



УДК 582.273-119.2:547.458.7

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ

53*. БУРАЯ ВОДОРΟΣЛЬ *Laminaria saccharina* (L.) Lam. КАК ИСТОЧНИК ФУКОИДАНА

© 1998 г. А. И. Усов[#], Г. П. Смирнова, М. И. Билан, А. С. ШашковИнститут органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
117913, Москва, ГСП-1, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 10.12.97 г. Принята к печати 22.12.97 г.

Буряя водоросль *Laminaria saccharina* исследована как потенциальный источник фукоидана. Показано, что два образца водоросли, собранные в Белом и Баренцевом морях, имеют качественно идентичный полисахаридный состав и существенно различаются только содержанием резервных углеводов – маннита и ламинарана. Полисахариды выделены фракционной экстракцией, и препараты ламинарана и альгината охарактеризованы спектрами ¹³C-ЯМР. В составе фукоидана в качестве главных компонентов найдены L-фукоза и сульфат, а в качестве минорных – галактоза, ксилроза и глюкуроновая кислота. Эффективное десульфатирование фукоидана достигнуто путем сольволиза в смеси DMSO–метанол. Строение десульфатированного полисахарида и исходного фукоидана изучено методами метилирования, периодатного окисления и спектроскопии ЯМР. Установлено, что фукоидан содержит главную цепь из 1 → 3-связанных остатков α-L-фукопиранозы с сульфатными группами в положении 4 и отдельными разветвлениями в положении 2. Фукоидан проявляет антикоагулянтные свойства и является мощным ингибитором взаимодействия Р-селектина с его углеводными лигандами.

Ключевые слова: бурые водоросли; фукоидан; ламинаран; альгинат; *Laminaria saccharina*.

ВВЕДЕНИЕ

Фукоиданами называют полисахариды, построенные преимущественно из остатков α-L-фукопиранозы и сульфата. Такие биополимеры содержатся в бурых водорослях [2–4], а родственные им вещества найдены в морских беспозвоночных, относящихся к типу иглокожих [5–8]. Фукоиданы проявляют многочисленные важные биологические эффекты в клетках млекопитающих, связанные преимущественно с модификацией свойств клеточной поверхности, и могут найти применение при разработке новых медицинских препаратов противовирусного, противовоспалительного, противоопухолевого, иммуномодулирующего, контрацептивного и антикоагулянтного действия [9, 10]. Биологическую активность фукоиданов связывают в первую очередь с высокой степенью сульфатирования, хотя очевидно, что тонкие детали структуры и молекулярно-массовое распределение также должны

существенно влиять на биологические свойства препаратов [9].

Разные виды бурых водорослей часто сильно различаются по содержанию и составу фукоиданов [11, 12]. Наиболее богатым источником этих полимеров являются представители порядка Fucales. Один из видов фукусовых, *Fucus vesiculosus*, служит сырьем для производства коммерческого препарата фирмы "Sigma". На полисахариде из этой водоросли были установлены и главные структурные характеристики фукоиданов [2–4]. В течение длительного времени считалось, что углеводные цепи этого полисахарида содержат преимущественно связи 1 → 2, а сульфат расположен главным образом в положении 4 остатков α-L-фукопиранозы; в меньшей степени в молекулах обнаруживались связи других типов и разветвления. Пересмотр этой структуры в недавней работе [10] привел авторов к выводу, что главная цепь полисахарида содержит связи 1 → 3, разветвления присоединены к ней в положение 2, а сульфатные группы занимают почти исключительно положения 4 остатков фукозы. Более разветвленная структура с неупорядоченным распределением сульфата предложена для фукоидана из *Ecklonia kurome* [13, 14]. В целом можно сказать, что отсутствие видимых признаков регулярности в построении полимерных молекул де-

* Сообщение 52 см. [1].

Автор для переписки (тел.: 137-67-91; факс: 135-53-28; e-mail: usov@ioc.ac.ru).

Таблица 1. Углеводный состав биомассы двух образцов *L. saccharina**

Образец	Содержание, %					
	Маннит	Фукоза	Ксилоза	Манноза	Глюкоза	Галактоза
I	17.6	4.6	0.6	2.2	16.8	1.7
II	8.2	4.1	0.4	1.3	1.2	0.9

* Нейтральные моносахариды определяли в гидролизате биомассы водоросли, полученной после предварительной экстракции и определения маннита по методике [20].

лает в высшей степени затруднительной характеристикой общей структуры этих биополимеров. Наличие в их составе минорных компонентов (галактозы, ксилозы, уроновых кислот, в некоторых случаях прочно связанного пептидного фрагмента) еще более усложняет структурный анализ водорослевых фукоиданов. В отличие от них несколько полисахаридов, выделенных из иглокожих, как оказалось, обладают линейной структурой с повторяющимися тетрасахаридными звеньями, строение которых удалось установить [5–8].

Водоросли рода *Laminaria*, добываемые в крупных масштабах, могут наряду с фукусовыми служить доступным источником фукоиданов [15–18]. В частности, большой интерес представляет с этой точки зрения *L. saccharina*, которая уже в течение длительного времени используется для промышленного получения альгиновой кислоты и маннита [19], но фукоидан при этом является отходом производства; его химическое строение, насколько нам известно, ранее не исследовалось. В данной работе проведена оценка этой водоросли как возможного сырья для выделения сульфатированных полисахаридов и получены предварительные сведения о химическом строении содержащегося в ней фукоидана.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходным материалом для извлечения полисахаридов послужили два образца *L. saccharina* (I и II), один из которых был собран в Белом, а другой – в Баренцевом море. Для характеристики их углеводного состава была использована методика определения маннита, описанная нами ранее [20], с последующим гидролизом биомассы и количественным определением образующихся нейтральных моносахаридов в виде ацетатов полиолов методом ГЖХ [21]. Найденные величины для глюкозы и фукозы дают представление о содержании в биомассе ламинарана и фукоидана соответственно (табл. 1). Из данных таблицы можно заключить, что различие в географическом положении сказывается в первую очередь на накоплении резервных углеводов – маннита и ламинарана, но в гораздо меньшей степени влияет на содержание структурных полисахаридов.

Для препаративного выделения полисахаридов использовали методику экстракции, подробно описанную в одной из наших предыдущих работ [15]; однако из этой методики с целью ее упрощения была исключена стадия предварительной обработки сырья, предназначенная для удаления низкомолекулярных веществ, и применен несколько отличный температурный режим (см. “Экспер. часть”). В результате экстракции из каждого образца водоросли были получены препараты ламинарана, альгината и три фракции фукоидана, выходы и состав которых приведены в табл. 2.

В соответствии с результатами предварительной оценки (табл. 1) более высокий выход ламинарана был получен из образца I. Выделенный полисахарид обладал характерной для линейных (1 → 3)-β-глюканов ограниченной растворимостью в холодной воде и был очищен с помощью нескольких “перекристаллизаций” из воды [22]. Очищенный полисахарид имел $[\alpha]_D^{20} -13.0^\circ$ (с 1.1; вода). В его составе кроме глюкозы был найден маннит (соотношение глюкоза – маннит 35 : 1); после восстановления ламинарана боргидридом натрия и гидролиза наряду с глюкозой обнаружались сорбит и маннит в соотношении, близком к 1 : 1. Таким образом, подобно многим другим ламинаранам бурых водорослей полисахарид содержал M- и G-цепи примерно в равных количествах и имел среднюю степень полимеризации 18. Его спектр ^{13}C -ЯМР (рис. 1) соответствовал линейной молекуле из (1 → 3)-связанных остатков β-D-глюкопиранозы [23]. Аналогичный препарат из образца II был получен с гораздо меньшим выходом, содержал значительное количество примесей и подробнее не исследовался.

Препараты альгината натрия были выделены из обоих образцов водоросли с близкими выходами и, судя по величинам удельного вращения ($[\alpha]_D^{20} -104.5^\circ$ и -105.0° (с 0.3; вода) соответственно) и спектрам ^{13}C -ЯМР (рис. 2), имели строение, типичное для этого класса полисахаридов [24, 25]. Однако происхождение водоросли существенно влияло на мономерный состав полученных альгинатов: соотношение D-маннурановой и L-гулурановой кислот (M/G), рассчитанное из спектров

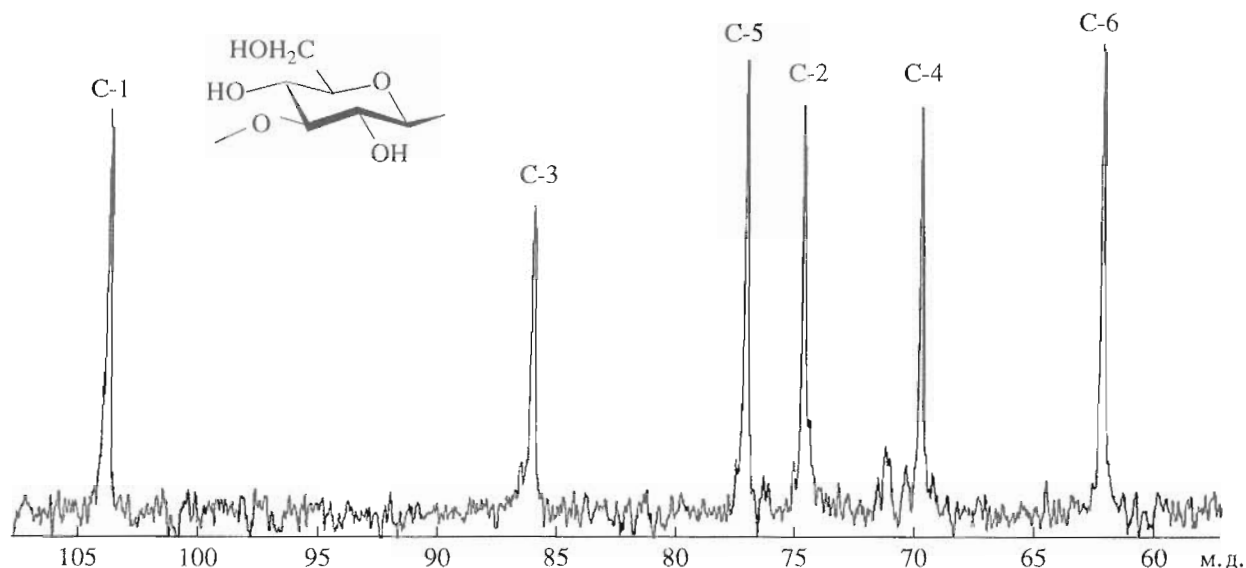


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР ламинарана из образца I водоросли *L. saccharina*.

^{13}C -ЯМР, в Na-альгинате I составило 2.20, а в Na-альгинате II – 1.66.

Методика фракционной экстракции водоросли позволила получить три фракции фукоиданов, извлекаемых соответственно разбавленным водным раствором хлорида кальция, разбавленной соляной кислотой и 3% водным карбонатом натрия. В составе этих препаратов кроме фукозы и сульфата обнаруживались небольшие количества других нейтральных моносахаридов (галактозы, ксилозы, глюкозы) и уроновых кислот. Наибольший выход, наибольшее содержание фукозы и сульфата и наименьшее – уроновых кислот соответствовали фракции фукоидана I для обоих образцов водоросли. При исследовании биологических свойств было показано, что для этой же фракции наблюдается и наиболее высокая антикоагулянтная активность [26]. Поэтому для препаративного получения фукоидана в количестве, необходимом для структурных исследований, была использована упрощенная методика, приводящая к высокосульфатированной фракции фукоидана без выделения прочих полисахаридов.

В качестве исходного материала был выбран образец II, содержащий меньше сопутствующих водорастворимых полисахаридов. В этом препаративном опыте был получен фукоидан F в виде Са-соли с общим выходом 5.16% от сухой биомассы. Для его очистки и одновременного перевода в Na-соль была проведена щелочная обработка по известной методике [27], которая не привела к потере сульфата и лишь способствовала удалению небольшого количества неидентифицированных примесей. Модифицированный щелочью препарат (фукоидан FM) был получен с выходом 90% от фукоидана F (состав обоих препаратов

приведен в табл. 2). Мольное отношение фукозы и сульфата в них составило около 10:7. L-Конфигурация фукозы была подтверждена методом ГЖХ ацетилированных S-(+)-2-октилгликозидов [28]. Уроновая кислота идентифицирована как глюкуроновая с помощью высокоэффективной ионообменной хроматографии (ср. [29]), однако определение ее абсолютной конфигурации, как и абсолютных конфигураций минорных нейтральных моносахаридов, входящих в состав фукоидана F, не проводилось.

В ИК-спектре фукоидана F наблюдались интенсивные полосы поглощения при 1240 см^{-1} (сульфатные группы) и 850 см^{-1} (аксиальный сульфат), что соответствовало расположению сульфатных групп в положении 4 остатков фукозы; плечо при 830 см^{-1} (экваториальный сульфат) указывало на то, что небольшая часть сульфатных групп занимает также положения 2 или 3 в этих остатках [30]. Спектр ^{13}C -ЯМР полисахарида подобно аналогичным спектрам других водорослевых фукоиданов [6] был сложен и не поддавался интерпретации (рис. 3).

Для упрощения структуры биополимера F было изучено его десульфатирование в двух условиях: при действии HCl в абсолютном метаноле [31] и при сольволизе пиридиниевой соли в смеси DMSO–метанол [32, 33]. Первый метод приводил лишь к частичному удалению сульфатных групп (фукоидан DM, табл. 2) и значительному расщеплению углеводных цепей и поэтому был признан непригодным для наших целей. Напротив, при сольволитическом десульфатировании удалось снизить содержание сульфата с 35 до 0.5% и получить десульфатированный фукоидан DS с выходом 35%.

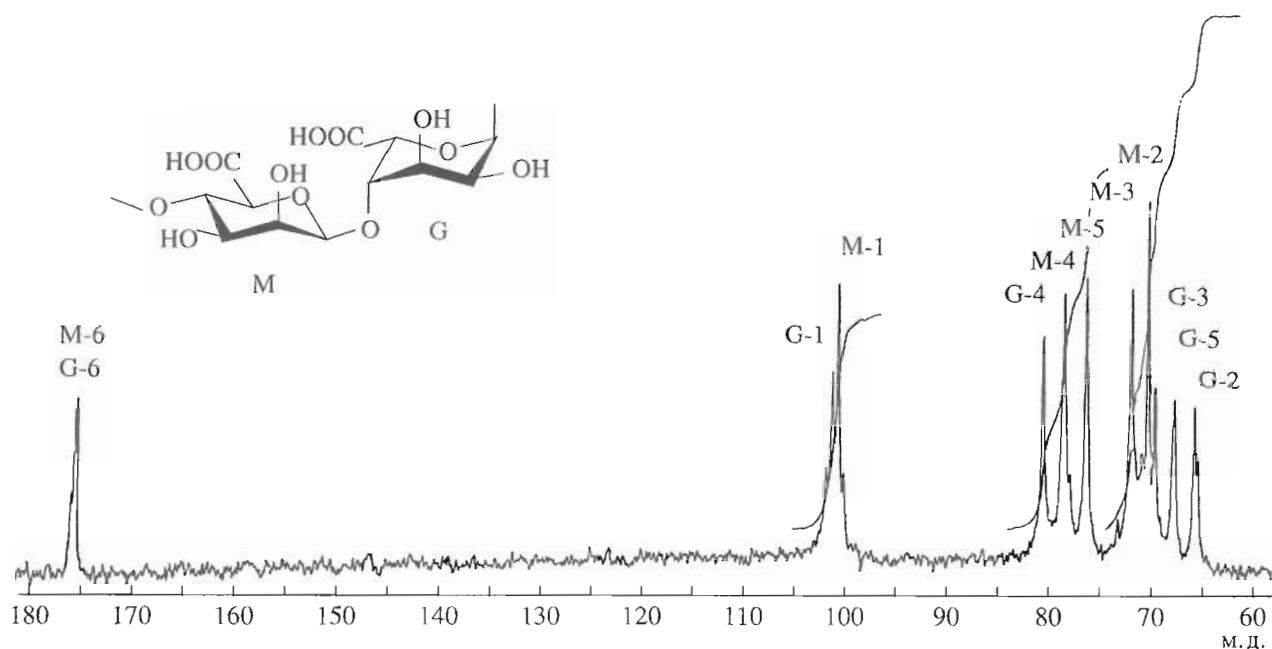


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР альгината натрия из образца II водоросли *L. saccharina*. М – остаток β -D-маннуроновой кислоты, G – остаток α -L-гулурановой кислоты. Цифры у символа остатка соответствуют номеру углеродного атома.

При периодатном окислении фукоидана DS наблюдался заметный расход окислителя, однако определение фукозы показало, что в окисленном препарате сохраняется 84% этого моносахарида. Такой результат давал возможность предположить, что в основе фукоидана лежит цепь из 1 \rightarrow 3-связанных остатков фукозы с некоторым количеством разветвлений, так что окислению

при действии периодата подвергаются только концевые остатки фукозы и сопутствующие моносахариды. Этот вывод был качественно подтвержден анализом продуктов метилирования десульфатированного и исходного фукоиданов: если в первом случае главным компонентом смеси метилированных моносахаридов была 2,4-ди-O-метилфукоза с примесью 2,3,4-три-O-метилфу-

Таблица 2. Выходы и состав полисахаридных фракций, выделенных из двух образцов *L. saccharina*

Исходное сырье	Полисахарид	Выход, %	Содержание главных компонентов, %			
			Фукоза	Сульфат	Уроновые кислоты	Глюкоза
Образец I	Ламиран	7.7	0.9	–	–	84.0
	Альгинат	28.2	–	–	89.0	–
	Фукоидан 1	5.0	36.3	37.0	8.9	1.5
	Фукоидан 2	0.9	14.0	14.3	36.8	0.6
	Фукоидан 3	0.7	18.6	23.8	15.0	0.2
Образец II	Ламиран	0.5	2.9	–	–	60.5
	Альгинат	23.5	–	–	92.4	–
	Фукоидан 1	4.3	34.8	40.0	9.6	0.7
	Фукоидан 2	0.2	20.2	20.4	19.7	–
	Фукоидан 3	0.8	18.0	25.8	13.6	–
	Фукоидан F	5.2	33.8	35.4	10.8	–
	Фукоидан FM		36.0	36.7	11.8	–
	Фукоидан DM		39.0	21.6	9.7	–
	Фукоидан DS		53.5	0.6	11.6	–

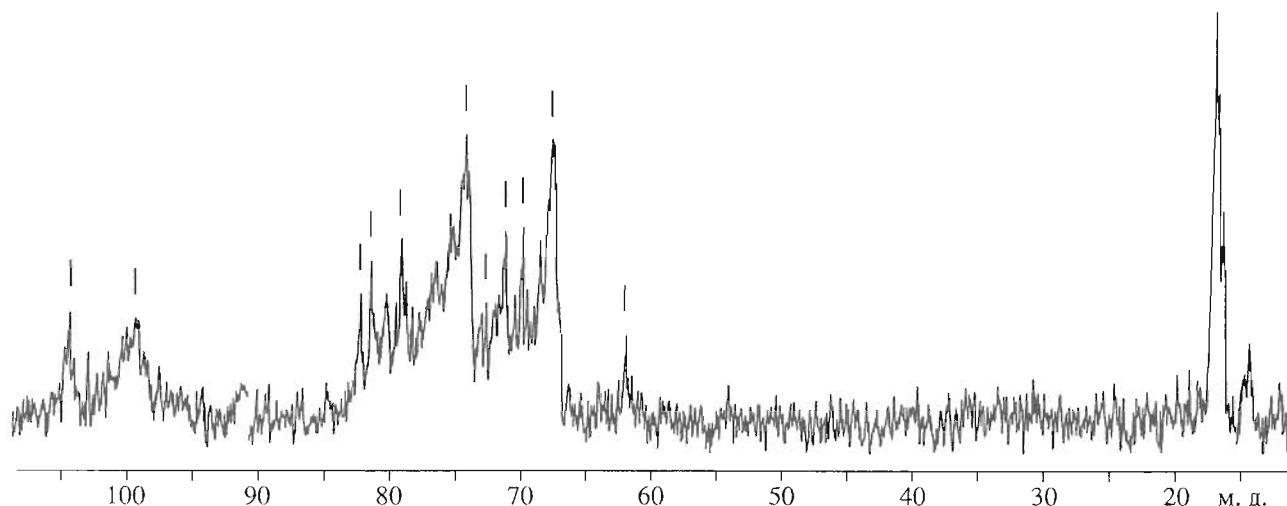


Рис. 3. Спектр ^{13}C -ЯМР фукоидана F (область сигналов карбоксильных групп не показана).

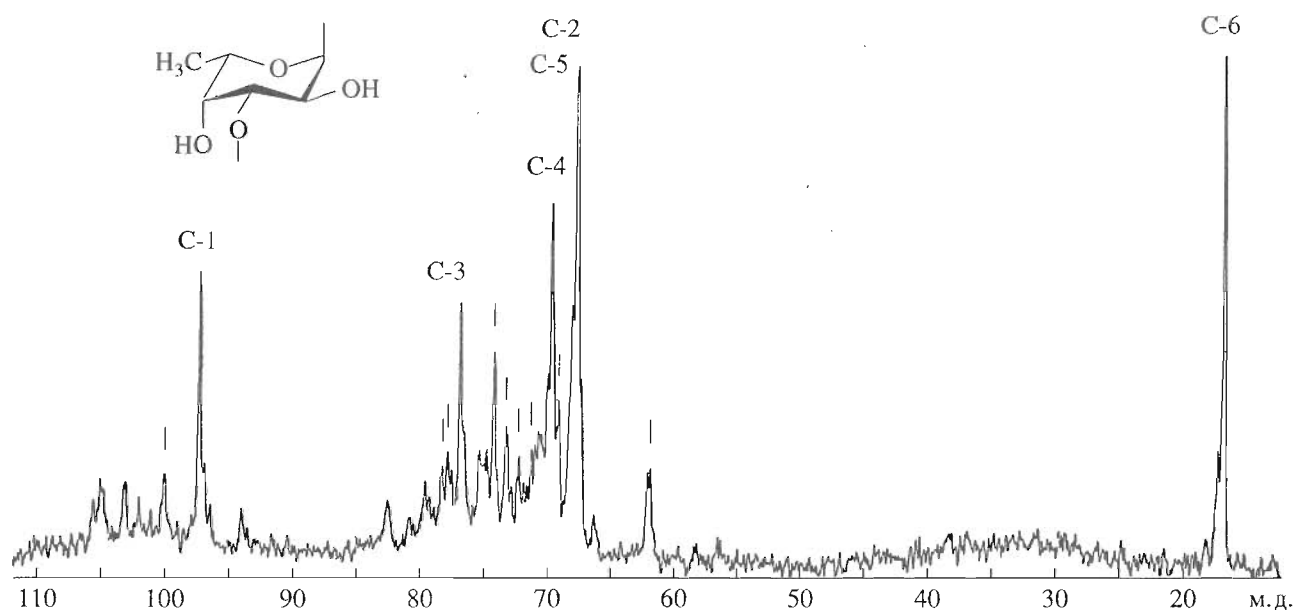


Рис. 4. Спектр ^{13}C -ЯМР десульфатированного фукоидана DS (область сигналов карбоксильных групп не показана).

козы, 2-*O*-метилфукозы и 4-*O*-метилфукозы, то во втором случае главными продуктами были 2-*O*-метилфукоза и незамещенный моносахарид с примесью 2,4-ди-*O*-метил- и 4-*O*-метилфукозы.

Дополнительные данные о строении главной цепи фукоидана были получены при анализе спектров ЯМР десульфатированного препарата DS. Его спектр ^{13}C -ЯМР был типичным для полимера со скрытой регулярностью структуры (рис. 4). В области резонанса аномерных атомов углерода наряду с интенсивным пиком при 96.9 м.д. наблюдались сигналы значительно меньшей интенсивности в диапазоне 93.3-105.4 м.д. Область резонанса С-6 6-дезоксипираноз была также неодно-

родна: рядом с интенсивным сигналом при 16.5 м.д. имелись минорные сигналы при 16.7 и 16.9 м.д. О присутствии гексопираноз с незамещенными CH_2OH -группами свидетельствовали сигналы при 61.8 и 62.2 м.д. В слабом поле наблюдался уширенный сигнал CO -групп уруновых кислот при 175.8 м.д.

В слабопольной области ^1H -ЯМР-спектра полисахарида (4.4-5.4 м.д.) также наблюдались сигналы разной интенсивности, среди которых выделялся наибольший дублет при 5.115 м.д. (КССВ $^3J_{1,2}$ 3.5 Гц, H-1 α -фукопиранозы). В области резонанса протонов при С-6 6-дезоксипираноз (1.2-1.35 м.д.) наиболее интенсивным был

дублет при 1.245 м.д. ($^3J_{5,6}$ 6.5 Гц, Н-6 α -фукопиранозы). В спектре отчетливо были видны минорные синглеты при 3.42 и 3.57 м.д., типичные для групп OCH_3 , что можно объяснить присутствием в составе фукоидана небольших количеств *O*-метилпроизводных фукозы.

Анализ двумерных COSY, TOCSY и NOESY-спектров был крайне затруднен из-за многочисленности кросс-пиков и их перекрывания. Однако серия наиболее интенсивных сигналов была надежно идентифицирована как принадлежащая остаткам α -фукопиранозы (Н-2 при 3.970 м.д., $^3J_{2,3}$ 10 Гц; Н-3 при 4.015 м.д., $^3J_{3,4}$ 3.5 Гц; Н-4 при 4.035 м.д., $^3J_{4,5} < 2$ Гц; Н-1 и Н-6 – как указано выше).

Для определения типа замещения в остатках α -фукопиранозы был снят двумерный спектр $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HMQC). Его анализ показал, что сигналы ^{13}C упомянутых выше остатков α -фукопиранозы находятся при 96.9; 67.8; 76.4; 69.9; 67.9 и 16.5 м.д. для С-1, С-2, С-3, С-4, С-5 и С-6 соответственно. Сравнение со спектром α -метилфукопиранозидов [34] и данными по десульфатированным фукоиданам иглокожих [5, 6] (с поправкой на систематическую разницу в значениях химических сдвигов, возникающую при использовании различных стандартов) однозначно указывает на замещение остатков α -фукопиранозы по С-3.

Суммируя данные химических и физико-химических методов исследования, можно заключить, что фукоидан из *L. saccharina* содержит главную цепь из 1 \rightarrow 3-связанных остатков α -*L*-фукопиранозы, сульфатированную преимущественно по положениям 4 и содержащую некоторое количество разветвлений и сульфатных групп в положениях 2. Расположение и структурное значение обнаруженных в составе полисахарида минорных компонентов еще предстоит определить.

Таким образом, бурая водоросль *L. saccharina* является доступным источником фукоидана, который может быть выделен и очищен по сравнительно несложной методике. Полисахарид представляет интерес как соединение с высокой антикоагулянтной активностью [26] и мощный ингибитор взаимодействия Р-селектина с его углеводными лигандами [35].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Количественное определение нейтральных моносахаридов после гидролиза полисахаридов (2 М CF_3COOH , 8 ч при 100°C) проводили методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов [21] или ацетатов альдононитрилов [36] с ацетатом миоинозита в качестве внутреннего стандарта. Спектрофотометрическое определение фукозы выполняли по реакции с конц. H_2SO_4 и *L*-цистеином [37], а уриновых кислот – по реакции с конц. H_2SO_4 и 3,5-диметилфенолом [29]. Сульфат определяли тур-

бидиметрически в виде BaSO_4 после гидролиза полисахаридов в 1 М HCl [38].

ГЖХ выполняли на хроматографе Hewlett-Packard 5890А, снабженном пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой HP Ultra-2 и интегратором HP 3393А при программировании температуры от 200°C (для ацетилированных октилгликозидов), от 175°C (для ацетатов полиолов или альдононитрилов) или от 150°C (для ацетатов частично метилированных полиолов) до 290°C со скоростью 10°C/мин. ИК-спектры регистрировали на спектрофотометре Perkin-Elmer 577 в таблетках КВг. Спектры ЯМР ламинарана и альгинатов получали на приборе Bruker WM-250, а фукоиданов F и DS – на приборе Bruker DRX-500 для растворов полисахаридов в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 60°C с метанолом (δ_{C} 50.15 м.д.) в качестве внутреннего стандарта. Использовались стандартные методики съемки двумерных спектров из материального обеспечения фирмы для приборов этого класса. Оптическое вращение измеряли на поляриметре Jasco DIP-360.

Образец *I. L. saccharina*, собранной в Белом море в августе 1982 г., предоставлен Архангельским опытно-промышленным водорослевым комбинатом; образец II собран в Дальних Зеленцах (Мурманская обл.) в августе 1988 г.

Выделение полисахаридов. 10 г высушенной водоросли, измельченной до размера частиц < 0.5 мм, и 100 мл 2% водного раствора CaCl_2 перемешивали 3-4 ч при 60°C, центрифугировали и к слегка окрашенному экстракту приливали 25 мл 10% водного раствора бромид цетилтриметиламмония (цетавлона). При этом выпадает обильный осадок, который легко коагулирует, причем окраска остается в растворе. Остаток водоросли еще дважды подвергали экстракции в тех же условиях, и получаемые экстракты объединяли с суспензией цетавлоновых солей. Суспензию центрифугировали, раствор диализовали против диализированной воды, концентрировали до ~25 мл и приливали 5 объемов этанола. Выпавший осадок промывали этанолом, ацетоном, эфиром и высушивали в вакууме над P_2O_5 , получали фракцию ламинарана. Осадок цетавлоновых солей размешивали с 50 мл 3 М CaCl_2 , выдерживали несколько дней, нагревали непродолжительное время при 60°C, к полученному раствору приливали 200 мл этанола, выпавший осадок промывали этанолом, растворяли в 25 мл 2% CaCl_2 , нерастворившийся слизистый темный осадок отделяли центрифугированием, а к раствору приливали 100 мл этанола. Выпавший осадок отделяли центрифугированием и сушили сменной растворителем, как описано выше; получали фракцию Са-соли фукоидана I.

Остаток водоросли обрабатывали 0.1 М HCl (3 \times 100 мл) в режиме, использованном при экс-

тракции водным CaCl_2 . Кислые экстракты объединяли, нейтрализовали NaHCO_3 и приливали 10% раствор цетавлона до полного осаждения кислых полисахаридов (30 мл). Из этого осадка получали фракцию Са-соли фукоидана 2, как описано выше.

Остаток водоросли суспендировали в воде (общий объем 150 мл), нейтрализовали NaHCO_3 , после чего прибавляли 4.5 г Na_2CO_3 и перемешивали 4 ч при 70°C. Экстракт отделяли, остаток обрабатывали в тех же условиях 3% раствором Na_2CO_3 (3×100 мл). Объединенные экстракты подкисляли конц. HCl до $\text{pH} < 1$, выпавший осадок альгиновой кислоты отделяли центрифугированием, дважды промывали 0.1 М HCl и дважды водой, после чего растворяли при осторожном подщелачивании в 250 мл воды. Раствор диализовали и лиофилизовали, получали фракцию Na-альгината. Кислый маточный раствор после отделения альгиновой кислоты и первую промывку объединяли, нейтрализовали NaHCO_3 , приливали 40 мл 10% раствора цетавлона, суспензию диализовали против воды, скоагулировавший осадок цетавлоновых солей отделяли и переводили в Са-соли, как описано выше; получали фракцию Са-соли фукоидана 3.

Выходы и состав полисахаридных фракций, полученных из разных образцов водоросли, приведены в табл. 2.

Упрощенная методика выделения фукоидана.

100 г измельченной водоросли (образец II) перемешивали 4 ч с 1 л 2% водного раствора CaCl_2 при 60°C, смесь центрифугировали и остаток водоросли экстрагировали еще три раза в тех же условиях. К объединенным экстрактам приливали при эффективном перемешивании 300 мл 10% водного раствора бромид цетилтриметиламмония, суспензию диализовали в течение 16 ч против проточной водопроводной воды, осадок цетавлоновых солей кислых полисахаридов отделяли центрифугированием и промывали дважды водой. Далее этот осадок растворяли при перемешивании и нагревании до 50°C в 150 мл 3 М CaCl_2 , приливали 500 мл этанола, осадок промывали этанолом, перемешивали с 150 мл 2% CaCl_2 при 50°C, нерастворившийся осадок отделяли центрифугированием, промывали 50 мл 2% CaCl_2 , растворы объединяли, приливали 4 объема этанола, выпавший осадок сушили сменой растворителей, получали Са-соль фукоидана F. Выход 5.16 г, $[\alpha]_D^{20} -90.8^\circ$ (c 1.1; вода). Кроме компонентов, указанных в табл. 2, в гидролизате полисахарида найдены 3.0% ксилозы и 4.3% галактозы.

Щелочная обработка фукоидана. К раствору 600 мг фукоидана F в 120 мл воды прибавляли 300 мг NaBH_4 , оставляли на ночь, затем при перемешивании вносили 1.2 г NaBH_4 и 4.8 г NaOH . По-

сле полного растворения щелочи смесь выдерживали в термостате 7 ч при 80°C. Полученный раствор диализовали и лиофилизовали, получали фукоидан FM. Выход 550 мг, $[\alpha]_D^{20} -97.5^\circ$ (c 1.0; вода).

Идентификация L-фукозы и глюкуроновой кислоты. 50 мг фукоидана F растворяли в 2 мл 1 М H_2SO_4 , нагревали 8 ч при 100°C, раствор нейтрализовали BaCO_3 , осадок отделяли центрифугированием, супернатант обрабатывали дауэксом 1×1 (CO_3^{2-}), упаривали, остаток растворяли в 2 мл воды, 0.5 мл этого раствора высушивали в вакууме и переводили в ацетаты S(+)-2-октилглюкозидов по известной методике [28]. Сравнение методом ГЖХ с заведомыми образцами, полученными соответственно из D- и L-фукозы, показало наличие в гидролизате фукоидана только L-фукозы.

Анионит промывали водой, затем 0.1 М HCl , кислый элюат упаривали и высушивали в вакууме над КОН. Остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке с анионитом Dionex Ax8-II в 0.02 М фосфатном буфере с pH 2.4 при 70°C [29]. Сравнением с заведомыми образцами D-глюкуроновой, D-галактуроновой, D-маннуроновой и L-гулуруновой кислот в гидролизате обнаружена только глюкуроновая кислота.

Десульфатирование фукоидана. а) Действие метанольного HCl .

Суспензию 200 мг фукоидана F в 40 мл абсолютного метанола перемешивали на магнитной мешалке при охлаждении льдом, приливали по каплям 1 мл AsCl_3 , перемешивание и охлаждение продолжали 6 ч, после чего смесь центрифугировали, осадок промывали метанолом, растворяли в 25 мл воды, прибавляли 10% раствор NaOH до отчетливой щелочной реакции. Раствор диализовали и лиофилизовали, получали частично десульфатированный препарат DM. Выход 90 мг. Метанольные растворы объединяли, упаривали в вакууме, остаток растворяли в воде, нейтрализовали амберлитом IRA-400 (CO_3^{2-}), смолу отделяли фильтрованием, раствор концентрировали в вакууме и лиофилизовали, получали смесь низкомолекулярных нейтральных продуктов метанолиза. Выход 60 мг.

б) *Сольволитическое десульфатирование.* Раствор 200 мг фукоидана F пропускали через колонку, содержащую 5 г дауэкса 50W \times 4 (200–400 меш) в H^+ -форме, собирая элюат в колбу с 0.5 мл пиридина. Колонку дополнительно промывали 20 мл воды, полученный раствор лиофилизовали, к остатку прибавляли 18 мл DMSO и 2 мл метанола, перемешивали до полного растворения полисахарида, после чего нагревали 6 ч при 80°C, диализовали для удаления DMSO, концентриро-

вали и лиофилизировали, получали десульфатированный фукоидан DS. Выход 70 мг, $[\alpha]_D^{20} -125.2^\circ$ (с 0.6; вода).

Периодатное окисление фукоидана DS. К раствору 1.7 мг полисахарида в 3.5 мл воды прибавляли 0.5 мл 0.05 М раствора NaIO_4 и оставляли в темноте при 20°C . Расход окислителя контролировали по убыли оптической плотности раствора при 305 нм; через 6 сут он составил 7.22 мкмоль NaIO_4 . К раствору прибавляли 0.05 мл 10% водного этиленгликоля, через 20 мин вносили избыток KBH_4 , оставляли на ночь, после чего раствор диализовали, лиофилизировали и остаток растворяли в 4.5 мл воды. Через те же стадии параллельно проводили контрольный раствор полисахарида, к которому вместо периодата прибавляли 0.5 мл воды. Спектрофотометрическое определение фукозы показало, что ее содержание в окисленном полисахариде составляет 84% от контроля.

Метилирование полисахаридов. К раствору 5 мг фукоидана F или DS в 0.5 мл DMSO прибавляли 0.2 мл CH_3I и 20-30 мг порошкообразного NaOH. Суспензию перемешивали 1 ч при 20°C , прибавляли 4 мл воды, раствор диализовали и упаривали в вакууме досуха. К остатку приливали 1 мл 2 М CF_3COOH , нагревали 8 ч при 100°C , упаривали с этанолом для удаления кислоты и полученную смесь частично метилированных моносахаридов переводили в ацетаты полиолов и анализировали с помощью ГЖХ и ГЖХ-МС по известным методикам [39]. Обнаружены ацетаты 2,3,4-три-*O*-метилфуцита, 2,4-ди-*O*-метилфуцита, 2-*O*-метилфуцита, 4-*O*-метилфуцита и фуцита в соотношении 6:7:45:11:31 в случае фукоидана F и 13:51:13:10:13 в случае фукоидана DS.

Благодарность. Работа поддержана грантом РФФИ № 96-03-32453, грантом РГНТП Научного совета "Химия и технология переработки возобновляемого растительного сырья" № ХТРС 96-11 и грантом РГНТП "Комплексное использование древесного сырья" № 03.004.1. Авторы выражают глубокую признательность В.Л. Садовской (ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН) за проведение анализа продуктов метилирования методом ГЖХ-МС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Усов А.И., Билан М.И. // Биоорганич. химия. 1998. Т. 24. С. 139-146.
2. Percival E., McDowell R.H. Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. L.: Acad. Press, 1967. P. 157-164.
3. Percival E., McDowell R.H. // Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Plant Carbohydrates, II. Extracellular Carbohydrates. V. 13B / Eds W. Tanner, F.A. Loewus. B.: Springer-Verlag, 1981. P. 276-316.
4. Painter T.J. // The Polysaccharides. V. 2 / Ed. G.O. Aspinall. N.Y.: Acad. Press, 1983. P. 195-285.
5. Ribeiro A.-C., Vieira R.P., Mourao P.A.S., Mulloy B. // Carbohydr. Res. 1994. V. 255. P. 225-240.
6. Mulloy B., Ribeiro A.-C., Alves A.-P., Vieira R.P., Mourao P.A.S. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 22113-22123.
7. Alves A.-P., Mulloy B., Diniz J.A., Mourao P.A.S. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 6965-6971.
8. Christ M.D., Brant D.A. // XVIIth International Carbohydrate Symposium. Abstracts. Ottawa, Canada, 1994. P. 96.
9. Nagumo T., Nishino T. // Polysaccharides in Medicinal Applications / Ed. S. Dumitriu. N.Y.: Marcel Dekker, Inc., 1996. P. 545-574.
10. Patankar M.S., Oehninger S., Barnett T., Williams R.L., Clark G.F. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 21770-21776.
11. Black W.A.P. // J. Sci. Food Agric. 1954. V. 5. P. 445-448.
12. Усов А.И., Кошелева Е.А., Яковлев А.П. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. С. 830-836.
13. Nishino T., Kiyohara H., Yamada H., Nagumo T. // Phytochemistry. 1991. V. 30. P. 535-539.
14. Nishino T., Nagumo T., Kiyohara H., Yamada H. // Carbohydr. Res. 1991. V. 211. P. 77-90.
15. Усов А.И., Кирьянов А.В. // Биоорганич. химия. 1994. Т. 20. С. 1342-1348.
16. Kitamura K., Matsuo M., Yasui T. // Agric. Biol. Chem. 1991. V. 55. P. 615-616.
17. Grauffel V., Kloareg B., Mabeau S., Durand P., Jozefonvicz J. // Biomaterials. 1989. V. 10. P. 363-368.
18. Maruyama H., Nakajima J., Yamamoto I. // Kitasato Arch. Exp. Med. 1987. V. 60. P. 105-121.
19. Кизеветтер И.В., Грюнер В.С., Евтушенко В.А. Переработка морских водорослей и других промысловых водных растений. М.: Пищевая промышленность, 1967. С. 332-348.
20. Усов А.И., Клочкова Н.Г. // Биоорганич. химия. 1994. Т. 20. С. 1236-1241.
21. Слопекер Дж. Методы исследования углеводов. Пер. с англ. под ред. А.Я. Хорлина. М.: Мир, 1975. С. 22-25.
22. Блэк В.А.П. Методы химии углеводов. Пер. с англ. под ред. Н.К. Кочеткова. М.: Мир, 1967. С. 371-373.
23. Colson P., Jennings H.J., Smith I.C.P. // J. Am. Chem. Soc. 1974. V. 96. P. 8081-8087.
24. Grasdalen H., Larsen B., Smidsrod O. // Carbohydr. Res. 1977. V. 56. P. C11-C15.
25. Grasdalen H., Larsen B., Smidsrod O. // Carbohydr. Res. 1981. V. 89. P. 179-191.
26. Гаврилова Е.А., Барбанова И.И., Усов А.И., Ефимов В.С., Смирнов А.И. // Эксперим. и клин. фармакология. 1997. Т. 60. С. 42-44.
27. DeAngelis P.L., Glabe C.G. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 13946-13952.
28. Leontein K., Lindberg B., Lonngren J. // Carbohydr. Res. 1978. V. 62. P. 359-362.

29. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Mar. 1995. V. 38. P. 43–51.
30. Bernardi G., Springer G.F. // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. P. 75–80.
31. Kantor T.G., Schubert M. // J. Am. Chem. Soc. 1956. V. 72. P. 152–153.
32. Usov A.I., Adamyants K.S., Miroshnikova L.I., Shaposhnikova A.A., Kochetkov N.K. // Carbohydr. Res. 1971. V. 18. P. 336–338.
33. Nagasawa K., Inoue Y., Kamata T. // Carbohydr. Res. 1977. V. 58. P. 47–55.
34. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27–66.
35. Preobrazhenskaya M.N., Berman A.E., Mikhailov V.I., Ushakova N.A., Mazurov A.V., Semenov A.V., Usov A.I., Nifant'ev N.E., Bovin N.V. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1997. V. 43. P. 443–451.
36. Morrison I.M. // J. Chromatogr. 1975. V. 108. P. 361–364.
37. Dische Z., Shettles L.B. // J. Biol. Chem. 1948. V. 175. P. 595–603.
38. Dodgson K.S., Price R.G. // Biochem. J. 1962. V. 84. P. 106–110.
39. Bjorndal H., Hellerqvist C.G., Lindberg B., Svensson S. // Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1970. V. 9. P. 610–619.

Polysaccharides of Algae. 53. Brown Alga *Laminaria saccharina* (L.) Lam. as a Source of Fucoidan

A. I. Usov[#], G. P. Smirnova, M. I. Bilan, and A. S. Shashkov

Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, GSP-1 Moscow, 117913 Russia

Brown alga *Laminaria saccharina* was investigated as a potential source of fucoidan. Two samples of alga collected in the White Sea and the Barents Sea showed a qualitatively similar polysaccharide composition and considerably differed only in the content of stock carbohydrates mannitol and laminaran. The polysaccharides were isolated by fractional extraction, and the laminaran and sodium alginate preparations were characterized by ¹³C NMR spectra. Fucoidan was found to contain *L*-fucose and sulfate as major components and galactose, xylose, and glucuronic acid as minor components. It was efficiently desulfated by solvolysis in a DMSO–methanol mixture. The structures of the starting and desulfated polysaccharides were studied by the methylation procedure, periodate oxidation, and NMR spectroscopy. The fucoidan backbone was found to be composed of 1 → 3-linked α -*L*-fucopyranose residues sulfated in position 4. It contains single branchings in position 2. Fucoidan possesses anticoagulant properties and efficiently inhibits interaction of P-selectin with its carbohydrate ligands.

Key words: brown algae, fucoidan, laminaran, alginate, *Laminaria saccharina*

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 137-6791; fax: +7 (095) 135-5328; e-mail: usov@ioc.ac.ru.