



УДК 547.458.7:582.272-119.2

**ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ. 60\*. ФУКОИДАН  
ИЗ ТИХООКЕАНСКОЙ БУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ *Analipus japonicus* (Harv.)  
Winne (Ectocarpales, Scytosiphonaceae)**© 2007 г. М. И. Билан, А. Н. Захарова, А. А. Грачев, А. С. Шашков,  
Н. Э. Нифантьев, А. И. Усов<sup>#</sup>

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 16.04.2006 г. Принята к печати 30.05.2006 г.

Из бурой водоросли *Analipus japonicus*, собранной в Японском море, выделен фукоидан, содержащий *L*-фукозу, сульфатные и *O*-ацетильные группы в мольном соотношении 3 : 2 : 1, а также небольшие количества ксилозы, галактозы и уроновых кислот. Строение нативного полисахарида и продуктов его десульфатирования и дезацетилирования исследовано с помощью методов метилирования и периодатного окисления, а также с помощью спектроскопии ЯМР. Показано, что в основе полисахаридных молекул лежит линейная углеводная цепь из (1→3)-связанных остатков  $\alpha$ -*L*-фукопиранозы (три ответвления в положении 4 и одно в положении 2 на каждые 10 остатков главной цепи). Сульфатные группы занимают положения 2 и (в меньшей степени) 4, причем большинство концевых невосстанавливающих остатков фукозы сульфатировано дважды. Ацетильные группы расположены преимущественно в положениях 4. Структурное значение минорных моносахаридов установить не удалось.

*Ключевые слова:* *Analipus japonicus*; бурые водоросли; спектроскопия ЯМР; сульфатированные полисахариды; фукоидан.

## ВВЕДЕНИЕ

Сульфатированные полисахариды бурых водорослей, называемые фукоиданами, в последние годы привлекают пристальное внимание как легко доступные биополимеры, наделенные разнообразной биологической активностью. Наиболее подробно изучены их гепариноподобные антикоагулянтные и антитромботические свойства [2, 3], однако не меньшее практическое значение может получить их способность ингибировать воспаление, клеточную адгезию, вирусную инфекцию, ангиогенез и процесс оплодотворения [4].

С химической точки зрения, фукоиданы представляют собой довольно разнородную группу полисахаридов. Их простейшие представители содержат только  $\alpha$ -*L*-фукозу, сульфат и ацетат, причем фукоиданы, выделенные из видов, относящихся к разным порядкам бурых водорослей, могут различаться структурой главной цепи, которая построена или из 3-замещенных, или из чередующихся 3- и 4-замещенных остатков  $\alpha$ -*L*-фукопиранозы [5]. Даже в этом случае нативные полисахариды обычно лишены элементов регулярности за счет наличия разветвлений главной цепи и произ-

вольного расположения неуглеводных заместителей. Однако значительное число известных фукоиданов имеет более сложный состав, поскольку, наряду с фукозой, они могут содержать ксилозу, галактозу, маннозу, глюкуроновую кислоту. В эту группу полисахаридов часто относят вещества с главными цепями другой химической природы, построенными, например, из остатков галактозы или глюкуроновой кислоты и маннозы, где фукоза входит лишь в состав боковых цепей [6–10]. Перечисленные структурные особенности делают чрезвычайно сложной проблему установления химического строения фукоиданов. Их свойства во многом определяются степенью сульфатирования, однако биологическая активность не является простой функцией плотности заряда их молекул, но также зависит от состава и строения углеводной части и конкретного расположения сульфатных групп. Идентификация отдельных структурных элементов молекул фукоиданов, ответственных за проявление той или иной биологической активности, представляет собой актуальную, но все еще не решенную задачу.

Целью специальной программы, начатой в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН несколько лет тому назад, является изучение строения природных фукоиданов и обнаружение фармакофорных группировок в их

\* Сообщение 59 см. [1].

<sup>#</sup> Автор для связи (тел.: (495) 137-67-91; факс: (495) 135-53-28; эл. почта: usov@ioc.ac.ru).

**Таблица 1.** Выходы и состав полисахаридных фракций, полученных при ионообменной хроматографии суммарного полисахаридного препарата F

Фракция	Выход, % от F	Нейтральные моносахариды, %					Сульфат (SO <sub>3</sub> Na), %	Ацетат (CH <sub>3</sub> CO), %	Уроновые кислоты, %
		Fuc	Xyl	Gal	Man	Glc			
F <sub>1</sub>	38.5	34.5	5.6	5.4	1.0	–	12.7	1.8	11.8
F <sub>2</sub>	42.9	44.1	2.2	5.8	–	–	22.9	4.0	5.9
F <sub>3</sub>	5.2	22.2	3.7	5.9	3.4	5.9	17.5	н.о.	3.2

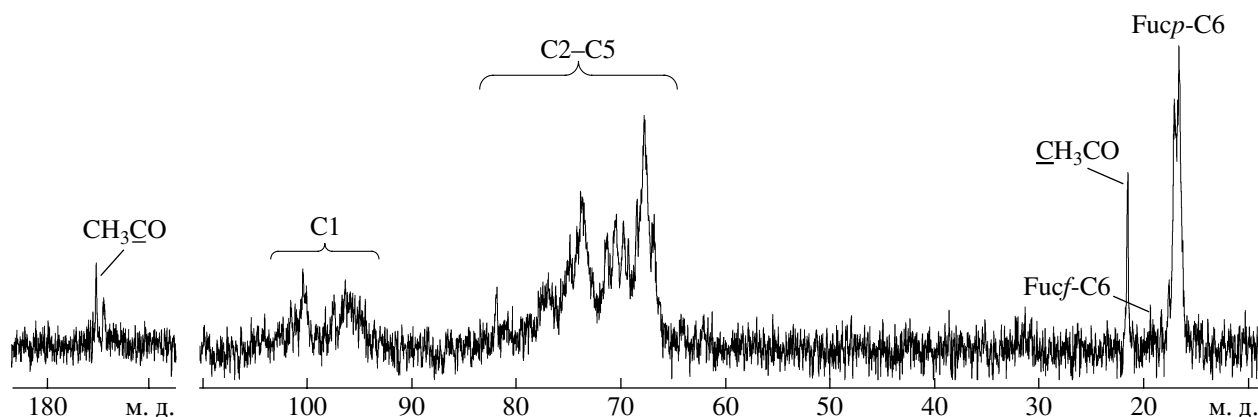
молекулах. Эта программа включает выделение фукоиданов из многих видов бурых водорослей, их структурный анализ и биологические испытания, а также синтез различных сульфатированных олигосахаридов, потенциальных фрагментов фукоиданов, для использования в качестве модельных соединений при химическом и биологическом исследовании природных полисахаридов. В частности, подробное изучение спектров ЯМР синтетических олигосахаридов [11–13] оказало большую помощь при расшифровке сложных спектров ЯМР природных фукоиданов. Нами было охарактеризовано строение полисахаридов, выделенных из *Laminaria saccharina* [14], *Chorda filum* [15] и трех представителей рода *Fucus* [1, 5, 16]. Данная работа посвящена структурному анализу фукоидана, выделенного из тихоокеанской бурой водоросли *Analipus japonicus*. Эта водоросль широко распространена в Японском море и относится к семейству Scytosiphonaceae, представители которого довольно слабо изучены с химической точки зрения. О полисахаридном составе *A. japonicus* в литературе имеются лишь самые предварительные сведения [17].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходным материалом для выделения фукоидана послужил образец водоросли *A. japonicus*, собранный в Японском море. Водорастворимые по-

лисахариды экстрагировали из обезжиренной биомассы водоросли водным раствором CaCl<sub>2</sub> при нагревании, кислые полисахариды осаждали из экстракта прибавлением бромид гексадецилтриэтиламмония и затем переводили в водорастворимые натриевые соли. Выделенный таким образом суммарный препарат фукоидана (состав см. в “Эксперимент. части”) далее очищали и фракционировали с помощью анионообменной хроматографии. Этим способом были получены три полисахаридные фракции, выходы и состав которых приведены в табл. 1. Для структурного анализа была выбрана фракция F<sub>2</sub>, содержащая L-фукозу, сульфат и ацетат в мольном соотношении 1.00 : 0.66 : 0.32, а также в небольших количествах галактозу, ксилозу и уроновые кислоты.

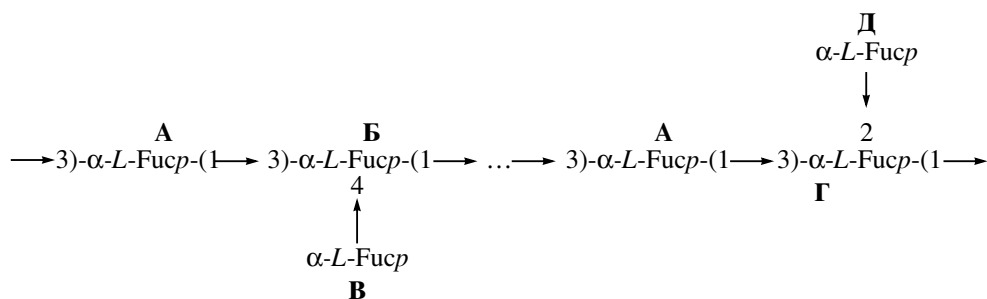
В ИК-спектре фукоидана F<sub>2</sub> наблюдались интенсивная полоса поглощения при 1260 см<sup>-1</sup> (сульфатные группы), а также широкая несимметричная полоса поглощения с максимумом при 848 см<sup>-1</sup>, форма которой свидетельствовала о наличии в полисахариде как аксиальных, так и экваториальных сульфатных групп. Это означало, что сульфатные группы могут занимать любые положения в остатках фукозы. Спектры ЯМР (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C) полисахарида, подобно аналогичным спектрам других водорослевых фукоиданов, были сложными и не интерпретировались полностью. Сигналы в аномерной (94–105 м.д.) и высокопольной (16–18 м.д.) областях углеродного спектра (рис. 1) бы-

**Рис. 1.** Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР нативного фукоидана F<sub>2</sub>.





**Таблица 4.** Химические сдвиги сигналов ( $\delta$ , м.д.) в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР образца deSdeAc, зарегистрированных в  $\text{D}_2\text{O}$  при 303 К



Остаток <i>L</i> -фукозы		Протоны						Атомы углерода					
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<b>A</b>	$\rightarrow 3)\text{-Fucp}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{-}$	5.10	3.94	4.02	4.05	4.31	1.22	97.0	67.8	76.3	70.0	68.0	16.8
<b>Б</b>	$\rightarrow 3)\text{-Fucp}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{-}$	5.15	3.94	3.97	4.10	4.35	1.35	97.1	67.8	76.1	81.2	69.8	17.4
<b>В</b>	$\text{Fucp}(\alpha 1 \rightarrow 4)\text{-}$	5.12	3.81	4.97	3.80	4.27	1.18	102.3	70.5	70.5	73.5	68.4	16.8
<b>Г</b>	$\rightarrow 3)\text{-Fucp}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{-}$	5.39	4.08	4.25	4.12	4.30	1.22	93.3	70.0	73.2	69.1	68.0	16.8
<b>Д</b>	$\text{Fucp}(\alpha 1 \rightarrow 2)\text{-}$	5.18	3.82	3.83	3.80	4.13	1.25	97.0	69.6	70.5	73.7	68.5	16.8

козы и  $\beta$ -ксилозы. Было подтверждено, что молекулы фукоидана построены главным образом из (1  $\rightarrow$  3)-связанных остатков  $\alpha$ -фукопиранозы (рис. 2, табл. 4, остаток **A**). Тип гликозидной связи в этой цепи был доказан наличием корреляционного пика 5.10/4.03 м.д. в спектре ROESY, отвечающего сумме взаимодействий  $\text{H1}'/\text{H3}$  +  $\text{H1}'/\text{H4}$ , характерных для  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3)-фукозидной связи. Наличие  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3)-фукозидной связи следовало также из характерного положения в HSQC-спектре корреляционных пиков  $\text{C1}'/\text{H1}'$  и  $\text{C3}/\text{H3}$ , отвечающих атомам углерода  $\text{C1}'$  и  $\text{C3}$  при гликозидной связи, соответственно при 97.0/5.10 и 76.3/4.02 м.д. Анализ спектров ЯМР также указывал на разветвленность полимерной цепи. Присутствие разветвлений в положении 2 было подтверждено наличием в HSQC-спектре характерного сигнала  $\text{C1}/\text{H1}$  (корреляционный пик 93.3/5.39 м.д.) для 2,3-дигликозилированного фукопиранозного остатка [15] (остаток **Г**). Присутствие разветвлений в положении 4 было подтверждено наличием в HSQC-спектре характерного сигнала  $\text{C1}/\text{H1}$  (корреляционный пик 102.3/5.12 м.д.) для терминального остатка, гликозилирующего положение 4 [13] (остаток **В**). Малоинтенсивный сигнал  $\text{C6}/\text{H6}$  в HSQC-спектре (корреляционный пик 19.5/1.23 м.д.) соответствовал небольшому содержанию остатков фукофуранозы. В то же время из спектров ЯМР не удалось получить надежных данных о длине боковых цепей.

Анализ сигналов  $\beta$ -ксилозы, представленных в двумерных ЯМР-спектрах deSdeAc, показывал,

что в образце присутствуют  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-ксилопиранозные цепи небольшой длины. Соотношение терминальных и внутренних ксилозных остатков, согласно интенсивностям сигналов в HSQC-спектре, составляло  $\sim 4$ . Положение этих цепей осталось не установленным. В спектре HSQC присутствовал корреляционный пик 62.0/3.76, отвечающий сигналу  $\text{C6}/\text{H6}$  остатков гексоз, однако природу этих сахаров с помощью ЯМР-спектроскопии также установить не удалось.

Спектры ЯМР десульфатированного фукоидана (deS) были проанализированы с целью определения количества и расположения ацетильных групп. Полное отнесение сигналов в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР для этого образца не проводилось из-за сильного перекрытия сигналов в двумерных спектрах. Однако было установлено, что ацетильные группы располагаются при О4 части фукопиранозных остатков (характеристичный корреляционный пик  $\text{C4}/\text{H4}$  при 71.6/5.42 м.д. в HSQC-спектре). Мольное соотношение фукозы и ацетата, рассчитанное из интенсивностей сигналов протонов метильных групп, составило 1.00 : 0.29.

Спектры ЯМР дезацетилированного фукоидана (deAc) были проанализированы с целью определения положения сульфатных групп. Сильное перекрытие сигналов в двумерных спектрах не позволило провести полное отнесение сигналов в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР. Однако анализ спектров COSY, TOCSY и HSQC показал, что большинство сульфатных групп располагается преимущественно при  $\text{C2}$  и в меньшей степени при  $\text{C4}$  в тер-

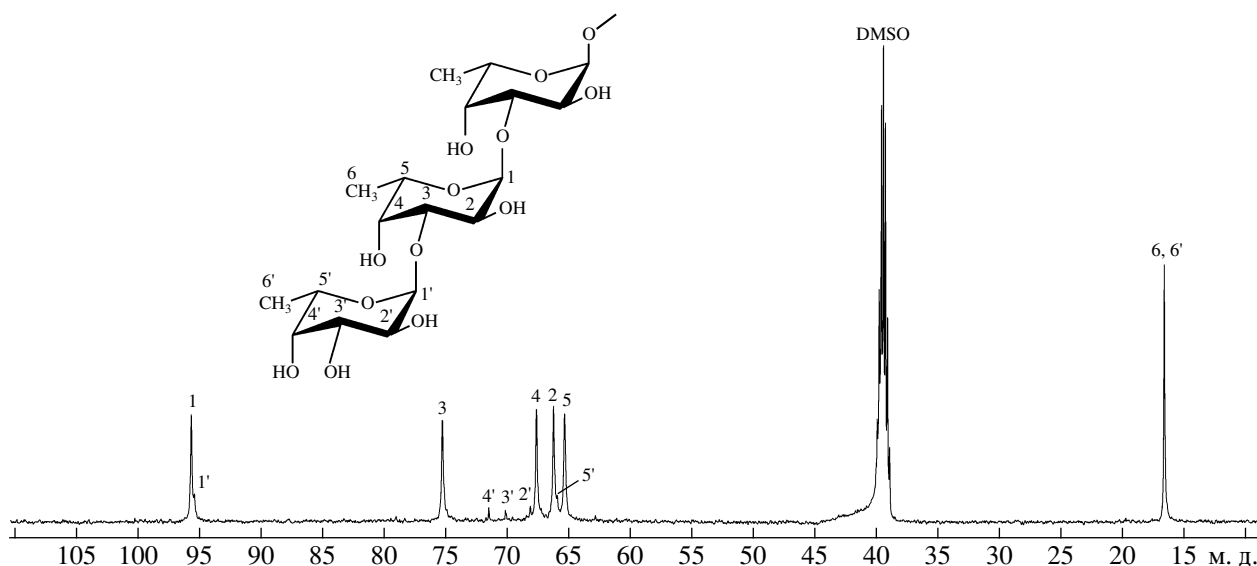


Рис. 3. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР образца Sm-I, полученного в результате расщепления по Смитсу десульфатированного и дезацетилированного фукоидана deSdeAc.

минальных (боковых) фукопиранозных остатках (характеристичные корреляционные пики C2/H2 при 77.5/4.45 м.д. и C4/H4 при 82.3/4.68 м.д. в HSQC-спектре). С некоторой вероятностью можно предположить, что небольшая часть сульфатных групп в этих остатках находится при C3 (малоинтенсивный корреляционный пик при 79.0/4.65 м.д.). Было определено также, что часть сульфатных групп располагается при C2 в нетерминальных фукопиранозных остатках (характеристичный корреляционный пик C2/H2 при 74.7/4.58 м.д. в спектре HSQC). Учитывая данные метилирования, можно предположить, что эти сульфатные группы занимают положения 2 в 3,4-дигликозильированных остатках фукопиранозы главной цепи фукоидана.

Поскольку продукт расщепления deSdeAc по Смитту (Sm-I) не растворялся в воде и даже в 1 М NaOH, образец для получения спектров ЯМР был приготовлен растворением вещества в DMSO- $d_6$  с добавлением хлорида лития (по аналогии с растворением целлюлозы [20]). Спектры ЯМР этого

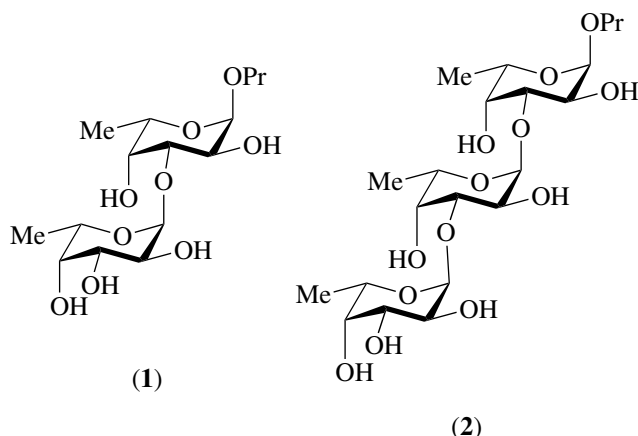
раствора регистрировали при температуре 333 К. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР содержал всего шесть интенсивных сигналов, отвечающих атомам углерода монозамещенного остатка  $\alpha$ -L-фукопиранозы, а также несколько малоинтенсивных сигналов, принадлежащих атомам углерода концевых невосстанавливающих моносахаридных остатков (рис. 3). Анализ двумерных спектров COSY, TOCSY и HSQC не позволил сделать независимое отнесение сигналов фукопиранозных остатков в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР и определить положения гликозидных связей в полимерной цепи исследуемого образца из-за перекрывания сигналов протонов H2, H3 и H4 в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР (табл. 5). Однако было показано, что спектры Sm-I аналогичны спектрам  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3)-связанных олигофукозидов (1) и (2), зарегистрированных также в DMSO- $d_6$  (табл. 6; синтез этих веществ описан нами ранее [11, 12]). Используя протонные спектры модельных олигосахаридов, удалось отнести все сигналы в спектрах образца Sm-I (табл. 5) и подтвердить, что фукопиранозные остатки в основной цепи по-

Таблица 5. Химические сдвиги сигналов в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР вещества Sm-I, зарегистрированных в DMSO- $d_6$  при 333 К

Остаток*	H1	H2	H3	H4	H5	H6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-	4.73	3.60	3.62	3.62	4.12	0.97	95.7	66.1	75.3	67.7	65.4	16.7
$\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-	4.73	3.54	3.62	3.45	4.10	1.03	95.4	68.2	70.2	71.5	66.0	16.7

\* Для концевых "восстанавливающих" остатков  $\rightarrow$ 3)-L-Fucp-(OH)OMe, находящихся преимущественно в виде метилгликозидов (в результате реакции с метанолом в процессе десульфатирования),  $\delta\text{H}(\alpha\text{-OMe}) = 3.13$ ;  $\delta\text{C}(\alpha\text{-OMe}) = 54.7$ ;  $\delta\text{H}(\beta\text{-OMe}) = 3.23$ ;  $\delta\text{C}(\beta\text{-OMe}) = 55.6$ ;  $\delta\text{H}(\sim\text{OH}) = 4.37$  и 5.10 м.д.

лисахарида соединены между собой  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-гликозидными связями.



Справедливость интерпретации сигналов в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР Sm-I была подтверждена вычислением суммарного среднеквадратичного отклонения ( $S$ ) величин химических сдвигов в экспериментальном спектре полисахарида от соответствующих ве-

личин в спектрах модельных олигофукозидов (1) и (2). Этот прием обычно используется для сравнения экспериментальных и расчетных спектров сложных углеводных структур [21], причем спектры считаются практически идентичными, если величина  $S$  не превышает 0.5. В нашем случае расчет дал величину  $S$  0.3 для дисахарида (1) и 0.4 для трисахарида (2) (табл. 7). Такие незначительные различия могут быть обусловлены различной длиной цепей, концентрацией и вязкостью растворов, а также разницей температур регистрации спектров (333 и 303 К) для образцов полисахарида и олигосахаридов.

Подводя итог химическому и спектроскопическому исследованию, можно заключить, что в основе молекул фукоидана  $F_2$  из бурой водоросли *A. japonicus* лежит линейная углеводная цепь из (1 $\rightarrow$ 3)-связанных остатков  $\alpha$ -L-фукопиранозы, содержащая многочисленные заместители в виде единичных остатков  $\alpha$ -L-фукопиранозы (три ответвления в положении 4 и одно в положении 2 на каждые 10 остатков главной цепи). Сульфатные

**Таблица 6.** Химические сдвиги сигналов в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР олигофукозидов (1) и (2), зарегистрированных в  $\text{DMSO-}d_6$  при 303 К

Олигосахарид	Остаток	H1	H2	H3	H4	H5	H6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
(1)	$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Фуцp-OPr*	4.61	3.64	3.62	3.69	3.79	1.12	98.9	66.2	75.6	67.7	65.1	16.6 <sup>a</sup>
	$\alpha$ -L-Фуцp-(1 $\rightarrow$ 3)-	4.76	3.55	3.64	3.47	4.20	1.06	95.9	68.0	69.6	71.8	66.1	16.4 <sup>a</sup>
(2)	$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Фуцp-OPr*	4.62	3.66	3.66	3.71	3.78	1.14	98.8	66.0	75.3	67.5	65.0	16.5 <sup>b</sup>
	$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Фуцp-(1 $\rightarrow$ 3)-	4.81	3.65	3.73	3.67	4.21	1.10	95.5	66.2	75.8	68.0	65.2	16.4 <sup>b</sup>
	$\alpha$ -L-Фуцp-(1 $\rightarrow$ 3)-	4.76	3.55	3.64	3.47	4.20	1.07	96.2	68.0	69.6	71.7	66.0	16.3 <sup>b</sup>

\* Сигналы протонов пропил-агликона:  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$   $\delta$  0.88;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$   $\delta$  1.54;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$   $\delta$  3.33–3.34 и 3.47–3.48; сигналы атомов углерода пропил-агликона:  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$   $\delta$  10.5–10.7;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$   $\delta$  22.4–22.5;  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$   $\delta$  68.8–68.9 м.д.

<sup>a,b</sup> Отнесение сигналов может быть обратным.

**Таблица 7.** Экспериментальные химические сдвиги сигналов в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР Sm-I, зарегистрированном в  $\text{DMSO-}d_6$ , и их отличия ( $\Delta\delta\text{C}$ ) от спектров модельных олигосахаридов (1) и (2)

Объект	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	$S^a$
		Химические сдвиги $^{13}\text{C}$ -ЯМР (м.д.)						
Полисахаридная цепь Sm-I	$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Фуцp-(1 $\rightarrow$ 3)-	95.7	66.1	75.3	67.7	65.4	16.7	0.3
	$\alpha$ -L-Фуцp-(1 $\rightarrow$ 3)-	95.4	68.2	70.2	71.5	66.0	16.7	
Разница в положении сигналов $\Delta\delta^{13}\text{C}$ (м.д.)								
Дисахарид (1)	$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Фуцp-(1 $\rightarrow$ 3)-	-0.2	0.1	-0.3	0	0.3	0.1	
	$\alpha$ -L-Фуцp-(1 $\rightarrow$ 3)-	-0.5	0.2	0.6	-0.3	-0.1	0.3	
Трисахарид (2)	$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Фуцp-(1 $\rightarrow$ 3)-	0.2	-0.1	-0.5	-0.3	0.2	0.3	
	$\alpha$ -L-Фуцp-(1 $\rightarrow$ 3)-	-0.8	0.2	0.6	-0.2	0	0.4	

<sup>a</sup> Спектры считаются практически идентичными, если величина суммарного среднеквадратичного отклонения  $S$  не превышает 0.5 [21].

группы занимают положения 2 и (в меньшей степени) 4, причем большинство концевых невосстанавливаемых остатков фукозы сульфатировано дважды. Ацетильные группы расположены преимущественно в положениях 4. По структуре главной цепи исследованный полисахарид аналогичен известным фукоидам из *L. saccharina* [14], *S. filum* [15] и *Cladosiphon okamuranus* [22]. От последнего полисахарида он отличается тем, что боковые ответвления от главной цепи представлены в нем остатками фукозы, а не глюкуроновой кислоты, а от первых двух – более высокой степенью разветвления и ацетилирования и положением боковых остатков преимущественно при C4, а не при C2 главной цепи. Характер распределения углеводных и неуглеводных заместителей вдоль главной цепи и структурное значение минорных моносахаридных компонентов фукоида на еще предстоит установить.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЖХ ацетатов полиолов проводили на хроматографе Hewlett-Packard 5890A, снабженном пламенно-ионизационным детектором и интегратором 3393A, с использованием капиллярной колонки HP-1MS в токе азота при градиенте температуры от 160 до 290°C со скоростью 7°/мин. Для спектрофотометрических измерений использовали Ultrospec 4050 (LKB Biochrom). Оптическое вращение измеряли на поляриметре ПУ-07 (Россия). ИК-спектры регистрировали на приборе Perkin-Elmer 577 в таблетках KBr.

**Аналитические методы.** Для кислотного гидролиза к навескам полисахаридных препаратов (4–6 мг) приливали 1 мл 2 М трифторуксусной кислоты, нагревали 8 ч при 100°C, прибавляли 1 мл водного раствора мио-инозита (1 мг/мл, внутренний стандарт), кислоту отгоняли в вакууме с этанолом. Перевод освобожденных моносахаридов в ацетаты полиолов и количественный анализ методом ГЖХ проводили по методике [23]. Сульфат определяли турбидиметрически в виде BaSO<sub>4</sub> после гидролиза полисахаридов в 2 М трифторуксусной кислоте [24]. Уроновые кислоты определяли цветной реакцией с 3,5-диметилфенолом и конц. серной кислотой [25]. Содержание ацетильных групп в полисахаридах измеряли по методике [26]. Абсолютную конфигурацию фукозы устанавливали методом ГЖХ ацетилированных S-(+)-вторбутилгликозидов [27].

**Спектроскопия ЯМР.** Спектры ЯМР получали на спектрометре Bruker DRX-500 при 303 К после 1–2-кратной лиофилизации образцов (кроме Sm-I) из D<sub>2</sub>O и последующего растворения их в 99.96% D<sub>2</sub>O (2–3% растворы). Для калибровки спектров использовали Na-соль 3-(триметилсилил)-пропионовой-2,2,3,3-*d*<sub>4</sub> кислоты (внутренний стандарт, δ<sub>H</sub> 0). Спектры ЯМР образца Sm-I регистрировали

для 2.5% раствора полисахарида в 10% растворе LiCl в 99.95% DMSO-*d*<sub>6</sub> при 333 К. Спектры были обработаны с помощью программы XWINNMR 3.6 фирмы “Bruker”. Параметры, использованные для получения двумерных спектров ЯМР, были описаны ранее [5]. Дополнительные сведения: эксперимент TOCSY регистрировали со временем смешивания (MLEV17 spin-lock) 200 мс, эксперимент ROESY – со временем смешивания (ROE spin-lock) 200 мс, эксперимент NOESY – со временем смешивания (mixing time) 100 мс. Эксперимент НМВС регистрировали с задержкой для эволюции дальних констант спин-спинового взаимодействия, равной 60 мс.

**Выделение фукоида.** Образец водоросли, собранный в бухте Астафьева (залив Петра Великого, Японское море) в сентябре 1978 г., высушивали вначале на воздухе, затем в вакууме над фосфорным ангидридом до постоянного веса и измельчали до размера частиц, не превышающего 0.1 мм. Измельченную биомассу обрабатывали последовательно этанолом, хлороформом, метанолом и ацетоном и высушивали. Далее 15 г биомассы и 150 мл 2% водного раствора CaCl<sub>2</sub> перемешивали на магнитной мешалке 5 ч при 85°C, центрифугировали и к экстракту приливали 25 мл 10% водного раствора бромида гексадецилтриметиламмония (цетавлона). Остаток водоросли еще трижды экстрагировали в тех же условиях, получаемые экстракты объединяли с суспензией цетавлоновых солей и для полного осаждения кислых полисахаридов прибавляли еще 50 мл раствора цетавлона. Суспензию центрифугировали, осадок промывали водой, затем этанолом и перемешивали на магнитной мешалке с 20% этанольным раствором NaI (3 × 50 мл) при комнатной температуре в течение 2–3 сут. Далее осадок промывали этанолом, растворяли в воде, диализовали и лиофилизовали; получали суммарную фракцию фукоида F<sub>1</sub>; выход 1.04 г (6.9% от сухой биомассы), состав (%): фукоза 39.0; сульфат 18.4; галактоза 7.0; ксилоза 3.4; глюкоза 2.1; манноза 1.6. 1.35 г фракции F<sub>2</sub> растворяли в 50 мл воды, нерастворимый осадок отделяли центрифугированием, а супернатант наносили на колонку (3 × 50 см) с DEAE-сефацелом (Pharmacia) в Cl<sup>-</sup> форме, которую промывали последовательно водой и далее 0.5, 1.0 и 1.5 М водными растворами NaCl, каждый раз до отсутствия положительной реакции элюата на углеводы с фенолом и конц. серной кислотой [28]. Солевые растворы диализовали, концентрировали и лиофилизовали, получали фракции F<sub>1</sub>–F<sub>3</sub>, выходы и состав которых приведены в табл. 1. Для фракции F<sub>2</sub> [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –152° (с 1.0, вода).

**Десульфатирование фукоида.** Раствор 200 мг фукоида F<sub>2</sub> в 20 мл воды пропускали через колонку, содержащую дауэкс 50Wx4 в RuH<sup>+</sup> форме. Полученный раствор лиофилизовали, приливали



18 мл DMSO и 2 мл абс. MeOH, перемешивали до полного растворения полисахарида и нагревали 5 ч при 80°C. Далее смесь диализовали, концентрировали, лиофилизовали и получали десульфатированный фукоидан deS, выход 90 мг,  $[\alpha]_D^{20} -173^\circ$  (с 1.0, вода).

**Дезацетилирование полисахаридов.** 41 мг фукоидана F<sub>2</sub> или 29 мг десульфатированного препарата deS растворяли в 2 мл воды, прибавляли равные количества NaBH<sub>4</sub> и выдерживали не менее 2 ч при комнатной температуре. Далее приливали 2 мл конц. NH<sub>4</sub>OH, оставляли на ночь при 37°C, диализовали и лиофилизовали, получали дезацетилированный фукоидан deAc, выход 25 мг,  $[\alpha]_D^{20} -160^\circ$  (с 0.7, вода), или десульфатированный и дезацетилированный фукоидан deSdeAc, выход 22 мг,  $[\alpha]_D^{20} -171^\circ$  (с 1.0, вода).

**Периодатное окисление фукоидана deSdeAc.** К раствору 68 мг полисахарида в 50 мл воды приливали 27 мл 0.02 М водного раствора NaO<sub>4</sub> и выдерживали в темноте при комнатной температуре 5 сут до прекращения расхода окислителя (контроль по убыли оптической плотности раствора при 305 нм). К раствору прибавляли 0.5 мл этиленгликоля, смесь диализовали, концентрировали до объема 25 мл, прибавляли 100 мг NaBH<sub>4</sub> и оставляли на ночь. Раствор нейтрализовали уксусной кислотой, диализовали и лиофилизовали, получали 55 мг окисленного периодатом и восстановленного полисахарида, содержащего 50.4% фукозы, 2.2% ксилозы и 3.0% галактозы. Это вещество растворяли в 10 мл 1% CH<sub>3</sub>COOH и нагревали 2 ч при 100°C. Обильный осадок, выпавший из реакционной смеси в процессе частичного гидролиза, отделяли центрифугированием, промывали водой, ацетоном и сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, получали фракцию Sm-I расщепленного по Смитсу десульфатированного и дезацетилированного фукоидана, выход 18 мг. Супернатант упаривали досуха, сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и NaOH, остаток растворяли в 2 мл воды и наносили на колонку 2.7 × 76 см с гелем TSK HW-40(S) Toyopearl (Toyo Soda Manufacturing, Япония, диапазон разделяемых масс по декстранам 0.1–7 кДа). Элюцию проводили водой со скоростью 2 мл/мин, для детектирования использовали дифференциальный рефрактометр (Knauer, Германия). Полимерную фракцию концентрировали, лиофилизовали, получали фракцию Sm-II, выход 9 мг, содержащую 14.9% фукозы, 6.9% ксилозы и 2.8% галактозы.

**Метилирование полисахаридов.** К суспензии 5–7 мг полисахарида (F<sub>2</sub>, deS, Sm-I) в 0.5 мл DMSO прибавляли 30–40 мг тонкоизмельченного NaOH и 0.2 мл CH<sub>3</sub>I, смесь перемешивали 1 ч, добавляя через 30 мин еще 0.2 мл CH<sub>3</sub>I (ср. [29]). Затем приливали 4 мл воды и 4 мл хлороформа, смесь диа-

лизовали, упаривали для удаления хлороформа и лиофилизовали. Для фукоидана F<sub>2</sub> обработку метилирующими реагентами повторяли еще раз, а для фукоидана Sm-I – еще два раза. К метилированному полисахариду прибавляли 1 мл 2 М CF<sub>3</sub>COOH, нагревали 8 ч при 100°C, кислоту отгоняли с этанолом, полученные частично метилированные моносахариды переводили в ацетаты полиолов и анализировали методами ГЖХ и ГЖХ-МС по известным методикам [30].

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы благодарят А.О. Чижова (ИОХ РАН) за проведение анализа продуктов метилирования полисахаридов методом ГЖХ-МС.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 2006. V. 341. P. 238–245.
2. Nagumo T., Nishino T. Fucan sulfates and their anticoagulant activities. // Polysaccharides in Medicinal Applications / Ed. Dumitriu S. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996. P. 545–574.
3. Mourão P.A.S. // Curr. Pharm. Design. 2004. V. 10. P. 967–981.
4. Berteau O., Mulloy B. // Glycobiology. 2003. V. 13. P. 29R–40R.
5. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 719–730.
6. Duarte M.E.R., Cardoso M.A., Nosedá M.D., Cerezo A.S. // Carbohydr. Res. 2001. V. 333. P. 281–293.
7. Ponce N.M.A., Pujol C.A., Damonte E.B., Flores M.L., Stortz C.A. // Carbohydr. Res. 2003. V. 338. P. 153–165.
8. Sakai T., Kimura H., Kojima K., Shimanaka K., Ikai K., Kato I. // Mar. Biotechnol. 2003. V. 5. P. 70–78.
9. Silva T.M.A., Alves L.G., de Queiroz K.C.S., Santos M.G.L., Marques C.T., Chavante S.F., Rocha H.A.O., Leite E.L. // Brazilian J. Med. Biol. Res. 2005. V. 38. P. 523–533.
10. Rocha H.A.O., Moraes F.A., Trindade E.S., Franco C.R.C., Torquato R.J.S., Veiga S.S., Valente A.P., Mourão P.A.S., Leite E.L., Nader H.B., Dietrich C.P. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 41278–41288.
11. Khatuntseva E.A., Ustuzhanina N.E., Zatonskii G.V., Shashkov A.S., Usov A.I., Nifant'ev N.E. // J. Carbohydr. Chem. 2000. V. 19. P. 1151–1173.
12. Gerbst A.G., Ustuzhanina N.E., Grachev A.A., Khatuntseva E.A., Tsvetkov D.E., Shashkov A.S., Usov A.I., Preobrazhenskaya M.E., Ushakova N.A., Nifantiev N.E. // J. Carbohydr. Chem. 2003. V. 22. P. 109–122.
13. Gerbst A.G., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Khatuntseva E.A., Tsvetkov D.E., Usov A.I., Shashkov A.S., Preobrazhenskaya M.E., Ushakova N.A., Nifantiev N.E. // Russian J. of Bioorgan. Chemistry. 2004. V. 30. P. 137–147. (Гербст А.Г., Грачев А.А., Устюжанина Н.Е., Хатунцева Е.А., Цветков Д.Е., Усов А.И., Шашков А.С., Преображенская М.Е., Уша-

- кова Н.А., Нифантьев Н.Э. // Биоорган. химия. 2004. Т. 30. С. 156–167.)
14. Усов А.И., Смирнова Г.П., Билан М.И., Шауков А.С. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 437–445.
  15. Chizhov A.O., Dell A., Morris H.R., Haslam S.M., McDowell R.A., Shashkov A.S., Nifant'ev N.E., Khatuntseva E.A., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 1999. V. 320. P. 108–119.
  16. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifant'ev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 2004. V. 339. P. 511–517.
  17. Усов А.И., Кошелева Е.А., Яковлев А.П. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. С. 830–836.
  18. Rees D.A. Polysaccharide conformations // MTP Intern. Review of Science. V. 7. Carbohydrates / Ed. Aspinall G.O. London: Butterworth, 1973. P. 251–283.
  19. Patankar M.S., Oehninger S., Barnett T., Williams R.L., Clark G.F. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 21770–21776.
  20. Petrus L., Gray D.G., BeMiller J.N. // Carbohydr. Res. 1995. V. 268. P. 319–323.
  21. Lipkind G.M., Shashkov A.S., Nifant'ev N.E., Kochetkov N.K. // Carbohydr. Res. 1992. V. 237. P. 11–22.
  22. Nagaoka M., Shibata H., Kimura-Takagi I., Hashimoto S., Kimura K., Makino T., Aiyama R., Ueyama S., Yokokura T. // Glycoconjugate J. 1999. V. 16. P. 19–26.
  23. Слонекер Дж. // Методы исследования углеводов. Пер. с англ. / Ред. А.Я. Хорлин. М.: Мир, 1975. С. 22–25.
  24. Dodgson K.S., Price R.G. // Biochem. J. 1962. V. 84. P. 106–110.
  25. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Mar. 1995. V. 38. P. 43–51.
  26. Hestrin S. // J. Biol. Chem. 1949. V. 180. P. 249–261.
  27. Gerwig G.J., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G. // Carbohydr. Res. 1978. V. 62. P. 349–357.
  28. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.
  29. Ciukanu I., Kerek F. // Carbohydr. Res. 1984. V. 131. P. 209–217.
  30. Bjorndal H., Hellerquist C.G., Lindberg B., Svensson S. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1970. V. 9. P. 610–619.

## Polysaccharides of Algae: 60. Fucoidan from the Pacific Brown Alga *Analipus japonicus* (Harv.) Winne (Ectocarpales, Scytosiphonaceae)

M. I. Bilan, A. N. Zakharova, A. A. Grachev, A. S. Shashkov,  
N. E. Nifant'ev, and A. I. Usov<sup>#</sup>

<sup>#</sup> Phone: +7 (495) 137-6791; fax: +7 (495) 135-5328; e-mail: usov@ioc.ac.ru

Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 119991 Russia

A fucoidan containing *L*-fucose, sulfate, and *O*-acetyl groups at a molar ratio of 3 : 2 : 1, as well as minor amounts of xylose, galactose, and uronic acids was isolated from the brown alga *Analipus japonicus* collected in the Sea of Japan. The structures of the native polysaccharide and the products of its desulfation and deacetylation were studied by the methods of methylation, periodate oxidation, and NMR spectroscopy. It was shown that the polysaccharide molecule mainly consists of a linear carbohydrate chain of (1→3)-linked  $\alpha$ -*L*-fucopyranose residues, which bear numerous branches in the form of single  $\alpha$ -*L*-fucopyranose residues (three branches at position 4 and one branch at position 2 per each ten residues of the main chain). Sulfate groups occupy positions 2 and (to a lesser extent) 4, most of the terminal nonreducing fucose residues being sulfated twice. The acetyl groups are located predominantly at positions 4. The structural role of minor monosaccharides was not established. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2007, vol. 33, no. 1; see also <http://www.maik.ru>

*Key words:* *Analipus japonicus*, brown algae, fucoidan, NMR spectroscopy, sulfated polysaccharides