



УДК 547.458.7.02+582.273

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ

XXXI *. ПОЛИСАХАРИДЫ КРАСНОЙ ВОДОРΟΣЛИ *GALAXAURA SQUALIDA*
KJELLM

Усов А. И., Яроцкий С. В., Эстевес М. Л.

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

Из красной морской водоросли *Galaxaura squalida* выделены сульфатированный ксилогалактоманнан и несколько фракций нейтрального ксилана. С помощью спектроскопии ^{13}C -ЯМР и частичного гидролиза установлено, что ксиланы представляют собой семейство родственных линейных полисахаридов с $\beta 1 \rightarrow 4$ - и $\beta 1 \rightarrow 3$ -связями между остатками *D*-ксилопиранозы. Строение сульфатированного полисахарида изучено методом метилирования до и после десульфатирования, а также с помощью расщепления по Смитту. Показано, что в основе молекулы полисахарида лежит линейная цепь, построенная из $\beta 1 \rightarrow 3$ -связанных остатков *D*-маннопиранозы, каждый третий из которых в положении 4 несет сульфатную группу; единичные остатки *D*-ксилопиранозы (примерно три остатка на пентасахаридный участок главной цепи) присоединены также в положении 4 маннопиранозных остатков; по-видимому, таким же образом расположены и имеющиеся в полисахариде в небольшом количестве остатки галактозы (преимущественно *L*-изомер). Таким образом, сульфатированный ксилогалактоманнан из *Galaxaura squalida* является представителем нового типа полисахаридов красных водорослей.

Красная морская водоросль *Galaxaura squalida* принадлежит к порядку *Nemaliales*, представители которого мало изучены в химическом отношении. Известно, что в нескольких видах этих водорослей присутствуют нейтральные ксиланы, обладающие линейным строением с $\beta 1 \rightarrow 3$ - и $\beta 1 \rightarrow 4$ -связями между остатками *D*-ксилопиранозы [2-6]. Что касается сульфатированных полисахаридов, то подробно исследован только полисахарид из *Nemalion vermiculare* [5-9], который в отличие от сульфатированных полисахаридов подавляющего большинства красных водорослей является не галактансульфатом, а ксиломаннансульфатом. В связи с этим несомненный интерес представляет изучение полисахаридного состава других водорослей порядка *Nemaliales*.

Водоросль *Galaxaura squalida* широко распространена в тропической зоне Атлантического океана [10] и была заготовлена на о. Куба. Талломы этой водоросли в значительной степени минерализованы, поэтому предварительная обработка заключалась в удалении основной части минеральных веществ действием триэтиламмонийной соли этилендиаминтетрауксусной кислоты в этаноле по методу, рекомендованному для выделения мукополисахаридов из минерализованных тканей [11]. Затем проводили извлечение полисахаридов, вначале горячей водой и далее раствором щелочи при комнатной температуре и при нагревании. Водный экстракт со-

* Сообщение XXXI см. [1].

Характеристика сульфатированных полисахаридов из *Galaxaura squalida*

Полисахарид	Выход, %	$[\alpha]_D^{20}$ (вода)	SO ₃ Na, %	Моносахариды, моль/моль		
				Gal	Man	Xyl
II-1	24,4	-12,2°	11,2	0,18	1,0	0,6
II-2	6,3	-6,5°	5,6	0,87	1,0	1,0

Таблица 2

Характеристика ксиланов из *Galaxaura squalida*

Ксилан	Выход, %	$[\alpha]_D^{20}$ (1 н. NaOH)	Соотношение связей $\beta 1 \rightarrow 4$ и $\beta 1 \rightarrow 3$ *
I	7,2	-87° (с 1,0)	4,2 : 1
III-1	6,0	-81° (с 1,5)	11 : 1
III-2	4,1	-99° (с 2,2)	16,5 : 1

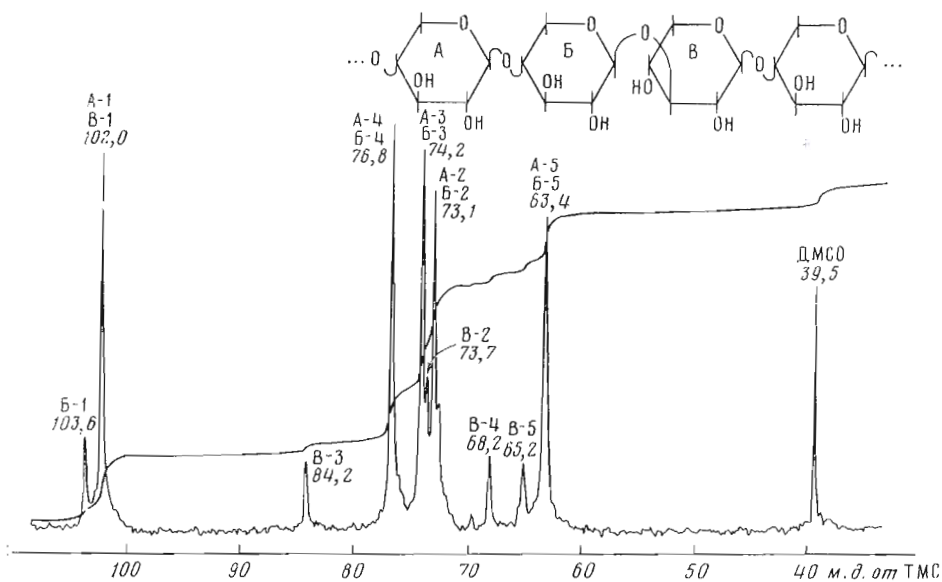
*Рассчитано из спектров ¹³C-ЯМР (ср. [12]). Спектры сняты для раствора I в D₂O (рис. 1) и растворов III-1 и III-2 в D₂O, содержащей 1 н. NaOH. Химические сдвиги сигналов углеродных атомов практически совпадают с величинами, приведенными в [13].

держал нейтральные и кислые полисахариды и не давал геля при охлаждении или прибавлении хлористого калия, что свидетельствовало об отсутствии в нем полисахаридов группы агара или группы каррагинана. Разделение кислых и нейтральных полисахаридов было достигнуто с помощью осаждения бромистым цетилтриметиламмонием (цетавлоном), причем фракция II кислых полисахаридов была получена в виде двух субфракций, одна из которых выпала в осадок из раствора, содержащего 4% KCl, а вторая — при последующем диализе маточного раствора. После перевода цетавлоновых солей в натриевые были получены соответствующие этим субфракциям препараты полисахаридов II-1 и II-2, несколько различающиеся по составу (табл. 1).

Оставшиеся в маточном растворе после осаждения цетавлоном нейтральные водорастворимые полисахариды выделяли осаждением этанолом (фракция I). Из холодного и горячего щелочных экстрактов получали соответственно фракции III и IV, причем первую из них удалось разделить на две части (III-1 и III-2) благодаря их различной растворимости в воде. Оказалось, что фракции I, III и IV при гидролизе дают практически только ксилозу, идентифицированную как D-изомер, и обладают значительным отрицательным удельным вращением (табл. 2), что позволяет рассматривать их как β-ксиланы.

Недавно мы показали, что наиболее эффективным методом структурного анализа линейных ксиланов водорослей служит спектроскопия ¹³C-ЯМР [12, 13]. В спектрах таких ксиланов наблюдаются хорошо разрешенные сигналы, положение которых однозначно доказывает структуру молекулы, а относительные интенсивности позволяют рассчитать соотношение типов связей. Анализ спектров ¹³C-ЯМР трех ксилановых фракций из *Galaxaura squalida* показал, что эти полисахариды подобны ксиланам других красных водорослей (рисунок) и различаются только отношением числа связей β1→4 и β1→3 (табл. 2), причем растворимость в воде падает с ростом этого отношения.

Одновременное наличие обоих типов связей в одной и той же полимерной молекуле было специально установлено прямым сравнением наборов олигосахаридов, образующихся при частичном гидролизе ксилана I и кси-



Спектр ^{13}C -ЯМР ксилана I (5% раствор в D_2O , внутренний стандарт – ДМСО)

лапа из *Rhodymenia stenogona* [12], проведенном в одинаковых условиях. Оказалось, что эти наборы идентичны. Для ксилана из *Rhodymenia stenogona* ранее было строго доказано, что в трисахаридной фракции продуктов его частичного расщепления содержатся ксилотриозы со связями $\beta 1 \rightarrow 4$, $\beta 1 \rightarrow 3$ и $\beta 1 \rightarrow 3$, $\beta 1 \rightarrow 4$.

Особый интерес представляло изучение сульфатированного полисахарида II-1, являющегося основным компонентом фракции кислых полисахаридов. При разделении препарата II-1 на DEAE-сефадексе были получены фракции, которые вымывались растворами солей разной концентрации, но не отличались по моносахаридному составу от исходного полисахарида. На этом основании был сделан вывод, что полимер II-1 не является смесью различных сульфатированных полисахаридов, а представляет собой ксилогалактоманнан, обладающий разной степенью сульфатирования. Моносахариды, входящие в его состав, были охарактеризованы как *D*-манноза, *D*-ксилоза и *L*-галактоза (возможно, с небольшой примесью *D*-изомера). Помимо этого в незначительных количествах в полисахариде II-1 содержатся остатки 4-*O*-метил- и 3,4-ди-*O*-метилксилозы. Эти моносахариды были выделены из гидролизата; их деметилирование действием BCl_3 [14] привело к образованию ксилозы, а расположение метильных групп было установлено масс-спектрометрически после восстановления боргидридидом натрия и ацетилирования [15].

Для выяснения структуры углеводных цепей сульфатированного полисахарида II-1 необходимо было предварительно удалить содержащиеся в нем сульфатные группы. Для десульфатирования был использован кислотный метанолиз [16]. Четырехкратной обработкой ксилогалактоманнана II-1 0,1 М раствором HCl в метаноле удалось полностью отщепить остатки сульфата. При этом соотношение моносахаридов по сравнению с исходным полимером практически не изменилось.

Десульфатированный полисахарид исследовали методом метилирования. Полностью метилированный полисахарид был получен в результате двукратной обработки диметилсульфатом и щелочью в водном растворе по методу Хеурса с последующим метилированием теми же реагентами в абсолютном тетрагидрофуране (ТГФ) [17]. Метилированный полисахарид подвергали формолизу, гидролизу, боргидридному восстановлению и ацетилированию. В полученной смеси ацетатов частично метилированных

полиолов методами ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии [15] были идентифицированы ацетаты 2,3,4-три-*O*-метилксилита, 2,4,6-три- и 2,6-ди-*O*-метилманнита в мольном соотношении 1:1,4:1, а также небольшие количества ацетатов 2,3,4,6-тетра-*O*-метилдульцита и 2,3,4,6-тетра-*O*-метилманнита.

На основании результатов метилирования можно предположить, что полисахарид II-1 имеет линейную главную цепь из 1→3-связанных остатков *D*-маннопиранозы, часть из которых замещена по положению 4 единичными остатками *D*-ксилопиранозы (и *L*-галактопиранозы). Чтобы подтвердить такое предположение, мы подвергли полисахарид II-1 расщеплению по Смитту, т. е. периодатному окислению с последующим восстановлением NaBH₄. Образующийся в результате этих реакций полиспирт гидролизовали в мягких условиях, когда расщепляются ацетальные, но не гликозидные связи [18]. Полученный модифицированный полисахарид, $[\alpha]_D^{20} -52^\circ$ (вода), при полном кислотном гидролизе давал только маннозу, что согласуется с конечным расположением остатков ксилозы и галактозы, и содержал 17,4% SO₃Na. Повышение содержания сульфата говорит о том, что сульфатные группы главным образом, если не исключительно, находятся в главной цепи и связаны с остатками маннозы (один сульфат на 3 остатка маннозы). Модифицированный полисахарид метилировали, как описано выше, затем десульфатировали однократной обработкой 0,1 М HCl в метаноле и вновь метилировали диметилсульфатом и твердой щелочью в ТГФ. Полностью метилированное производное гидролизовали и продукты гидролиза переводили в ацетаты полиолов, как описано выше. В полученном продукте содержался единственный компонент, идентифицированный методом хроматомасс-спектрометрии как ацетат 2,4,6-три-*O*-метилманнита. Таким образом, расщепление по Смитту полимера II-1 приводит к сульфатированному 1→3-маннану. Это доказывает, что полисахарид II-1 действительно имеет главную цепь из 1→3-связанных остатков *D*-маннопиранозы, в которой приблизительно каждые 3 из 5 остатков замещены по положению 4 единичными остатками *D*-ксилопиранозы (и *L*-галактопиранозы). Отрицательные значения удельного вращения ксилогалактоманнана II-1 и продукта его расщепления по Смитту свидетельствуют, что гликозидные связи между остатками *D*-маннозы в главной цепи имеют β-конфигурацию. Этот вывод находится в соответствии с данными спектра ¹³C-ЯМР продукта расщепления по Смитту, где в области резонансов C1 наблюдается единственный сигнал с δ_c 100,2 м.д., характерный для остатков β-*D*-маннопиранозы в углеводных цепях (ср. [19]). Интересно, что в результате модификации периодатным окислением отрицательное удельное вращение полисахарида увеличивается. Это позволяет предположить, что расщепляемые при действии периодата остатки *D*-ксилозы связаны с главной маннановой цепью α-гликозидными связями.

Для определения положения сульфатных групп в полисахариде II-1 мы также применили метод метилирования, предварительно убедившись, что щелочелabile сульфат в полисахариде отсутствует. Для метилирования были снова использованы последовательные обработки полимера диметилсульфатом и щелочью в воде по Хеурсу и в абсолютном ТГФ. Метилированный полимер II-1 гидролизом, восстановлением и ацетилированием переводили в смесь ацетатов полиолов, которую анализировали методами ГЖХ (сравнением с известными образцами) и хроматомасс-спектрометрии. При этом идентифицировали в качестве основных компонентов ацетаты 2,3,4-три-*O*-метилксилита, 2,4,6-три- и 2,6-ди-*O*-метилманнита в мольном соотношении 1,2:1:1,6, а также небольшие количества ацетатов 2,3,4,6-тетра-*O*-метилманнита и 2,3,4,6-тетра-*O*-метилдульцита.

Эти данные (несмотря на некоторую потерю сульфатных групп в условиях метилирования) показывают, что остатки сульфата, как и остатки ксилозы, расположены в главной цепи при C4 остатков маннозы. Ин-

тересно, что в характеристической для сульфатных групп области 800–860 см^{-1} ИК-спектра полисахарида имеется полоса поглощения при 850 см^{-1} . Такая полоса в сульфатированных галактанах свидетельствует об аксиальной ориентации сульфатной группы [20]. В то же время очевидно, что расположенная при C4 остатков маннозы сульфатная группа должна быть экваториальной и в соответствии с закономерностями, найденными для галактаосульфатов, должна давать полосу поглощения при 830 см^{-1} . Это противоречие снимается сделанным ранее наблюдением [21], что в ИК-спектре модельного 4-сульфата метил-3-О-метил- α -D-маннопиранозид сульфат поглощает при 862 см^{-1} , т. е. вышеприведенное правило тоже не выполняется. Можно заключить поэтому, что данные ИК-спектра ксилогалактоманнана II-1 не противоречат результатам метилирования, но лишь раз говорят о том, что закономерности ИК-спектров сульфатов углеводов, установленные главным образом при исследовании производных галактозы, лишь с большой осторожностью можно использовать для производных других сахаров.

В заключение следует отметить, что, хотя *Galaxaura squalida* по содержанию нейтральных β 1 \rightarrow 4, β 1 \rightarrow 3-кисланов напоминает другие водоросли из порядков Nemaliales и Rhodumiales, по структуре сульфатированного полисахарида она резко отличается от всех известных на сегодня представителей красных водорослей. Ближайшим аналогом является сульфатированный ксилманнан из *Nemalion vermiculare*, но он содержит α 1 \rightarrow 3-маннановую главную цепь, к которой ксилозные остатки присоединены в положения 2, а сульфатные группы — в положения 4 и 6, тогда как в основе полисахарида из *Galaxaura squalida* лежит β 1 \rightarrow 3-маннан и все заместители расположены в положениях 4 главной цепи. Отмеченные структурные особенности позволяют считать сульфатированный ксилогалактоманнан из *Galaxaura squalida* полисахаридом не известного ранее типа.

Экспериментальная часть

Хроматография на бумаге (БХ) выполнена нисходящим способом с использованием хроматографической бумаги «Filtrak FN 11» или FN 15 и систем растворителей бутанол-1 — пиридин — вода, 6:4:3 (А) или бутанол-1 — этанол — вода, 5:1:4 (Б). Пренаративная БХ выполнена на бумаге Ватман 3ММ в системе А. Восстанавливающие сахара на бумаге обнаруживали кислым фталатом аншлина.

ГЖХ выполнена на хроматографе «Руч 104» с пламенно-ионизационным детектором, колодки (150 \times 0,6 см) с 3% полинеопентилгликольдипиридата на диатомите С (В) или с 3% ECNSS-M на газхроме Q(Г), скорость N_2 50 мл/мин. Хроматомасс-спектрометрию проводили на приборе «Varian MAT III» с использованием колодки (150 \times 0,2 см) с 10% SE-30 на хромосорбе W с программированием температуры от 140 до 250°С. ИК-спектры снимали на спектрометре UR-10 в таблетках KBr. Оптическую активность измеряли на автоматическом поляриметре «Perkin-Elmer 141». Спектры ^{13}C -ЯМР получали на спектрометре «Bruker-Physik WP-60» при 15,08 МГц для 3–5% растворов полисахаридов в D_2O или 1 н. NaOH в D_2O при 50°С. Химические сдвиги сигналов в миллионных долях измерены относительно диметилсульфоксида как внутреннего стандарта и пересчитаны относительно тетраметилсилана (ТМС) по соотношению $\delta_{\text{ТМС}} - \delta_{\text{ДМСО}} + 39,5$ м. д.

Расход периодата контролировали спектрофотометрически по поглощению при 305 нм [22]. Содержание сульфата в полисахаридах определяли турбидиметрически после кислотного гидролиза по методу Доджсона [23], общее содержание сахаров — по реакции с фенолом и конц. H_2SO_4 [24].

Для анализа моносахаридного состава методом БХ (система А) и для превращения моносахаридов в ацетаты полиолов использовали стандартные методики (см., например, [12]).

Выделение полисахаридов. Водоросль *Galaxaura squalida*, собранную в 1977 г. в районе Сантьяго-де-Куба, промывали пресной водой, метанолом, ацетоном и высушивали на воздухе. 21 г водоросли измельчали, перемешивали 5 раз по 20 ч с порциями по 300 мл 0,2 М этанольного раствора триэтиламмониийной соли этилендиаминтетрауксусной кислоты при 80° С, а затем экстрагировали в аппарате Сокслета этанолом и высушивали, выход 7 г. Полученный материал перемешивали с 400 мл воды 4 ч при 100° С, экстракт отделяли центрифугированием, а остаток обрабатывали аналогичным образом еще 3 раза. К объединенным экстрактам прибавляли 20% раствор KCl до концентрации соли 4% и приливали 35 мл 10% раствора цетавлона. Осадок цетавлоновой соли субфракции II-1 отделяли, а маточный раствор диализовали; в процессе диализа выпадал осадок цетавлоновой соли субфракции II-2. Осадки раздельно растворяли в 4 М NaCl, к растворам приливали 4 объема этанола, осадки растворяли в воде, диализовали и лиофилизировали, получали Na-соли полисахаридов II-1 и II-2; выходы и аналитические характеристики приведены в табл. 1. Соотношения моносахаридов определены ГЖХ в виде ацетатов полиолов (колонка Г). В ИК-спектрах обеих фракций имеются полосы поглощения сульфата при 850 и 1260 см⁻¹.

Маточный раствор после осаждения цетавлоном концентрировали и приливали 4 объема этанола, осадок отделяли, промывали этанолом, ацетоном и сушили в вакууме, получали фракцию нейтральных водорастворимых полисахаридов I. Остаток водоросли после водной экстракции перемешивали с 200 мл 1 н. NaOH 3 ч при 20° С, остаток отделяли и повторно обрабатывали в тех же условиях, экстракты объединяли, нейтрализовали уксусной кислотой и диализовали. При диализе часть полисахарида выпала в осадок (субфракция III-2), который отделяли и высушивали сменой растворителей, а из маточного раствора осаждением этанолом выделяли субфракцию III-1. Вещества I, III-1 и III-2 при гидролизе, по данным БХ (система А), давали ксилозу и следы галактозы, глюкозы и маннозы; их характеристика приведена в табл. 2. Остаток водоросли нагревали с 200 мл 1 н. NaOH 5 ч при 100° С, экстракт отделяли, нейтрализовали уксусной кислотой и диализовали; в процессе диализа выпал осадок, который отделяли и высушивали сменой растворителей, получали дополнительное количество ксилана (фракция IV), выход 0,5%. Остаток водоросли промывали до нейтральной реакции водой и высушивали сменой растворителей, выход остатка 8%.

Идентификация D-ксилозы. Смесь, содержащую по 50 мг фракций I, III-1 и III-2, нагревали 5 ч при 100° С с 5 мл 2 н. H₂SO₄, нейтрализовали BaCO₃, осадок отделяли и промывали метанолом, объединенные растворы упаривали до небольшого объема, обрабатывали активированным углем и после фильтрования упаривали досуха, получали бесцветный сироп (выход 120 мг), содержащий, по данным БХ (система А), ксилозу со следами примесей маннозы, глюкозы и галактозы. Для определения оптического вращения сироп растворяли в 5 мл воды, точную концентрацию ксилозы в полученном растворе определяли по реакции с фенолом и H₂SO₄; $[\alpha]_D^{20} + 18,4^\circ$ (с 2; вода), по лит. данным [25], D-ксилоза имеет $[\alpha]_D^{20} + 18,8^\circ$ (вода).

Частичный гидролиз ксилана I (50 мг) осуществляли как описано в работе [12]. В гидролизате (БХ, система А) обнаружили ксилозу и набор олигосахаридов с $R_{X,1}$ 0,83; 0,53; 0,35; 0,31; 0,24; 0,12; 0,07; 0,04 и 0,02, идентичный продуктам частичного гидролиза в тех же условиях ксиланов из *Rhodymenia stenogona* [12] и *Halosaccion glandiforme* [13].

Фракционирование полисахарида II-1 на DEAE-сефадексе. 300 мг фракции II-1 растворяли в 200 мл воды и перемешивали с суспензией 5 г DEAE-сефадекса А-50 (Cl⁻-форма) в воде. Раствор отделяли, а сефадекс последовательно промывали при перемешивании порциями по 200 мл 0,1; 0,5; 1,0 и 2,0 М NaCl. Все растворы диализовали, концентрировали и лио-

филизовали, получали 5 фракций с выходами 10, 20, 80, 110 и 40 мг. При гидролизе каждая фракция давала ксилозу, маннозу и небольшие количества галактозы и сахаров с R_{Gal} 2,18 и 2,40 (БХ, система А), причем соотношение этих моносахаридов, по данным ГЖХ в условиях Г в виде ацетатов полиолов, практически не отличалось от соотношения в исходном полисахариде.

Действие щелочи на полисахарид II-1. 200 мг полисахарида II-1 (11,6% SO_3Na) растворяли в 100 мл воды, прибавляли 300 мг NaBH_4 , через 16 ч прибавляли еще 300 мг NaBH_4 и 4 г NaOH , нагревали 6 ч при 80°C , охлаждали, нейтрализовали уксусной кислотой, диализовали и лиофилизовали. Выход полисахарида 180 мг (11,2% SO_3Na).

Гидролиз полисахарида II-1. 200 мг фракции II-1 нагревали 5 ч при 100°C в 10 мл 2 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 две зоны с большей подвижностью (R_{Gal} 2,18 и 2,40), окрашивающиеся подобно ксилозе. Зоны элюировали водой, растворы упаривали досуха, остатки экстрагировали метанолом, экстракты упаривали и сушили в вакууме. Получали *D*-маннозу (выход 17,9 мг, $[\alpha]_D^{20} +11,8^\circ$ (c 0,88; вода), по лит. данным [25]: $[\alpha]_D^{20} +14,2^\circ$ (вода)), *D*-ксилозу (выход 25,3 мг, $[\alpha]_D^{20} +16,7^\circ$ (c 0,63; вода), по лит. данным [25]: $[\alpha]_D^{20} +18,8^\circ$ (вода)), галактозу (выход 13,0 мг, $[\alpha]_D^{20} -45^\circ$ (c 0,5; вода), преимущественно *L*-изомер, в котором примесь *D*-изомера не превышает 22%; по лит. данным [25] для *D*-галактозы $[\alpha]_D^{20} +80,2^\circ$ (вода)), а также вещества с R_{Gal} 2,18 и 2,40 (выходы 2,8 и 4,0 мг соответственно). Каждое из этих веществ делили на две части. Одну из них восстанавливали NaBD_4 и ацетилировали; в производных, соответствующих зоне с R_{Gal} 2,18, идентифицировали методом хроматомасс-спектрометрии ацетат 4-*O*-метилксилита, а зоне с R_{Gal} 2,40 — ацетат 3,4-*ди-O*-метилксилита. Другую часть каждого вещества суспендировали в 2 мл сухого метилхлорида, охлаждали до -70°C и быстро прибавляли по 2 мл охлажденного BCl_3 . Далее температуру медленно доводили до комнатной, смеси оставляли на 12 ч, после чего упаривали, H_3BO_3 удаляли отгонкой с метанолом и в остатках методом БХ (система А) идентифицировали ксилозу.

Десульфатирование полисахарида II-1. 300 мг полисахарида перемешивали 24 ч при 20°C в 100 мл 0,1 М HCl в абсолютном метаноле, раствор декантировали, а к осадку приливали свежую порцию HCl в метаноле. Такую обработку проводили 4 раза, после чего осадок отделяли, промывали метанолом, суспендировали в воде, нейтрализовали NaHCO_3 , диализовали и лиофилизовали, получали десульфатированный II-1, выход 140 мг (0% SO_3Na). При его гидролизе, по данным БХ (система А), образуются манноза, ксилоза и небольшие количества галактозы и *O*-метилпроизводных ксилозы; после перевода в ацетаты полиолов методом ГЖХ (условия Г) найдены ацетаты ксилита, маннита и дульцита в соотношении 0,7:1:0,2.

Метилирование десульфатированного полисахарида II-1. 100 мг десульфатированного II-1 растворяли в 5 мл 30% NaOH . К перемешиваемому раствору при 20°C приливали 3 мл диметилсульфата и 6 мл 30% NaOH , через 30 мин смесь нагревали до 60°C и прибавляли в течение 3 ч еще 3 мл диметилсульфата и 6 мл 30% NaOH ; такую же порцию реагентов прибавляли затем в течение 30 мин при 70°C . Далее смесь оставляли на 12 ч при 20°C , после чего всю обработку метилирующими агентами повторяли. После нейтрализации CO_2 смесь экстрагировали хлороформом, экстракт сушили Na_2SO_4 и упаривали досуха. Частично метилированный полисахарид растворяли в 5 мл сухого ТГФ, прибавляли 0,9 г порошкообразной NaOH и 1 мл диметилсульфата, после чего перемешивали 15 ч при 20°C . Затем к смеси приливали 15 мл воды, нагревали 30 мин при 100°C , нейтрализовали CO_2 , метилированный полисахарид экстрагировали хло-

роформом, экстракт сушили Na_2SO_4 и упаривали. Остаток выдерживали в 5 мл 85% HCOOH 3 ч при 60°C и 2 ч при 100°C , упаривали досуха, несколько раз упаривали с водой, нагревали с 5 мл 2 н. H_2SO_4 5 ч при 100°C , нейтрализовали BaCO_3 , фильтровали, осадок промывали метанолом, растворы объединяли и упаривали досуха. Полученный остаток, по данным БХ (система В), содержал три-О-метилпроизводные ксилозы и ди-, три- и тетра-О-метилпроизводные гексоз. После перевода в ацетаты полиолов методами ГЖХ (условия В) и хроматомасс-спектрометрии обнаружены ацетаты 2,3,4-три-О-метилксилита, 2,4,6-три- и 2,6-ди-О-метилманнита в мольном соотношении 1:1,4:1, а также небольшие количества ацетатов 2,3,4,6-тетра-О-метилпроизводных маннита и дульцита.

Периодатное окисление сульфатированного полисахарида II-1. Раствор 300 мг полисахарида в 37 мл 0,05 М NaIO_4 выдерживали при 0°C , контролируя расход периодата. Через 72 ч реакция закончилась, причем общий расход окислителя составил почти 1 моль на остаток моносахарида. Избыток периодата разлагали, прибавляя 2 мл этиленгликоля, раствор диализовали, прибавляли 300 мг NaNH_4 , оставляли на 12 ч, нейтрализовали 2 н. HCl , диализовали и лиофилизировали. Полученное вещество растворяли в 15 мл 0,5 н. HCl , выдерживали 4 ч при 20°C , диализовали и лиофилизировали. Выход деградированного полисахарида 140 мг, содержание SO_3Na 17,4%, $[\alpha]_{\text{D}} -52^\circ$ (с 0,5; вода). При его гидролизе, по данным БХ (система А), образуется маинноза и следы ксилозы и галактозы.

Метилирование деградированного полисахарида. 120 мг полисахарида, полученного в результате периодатного окисления II-1, метилировали, как описано выше; полученный продукт, по данным БХ (система В), давал при гидролизе ди- и три-О-метилпроизводные маннозы. Метилированный полисахарид перемешивали с 50 мл 0,1 М HCl в метаноле 20 ч при 20°C , полученный раствор нейтрализовали PbCO_3 , фильтровали, осадок несколько раз промывали метанолом, растворы объединяли и упаривали. Полученное вещество не содержало сульфата. Его дополнительно метилировали диметилсульфатом и твердой щелочью в ТГФ, затем гидролизовали, восстанавливали и ацетилировали, как описано выше, в результате чего, по данным хроматомасс-спектрометрии, получили ацетат 2,4,6-три-О-метилманнита.

Метилирование сульфатированного полисахарида II-1. 50 мг II-1 восстанавливали NaNH_4 , а затем метилировали, как описано для десульфатированного полисахарида. При анализе продуктов гидролиза метилированного полисахарида в виде ацетатов полиолов методами ГЖХ (колонка В) и хроматомасс-спектрометрии идентифицировали ацетаты 2,3,4-три-О-метилксилита, 2,4,6-три- и 2,6-ди-О-метилманнита в мольном соотношении 1,2 : 1 : 1,6, а также небольшие количества 2,3,4,6-тетра-О-метилманнита и 2,3,4,6-тетра-О-метилдульцита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Усов А. И., Иванов Е. Г. Полисахариды водорослей. XXXI. Ферментативное расщепление агароидного полисахарида из красной водоросли *Rhodomela larix* (Turn.) C. Ag.— Биорган. химия, 1981, т. 7, № 7, с. 1060-1068.
2. Cerezo A. S., Lezerovich A., Labriola R., Rees D. A. A xylan from the red seaweed *Chaetangium fastigiatum*.— Carbohydr. Res., 1971, v. 19, p. 289-296.
3. Cerezo A. S. The fine structure of *Chaetangium fastigiatum* xylan: studies of the sequence and configuration of the (1→3)-linkages.— Carbohydr. Res., 1972, v. 22, p. 209-211.
4. Nunn J. R., Parolis H., Russell I. Polysaccharides of the red alga *Chaetangium erinaceum*. Part I. Isolation and characterisation of the water-soluble xylan.— Carbohydr. Res., 1973, v. 26, p. 169-180.
5. Усов А. И., Адамьянц К. С., Яроцкий С. В., Аношина А. А., Кочетков Н. К. The isolation of a sulphated mannan and a neutral xylan from the red seaweed *Nemalion vermiculare* Sur.— Carbohydr. Res., 1973, v. 26, p. 282-283.
6. Усов А. И., Адамьянц К. С., Яроцкий С. В., Аношина А. А., Кочетков Н. К. Полисахариды водорослей. XIV. Выделение сульфатированного маннана и нейтраль-

- ного ксилана из красной водоросли *Nemalion vermiculare* Sur.— Ж. общ. химии, 1974, т. 44, с. 416—420.
7. Усов А. И., Адамянц К. С., Яроцкий С. В., Аношина А. А. Полисахариды водорослей. XVI. Изучение структуры сульфатированного маннана из красной водоросли *Nemalion vermiculare* Sur. методом метилирования.— Ж. общ. химии, 1975, т. 45, с. 916—921.
 8. Усов А. И., Адамянц К. С., Яроцкий С. В. Полисахариды водорослей. XVIII. Ацетоллиз сульфатированного маннана из *Nemalion vermiculare* Sur.— Ж. общ. химии, 1975, т. 45, с. 1377—1381.
 9. Усов А. И., Яроцкий С. В. Полисахариды водорослей. XXI. Щелочная деградация сульфатированного маннана из красной водоросли *Nemalion vermiculare* Sur.— Биоорг. химия, 1975, т. 1, с. 919—922.
 10. Taylor W. R. Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas. Ann Arbor: The University of Michigan Press, 1960.
 11. Scott J. E., Kyffin T. W. Demineralization in organic solvents by alkylammonium salts of ethylenediaminetetra-acetic acid.— Biochem. J., 1978, v. 169, p. 697—701.
 12. Усов А. И., Яроцкий С. В., Шашков А. С., Тищенко В. И. Полисахариды водорослей. XXII. Полисахаридный состав *Rhodomenia stenogona* Perest. и применение спектроскопии ¹³C-ЯМР для установления строения ксиланов.— Биоорг. химия, 1978, т. 4, с. 57—65.
 13. Kovac P., Hirsch J., Shashkov A. S., Usov A. I., Yarotsky S. V. ¹³C-N.M.R. spectra of xylo-oligosaccharides and their application to the elucidation of xylan structures.— Carbohydr. Res., 1980, v. 85, p. 177—185.
 14. Bonner T. G., Bourne E. L., McNally S. Dealkylation and deacylation of carbohydrate derivatives with boron trichloride and boron tribromide.— J. Chem. Soc., 1960, p. 2929—2934.
 15. Björndal H., Hellerqvist C. G., Lindberg B., Svensson S. Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides.— Angew. Chem., Internat. Ed., 1970, v. 9, p. 610—619.
 16. Kantor T. G., Schubert M. A method for the desulfation of chondroitin sulfate.— J. Amer. Chem. Soc., 1957, v. 79, p. 152—153.
 17. Херст Е. Л., Персиваль Е. Метилловые эфиры моно- и дисахаридов.— В кн.: Методы химии углеводов. М.: Мир, 1967, с. 85—89.
 18. Гольдштейн Н. Дж., Хэй Г. В., Льюис Б. А., Смит Ф. Контролируемая деградация полисахаридов с помощью периодатного окисления, восстановления и гидролиза (распад по Смитю).— В кн.: Методы химии углеводов. М.: Мир, 1967, с. 471—478.
 19. Gorin P. A. J. Assignment of signals of the carbon-13 magnetic resonance spectrum of a selected polysaccharide: comments on methodology.— Carbohydr. Res., 1975, v. 39, p. 3—10.
 20. Anderson N. S., Dolan T. C. S., Penman A., Rees D. A., Mueller G. P., Stancioff D. J., Stanley N. F. Carrageenans. Part IV. Variations in the structure and gel properties of κ -carrageenan, and the characterisation of sulphate esters by infrared spectroscopy.— J. Chem. Soc. (C), 1968, p. 602—606.
 21. Усов А. И., Яроцкий С. В., Васянина Л. К. Синтез и исследование методом ¹³C-ЯМР сульфатов метил-3-О-метил- α -D-маннопиранозиды.— Биоорг. химия, 1975, т. 1, с. 1583—1588.
 22. Marinetti G. V., Rouser G. The periodate oxidation of ribose-5-phosphate in acid and alkaline solution.— J. Amer. Chem. Soc., 1955, v. 77, p. 5345—5349.
 23. Dodgson K. S., Price R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides.— Biochem. J., 1962, v. 84, p. 106—110.
 24. Dubois M., Gilles M. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances.— Anal. Chem., 1956, v. 28, p. 350—356.
 25. Isbell H. S., Pigman W. W. A study of the α - and β -aldoses and their solutions by bromine oxidation and mutarotation measurements.— J. Org. Chem., 1937, v. 1, p. 505—539.

Поступила в редакцию
2.III.1981

POLYSACCHARIDES OF ALGAE. XXXII. POLYSACCHARIDES OF THE RED SEAWEED *GALAXAURA SQUALIDA* KJELLM

USOV A. I., YAROTSKY S. V., ESTEVEZ M. L.

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

A sulfated xylogalactomannan and several neutral xylan fractions were isolated from the red seaweed *Galaxaura squalida*. Xylans were shown by ¹³C-NMR spectroscopy and partial hydrolysis data to be a family of related linear polysaccharides with β 1→4 and β 1→3 linkages between D-xylopyranose residues. The structure of sulfated

polysaccharide was studied by methylation analysis before and after desulfation and by Smith degradation. Polysaccharide was shown to have a linear backbone built of β 1 \rightarrow 3-linked *D*-mannopyranose residues, every third of which being sulfated at position 4; single *D*-xylopyranose residues (approximately 3 residues in every pentasaccharide fragment of the backbone) are linked also at position 4 of mannopyranose residues; probably the same positions occupy the galactopyranose residues (predominantly *L*-isomer) found in the polysaccharide in minor amount. Thus, sulfated xylogalactomannan from *Galaxaura squalida* represents a new type of red algal polysaccharides.
