0,385 ± 0,025, 0,63 ± 0,025 и 0,515 ± ± 0,015 соответственно. Эти величины использовали при расчете содержания моносахаридов в полимерных образцах; для 2-О-метил-3,6-ангидрогалактозы коэффициент молярного отклика принимали равным 0,63, а для монометиловых эфиров галактозы — 0,515. Средние результаты, полученные не менее чем в трех параллельных опытах, приведены в табл. 1.

Частичный восстановительный гидролиз бакто-агара Дифко. 200 мг бакто-агара Дифко растворяли в 15 мл воды при нагревании до 100° С, раствор охлаждали до 50—60° С, прибавляли 1,35 г 4-метилморфолинборана и 5 мл 2 М CF₃COOH и помещали в термостат при 55° С на 20 ч или же при 65° С на 1 или 8 ч. (Колбу не следует плотно закрывать во избежание разрыва выделяющимися газообразными продуктами реакции.) Далее

кислоту отгоняли с водой и раствор остатка в воде хроматографировали на колонке с TSK HW-40S, собирая фракцию 135—180 мл, содержащую высокомолекулярные продукты гидролиза, а также фракции 181—192, 193—208, 209—230, 231—255 и 256—280 мл, содержащие олигосахариды (I)—(V), как указано на кривых элюции (рис. 1). Вещества (I)—(IV) дополнительно очищали хроматографией на силасорбе С-18. Характеристика выделенных веществ приведена в табл. 2, а спектры ЯМР — в табл. 4 и 5.

Частичный восстановительный гидролиз каррагинанов. а) *каппа-Каррагинан из E. cottonii.* 200 мг каппа-каррагинана обрабатывали в условиях частичного гидролиза, как описано для агара, 24 ч при 55° С или 8 ч при 65° С. В процессе гель-хроматографии собирали фракции 240—254 и 255—266 мл, содержащие преимущественно дисульфат карратетрата (VIII) и сульфат каррабиита (VII) соответственно в виде 4-метилморфолиниевых солей. Каждую из этих фракций рехроматографировали на ионообменной колонке и полученные фракции с временами удерживания 6 и 12 мин обессоливали на сефадексе G-10. Выходы продуктов (VII) и (VIII) приведены в табл. 3, а спектры ¹³C-ЯМР — в табл. 6.

б) *каппа-Полисахарид из T. crinitus.* 200 мг каппа-полисахарида из *T. crinitus* обрабатывали в условиях частичного гидролиза, как описано выше, 8 ч при 65° С. В процессе гель-хроматографии гидролизата собирали фракции 230—258 и 259—276 мл, содержащие преимущественно сульфат каррабиита (VII) и каррабиит (VI) соответственно. После рехроматографии первой из этих фракций на ионообменной колонке получали индивидуальный 4'-сульфат каррабиита (VII). Вторую фракцию рехроматографировали на колонке с силасорбом С-18, получали каррабиит (VI) (табл. 3). Спектры ЯМР этих соединений см. в табл. 4 и 6.

в) *иота-Каррагинан из E. spinosum.* 200 мг иота-каррагинана обрабатывали как в предыдущем опыте и после гель-хроматографии гидролизата собирали фракцию 245—275 мл. Вещества, содержащиеся в этой фракции, разделяли на ионообменной колонке, получали 4'-сульфат каррабиита (VII) (время удерживания 6 мин) и 2,4'-дисульфат каррабиита (IX) (время удерживания 18 мин) (табл. 3), также охарактеризованные спектрами ЯМР (табл. 4 и 6).

Частичный восстановительный гидролиз биомассы водорослей. К навеске (20 мг) биомассы *L. nipponica* или *T. crinitus*, предварительно измельченной, обработанной метанолом в аппарате Сокслета до получения бесцветного экстракта и высушенной, прибавляли 3 мл воды, нагревали 6 ч при 100° С, охлаждали, прибавляли 50 мг 4-метилморфолинборана, приливали 1 мл 2 М CF₃COOH и выдерживали 8 ч при 65° С. Далее к гидролизатам прибавляли по 10 мл этанола, фильтровали, упаривали, остатки кислоты отгоняли с этанолом, после чего приливали по 1 мл As₂O₃, 0,5 мл безводной CF₃COOH и нагревали 30 мин при 100° С. Реакционную смесь трижды упаривали с толуолом, остаток распределяли между водой и хлороформом, хлороформный слой отделяли, концентрировали и использовали для ГЖХ в условиях Б. При этом в гидролизате *L. nipponica* обнаружили ацетат агаробиита (время удерживания 7,8 мин), а в гидролизате *T. crinitus* — ацетат каррабиита (время удерживания 8,1 мин), идентифицированные сравнением с заведомыми образцами (рис. 2).

Авторы выражают глубокую признательность В. Л. Садовской за получение масс-спектров олигосахаридов и А. С. Шашкову за получение спектров ЯМР и помощь в их интерпретации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Painter T. J. // The Polysaccharides. V. 2 / Ed. Aspinall G. O. N. Y.: Acad. Press, 1983. P. 195—285.
2. Yaphe W., Arsenault G. P. // Anal. Biochem. 1965. V. 13. № 1. P. 143—148.
3. Anderson W., Bowtle W. // Analyst. 1974. V. 99. № 1176. P. 178—183.
4. Matsuhira B., Zanolungo A. B. // Carbohydr. Res. 1983. V. 118. P. 276—279.
5. Usov A. I. // Bot. Mar. 1984. V. 27. № 5. P. 189—202.
6. Usov A. I., Лотков П. А., Кочетков Н. К. // Журн. общ. химии. 1971. Т. 41. № 5. С. 1154—1160.

7. Anderson N. S., Rees D. A. // Proc. Int. Seaweed Symp. 1966. V. 5. P. 243—249.
8. Miller I. J., Wong H., Newman R. H. // Austr. J. Chem. 1982. V. 35. № . P. 853—856.
9. Stortz C. A., Cerezo A. S. // Carbohydr. Res. 1987. V. 166. № 2. P. 317—323.
10. Clingman A. L., Nunn J. R., Stephen A. M. // J. Chem. Soc. 1957. № 1. P. 197—203.
11. Whyte J. N. C., Hosford S. P. C., Englar J. R. // Carbohydr. Res. 1985. V. 140. № 2. P. 336—341.
12. Hirase S., Araki C. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1954. V. 27. № 1. P. 105—109.
13. Penman A., Rees D. A. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1973. № 19. P. 2191—2196.
14. Garegg P. J., Lindberg B., Konradsson P., Kvarnström I. // Carbohydr. Res. 1988. V. 176. № 1. P. 145—148.
15. Usov A. I., Elashvili M. Ya. // Proc. Vth Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Active Nat. Prod. Sofia: Bulgarian Acad. Sci. 1989. V. 2. P. 346—350.
16. Sloneker J. H. // Methods Carbohydr. Chem. 1972. V. 6. P. 20—24.
17. Morrison I. M. // J. Chromatogr. 1975. V. 108. № 2. P. 361—364.
18. Усов А. И., Козлова Е. Г. // Биооргани. химия. 1975. Т. 1. № 7. С. 912—918.
19. Усов А. И., Иванова Е. Г., Элашвили М. Я. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1259—1267.
20. Усов А. И., Рехтер М. А., Кочетков Н. К. // Журн. общ. химии. 1970. Т. 40. № 12. С. 2732—2737.
21. Rochas C., Lahaye M., Yaphe W., Phan Viet M. T. // Carbohydr. Res. 1986. V. 148. № 2. P. 199—207.
22. Яроцкий С. В., Шашков А. С., Усов А. И. // Биооргани. химия. 1978. Т. 4. № 6. С. 745—751.
23. Rochas C., Rinaudo M., Vincendon M. // Int. J. Biol. Macromol. 1983. V. 5. № 2. P. 111—115.
24. Greer C. W., Rochas C., Yaphe W. // Bot. Mar. 1985. V. 28. № 1. P. 9—14.
25. Lahaye M., Yaphe W., Phan Viet M. T., Rochas C. // Carbohydr. Res. 1989. V. 190. № 2. P. 249—265.
26. Welti D. // J. Chem. Res. 1977. № 12. P. 312—313(S), 3566—3587(M).
27. Contreras R. R., Kamerling J. P., Breg J., Vliegenthart J. F. G. // Carbohydr. Res. 1988. V. 179. P. 411—418.
28. Шашков А. С., Усов А. И., Книрель Ю. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. // Биооргани. химия. 1981. Т. 7. № 9. С. 1364—1371.
29. Shashkov A. S., Lipkind G. M., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K. // Magn. Reson. Chem. 1988. V. 26. № 9. P. 735—747.
30. Усов А. И., Рехтер М. А. // Журн. общ. химии. 1969. Т. 39. № 4. С. 912—913.
31. Patt S. L., Shooley J. N. // J. Magn. Reson. 1982. V. 46. № 3. P. 535—539.
32. Lewis B. A., Smith F., Stephen A. M. // Methods Carbohydr. Chem. 1963. V. 2. P. 172—178.

Поступила в редакцию
7.IX.1990

A. I. USOV, M. Ya. ELASHVILI

QUANTITATIVE DETERMINATION OF 3,6-ANHYDROGALACTOSE DERIVATIVES AND SPECIFIC FRAGMENTATION OF THE RED ALGAL GALACTANS UNDER REDUCTIVE HYDROLYSIS CONDITIONS

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

The complete acid hydrolysis of the red algal galactans in the presence of 4-methylmorpholine — borane is shown to proceed with quantitative reduction of 3,6-anhydrogalactose derivatives to the corresponding 3,6-anhydrogalactitols, whereas all the other monosaccharides are liberated essentially in the non-reduced form. The reaction allows one to determine separately 3,6-anhydrogalactose and its 2-O-methyl derivative together with other monosaccharides in one sample of hydrolyzate by g.l.c. The method gives the possibility to analyse the 3,6-anhydrogalactose content in algal biomass before the isolation of polysaccharides. Partial acid hydrolysis in the presence of the same reducing agent gives rise to a series of oligosaccharides having a 3,6-anhydrogalactitol residue at the «reducing» end; sulfate groups are substantially retained. These oligosaccharides are stable and convenient for chromatographic separation; their structures may be elucidated by ¹³C NMR spectroscopy. Partial reductive hydrolysis of polysaccharides or algal biomass can be used as micro-scale method for assignment of agar or carrageenan structures to unknown galactans, since the resulting agarobitol or carrabitol are unambiguously identified as acetates by g.l.c.