



УДК 547.458.7.02 + 582.273

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ

XXVI. МЕТИЛИРОВАНИЕ И ПЕРИОДАТНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДА ИЗ КРАСНОЙ ВОДОРΟΣЛИ *GRATELOUPIA DIVARICATA* ОКАМ.

Барбакадзе В. В., Усев А. И.

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

Сульфатированный галактан из *Grateloupia divaricata* и два его десульфатированных производных, полученных в результате кислотного метанолиза и сольволитического десульфатирования, изучены с помощью метилирования и периодатного окисления. Показано, что углеводная цепь полисахарида содержит линейные участки с чередующимися 1 → 3- и β-1 → 4-связями между остатками галактозы, причем 3-О-замещенные остатки имеют *D*-конфигурацию. Получены данные о наличии разветвлений в молекуле полисахарида.

В одном из предыдущих сообщений [1] мы проанализировали полисахаридный состав двух красных водорослей, *Grateloupia divaricata* и *Grateloupia turuturu*, обитающих в Японском море. Полученные результаты указывали, что сульфатированные галактаны, содержащиеся в этих водорослях, не принадлежат к представителям групп агара или каррагинана [2], а обладают менее регулярным строением. Данная статья посвящена дальнейшему изучению сульфатированного галактана, выделенного из *G. divaricata*.

Ранее было установлено [1], что этот полисахарид содержит 21% SO_3Na и 66,2% сахаров, причем главным моносахаридом является галактоза, представленная смесью *D*- и *L*-форм в соотношении около 4 : 1. Кроме того, в составе полисахарида были обнаружены 7,1% 3,6-ангидро-галактозы и небольшие количества ксилозы, 2-, 3- и 6-О-метилгалактозы. Прежде чем приступить к дальнейшему изучению полисахарида, необходимо было убедиться в его однородности. При гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-200 полисахарид давал единственный пик, непосредственно следующий за пиком голубого декстрана *M* 2000, причем фракции полисахарида, соответствующие восходящему участку, максимуму и нисходящему участку выходной кривой, не различались по составу. При хроматографии на DEAE-целлюлозе удалось отделить от полисахарида небольшие примеси нейтральных компонентов — глюкана и ксилана, однако их общее содержание в препарате не превышало 1%. На основании этих данных сульфатированный галактан [1] из *G. divaricata* был признан достаточно однородным для дальнейшего исследования его строения.

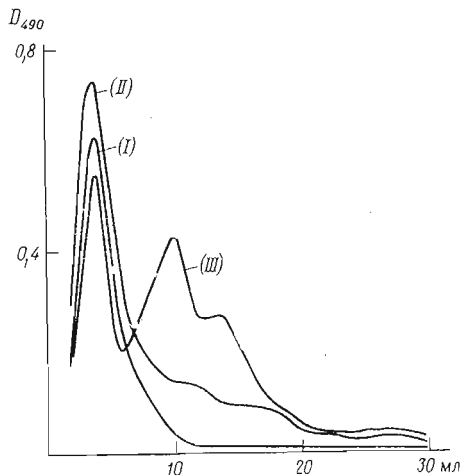
Для установления структуры углеводной цепи полисахарида было необходимо удалить из него сульфатные группы. Для этой цели мы воспользовались двумя методами — кислотным метанолизом [3] и разрабо-

таным в нашей лаборатории более мягким сольволитическим десульфатированием [4]. Было показано, что в условиях метанолиза сульфатные группы отщепляются практически полностью, однако происходит заметная деградация полимера, в результате которой снижаются молекулярный вес и содержание 3,6-ангидросахаров в десульфатированном полисахариде (III) (рисунок, табл. 1). При сольволитическом десульфатировании вещество подвергалось меньшей деградации, десульфатированный полисахарид (II) был получен с более высоким выходом, но содержание сульфатных групп в нем удалось уменьшить только до 3,7%. По данным ИК-спектра образца (II), в котором имеется полоса поглощения при 830 см^{-1} , остаточные сульфатные группы в этом полисахариде связаны с вторичными экваториальными гидроксильными (ср. [5]). Оба десульфатированных полисахарида (II) и (III) были использованы для сравнения с исходным галактаном (I) по результатам метилирования и периодатного окисления.

Метилирование всех трех полисахаридов было осуществлено в стандартных условиях по методу Хакомори [6]. Метилированные производные сахаров, полученные после гидролиза метилированных полисахаридов, восстанавливали в полиолы, ацетилювали и анализировали состав полученных смесей методом ГЖХ [7], а также с помощью хромато-масс-спектрометрии [8]. Полученные данные приведены в табл. 2.

Как и следовало ожидать, наименее сложная по составу смесь метилированных сахаров была получена из метилированного полисахарида (III). Ее главными компонентами являются 2,3,6- и 2,4,6-три-О-метилгалактозы, соотношение между которыми практически не отличается от единицы. Это означает, что остатки галактозы в линейных участках полисахаридной цепи связаны между собой только 1 → 3- или 1 → 4-связями, а одинаковое количество таких связей позволяет сделать предположение об их регулярном чередовании, что хорошо известно для большинства других галактанов красных водорослей [2]. В то же время обращает на себя внимание сравнительно высокое содержание в смеси 2,3,4,6-тетра-О-метилгалактозы и 2,3,4-три-О-метилксилозы. Этот факт свидетельствует о разветвленной структуре молекулы полисахарида и позволяет рассматривать имеющиеся в смеси 2,6- и 2,4-ди-О-метилгалактозы не как результат неполного метилирования, а как возможные точки присоединения к главной углеводной цепи единичных остатков ксилитозы и единичных остатков или цепочек из нескольких остатков галактозы.

При гидролизе метилированного полисахарида (II) был получен более сложный набор метилированных сахаров. Главными компонентами этого набора, как и в предыдущем случае, являются 2,3,6- и 2,4,6- три-О-метилгалактозы, но соотношение между ними составляет только 1 : 2. Однако этот результат не противоречит приведенным выше данным о равенстве числа 1 → 3- и 1 → 4-связей в изучаемых полисахаридах, а объясняется тем, что значительная часть 4-О-замещенных остатков галактозы в полисахариде (II) существует в виде 3,6-ангидропроизводного и полностью разрушается при гидролизе; кроме того, остаточные сульфатные группы в полисахариде (II) занимают, по-видимому, положения 2 в 4-О-за-



Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-100 (30 × 1,2 см) полисахарида (I) и его десульфатированных производных (II) и (III)

Состав сульфатированного галактана (I) и его десульфатированных производных (II) и (III), полученных соответственно методами сольволитического десульфатирования и кислотного метанолиза

Полисахарид	Выход, %	$[\alpha]_D^{20}$, град (вода)	Содержание, %		Галактоза — кислота, моль/моль
			SO ₃ Na	3,6-ангидрогалактозы	
(I)	—	+11,9 (с 0,84)	21	7,1	10:1,2
(II)	80,5	+14,3 (с 0,94)	3,7	8,5	10:0,44
(III)	22,9	+46,2 (с 0,95)	0,2	2,1	10:0,38

Таблица 2

Относительные времена удерживания и площади пиков ацетатов частично метилированных полиолов, полученных при метилировании полисахаридов (I)–(III) (ГЖХ, условия а, см. «Эксперим. часть»)

Полиол	T _{отн}	S _{отн}		
		(I)	(II)	(III)
2,3,4-Ме ₃ -ксилит	0,63	—	0,3	0,3
2,3,4,6-Ме ₄ -дульцит	1,00	1,0	1,0	1,0
2,3,6-Ме ₃ -дульцит	1,48	} 36,2 *	6,5	10,5
2,4,6-Ме ₃ -дульцит	1,54		12,8	9,8
2,6-Ме ₂ -дульцит	2,06	23,6 **	0,9	1,1
3,6-Ме ₂ -дульцит	2,30	5,2	1,0	—
2,4-Ме ₂ -дульцит	3,25	2,5	1,5	0,6
2-Ме-дульцит	3,80	3,4	1,7	0,2

* Недостаточное разделение пиков для отдельного определения их площадей вследствие преобладания ацетата 2,4,6-три-О-метилдульцита.

** По данным хромато-масс-спектрометрии, пик содержит смесь ацетата 4,6-ди-О-метилдульцита.

мещенных остатках галактозы, что согласуется с ИК-спектром полисахарида (см. выше); при метилировании из этих остатков образуется 3,6-ди-О-метилгалактоза, отсутствующая в продуктах метилирования (III). Оба эти фактора приводят к увеличению содержания 2,4,6-три-О-метилгалактозы по сравнению с 2,3,6-изомером в продуктах метилирования (II).

Наиболее сложная смесь метилированных сахаров была получена при гидролизе метилированного полисахарида (I). В этой смеси было обнаружено еще более низкое относительное содержание 2,3,6-три-О-метилгалактозы, но в ней возросло число и относительное количество производных галактозы низких степеней метилирования. Этот результат подтверждает сделанный ранее [1] на основании ИК-спектров и результатов модификации под действием щелочи вывод о том, что сульфатные группы в полисахаридах (I) должны быть связаны с различными гидроксильными группами разных остатков галактозы. К сожалению, из данных метилирования нельзя сделать однозначного заключения о расположении сульфатных групп, поскольку в выбранных условиях (трехкратное проведение процедуры Хакомори, четвертая обработка не увеличивает содержание метоксильных групп) нам не удалось добиться полного метилирования исходного полисахарида (I).

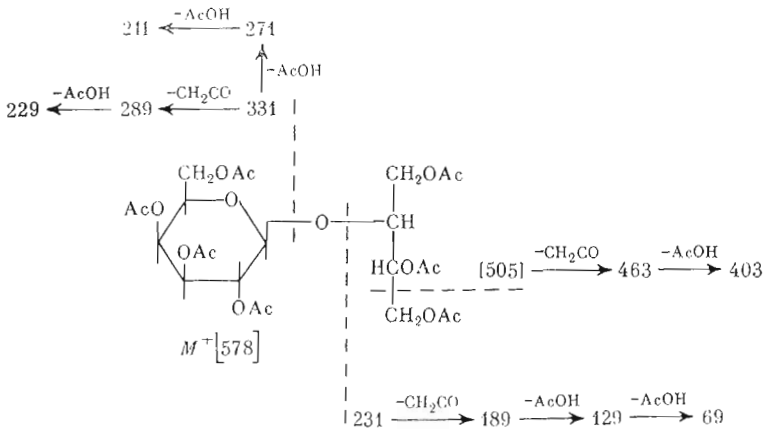
Таким образом, по данным метилирования, углеводная цепь полисахарида из *G. divaricata* построена в основном из 1 → 3- и 1 → 4-связанных остатков галактопиранозы, причем можно предполагать, что в этой цепи имеются разветвления [для полисахарида (III) — приблизительно

Периодатное окисление полисахаридов (I) — (III)

Полисахарид	Температура реакции, °С	Расход периодата, моль на остаток гексопиранозы	Галактоза — трент в восстановленном продукте окисления, моль/моль
(I)	5	0,04	12,7:1
	20	0,18	
(II)	5	0,34	1,6:1
	20	0,48	
(III)	5	0,57	1:1
	20	0,68	

одно разветвление на 20 моносахаридных остатков]. Для того чтобы определить относительное расположение двух указанных типов связей, было проведено периодатное окисление полисахаридов (I) — (III) (табл. 3). Хотя найденные величины расхода окислителя зависели от условий проведения реакции, для полисахарида (III) эти данные подтвердили линейную структуру с небольшим количеством разветвлений. Поскольку в полисахаридной цепи, содержащей 1 → 3- и 1 → 4-связи, периодатному окислению могут подвергаться лишь 4-О-замещенные моносахаридные остатки, полисахарид (II) окисляется в меньшей степени, чем полисахарид (III), ибо часть таких остатков в его молекуле защищена от окисления либо 3,6-ангидроциклами, либо остаточными сульфатными группами. Защищающее действие сульфатных групп еще сильнее сказывается при окислении полисахарида (I). Следует отметить, что в продуктах окисления всех трех полисахаридов резко уменьшается количество ксилозы; тем самым подтверждаются данные метилирования о конечном положении остатков этого моносахарида.

При расщеплении полисахарида (III) по Смиту в качестве главного продукта частичного гидролиза было получено вещество (IV), идентичное по хроматографическому поведению заведомому образцу 2-О-β-D-галактопиранозил-D-треита (ср. [9]). Строение этого вещества было доказано масс-спектром его ацетата (схема), а β-конфигурация гликозидной



Происхождение главных пиков в масс-спектре ацетата (IV)

связи и D-конфигурация остатка галактозы — ферментативным расщеплением β-галактозидазой из *E. coli*, результатом которого было образование равных количеств галактозы и трента, идентифицированных хроматографически. Таким образом, структура соединения (IV) была установлена с точностью до абсолютной конфигурации остатка трента. При расщепле-

нии по Смуту полисахаридов (I) и (II) также образуется фрагмент (IV), хотя и в меньших количествах. Получение этого вещества доказывает, что для углеводных цепей полисахарида из *G. divaricata* характерно чередованием связей $1 \rightarrow 3$ и $\beta-1 \rightarrow 4$, причем 3-О-замещенные остатки галактозы имеют D-конфигурацию.

Экспериментальная часть

Аналитическую и препаративную БХ выполняли нисходящим способом на бумаге Filtrak FN 11 (ГДР) в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3. Зоны восстанавливающих сахаров на бумаге обнаруживали кислым фталатом анилина, невосстанавливающих — AgNO_3 и KOH после периодатного окисления [10].

ГЖХ выполняли на хроматографе Pye Series 104 (Англия) с пламенно-ионизационным детектором, колонки ($120 \times 0,6$ см) с 3% полинеопентил-глицольадипината на диатомите С, при температуре 200° (условия а), или с 3% SE-30 на диатомите С, при температуре 180° (условия б); скорость N_2 50 мл/мин. Для измерения площадей пиков использовали интегратор Kent Chromalog 2 (Англия). Хромато-масс-спектрометрию проводили на приборе Varian MAT 111 (ФРГ), колонка ($120 \times 0,3$ см) с 3% SE-30 на варапасте.

ИК-спектры получали на приборе UR-10 (ГДР) в таблетках KBr. Спектрофотометрический анализ проводили на приборе CF-4A. Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 141 (США).

Количественное определение сахаров выполняли по реакции с фенолом и конц. H_2SO_4 [11], 3,6-ангидрогалактозы — по реакции с резорцином и HCl [12], сульфата — турбидиметрически по методу Доджсона [13].

Полисахарид (I) выделяли как описано в работе [1].

Фракционирование полисахарида (I) на сефадексе и DEAE-целлюлозе. Раствор 100 мг (I) в 10 мл 1 М NaCl наносили на колонку ($67 \times 2,7$ см) с сефадексом G-200, уравновешенную с 1 М NaCl (V_0 120 мл, V_e 400 мл). Колонку промывали 1 М NaCl со скоростью 0,4 мл/мин, собирая фракции по 20 мл, которые анализировали на присутствие сахаров по реакции с фенолом и конц. H_2SO_4 . Полисахарид дал один пик (фракции 1—9); объединяли порознь фракции 1—3, 4—5 и 6—9, диализовали и лиофилизовали, общий выход полимера (I) 80 мг; три полученных образца практически не отличались друг от друга и от исходного вещества по содержанию 3,6-ангидросахаров, сульфата и по соотношению галактоза — ксилоза.

Раствор 200 мг полисахарида (I) в 25 мл воды наносили на колонку (30×3 см) с DEAE-целлюлозой (Whatman, DE-52, CO_3^{2-} -форма). Колонку промывали 500 мл воды, затем 2 л раствора $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ с линейно возрастающей от 0 до 2 М концентрацией и 500 мл 2 М $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, собирая фракции по 11 мл, которые анализировали на присутствие сахаров, как описано выше. В водном элюате обнаружили зону (выход около 1%), гидролиз которой дал глюкозу и ксилозу. В солевом элюате обнаружили растянутый пик полисахарида (выход 68%); фракции, соответствующие центральной части этого пика, объединяли, диализовали и лиофилизовали, получали очищенный полисахарид (I) [выход 45 мг], практически не отличающийся от исходного вещества по содержанию 3,6-ангидросахаров и сульфата.

Десульфатирование полисахарида (I). а) *Кислотный метаноллиз.* Суспензию 870 мг полисахарида (I), высушенного в вакууме над P_2O_5 , в 100 мл 0,09 М раствора HCl в абс. метаноле перемешивали 7 ч при 20° . центрифугировали, к осадку приливали свежую порцию метанольного HCl и обрабатывали в тех же условиях еще 3 раза. Затем осадок растворяли в воде, раствор нейтрализовали Na_2CO_3 , диализовали и лиофилизовали, получали десульфатированный полисахарид (III), выход 199 мг (22,9%) (см. табл. 1); ИК-спектр: поглощение сульфата отсутствует. Метанольные растворы, полученные после каждой обработки, нейтрализовали

$PbCO_3$, центрифугировали и упаривали, получали соответственно 126, 70, 24 и 13 мг веществ, при кислотном гидролизе образующих галактозу и ксилозу.

б) *Сольволитическое десульфатирование*. К водному раствору 500 мг Na-соли (I) прибавляли избыток катионита КУ-2 (H^+ -форма), перемешивали, смолу отфильтровывали и промывали водой. Объединенный фильтрат нейтрализовали пиридином, концентрировали в вакууме и лиофилизировали, получали пиридиниевую соль (I), выход 398 мг. К 348 мг этого вещества приливали 50 мл абс. ДМСО и 1 мл пиридина, перемешивали 8 ч при 100° , диализовали и лиофилизировали, получали 278 мг (94%) частично десульфатированного полисахарида, содержащего 5,7% SO_4^{2-} и 7,7% 3,6-ангидрогалактозы; 235 мг этого вещества заново переводили в пиридиниевую соль и повторно десульфатировали, как описано выше, получали десульфатированный полисахарид (II), выход 196 мг (80,5%, считая на обе стадии) (см. табл. 1); ИК-спектр: $1240, 830\text{ см}^{-1}$ (вторичный экваториальный сульфат).

Гель-фильтрация полисахаридов (I) — (III). Растворы 5 мг полисахаридов в 0,5 мл 1 M NaCl наносили на колонку ($30 \times 1,2\text{ см}$) с сефадексом G-100 (V_0 8 мл, V_e 26 мл), уравновешенную с 1 M NaCl, которую промывали 1 M NaCl. Фракции объемом 2 мл анализировали на присутствие сахаров по реакции с фенолом и конц. H_2SO_4 . Полученные данные приведены на рисунке.

Метилирование полисахаридов (I) — (III). 191 мг полисахарида (I), высушенного в вакууме над P_2O_5 , растворяли в 7 мл абс. ДМСО, приливали раствор избытка метилсульфинилкарбаниона в 7 мл ДМСО, перемешивали 6 ч при 20° , прибавляли 2 мл MeI и продолжали перемешивание еще 20 ч. Реакционную смесь выливали в воду, диализовали и лиофилизировали, остаток еще дважды метилировали по описанной методике, получали метилированный полисахарид (I) (выход 95 мг, OMe 24,08%), в ИК-спектре которого имеется полоса поглощения OH-группы.

160 мг полисахарида (II) дважды метилировали, как описано выше, получали метилированный полисахарид (II) (выход 110 мг, OMe 34,05%), в ИК-спектре которого имеется малоинтенсивная полоса поглощения OH-группы.

113 мг полисахарида (III) метилировали один раз, как описано выше, получали метилированный полисахарид (III) [выход 106 мг, OMe 38,4%]; полоса поглощения OH-группы в ИК-спектре отсутствует.

Гидролиз метилированных полисахаридов и идентификация метилированных сахаров. 10 мг метилированного полисахарида растворяли в 2 мл 85—90% HCOOH, раствор выдерживали 12 ч при 20° , 3 ч при 60° и 30 ч при 90° . Кислоту отгоняли в вакууме с водой, остаток нагревали 5 ч при 100° с 2 мл 2 н. H_2SO_4 , раствор нейтрализовали амберлитом IRA-410 (HCO_3^- -форма), фильтровали, смолу промывали водным метанолом (1 : 1), объединенный фильтрат упаривали, остаток растворяли в водном метаноле, вносили избыток $NaBH_4$, через 20 ч обрабатывали избытком катионита КУ-2 (H^+ -форма), фильтровали и упаривали, отгоняя борную кислоту с метанолом. Остаток высушивали в вакууме над P_2O_5 и ацетилювали As_2O в пиридине, полученные смеси ацетатов частично метилированных полиолов анализировали ГЖХ; идентификацию веществ проводили сравнением с известными образцами, а также с помощью хромато-масс-спектрометрии. Результаты приведены в табл. 2.

Периодатное окисление полисахаридов (I) — (III). К раствору 50 мг полисахарида в 28,5 мл воды прибавляли 28,5 мл 0,0218 M $NaIO_4$ и 57 мл воды, перемешивали и оставляли в темноте при 5 или 20° . Расход окислителя определяли спектрофотометрически при 305 нм [14]. По окончании реакции (165 ч) приливали 1 мл этиленгликоля, через 1 ч раствор концентрировали, диализовали, обрабатывали избытком $NaBH_4$ в течение 20 ч, затем подкисляли $AsOH$, диализовали и лиофилизировали. 10 мг получен-

ного полиспирта нагревали 5 ч при 100° с 1 мл 2 н. HCl, нейтрализовали амберлитом IRA-410 (HCO₃⁻-форма) и методом БХ обнаруживали галактозу и трейт, ксилоза практически отсутствовала. Соотношение галактозы и трейта определяли в виде ацетатов полиолов методом ГЖХ (условия а) — результаты см. в табл. 3.

Раствор 25 мг полиспирта, полученного из полисахарида (III), в 8 мл 0,5 н. HCl выдерживали 8 ч при 20°, нейтрализовали амберлитом IRA-410 (HCO₃⁻-форма) и упаривали досуха. В остатке с помощью БХ обнаруживали вещества с R_{Gal} 0,8 (главный компонент, идентичный по подвижности заведомому 2-O-β-D-галактопиранозил-D-трейту) и 1,18. Аналогичные результаты получены при частичном гидролизе полиспиртов, полученных из полисахаридов (I) и (II).

Зону с R_{Gal} 0,8 выделяли препаративной БХ, получали вещество (IV), выход 8 мг. При кислотном гидролизе соединения (IV) методом БХ идентифицировали галактозу и трейт. 3 мг вещества (IV) ацетилировали As₂O в пиридине, ацетат очищали препаративной ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля в системе растворителей хлороформ — ацетон (4 : 1) и использовали для масс-спектрометрии. Масс-спектр: *m/e* 463, 331, 289, 271, 234, 229, 211, 189, 129, 69 (см. схему).

К раствору 3 мг соединения (IV) в 0,3 мл фосфатного буфера (рН 7,0) прибавляли 0,01 мл суспензии β-галактозидазы из *E. coli* (Schuchardt, ФРГ), инкубировали 22 ч при 37°, нагревали 5 мин при 100°, деионизировали КУ-2 (H⁺-форма) и IRA-410 (HCO₃⁻-форма), упаривали и в остатке методом БХ обнаруживали галактозу и трейт.

ЛИТЕРАТУРА

1. Усов Н. И., Мирошников Л. И., Барбакадзе В. В. (1975) Ж. общ. химии, 45, 1618—1624.
2. Anderson N. S., Dolan T. C. S., Rees D. A. (1965) Nature, 205, 1060—1062.
3. Kantor T. G., Schubert M. (1957) J. Amer. Chem. Soc., 79, 152—153.
4. Usov A. I., Adamyants K. S., Miroshnikova L. I., Shaposhnikova A. A., Kochetkov N. K. (1974) Carbohydr. Res., 18, 336—338.
5. Anderson N. S., Dolan T. C. S., Penman A., Rees D. A., Mueller G. P., Stancioff D. J., Stanley N. F. (1968) J. Chem. Soc. (C), 602—606.
6. Nakomori S. (1964) J. Biochem., 55, 205—208.
7. Джонс Г. Дж. (1975) в сб. Методы исследования углеводов (под ред. Хорлина А. Я.), с. 26—37, «Мир», М.
8. Björndal H., Hellerqvist C. G., Lindberg B., Svensson S. (1970) Angew. Chem. (Internat. Edition), 9, 610—619.
9. Усов А. И., Рехтер М. А., Кочетков Н. К. (1969) Ж. общ. химии, 39, 905—911.
10. Усов А. И., Рехтер М. А. (1969) Ж. общ. химии, 39, 912—913.
11. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956) Anal. Chem., 28, 350—356.
12. Yaphe W., Arsenault G. P. (1965) Anal. Biochem., 13, 143—148.
13. Dodgson K. S., Price R. G. (1962) Biochem. J., 84, 106—110.
14. Marinetti G. V., Rouser G. (1955) J. Amer. Chem. Soc., 77, 5345—5349.

Поступила в редакцию 25.I.1978

POLYSACCHARIDES OF ALGAE. XXVI. METHYLATION AND PERIODATE OXIDATION OF A POLYSACCHARIDE FROM THE RED SEAWEED *GRATELOUPIA DIVARICATA* OKAM.

BARBAKADZE V. V., USOV A. I.

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

A sulfated galactan from *Grateloupia divaricata* and two desulfated derivatives, obtained from this polysaccharide after acid methanolysis or solvolytic desulfation, were investigated by methylation and periodate oxidation procedures. The carbohydrate moiety of the polysaccharide molecule was shown to contain the linear chains with alternating 1 → 3- and β-1 → 4-linked galactose residues, the 3-linked residues belonging to the D-series. Information about the presence of some branchings in the polysaccharide molecule was also obtained.