

УДК 547.458+543.422.25

К. ТРУУС, Т. ВЯЛИМЯЭ, Мерике ВАХЕР, А. КОЛЛИСТ

ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ АГАРОНОСНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

9. ^{13}C ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ АГАРОЗНЫХ НОСИТЕЛЕЙ

(Представил Ю. Лилле)

В последние два десятилетия интерес к агарозным носителям постоянно нарастал и, несомненно, такая тенденция сохранится и в будущем [1]. Широкое применение агарозных сорбентов в ряде биохимических методик объясняется главным образом их уникальной гелеобразующей способностью, сетевой структурой геля и инертностью базисного полисахарида.

«Идеальная» матрица агарозы (рис. 1) представляет собой линейный гетерополисахарид, состоящий из чередующихся остатков *D*-галактозы и 3,6-ангидро-*L*-галактозы, соединенных между собой β (1 \rightarrow 4)- и α (1 \rightarrow 3)-связями, и имеющий молекулярную массу около $1,2 \cdot 10^5$. Однако реальная структура этого полисахарида красных морских водорослей всегда несколько отличается от «идеальной», поскольку она зависит от биологических особенностей используемого сырья (вида водоросли, среды обитания и климатических условий), технологии извлечения и очистки. Поэтому важные макроскопические показатели агарозных носителей (прочность геля, электрофоретические характеристики), которые интегрально отражают порой незначительные и фрагментарные отклонения в структуре, довольно сильно расходятся.

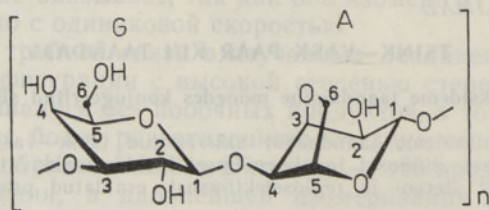


Рис. 1. Элементарное звено «идеальной» матрицы агарозы.

Плодотворное исследование водорослевых полисахаридов спектроскопией ЯМР ^{13}C началось в конце 70-х годов с появлением высокоразрешающих приборов [2–5]. Общие принципы и выводы по интерпретации ^{13}C ЯМР-спектров гелеобразующих полигалактанов сформулированы в 80-е годы [6, 7]. Тогда же появились первые работы по исследованию коммерческих образцов агарозы [8–10].

Сравнительное ^{13}C ЯМР-исследование агарозных носителей развито пока слабо, а извлечение полисахаридов из водорослей перед снятием спектров иногда существенно отличается от промышленной технологии получения агарозы [11]. Поскольку ^{13}C ЯМР-спектроскопия часто выявляет тонкие различия в структуре полисахаридов [7, 12], исследования с ее помощью представляют значительный интерес для сравнительного

изучения коммерческих препаратов агарозы. Но в литературе встречаются значительные расхождения в результатах разных авторов (табл. 1).

Таблица 1

Химические сдвиги относительно тетраметилсилана основных сигналов в ^{13}C ЯМР-спектрах агарозы разного происхождения по литературным данным, м. д.

Атом углерода повторяющегося звена*	Образцы		
	коммерческие и модифицированные (LITEX, Дания) [8]	коммерческие («D. Gelatine Ltd», Новая Зеландия) и специально приготовленные [10]	полученные по специальной лабораторной методике [11]
G1	102,2	102,8	102,4—102,6**
G2	70,0	70,9	70,1
G3	81,9	82,5—82,7	82,2
G4	68,6—68,8**	69,2	68,4—68,6**
G5	73,3—75,1**	76,0	73,0—75,6**
G6	61,2—71,5**	61,9	61,4—71,8**
A1	97,9	98,6	98,4
A2	69,7	70,4	69,8
A3	} 75,4—79,9	77,7—77,8	80,1
A4		80,5	77,4
A5		76,0	75,6
A6		69,7	69,3

* Обозначения согласно рис. 1 (здесь и в табл. 2).

** В зависимости от заместителя в положении G6.

Экспериментальная часть

Исследованию были подвергнуты три образца: 1) агароза фирмы LKB (Швеция), среднего электроэндоосмоса; 2) агароза Опытного завода органического синтеза и биопрепаратов Института химии АН ЭССР (Таллин) из красных водорослей *Ahnfeltia tobuchiensis* (залив Измены, о-в Кунашир, Курильские о-ва); 3) агароза фирмы «Sigma», тип I (США).

Таблица 2

Основные сигналы в ^{13}C ЯМР-спектрах коммерческих препаратов агарозы, м. д.

Атом углерода повторяющегося звена	Агароза фирмы LKB	Агароза Опытного завода Института химии АН ЭССР	Агароза фирмы «Sigma»
G1	102,08	102,07	102,07
G2	69,98	69,98	69,99
G3	81,93	81,92	81,93
G4	68,52	68,52	68,53
G5	75,10	75,09	75,10
G6	61,20	61,20	61,20
A1	98,06	98,05	98,05
A2	69,55	69,55	69,56
A3	79,77	79,77	79,77
A4	77,04	77,04	77,04
A5	75,25	75,25	75,25
A6	69,06	69,05	69,07

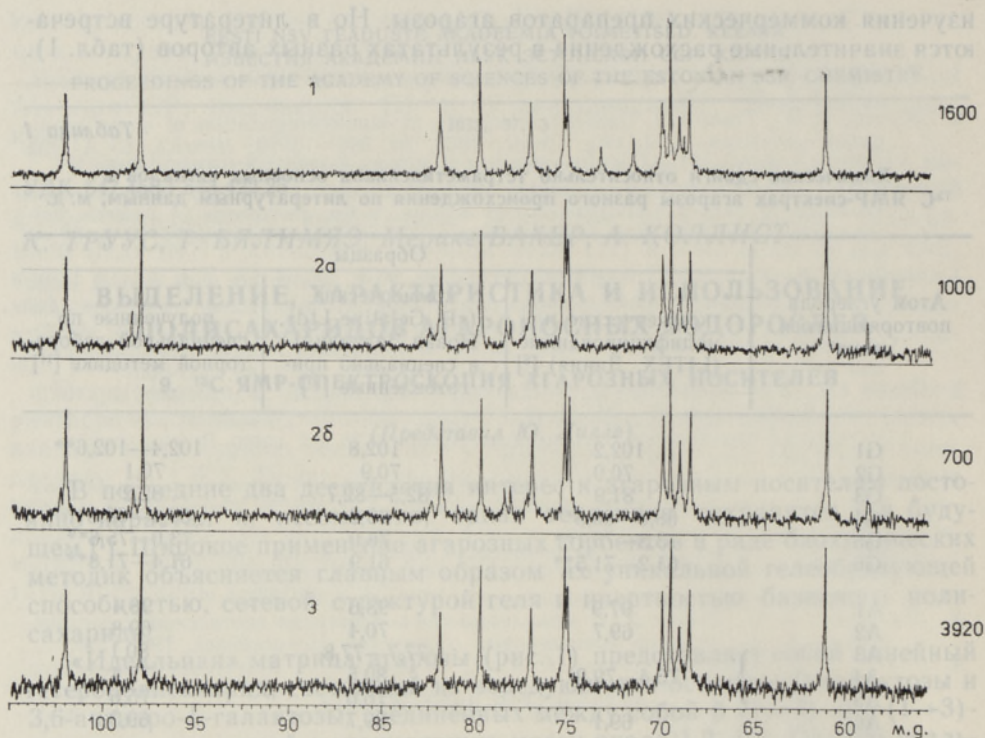


Рис. 2. Спектры ^{13}C ЯМР препаратов агарозы фирмы LKB (1), Опытного завода органического синтеза и биопрепаратов Института химии АН ЭССР (2а — при 323 К, 2б — при 343 К), фирмы «Sigma» (3). Рядом со спектром приведено число сканирований.

Содержание метоксильных групп в этих трех образцах, определенное по классической методике [13] с применением стандартного прибора [14], составляло 3,9, 2,2 и 0,9% соответственно.

Спектроскопией ЯМР исследовали также агар (или агар-агар) из той же производственной партии, из которой получен 2-й образец агарозы.

Все образцы исследовали в виде 4%-ных жидких растворов в обычной воде при температуре 323 К (образец 2 еще и при 343 К). Спектры снимали на спектрометре AM-500 фирмы «Bruker» (ФРГ) в режиме полной развязки от протонов при 125,76 МГц. Длительность измерительного импульса 8 мкс (33°), время ожидания между импульсами 2 с.

Сравнение спектров (рис. 2, табл. 2) свидетельствует о хорошем совпадении (в пределах $\pm 0,01$ м.д.) основных 12 сигналов, принадлежащих атомам углерода повторяющегося звена (рис. 1).

Обсуждение результатов

Характерные особенности структуры индивидуальных носителей, выявленные на основе спектров, заключаются в следующем (рис. 2).

1. Агароза фирмы LKB отличается содержанием метоксильных групп в шестом положении *D*-галактозного остатка G6 (сигналы 58,80, 71,53 и 73,27 м.д.) и малым содержанием метоксилов во втором положении 3,6-ангидро-*L*-галактозного остатка A2 (сигналы при 78,16 и 78,38 м.д.).

2. Агароза Опытного завода Института химии АН ЭССР отличается содержанием метоксильных групп во втором положении 3,6-ангидро-*L*-галактозного остатка A2 (сигналы 58,93, 78,17 и 78,14 м.д.), в остальных положениях углерода метоксилирование практически отсутствует.

3. Агароза фирмы «Sigma» наиболее близка к «идеальной» структуре: метоксилирование практически отсутствует (в пределах чувствительности метода) во всех положениях углерода.

Сравнение спектров 2а и 2б (рис. 2) показывает, что увеличение числа сканирований позволяет, без существенного ущерба качеству спектра, понизить температуру образца.

Таким образом, на примере настоящих данных можно очертить границы чувствительности и применимости метода ^{13}C ЯМР в исследованиях агарозной матрицы. Предел варьирования в значениях основных сигналов ($\pm 0,01$ м.д.) указывает на возможность устранения расхождений в результатах.

В случае агара (промежуточного продукта получения агарозы), представляющего собой смесь линейного агарозного компонента и более низкомолекулярного порфирана (агаропектина), в спектре появляются дополнительные интенсивные сигналы при 62,94 и 72,41 м.д. (рис. 3). Отсутствие этих пиков в спектре агарозы, полученной из агара той же партии, указывает на полное извлечение низкомолекулярного компонента и, следовательно, на однородность получаемого агарозного препарата.

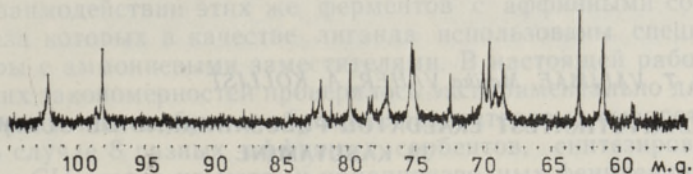


Рис. 3. Спектр ^{13}C ЯМР агара (из водорослей *Ahnfeltia tobuchiensis*, 4%-ный водный раствор при 323 К, число сканирований — 21 200).

Таким образом, ^{13}C ЯМР-спектроскопия является надежным и удобным методом для исследования существенных различий в структуре и качестве агарозных носителей.

Выражаем глубокую признательность А. И. Усову и А. С. Шашкову (Институт органической химии АН СССР им. Н. Д. Зелинского) за ценные советы по интерпретации спектров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Усов А. И. Полисахариды красных морских водорослей. — В кн.: Прогресс химии углеводов. М., 1985, 77—96.
2. Яроцкий С. В., Шашков А. С., Усов А. И. Анализ спектров ^{13}C -ЯМР некоторых галактанов красных водорослей. — Биоорганическая химия, 1977, 3, № 8, 1135—1137.
3. Шашков А. С., Усов А. И., Яроцкий С. В. Полисахариды водорослей. XXIV. Применение спектроскопии ^{13}C -ЯМР для анализа структуры полисахаридов группы агара. — Биоорганическая химия, 1978, 4, № 1, 74—81.
4. Hamer, G. K., Bhattacharjee, S. S., Yaphe, W. Analysis of the enzymic hydrolysis products of agarose by ^{13}C -n.m.r. spectroscopy. — Carbohydr. Res., 1977, 54, C7—C10.
5. Bhattacharjee, S. S., Yaphe, W., Hamer, G. K. ^{13}C -N.m.r. spectroscopic analysis of agar, κ -carrageenan and ι -carrageenan. — Carbohydr. Res., 1978, 60, C1—C3.
6. Usov, A. I., Yarotsky, S. V., Shashkov, A. S. ^{13}C -NMR spectroscopy of red algal galactans. — Biopolymers, 1980, 19, N 5, 977—990.
7. Чижов О. С., Шашков А. С. Масс-спектрометрия и ЯМР-спектроскопия в установлении структуры полисахаридов. — В кн.: Прогресс химии углеводов. М., 1985, 30—54.

8. Nicolaisen, F. M., Meyland, I., Schaumburg, K. ^{13}C NMR spectra at 67.9 MHz of aqueous solutions of agarose and partly 6-0-methylated agarose at 95 °C. — *Acta Chem. Scand.*, 1980, **B34**, N 2, 103—107.
9. Nicolaisen, F. M., Meyland, I., Schaumburg, K. ^{13}C NMR spectra at 67.9 MHz of aqueous agarose solutions and gels. — *Acta Chem. Scand.*, 1980, **B34**, N 8, 579—583.
10. Brasch, D. I., Chaw-Teo Chuan, Melton, L. D. A ^{13}C N.M.R. study of some agar-related polysaccharides from New Zealand seaweeds. — *Austral. J. Chem.*, 1981, **34**, N 5, 1095—1105.
11. Usov, A. I., Ivanova, E. G., Shashkov, A. S. Polysaccharides of algae. XXXIII. Isolation and ^{13}C -NMR spectral study of some new gel-forming polysaccharides from Japan Sea red seaweeds. — *Bot. marina*, 1983, **26**, N 6, 285—294.
12. Рот Г.-К., Келлер Ф., Шнайдер Х. Радиоспектроскопия полимеров. М., 1987, 5—380.
13. Черонис Н. Д., Ма Т. С. Микро- и полумикрометоды органического функционального анализа. М., 1973, 517—521.
14. Steyermark, A. *et al.* Report on recommended specifications for microchemical apparatus. Alkoxy. — *Anal. Chem.*, 1956, **28**, N 1, 112—115.

Институт химии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
21/III 1988

Институт химической и биологической физики
Академии наук Эстонской ССР

K. TRUUS, T. VÄLIMÄE, Merike VAHER, A. KOLLIST

AGARIVETIKATEST ERALDATUD POLÜSAHHARIIDIDE UURIMINE JA KASUTAMINE

9. Agaroskandjate ^{13}C -TMR-spektroskoopia

Firmade LKB (Rootsi) ja «Sigma» (USA) ning ENSV TA Keemia Instituudi Orgaanilise Sünteesi ja Biopreparaatide Katsetehase agarosipreparaatide raadiospektroskoopilisel uurimisel on tuvastatud nende kandjate põhilised struktuurierinevused. Agarooosi elementaarlülil 12 põhisignaali on detekteeritud $\pm 0,01$ miljondikosa täpsusega. On näidatud raadiospektroskoopiline kriteerium agarooosi homogeensuse määratlemiseks.

K. TRUUS, T. VÄLIMÄE, Merike VAHER, A. KOLLIST

CHARACTERIZATION AND UTILIZATION OF POLYSACCHARIDES ISOLATED FROM AGAR-CONTAINING ALGAE

9. ^{13}C -NMR spectroscopy of agarose carriers

^{13}C -NMR spectroscopy has been used to investigate structural differences between agarose preparations of LKB (Sweden) and Sigma (USA) and the Pilot-Production Plant of Organic Synthesis and Biopreparations of the Institute of Chemistry (Academy of Sciences of the Estonian SSR, USSR). The basic signal assignments of the disaccharide unit have been made with an accuracy of ± 0.01 ppm. A criterion of agarose homogeneity based on the spectra obtained has been described.