



УДК 547.458.7.02 + 582.273 + 543.422.25

## ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРОСЛЕЙ

XXVIII. ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРОЕНИЯ ГАЛАКТАНА ИЗ *GRATELOUPIA DIVARICATA* ОКАМУсов А. И., Барбакидзе В. В., Яроцкий С. В.,  
Шапков А. С.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва

Получены и интерпретированы спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР пяти олигосахаридов — продуктов ацетоллиза сульфатированного галактана из красной водоросли *Grateloupia divaricata*. Установлено, что положение сигнала C1 остатков галактозы в этих олигосахаридах зависит не только от типа связи с соседним звеном ( $\alpha$ -1  $\rightarrow$  3- или  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-), но и от абсолютной конфигурации как рассматриваемого, так и соседнего с ним остатка. Полученные данные использованы для анализа спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР исходного галактана и его десульфатированного производного. На примере этих полисахаридов показано, что галактаны красных водорослей, занимающие промежуточное положение между агарам и каррагинанами, дают в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР характерный набор сигналов в области резонанса C1. Это свойство позволяет распознать указанный тип структуры на ранних этапах исследования новых полисахаридов.

В предыдущих работах мы показали, что спектроскопия  $^{13}\text{C}$ -ЯМР дает чрезвычайно ценные сведения о строении сульфатированных галактанов красных водорослей. Так, положение в спектре сигнала C1 остатка 3,6-ангидрогалактозы позволяет определить абсолютную конфигурацию этого моносахарида, а следовательно, отнести изучаемый объект к группе агара или каррагинана [1]. Более подробный анализ спектров дает возможность установить положения сульфатных и O-метильных групп в полисахаридах, родственных агарозе [2] или  $\kappa$ -каррагинану [3].

Однако многие галактаны красных водорослей содержат незначительное количество 3,6-ангидрогалактозы. Такие полисахариды встречаются и в группе агара (некоторые аналоги порфирана [4]), и в группе каррагинана; кроме того, найдены полисахариды промежуточного между агарам и каррагинанами строения, в которых содержание D- и L-галактозы неодинаково. В частности, галактан такого типа был выделен из тихоокеанской красной водоросли *Grateloupia divaricata* [5]. Химическими методами было показано [6, 7], что в основе молекулы этого полисахарида лежит линейная углеводная цепь с регулярным чередованием  $\alpha$ -1  $\rightarrow$  3- и  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-связей между остатками галактозы, причем 3-O-замещенным остатком всегда является производное D-галактозы, а соседнее положение могут занимать остатки галактозы, имеющие как D-, так и L-конфигурацию. В молекуле полисахарида сочетаются, следовательно, элементы структуры, характерные для представителей группы агара и группы каррагинана. Поэтому интерпретация спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР этого галактана пред-

ставляет интерес не только для подтверждения его строения, но и для получения сведений, необходимых при спектроскопическом изучении других сложных полисахаридов красных водорослей.

Для анализа спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахаридов необходимо, как правило, предварительное исследование спектров модельных соединений. Такими модельными соединениями послужили в данном случае олигосахариды (I)–(V), полученные в результате ацетоллиза сульфатированного галактана; строение этих олигосахаридов было полностью установлено независимыми методами [7].

Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР олигосахаридов (I)–(V) приведены в табл. 1. Для отнесения сигналов было проведено сравнение всех спектров между собой с учетом закономерностей, установленных для влияния гликозилирования различных гидроксильных групп углеводов на положения сигналов ближайших углеродных атомов (ср. [8]), а также использованы данные спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР метиловых эфиров метил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-галактопиранозидов [9, 10].

Таблица 1

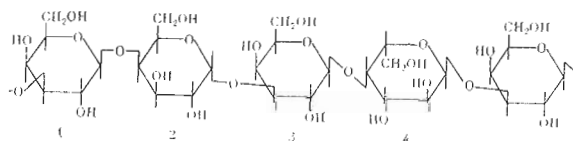
Отнесение сигналов ( $\delta$ , м.д.) в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР олигосахаридов (I)–(V)

Олигосахарид	Звено	C1	C2	C3	C4	C5	C6
(I)	A	96,6	69,5	70,5	70,5	71,6	62,2
	B $_{\alpha}$	93,6	68,1	76,5	66,2	71,6	62,2
	B $_{\beta}$	97,6	72,7	78,7	66,2	72,1	62,2
(II)	B	104,5	72,5	73,8	69,9	76,4	62,3
	G $_{\alpha}$	93,7	70,4	69,9	79,8	69,9	61,7
	G $_{\beta}$	97,9	73,8	73,5	78,5	76,6	61,5
(III)	B	104,5	72,3	73,8	69,9	76,6	62,3
	D	101,9	70,3	69,9	79,6	70,5	61,8
	E $_{\alpha}$	93,6	68,8	79,0	69,9	71,7	62,3
	E $_{\beta}$	97,6	73,0	82,3	69,9	76,2	62,3
(IV)	Ж	105,8	72,9	74,2	69,9	76,5	62,3
	З	96,9	69,9	71,1	79,6	69,9	61,7
	B $_{\alpha}$	93,6	69,9	76,1	66,9	71,5	62,3
	B $_{\beta}$	97,7	72,9	79,0	66,4	72,9	62,3
(V)	A	96,8	69,6	70,5	70,5	71,4	62,3
	И	105,7	72,3	78,9	66,3	76,2	62,3
	З	96,8	71,2	70,1	79,9	70,1	62,3
	B $_{\beta}$ *	97,6	72,9	78,9	66,3	72,3	62,3

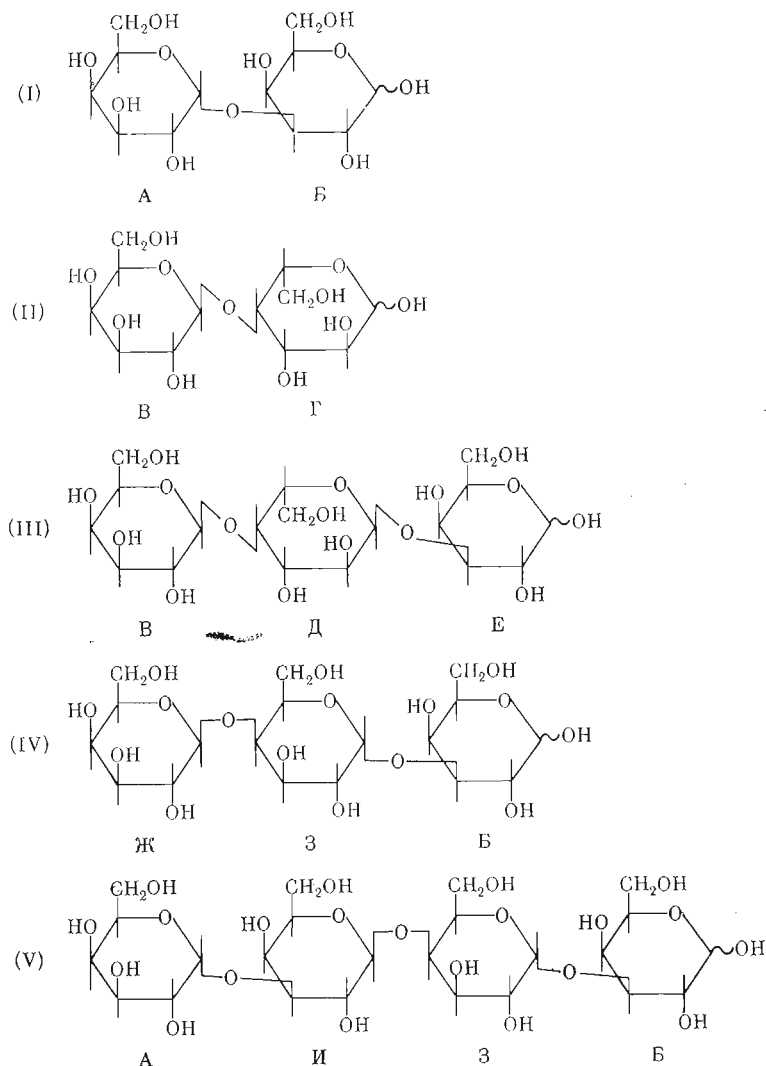
\* Интенсивность серии сигналов B $_{\alpha}$  очень мала.

Таблица 2

Отнесение сигналов ( $\delta$ , м.д.) в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР десульфатированного галактана из *Grateloupia divaricata*



Остаток галактозы	C1	C2	C3	C4	C5	C6
1	104,8	70,5	79,0	65,6	75,4	61,5
2	96,1	69,8	69,3	78,4	69,3	61,2
3	103,7	71,8	79,0	65,6	75,4	61,5
4	100,9	70,5	69,8	78,4	70,5	61,2



Как видно из табл. 1, для каждого типа моносахаридных звеньев существуют характерные сигналы в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, расположенные чаще всего в наиболее информативной и просто интерпретируемой области сигналов C1. Следует подчеркнуть, что значение химического сдвига сигнала C1 зависит не только от конфигурации гликозидного центра данного моносахаридного остатка и положения его связи с соседним звеном, но и от абсолютной конфигурации как рассматриваемого, так и связанного с ним остатков (ср., например, химические сдвиги сигналов C1 звеньев В и Ж, Д и З). Таким образом, если ранее мы показали, что по спектрам  $^{13}\text{C}$ -ЯМР можно определить абсолютную конфигурацию остатков 3,6-ангидрогалактозы в полисахариде [1], то полученные в данной работе результаты позволяют считать чувствительность метода к различиям в абсолютной конфигурации моносахаридных остатков в олиго- и полисахаридных цепях достаточно общим явлением.

Полная интерпретация спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР олигосахаридов (I)–(V), полученных при расщеплении родоначального галактана, позволила проанализировать спектр десульфатированного производного галактана (рис. 1). Удаление сульфатных групп проводили обработкой исходного полисахарида раствором HCl в метаноле [6]; при этом наряду с десульфатированием произошло практически полное удаление остатков ксилы и

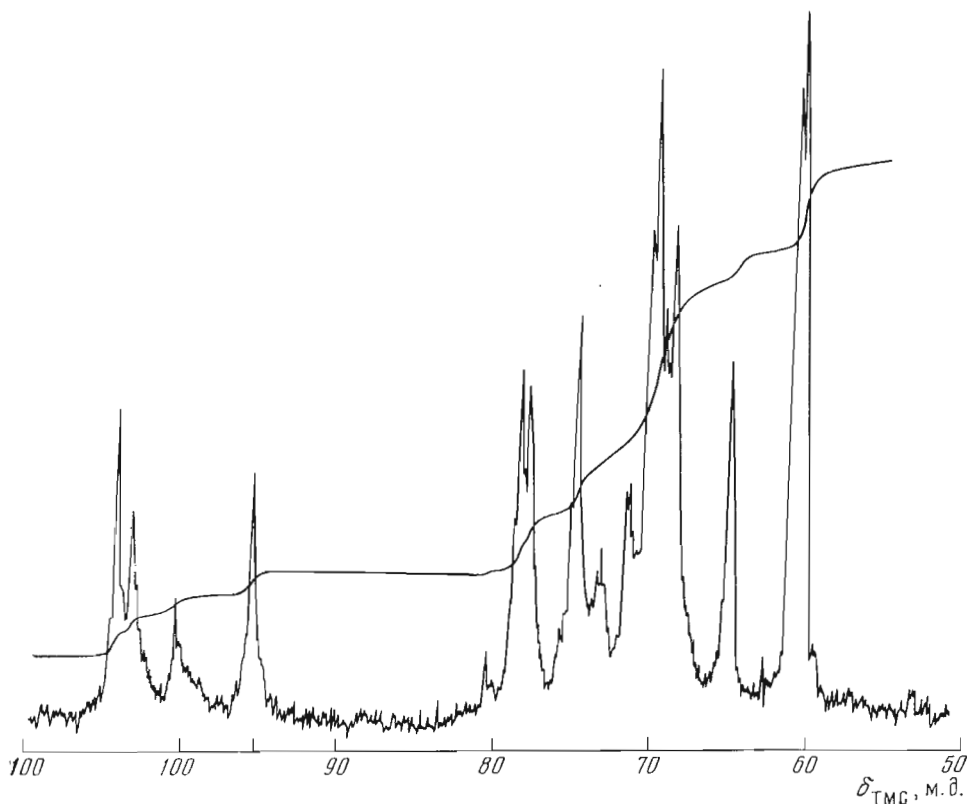
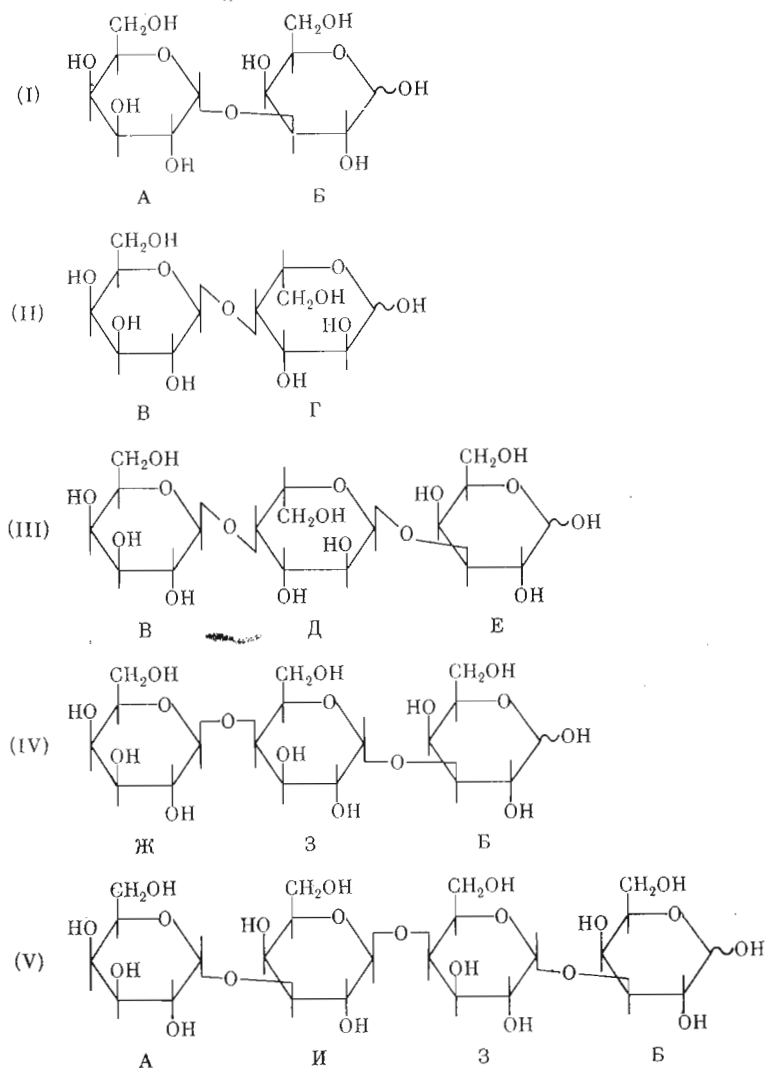


Рис. 1. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР десульфатированного галактана

значительное снижение содержания остатков 3,6-ангидрогалактозы, присутствовавших в исходном полисахариде.

В области сигналов С1 спектра десульфатированного галактана было обнаружено 4 сигнала с  $\delta$  104,8; 103,7; 100,9 и 96,1 м.д. в соотношении 7 : 4 : 4 : 7. Сравнивая их положение с положением соответствующих сигналов из спектров модельных соединений, можно заключить, что они принадлежат соответственно звеньям 1, 3, 4 и 2 молекулы полисахарида (табл. 2). По значениям интегральных интенсивностей этих сигналов (рис. 1) можно судить об относительном количестве звеньев каждого типа в составе десульфатированного галактана. Остальные сигналы в спектре также удается интерпретировать (табл. 2). Интересно, что положение сигналов С-атомов звеньев 3 и 4 совпадает с положением сигналов аналогичных по строению участков молекулы полисахарида из *Bangia fuscopurpurea* [4], за исключением резонансных линий С5 и С6 остатков  $\alpha$ -L-галактопиранозы, которые в последнем полисахариде сульфатированы по С6.

Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР сульфатированного полисахарида из *Grateloupia divaricata* существенно сложнее спектра его десульфатированного производного. Это объясняется присутствием в молекуле полисахарида сульфатных групп, занимающих различные положения, а также остатков 3,6-ангидрогалактозы и ксилозы. Сравнение области сигналов С1 в спектрах десульфатированного (рис. 1) и исходного сульфатированного (рис. 2) полисахаридов показывает, что в последнем случае наряду с четырьмя сигналами остатков типа 1—4, рассмотренных выше (см. табл. 2), имеется два дополнительных сигнала с  $\delta$  102,4 и 98,5 м.д., интегральные интенсивности которых близки между собой. Привлечение данных спек-



Как видно из табл. 1, для каждого типа моносахаридных звеньев существуют характерные сигналы в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, расположенные чаще всего в наиболее информативной и просто интерпретируемой области сигналов C1. Следует подчеркнуть, что значение химического сдвига сигнала C1 зависит не только от конфигурации гликозидного центра данного моносахаридного остатка и положения его связи с соседним звеном, но и от абсолютной конфигурации как рассматриваемого, так и связанного с ним остатков (ср., например, химические сдвиги сигналов C1 звеньев В и Ж, Д и З). Таким образом, если ранее мы показали, что по спектрам  $^{13}\text{C}$ -ЯМР можно определить абсолютную конфигурацию остатков 3,6-ангидрогалактозы в полисахариде [1], то полученные в данной работе результаты позволяют считать чувствительность метода к различиям в абсолютной конфигурации моносахаридных остатков в олиго- и полисахаридных цепях достаточно общим явлением.

Полная интерпретация спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР олигосахаридов (I)—(V), полученных при расщеплении родоначального галактана, позволила проанализировать спектр десульфатированного производного галактана (рис. 1). Удаление сульфатных групп проводили обработкой исходного полисахарида раствором HCl в метаноле [6]; при этом наряду с десульфатированием произошло практически полное удаление остатков ксилозы и

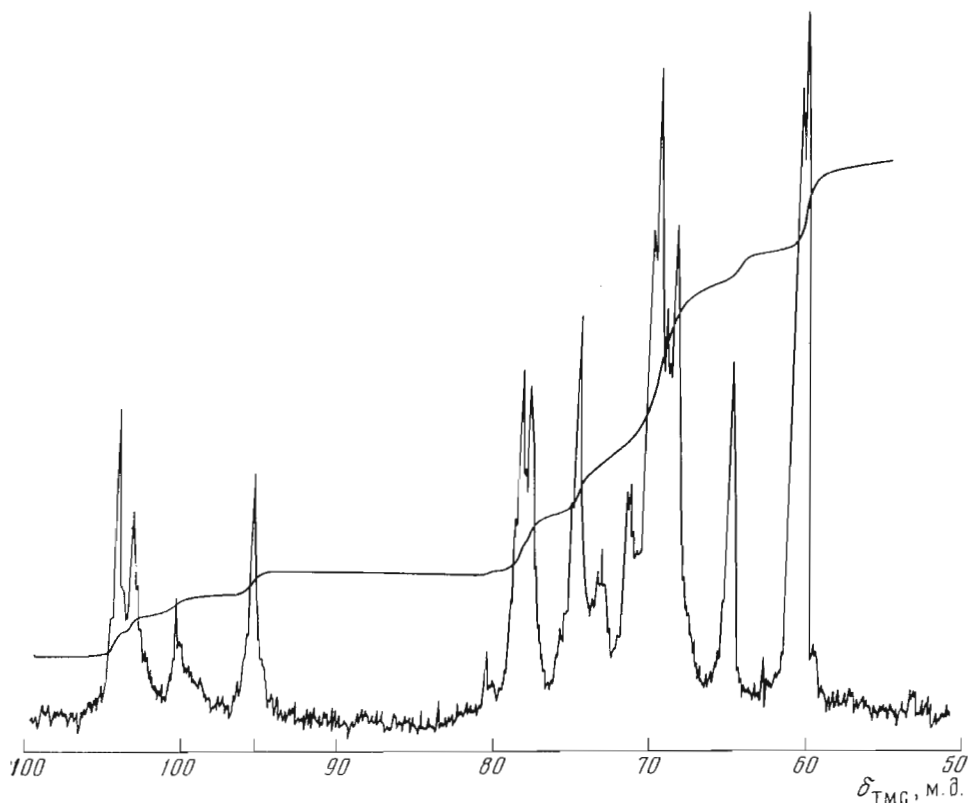


Рис. 1. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР десульфатированного галактана

значительное снижение содержания остатков 3,6-ангидрогалактозы, присутствовавших в исходном полисахариде.

В области сигналов С1 спектра десульфатированного галактана было обнаружено 4 сигнала с  $\delta$  104,8; 103,7; 100,9 и 96,1 м.д. в соотношении 7 : 4 : 4 : 7. Сравнивая их положение с положением соответствующих сигналов из спектров модельных соединений, можно заключить, что они принадлежат соответственно звеньям 1, 3, 4 и 2 молекулы полисахарида (табл. 2). По значениям интегральных интенсивностей этих сигналов (рис. 1) можно судить об относительном количестве звеньев каждого типа в составе десульфатированного галактана. Остальные сигналы в спектре также удается интерпретировать (табл. 2). Интересно, что положение сигналов С-атомов звеньев 3 и 4 совпадает с положением сигналов аналогичных по строению участков молекулы полисахарида из *Bangia fuscopurpurea* [4], за исключением резонансных линий С5 и С6 остатков  $\alpha$ -L-галактопиранозы, которые в последнем полисахариде сульфатированы по С6.

Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР сульфатированного полисахарида из *Grateloupia divaricata* существенно сложнее спектра его десульфатированного производного. Это объясняется присутствием в молекуле полисахарида сульфатных групп, занимающих различные положения, а также остатков 3,6-ангидрогалактозы и ксилозы. Сравнение области сигналов С1 в спектрах десульфатированного (рис. 1) и исходного сульфатированного (рис. 2) полисахаридов показывает, что в последнем случае наряду с четырьмя сигналами остатков типа 1—4, рассмотренных выше (см. табл. 2), имеется два дополнительных сигнала с  $\delta$  102,4 и 98,5 м.д., интегральные интенсивности которых близки между собой. Привлечение данных спек-

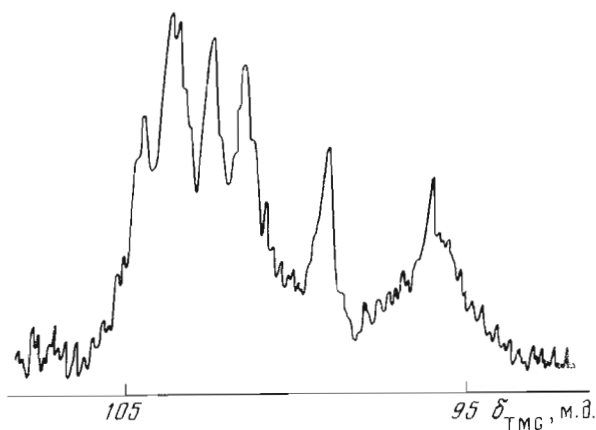


Рис. 2. Область сигналов C1 в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР галактана из *Grateloupia divaricata*

тров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР галактанов типа агара и каррагинана [2, 3] позволяет отнести эти сигналы к C1 3-О-замещенного остатка  $\beta$ -D-галактопиранозы, связанного с остатком 3,6-ангидрогалактозы, и к C1 4-О-замещенного остатка 3,6-ангидро- $\alpha$ -L-галактопиранозы соответственно. Сигналы C1 остатков ксилозы, присутствующих в молекуле галактана в небольшом количестве в виде единичных ответвлений [6], видимо, совпадают с сигналами C1 одного из остатков галактозы. К сожалению, область сигналов C2—C6 моносахаридных остатков очень сложна для расшифровки и не дает однозначных сведений о положениях сульфатных групп.

Проведенная работа показывает, что не только для агарозы,  $\kappa$ -каррагинана или их аналогов, сохраняющих «замаскированную регулярную структуру», но и в случае полисахаридов красных водорослей с менее регулярным строением, одновременно содержащих участки молекул, характерные для агаров и каррагинанов различных типов, анализ спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР дает возможность распознать этот тип структуры и выбрать наиболее рациональные пути дальнейшего химического исследования.

### Экспериментальная часть

Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР олигосахаридов (I)—(V) получены на спектрометре Bruker-Physik WP-60 при 15,08 МГц с полным подавлением по протонам (растворы в  $\text{D}_2\text{O}$ , температура съемки 30°). Химические сдвиги измерены относительно метанола как внутреннего стандарта и пересчитаны относительно тетраметилсилана по соотношению  $\delta_{\text{TMC}} = \delta_{\text{MeOH}} + 50,12$  м.д.

Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахаридов получены на спектрометре Bruker-Physik WH-27) при 67,86 МГц с полным подавлением по протонам (растворы около 2% в  $\text{D}_2\text{O}$ , температура съемки 80°). Химические сдвиги измерены относительно диметилсульфоксида как внутреннего стандарта и пересчитаны относительно тетраметилсилана по соотношению  $\delta_{\text{TMC}} = \delta_{\text{DMSO}} + 39,41$  м.д.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Яроцкий С. В., Шашков А. С., Усов А. И. (1977) Биоорган. химия, 3, 1135—1137
2. Шашков А. С., Усов А. И., Яроцкий С. В. (1978) Биоорган. химия, 4, 74—81.
3. Яроцкий С. В., Шашков А. С., Усов А. И. (1978) Биоорган. химия, 4, 745—751.
4. Усов А. И., Яроцкий С. В., Эстевес М. Л. (1978) Биоорган. химия, 4, 66—73.
5. Усов А. И., Мирошникова Л. И., Барбакадзе В. В. (1975) Ж. общ. химии, 45, 1618—1624.
6. Барбакадзе В. В., Усов А. И. (1978) Биоорган. химия, 4, 1100—1106.

7. Усов А. И., Барбакадзе В. В. (1978) Биоорган. химия, 4, 1107—1115.
8. Шашков А. С., Чижов О. С. (1976) Биоорган. химия, 2, 437—497.
9. Шашков А. С., Усов А. И., Яроцкий С. В., Рабовский А. Б. (1978) Биоорган. химия, 4, 1489—1494.
10. Усов А. И., Яроцкий С. В. (1977) Биоорган химия, 3, 746—751.

Поступила в редакцию  
13.IV.1978

POLYSACCHARIDES OF ALGAE. XXVIII. APPLICATION OF  $^{13}\text{C}$ -NMR SPECTROSCOPY FOR STRUCTURAL STUDIES OF GALACTAN FROM RED SEAWEED *GRATELOUPIA DIVARICATA* OKAM.

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

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

The  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of five oligosaccharides prepared by acetolysis of sulfated galactan from red seaweed *Grateloupia divaricata* were obtained and interpreted. It was shown that the position of the C1-signal of galactose residue depends not only upon the type of linkage with adjacent residue ( $\alpha$ -1  $\rightarrow$  3- or  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-), but also on the absolute configuration of both residues. The data obtained were used for analysis of  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of parent galactan and its desulfated derivate. A characteristic set of signals in C1 resonance region was found for galactans from red seaweed having an intermediate structure between agars and carrageenans. This allows to recognize the given type of a polysaccharide structure on early stages of analysis of new polysaccharides.

---