



УДК 577.114.5 : 582.273-119.2

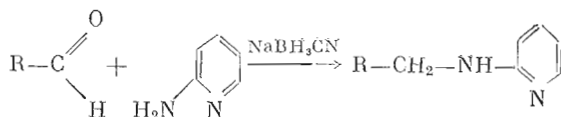
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОДУКТОВ РАСЩЕПЛЕНИЯ ГАЛАКТАНОВ  
КРАСНЫХ МОРСКИХ ВОДОРΟΣЛЕЙ В ВИДЕ  
ПИРИДИЛАМИНОПРОИЗВОДНЫХ

Усов А. И., Добкина И. М.

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

Показано, что пиридиламинопроизводные удобны для идентификации разнообразных продуктов расщепления галактанов красных водорослей. Реакция восстановительного аминирования 2-аминопиридином и цианоборгидридом натрия исследована на примере нескольких моносахаридов, обычных компонентов полисахаридных фракций красных морских водорослей, а также для каррабпозы, агаробпозы и олигосахаридов ряда пеоагаробпозы. Для разделения пиридиламинопроизводных использованы различные виды хроматографии и высоковольтный электрофорез на бумаге, а для структурной характеристики — спектроскопия ЯМР и масс-спектрометрия полных ацетатов.

Высокочувствительный метод анализа смесей олигосахаридов в виде пиридиламинопроизводных (ПАП) предложен Хази и сотр. [1, 2]. Основные достоинства этого подхода заключаются в следующем. Реакция получения ПАП представляет собой восстановительное аминирование альдегидной группы в присутствии 2-аминопиридина под действием цианоборгидрида натрия и протекает с восстанавливающими сахарами достаточно гладко:



Положительный заряд, придаваемый молекуле введенной ионогенной группировкой, позволяет использовать для выделения и идентификации этих производных такие эффективные методы, как ионообменная хроматография и электрофорез на бумаге (БЭ). Благодаря флуоресценции в УФ-свете ПАП можно обнаруживать на хроматограммах без обработки химическими реагентами. Кислотный гидролиз ПАП олигосахаридов дает возможность идентифицировать моносахаридный остаток, который в исходном олигосахариде располагался на восстанавливающем конце. В виде ТМС-эфиров ПАП пригодны для разделения с помощью ГЖХ [2], а в виде метиловых эфиров — для получения масс-спектров [1, 3]. Особенно привлекательным представляется анализ смеси ПАП методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), где с помощью ультрафиолетовых и в особенности флуоресцентных детекторов удается обнаруживать очень малые количества таких производных (до 0,1 пмоль [4]). ПАП применялись при исследовании углеводных составляющих ряда гликопротеинов [4–7], для определения ненасыщенных дисахаридов — продуктов ферментативного расщепления хондроитинсульфатов [8], а также для разделения и идентификации компонентов сложной смеси олигосахаридов, образующихся при расщеплении гепарина по реакции дезаминирования [9]. Целью настоящей работы является применение этого подхода для анализа продуктов расщепления галактанов красных морских водорослей.

Реакцию получения ПАП мы исследовали на примере *D*-глюкозы, *D*-галактозы, *D*-маннозы, *D*-ксилозы, 6-*O*-метил-*D*-галактозы и 3,6-ангидро-*D*-

Сокращения: ПАП — пиридиламинопроизводное, БЭ — электрофорез на бумаге.

Хроматографические и электрофоретические свойства ПАП моно- и олигосахаридов  
(подвижности относительно соответствующих производных *D*-галактозы)

Родоначальный углевод	ПАП			Ацетаты ПАП		ТМС-эфиры ПАП, ГЖХ, колонка 2	
	ВЭ *	БХ, система 1	ВЭЖХ, условия а	ГЖХ, колонка 2,	ВЭЖХ, условия б	230°	230° С
				240° С	условия б		
<i>D</i> -Ксилоза		1,2		0,56	0,62	0,45	
3,6-Ангидро- <i>D</i> -галактоза		1,08		0,57	0,62	0,6	
6-О-Метил- <i>D</i> -галактоза		1,18		0,71	0,88	0,8	
<i>D</i> -Галактоза	1	1 ( $R_{\text{cal}} 2,0$ )	1 (3,5 мин)	1 (13 мин)	1 (10,5 мин)	1 (9 мин)	1 (3,2 мин)
<i>D</i> -Глюкоза		1		1	0,83	1	
<i>D</i> -Манноза		1		1	1	1	
Агаробиоза	0,77		1,7				5,15
Каррабиоза	0,77		2,1				4,75
Неоагаробиоза	0,77		1,2				
Неоагаротетраоза	0,55		3,8				
Неоагарогексаоза	0,41		6,7				

\* По литературным данным [1], электрофоретическая подвижность ПАП олигосахаридов мало зависит от строения углеводной цепи и составляет 0,72 для ди-, 0,52 для тетра- и 0,46 для пентасахаридов.

галактозы — обычных моносахаридных компонентов полисахаридных фракций, выделяемых из красных водорослей [10]. Условия восстановительного ампирирования были аналогичны рекомендованным в литературе [2] и заключались в нагревании сахара с избытком 2-ампиопиридина и  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  в водно-метанольном растворе в присутствии уксусной кислоты. По окончании реакции смесь обрабатывали катионитом, который затем промывали водой и далее 0,6 М раствором аммиака. Было установлено, что в аммиачном элюате содержатся только продукт реакции и избыточный 2-ампиопиридин, а в водном — небольшие количества непрореагировавшего исходного моносахарида и продукта его прямого восстановления — полиола. Количественное определение этих веществ в водном элюате методом ГЖХ с инвизитом в качестве внутреннего стандарта позволило установить, что при применяемых условиях в реакцию восстановительного ампирирования вступает 85–95% исходного моносахарида.

Из ПАП моносахаридов были получены ТМС-эфиры, использованные для ГЖХ, и ацетаты — для ГЖХ, ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Было показано, что для полного ацетилирования ПАП необходимо нагревание в смеси уксусного ангидрида и пиридина при 400° С в течение 3 ч. Хроматографические свойства этих соединений приведены в табл. 1, из которой следует, что в примененных условиях комбинацией хроматографических методов можно разделить все исследованные ПАП моносахаридов, за исключением пары галактоза — манноза.

Как и ранее изученные ацетаты фенилозотриазолов [11, 12], ацетилированные ПАП моносахаридов оказались удобными для получения масс-спектров. Ионизация этих соединений под действием электронного удара приводит к образованию молекулярных ионов, надежно регистрируемых в спектрах, и набору фрагментов, происхождение которых легко объяснить по аналогии с масс-спектрометрической фрагментацией родственных соединений. Наиболее интенсивны пики ионов, образующихся в результате разрыва связей C1—C2 или C2—C3 и содержащих пиридиновое кольцо; главным пиком спектра во всех случаях является пик с  $m/z$  107. Большинство вторичных ионов образуется из первичных в результате последовательного отщепления уксусной кислоты или кетена (см. схему 1 и табл. 2). Наличие 3,6-ангидроцикла, как и в случае ацетатов фенилозотриазолов [12], существенно упрощает масс-спектр. Такой характер фрагментации позволяет по масс-спектрам легко отличать друг от друга производные гексоз, их О-метиловых эфиров, пентоз и 3,6-ангидрогалактозы; в то же время этот подход мало чувствителен к стереохимическим

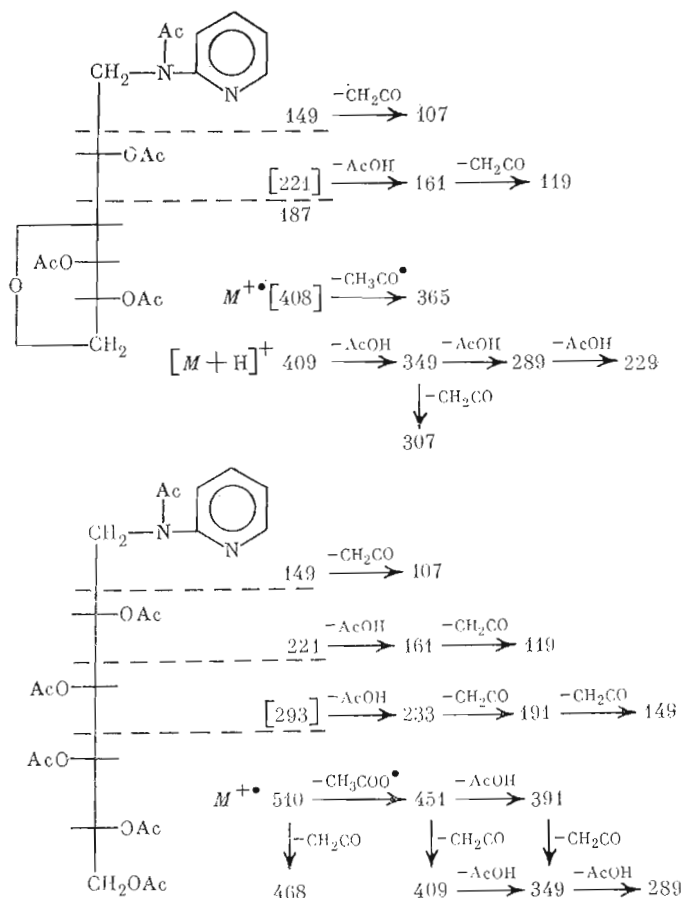


Схема 1. Происхождение некоторых пиков в масс-спектрах ацетилированных ПАП 3,6-ангидро-*D*-галактозы и *D*-галактозы

различиям, так что масс-спектры ацетилированных ПАП галактозы, глюкозы и маннозы практически идентичны.

Далее были изучены способы получения и свойства ПАП ряда олигомерных продуктов расщепления галактанов красных водорослей. При ферментативном гидролизе агара под действием  $\beta$ -агаразы из *Pseudomonas atlantica* [13] были получены неоагаробиоза (3,6-ангидро- $\alpha$ -*L*-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-*D*-галактоза) и два высших олигосахарида этого ряда, неоагаротетраоза (3,6-ангидро- $\alpha$ -*L*-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -*D*-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-ангидро- $\alpha$ -*L*-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-*D*-галактоза) и неоагарогексаоза. ПАП этих олигосахаридов использованы для определения степени полимеризации методом БЭ при pH 5 [1] и для разделения с помощью ВЭЖХ. Как видно из табл. 1, электрофоретические подвижности полученных соединений удовлетворительно совпадают с литературными данными для ПАП олигосахаридов с той же степенью полимеризации (несколько большие численные значения подвижности обусловлены, вероятно, присутствием остатков 3,6-ангидрогалактозы). Смесь ПАП неоагаро-олигосахаридов хорошо разделяется с помощью ВЭЖХ в условиях, рекомендованных в работе [4], что можно использовать и для идентификации, и для препаративного получения этих соединений.

Как известно, при кислотном расщеплении в отличие от действия  $\beta$ -агаразы наиболее лабильны гликозидные связи остатков 3,6-ангидрогалактозы. Агаробиоза (4- $O$ - $\beta$ -*D*-галактопиранозил-3,6-ангидро-*L*-галактоза) и каррабиоза (4- $O$ - $\beta$ -*D*-галактопиранозил-3,6-ангидро-*D*-галактоза) были получены частичным метанолизом агара и  $\kappa$ -каррагинана соответственно с

Масс-спектры ацетилированных ПАП моно- и олигосахаридов  
Приведены интенсивности пиков в %

m/z	Родоначальный углевод					
	3,6-ангидро- D-галактоза	D-Ксилоза	6-О-Метил- D-галактоза	D-Галактоза	Агаробиоза	Каррабиоза
107	100	100	100	100	91	100
108		12,5	5	8,2		
119	30	28	12,6	22	32	60
121	10	100	6	7,5	10	21
136		52	2,7	2,8		
137	11	11	3,2	4,7	20	52
145				2,0		
149	7	14,5	13	14		
161	66	44	31	50	100	91
162		5,3	3,0	5,1		
169					24	54
187	16		2,1	3,3	20	33
191		15	5,7	10		
203		1,9	1,0	1,6		
229	8			1,2	34	97
233		4,7	1,7	2,5		
245				1,0		
247					21	55
261			1,6			
262				1,4		
277		5,6				
279			1,4			
287				0,3		
289	13			1,3	100	93
290					20	60
293		2,9				
305				1,3		
307	4				1,5	8
321			2,0			
331					13	38
336		1,3				
337		5,4				
349	3			3,2	13	44
353		2,3				
363			2,0			
365	1,5					
378		1,3				
379		1,5				
380			1,2			
391				2,5		
395		1,3			14	55
396		1,6				
407				0,75		
409	0,8[M+H] <sup>+</sup>		0,3	0,75		
410				1,0		
423			0,7			
425				1,4		
437		0,3				
438		0,4 [M] <sup>+</sup>				
439			0,4			
440			0,4			
450			0,2			
451				0,3		
451				1,3		
467				0,75		
468				1,0		
475					1,2	3
482			0,2 [M] <sup>+</sup>			
509				0,4		
510				0,4 [M] <sup>+</sup>		
535					1,5	2,8
577					2	8
595					2	5
637					4	10,4
654					0,8	2,8
697					0,5 [M+H] <sup>+</sup>	0,8 [M+H] <sup>+</sup>

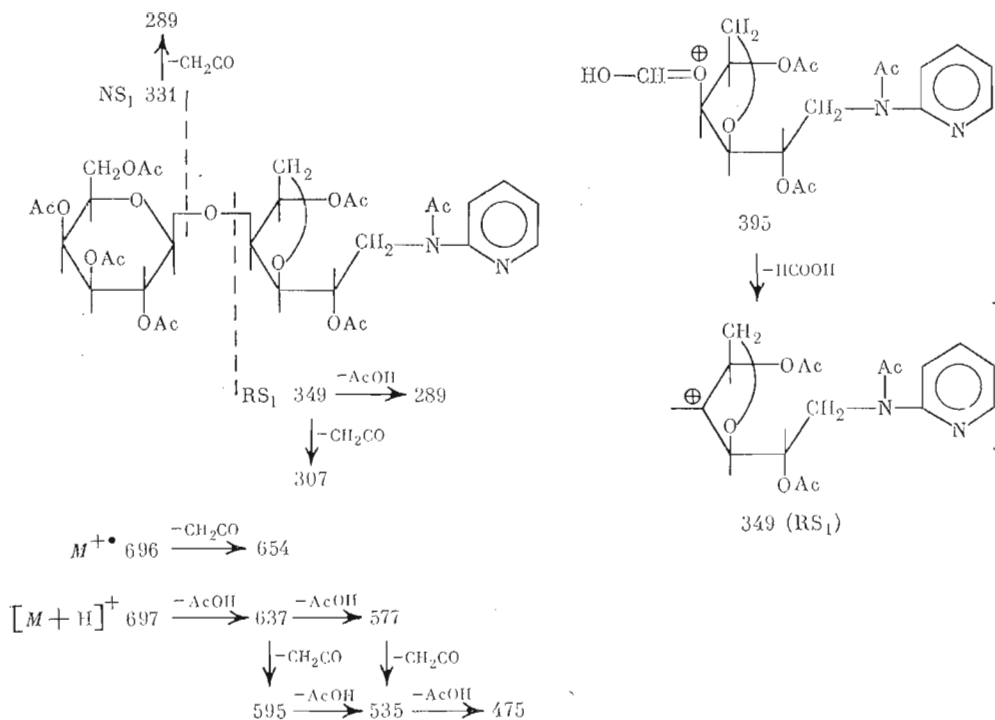


Схема 2. Происхождение некоторых пиков в масс-спектре ацетилированного ПАП каррабиозы

последующим мягким гидролизом образующихся первоначально диметил-ацеталей этих дисахаридов. При обработке агаробиозы и каррабиозы 2-аминопиридином и  $NaBH_3CN$  в обычных условиях оказалось, что в аммиачном элюате кроме целевого содержится ряд побочных продуктов, поглощающих в ультрафиолете. Понижение температуры реакции до комнатной и увеличение времени до 24 ч позволило в значительной степени исключить протекание побочных процессов, причем доля дисахарида, не вступившего в реакцию восстановительного аминирования, не превышала 10%. ПАП дисахаридов были очищены препаративной БХ; в качестве продуктов их кислотного гидролиза были идентифицированы галактоза и ПАП 3,6-ангидрогалактозы. ПАП этой пары дисахаридов обладают электрофоретической подвижностью, характерной для производных других дисахаридов (ср. [1]), а хроматографические свойства позволяют надежно отличать их друг от друга (табл. 1).

Масс-спектры ацетилированных ПАП агаробиозы и каррабиозы содержат один и тот же набор пиков и несколько различаются только их интенсивностью. В области высоких масс наблюдается достаточно интенсивный пик иона  $[M+H]^+$  с  $m/z$  697, а также пики фрагментов с  $m/z$  654, 637, 595, 577, 535 и 475, которые образуются из молекулярного иона при отщеплении одной или нескольких молекул уксусной кислоты или кетена. Природа невозстанавливающего конечного моносахаридного остатка следует из пика иона  $NS_1$  (обозначения, как в работах [11, 12]) с  $m/z$  331, который является родоначальником обычной серии фрагментов (схема 2). Строение модифицированного восстанавливающего конца ПАП дисахарида вытекает из наличия пика фрагмента  $RS_1$  с  $m/z$  349 и пиков фрагментов, связанных с его образованием ( $m/z$  395) и дальнейшим распадом (схема 2).

Ценную информацию о строении ПАП можно получить также из спектров ядерного магнитного резонанса. Мы исследовали спектры  $^1H$  и  $^{13}C$ -ЯМР ПАП 3,6-ангидро-*D*-галактозы, агаробиозы и каррабиозы. Сигналы в протонных спектрах были интерпретированы с помощью методики се-

Химические сдвиги сигналов (м. д. от ТМС) в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР  
ПАП 3,6-ангидро-*D*-галактозы, агаробиозы и каррабиозы

Соединение	Остаток	Атом углерода					
		1	2	3	4	5	6
ПАП 3,6-ангидро- <i>D</i> -галактозы	2-Пиридил		159,3	110,4	140,0	114,4	147,0
	1-Амино-1-дезоксигидро- <i>D</i> -дульцит	45,6	70,6	86,8	77,9	79,4	73,8
ПАП агаробиозы	2-Пиридил		159,4	110,6	140,4	114,6	147,0
	1-Амино-1-дезоксигидро- <i>L</i> -дульцит	46,0	70,3	85,7	86,8	76,6	74,2
	$\beta$ - <i>D</i> -Галактозил	103,6	72,0	73,9	69,7	76,4	62,0
ПАП каррабиозы	2-Пиридил		159,2	110,8	140,4	114,6	146,8
	1-Амино-1-дезоксигидро- <i>D</i> -дульцит	45,6	70,6	85,2	88,1	76,9	73,9
	$\beta$ - <i>D</i> -Галактозил	104,3	71,9	73,9	69,7	76,5	62,2

лективного гомоядерного двойного резонанса  $\text{H}_i - \{\text{H}_j\}$  в ее обычном или разностном варианте. Отнесение сигналов в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР было выполнено с применением методики селективного гетероядерного двойного резонанса  $\text{C}_i - \{\text{H}_j\}$ . С точки зрения структурной характеристики ПАП агаробиозы и каррабиозы особенно наглядны спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (табл. 3). Четкие различия в положении сигнала  $1'\text{-C}$  концевого невосстанавливающего остатка *D*-галактозы и практически всех сигналов *C*-атомов модифицированного концевого восстанавливающего остатка (в соответствии с известной зависимостью эффектов гликозилирования от абсолютной конфигурации агликона [14, 15]) позволяют, как и в случае соответствующих полисахаридов [16, 17], надежно определять абсолютную конфигурацию остатка 3,6-ангидрогалактозы в исходном дисахариде.

Суммируя все полученные данные, можно рекомендовать ПАП в качестве удобных производных для разделения и структурной характеристики разнообразных продуктов расщепления галактанов красных морских водорослей.

### Экспериментальная часть

Аналитическую БХ выполняли нисходящим способом на бумаге Filtrak FN-11 (ГДР) в системах растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3 (система 1), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 2 (система 2), метилэтилкетон — уксусная кислота — насыщ. водн.  $\text{H}_2\text{BO}_3$ , 9 : 1 : 1 (система 3). Препаративную БХ проводили на бумаге Whatman 3MM (Англия) в системе 1, высоковольтный БЭ — на приборе Shandon L-24 (Англия) на бумаге Filtrak FN-11 в буфере пиридин — уксусная кислота — вода, 45 : 30 : 900, pH 5,0, при 40 В/см в течение 1,5—2 ч. ТСХ осуществляли на пластинках с целлюлозным порошком Filtrak FND (ГДР) в системах 1 и 2 и на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР) в системах пропанол — вода — конц.  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 30 : 10 : 5 (система 4), хлороформ — метанол — вода, 10 : 8 : 2 (система 5) и хлороформ — ацетон, 9 : 1 (система 6). Зоны ПАП и их ацетатов обнаруживали по флуоресценции в УФ-свете. Восстанавливающие сахара на бумаге и на пластинках с целлюлозой обнаруживали анилинфталатом, 3,6-ангидросахара — *o*-аминофеиольным реагентом [18], невосстанавливающие сахара —  $\text{AgNO}_3$  и  $\text{KOH}$  после периодатного окисления [19]. ВЭЖХ проводили на хроматографе Altex 332 (США), снабженном спектрофотометрическим детектором Knauer (рабочая длина волны 254 нм), колонка Altech C-18 (10 мкм,  $25 \times 0,46$  см), элюенты — 0,1 М фосфатный буфер, pH 3,8, содержащий 0,1% *n*-бутанола (условия а) [4], и 50% водный метанол (условия б). ГЖХ проводили на хроматографе Pye 104 (Англия) с пламенно-ионизационным детектором; колонка 1 : 3% ECNSS-M на хромосорбе Q при 185° С, колонка 2 : 3% OV-1 на диатомите

С, 230, 240 или 260° С; скорость азота 50 мл/мин. ТМС-производные ПАП для ГЖХ получали действием N,O-бис-триметилсилилтрифторацетамида в ацетонитриле [20]. Ацетаты ПАП получали при нагревании со смесью пиридин — уксусный ангидрид, 2:1, в течение 3 ч при 190° С; для масс-спектрометрии ацетаты ПАП очищали препаративной ТСХ в системе 6. Масс-спектры измеряли на приборе М-80 А (Hitachi, Япония) с прямым вводом образца в ионный источник, температура ионизационной камеры 200° С, энергия ионизирующих электронов 70 эВ. Спектры ЯМР получали на спектрометре Bruker WM-250 (ФРГ) с рабочей частотой по протонам 250 МГц, по углероду 62,9 МГц, для растворов веществ в D<sub>2</sub>O при 40° С; внутренний стандарт для протонных спектров — ацетон, 2,24 м.д., для углеродных спектров — метанол, 50,1 м.д. УФ-спектры снимали на приборе Specord UV-VIS (ГДР).

*Получение ПАП моносахаридов.* 100 мг D-глюкозы растворяли в 0,1 мл воды и прибавляли раствор 300 мг 2-аминопиридина, 50 мг NaBH<sub>3</sub>CN и 10 мкл уксусной кислоты в 1,6 мл метанола. Реакционную смесь нагревали в запаянной ампуле 6 ч при 75° С, охлаждали, прибавляли дауэкс 50 (H<sup>+</sup>) до pH 3 и выдерживали несколько часов. Смолу промывали водой (150 мл) и продукт элюировали 0,6 М NH<sub>3</sub>OH (100 мл). Аммиачный элюат упаривали досуха, остаток перекристаллизовывали из метанола, промывали эфиром и сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, получали ПАП D-глюкозы с выходом 78%. Вещество хроматографически индивидуально при БХ в системах 1 и 2, при ТСХ в системах 4 и 5; т. пл. 176° С, УФ-спектр: λ<sub>max</sub> 234 и 305 нм (pH 1), 237 и 295 нм (pH 10). Найдено, %: С 51,10, Н 6,66, N 11,27. C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Вычислено, %: С 51,15, Н 7,03, N 10,85. (По лит. данным [2], т. пл. 173–174° С (из воды), УФ-спектр: λ<sub>max</sub> 234 и 305 нм (pH 1), 237 и 295 нм (pH 10).)

Аналогично получали ПАП D-галактозы (т. пл. 169–170° С), D-маннозы (т. пл. 186° С) и 6-О-метил-D-галактозы (т. пл. 170–171° С): выходы после перекристаллизации 40–80%. В остальных случаях остаток после упаривания аммиачного элюата растворяли в воде и многократно экстрагировали эфиром, контролируя удаление 2-аминопиридина с помощью ТСХ в системе 4; после упаривания водных растворов и высушивания остатка над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> получали сиропообразные ПАП D-ксилозы с выходом 91% и 3,6-ангидро-D-галактозы с выходом 83%, <sup>1</sup>H-ЯМР (δ, м.д., J, Гц): 1А-Н (3,39, дд, 1Н, J<sub>1А,1В</sub> 13,5, J<sub>1А,2</sub> 7,5), 1В-Н (3,53, дд, 1Н, J<sub>1В,2</sub> 4,5), 2-Н (4,02, дт, 1Н, J<sub>2,3</sub> 4,3), 3-Н (3,81, т, 1Н, J<sub>3,4</sub> 4,3), 4-Н (4,18, дд, 1Н, J<sub>4,5</sub> 2,5), 5-Н (4,27, м, 1Н, J<sub>5,6А</sub> 4,4, J<sub>5,6В</sub> 2,5), 6А-Н (4,03, дд, 1Н, J<sub>6А,6В</sub> 9,7), 6В-Н (3,88, дд, 1Н).

Водные растворы, полученные при обработке реакционных смесей катионитом и промывке катионита водой, концентрировали и с помощью БХ в системе 3 обнаруживали непрореагировавший моносахарид и соответствующий ему полиол. Количественное определение моносахарида проводили в аликвоте раствора спектрофотометрическим методом по реакции с фенолом и конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [21]; в другой аликвоте прибавляли известное количество инозита, восстанавливали NaBH<sub>4</sub>, ацетилювали и определяли содержание ацетата полиола методом ГЖХ на колонке 1 [22].

*Получение диметилацеталей агаробиозы и каррабиозы.* Частичный метанолиз бактоагара Дифко проводили по методике [23], а кашпа-каррагинана (Sigma) — как описано в работе [24]. Диметилацетали дисахаридов выделяли препаративной БХ.

*Получение ПАП агаробиозы и каррабиозы.* 110 мг диметилацетала агаробиозы гидролизovali, нагревая с 5 мл 0,01 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 ч при 100° С, раствор нейтрализовали BaCO<sub>3</sub> и упаривали досуха. Остаток растворяли в 0,3 мл воды и прибавляли раствор 250 мг 2-аминопиридина, 50 мг NaBH<sub>3</sub>CN и 10 мкл уксусной кислоты в 1,6 мл метанола. Реакционную смесь выдерживали 24 ч при комнатной температуре, прибавляли дауэкс 50 (H<sup>+</sup>) до pH 3, выдерживали 1 ч и переносили на колонку (1×3 см) с той же смолой. Колонку промывали водой, а затем 0,6 М NH<sub>3</sub>OH, аммиачный элюат упаривали досуха, остаток промывали эфиром и очищали препаративной БХ, получали ПАП агаробиозы, выход 40%, сироп,

$^1\text{H}$ -ЯМР ( $\delta$ , м.д.,  $J$ , Гц): 1А-Н (3,42, дд, 1Н,  $J_{1\text{A}, 1\text{B}}$  13,5,  $J_{1\text{A}, 2}$  7,5), 1В-Н (3,56, дд, 1Н,  $J_{1\text{B}, 2}$  4,5), 2-Н (4,11, дт, 1Н,  $J_{2, 3}$  4,5), 3-Н (3,97, т, 1Н,  $J_{3, 4}$  4,3), 4-Н (4,39, дд, 1Н,  $J_{4, 5}$  2,5), 5-Н (4,45, м, 1Н,  $J_{5, 6\text{A}}$  4,4,  $J_{5, 6\text{B}}$  2,7), 6А-Н (4,04, дд, 1Н,  $J_{6\text{A}, 6\text{B}}$  9,8), 6В-Н (3,91, дд, 1Н), 1'-Н (4,59, д, 1Н,  $J_{1', 2'}$  7,5), 2'-Н (3,56, дд, 1Н,  $J_{2', 3'}$  9,5), 3'-Н (3,67, дд, 1Н,  $J_{3', 4'}$  3,4), 4'-Н (3,94, д,  $J_{4', 5'} < 1$ ), 5'-Н, 6'-А-Н, 6'-В-Н (3,70, м, 3Н).

Аналогично получали ПАП каррабиозы, выход 40%, сироп,  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\delta$ , м.д.,  $J$ , Гц): 1А-Н (3,42, дд, 1Н,  $J_{1\text{A}, 1\text{B}}$  13,5,  $J_{1\text{A}, 2}$  7,0), 1В-Н (3,54, дд, 1Н,  $J_{1\text{B}, 2}$  4,5), 2-Н (4,05, м, 1Н), 3-Н (3,98, т, 1Н,  $J_{3, 4}$  4,5), 4-Н (4,23, дд, 1Н,  $J_{4, 5}$  2,5), 5-Н (4,52, м, 1Н,  $J_{5, 6\text{A}}$  5,0,  $J_{5, 6\text{B}}$  3,0), 6А-Н (4,04, дд, 1Н,  $J_{6\text{A}, 6\text{B}}$  9,7), 6В-Н (3,89, дд, 1Н), 1'-Н (4,46, д, 1Н,  $J_{1', 2'}$  7,0), 2'-Н (3,56, дд, 1Н,  $J_{2', 3'}$  9,4), 3'-Н (3,62, дд, 1Н,  $J_{3', 4'}$  2,8), 4'-Н (3,92, д, 1Н,  $J_{4', 5'} < 1$ ), 5'-Н (3,65, дд, 1Н,  $J_{5', 6'\text{A}}$  4,2), 6'-А-Н (3,81, дд, 1Н,  $J_{6'\text{A}, 6'\text{B}}$  11,2), 6'-В-Н (3,73, дд, 1Н,  $J_{5', 6'\text{B}}$  5,7).

*Получение ПАП неагаро-олигосахаридов.* Раствор бактоагара Дифко обрабатывали агарозой (Calbiochem) как описано в работе [25]. Образующуюся смесь неагаро-олигосахаридов разделяли препаративной БХ и переводили в ПАП в условиях, описанных выше для агаробиозы. В отдельном опыте в тех же условиях в реакцию восстановительного аминирования вводили смесь продуктов ферментализации без предварительного разделения. Подвижности полученных ПАП при БЭ и ВЭЖХ см. в табл. 1.

Авторы выражают глубокую признательность канд. хим. наук В. Л. Садовской за съемку масс-спектров и д-ру хим. наук А. С. Шашкову за получение спектров ЯМР.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1978, v. 85, № 1, p. 257-263.
2. Hase S., Hara S., Matsushima Y. *J. Biochem.*, 1979, v. 85, № 1, p. 217-220.
3. Reinhold V. N., Coles E., Carr S. A. *J. Carbohydr. Chem.*, 1983, v. 2, № 1, p. 1-18.
4. Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y. *J. Biochem.*, 1981, v. 90 № 2, p. 407-414.
5. Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y. *J. Biochem.*, 1979, v. 85, № 4, p. 989-994.
6. Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y. *J. Biochem.*, 1979, v. 85, № 4, p. 995-1002.
7. Hase S., Ibuki T., Ikenaka T. *J. Biochem.*, 1984, v. 95, № 1, p. 197-203.
8. Kodama C., Ototani N., Isemura M., Yosizawa Z. *J. Biochem.*, 1984, v. 96, № 4, p. 1283-1287.
9. Kosakai M., Yosizawa Z. *J. Biochem.*, 1982, v. 92, № 1, p. 295-303.
10. Усов А. И. *Успехи биол. химии*, 1979, т. 20, с. 169-191.
11. Chizhov O. S., Kochetkov N. K., Malysheva N. N., Shiyonok A. I., Chashchin V. L. *Org. Mass Spectrometry*, 1971, v. 5, № 10, p. 1145-1155.
12. Усов А. И., Иванова Е. Г. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 9, с. 1372-1378.
13. Duckworth M., Yaphe W. *Carbohydr. Res.*, 1971, v. 16, № 3, p. 435-445.
14. Seo S., Tomita Y., Tori K., Yoshimura Y. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1978, v. 100, № 11, p. 3331-3339.
15. Шашков А. С., Усов А. И., Книрель Ю. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 9, с. 1364-1371.
16. Яроцкий С. В., Шашков А. С., Усов А. И. *Биоорган. химия*, 1977, т. 3, № 8, с. 1135-1137.
17. Usov A. I. *Bot. Mar.*, 1984, v. 27, № 5, p. 189-202.
18. Hirase S., Araki S., Nakanishi S. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1953, v. 26, № 1, p. 183-184.
19. Усов А. И., Рехтер М. А. *Ж. общ. химии*, 1969, т. 39, № 4, с. 912-913.
20. Oshima R., Kumamoto J., Watanabe C. *J. Chromatogr.*, 1983, v. 259, № 1, p. 159-163.
21. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. *Anal. Chem.*, 1956, v. 28, № 3, p. 350-356.
22. Слонекер Дж. В сб.: *Методы исследования углеводов*. Пер. с англ. под ред. Хорлиха А. Я. М.: Мир, 1975, с. 22-25.
23. Araki S., Hirase S. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1954, v. 27, № 2, p. 109-112.
24. Painter T. J. *J. Chem. Soc.*, 1964, № 4, p. 1396-1400.
25. Усов А. И., Иванова Е. Г. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 7, с. 1060-1068.

Поступила в редакцию  
1.11.1985



IDENTIFICATION OF VARIOUS CLEAVAGE PRODUCTS OF RED SEAWEED  
GALACTANS IN THE FORM OF PYRIDYLAMINO DERIVATIVES

USOV A. I., DOBKINA I. M.

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

Pyridylamino derivatives have been shown convenient for identification of various cleavage products of red seaweed galactans. The reductive amination reaction with 2-aminopyridine and sodium cyanoborohydride was investigated for several monosaccharides (components of polysaccharide fractions usually obtained from red seaweeds), carabiose, agarobiose and oligosaccharides of neoagarobiose series. Various kinds of chromatography and high-voltage paper electrophoresis were used for separation of the pyridylamino derivatives, which were structurally characterized by NMR and mass-spectrometry of their peracetates.