



УДК 542.92 + 547.458 + 543.51

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЧАСТИЧНОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ
ПОЛИСАХАРИДОВ

Свиридов А. Ф., Чижов О. С.

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

Обсуждаются методы статистического, избирательного и специфического расщепления полисахаридов химическим путем.

Полисахариды наряду с белками и нуклеиновыми кислотами представляют собой один из важнейших классов биополимеров. В живой клетке они являются структурным материалом клеточных стенок, служат резервными питательными веществами и несут специфические функции, связанные с распознаванием клетками друг друга в таких биологических процессах, как дифференцировка и объединение однородных клеток в ткань, а соответствующих тканей — в орган, узнавание клетками иммунной системы чужеродных клеток и т. д.

Молекулы полисахаридов — это более или менее длинные прямые или разветвленные цепи, состоящие из моносахаридных единиц (в пиранозной или фуранозной форме), связанных между собой α - или β -гликозидными связями. Наиболее обычными компонентами природных полисахаридов являются нейтральные сахара: *L*-арабиноза, *D*-ксилоза, *D*-глюкоза, *D*-манноза, *D*- и реже *L*-галактоза, *L*-фукоза, *L*-рамноза, *D*-фруктоза; аминокислоты: *N*-ацетил-*D*-глюкозамин, *N*-ацетил-*D*-галактозамин; уроновые кислоты: *D*-глюкуроновая, *D*-галактуроновая, реже *D*-маннуроновая, *L*-гулуруновая и *L*-идуруновая. В отличие от белков и нуклеиновых кислот, где количество мономерных единиц ограничено соответственно 20 и 8, в полисахаридах их особенно много, причем их список продолжает пополняться, пожалуй, даже с возрастающей скоростью. Можно было бы назвать еще несколько десятков моносахаридов, найденных в тех или иных полисахаридах, выделенных из таких специфических источников, как водоросли, микроорганизмы, ткани и органы низших и высших животных и растений. Кроме того, в состав полисахаридов часто входят «несахарные компоненты»: остатки органических и неорганических кислот, связанные с моносахаридами сложноэфирными или амидными связями (чаще других ацетаты, сульфаты, фосфаты), остатки кето- и оксикислот, связанные в виде кеталей или простых эфиров, и др.

Итак, разнообразие структур полисахаридов очень велико и установление их строения распадается на определение: 1) мономерного состава (идентификация и количественное определение углеводных и неуглеводных компонентов); 2) размера цикла, местоположения и числа межмономерных гликозидных связей и мест привязки неуглеводных компонентов (если они имеются) для каждой из моносахаридных единиц; 3) конфигура-

ции гликозидных связей; 4) степени регулярности структуры полисахарида и последовательности моносахаридных единиц в его цепях; 5) молекулярного веса и степени полидисперсности; 6) вторичной структуры.

Для определения мономерного состава полисахаридов обычно применяется полный кислотный гидролиз. Размер циклов, местоположение гликозидных связей и неуглеводных компонент устанавливаются главным образом с помощью методов метилирования и перйодатного окисления; молекулярный вес, степень полидисперсности и вторичной структуры полисахаридов — с помощью различных физических методов. Для установления вторичной структуры также имеют большое значение расчетные методы. Определение степени регулярности структуры полисахарида, последовательности моносахаридных единиц в его цепях, а часто и конфигурации гликозидных связей возможно лишь путем проведения частичного расщепления полисахарида. Перспективы применения частичного расщепления в химии полисахаридов гораздо шире — реконструкция структуры исходного полимера по строению осколков, полученных при его частичном расщеплении. Распространение этого наиболее рационального пути установления строения биополимеров на полисахариды могло бы иметь большое значение для дальнейшего прогресса в области структурной химии полисахаридов.

Различают три вида частичного расщепления: *статистическое*, при котором, как показывает само название, разрыв или сохранение той или иной гликозидной связи в первом приближении можно считать не зависящими от ее природы; *избирательное*, при котором гликозидные связи данного специфического типа рвутся или сохраняются преимущественно перед другими; и наконец, *специфическое*, при котором рвутся только связи данного типа, тогда как все другие остаются неизменными.

Наибольший интерес представляют методы специфического расщепления как наиболее перспективные для работы с полисахаридами сложного строения, поскольку применение к таким полисахаридам методов расщепления с низкой избирательностью неизбежно ведет к образованию трудноразделимых смесей. Ферментативные методы специфического частичного расщепления полисахаридов в данном обзоре не рассматриваются, так как сведения о субстратной специфичности большинства эндополисахаридаз в настоящее время недостаточны и к тому же часто противоречивы (см., например, [1]). Мы сочли полезным рассмотреть наиболее интересные с экспериментальной точки зрения методики, а также дать ссылки на наиболее важные работы по гликопротеинам, касающиеся частичного расщепления углеводной части этих биополимеров. В обзоре обсуждаются результаты, опубликованные до середины 1975 г., а в отдельных случаях и более поздние.

1. СТАТИСТИЧЕСКИЙ КИСЛОТНЫЙ ГИДРОЛИЗ

Наиболее общим методом частичного расщепления полисахаридов пока остается кислотный гидролиз. Для идеального линейного полисахарида, в котором расщепление всех гликозидных связей равновероятно*, максимальные выходы олигосахаридов рассчитаны статистически [3, 4] и составляют для n -мера при степени гидролиза $s = \frac{2}{n+1}$ величину

$$Y_{n(\text{макс})} = n \left(\frac{2}{n+1} \right)^2 \cdot \left(\frac{n-1}{n+1} \right)^{n-1}$$

Согласно этим формулам, максимальный выход дисахарида составит в идеальном случае $\sim 29,6\%$, трисахарида $\sim 18,8\%$, тетрасахарида

* Такое допущение соответствует истине (см. обзор [2]), так как скорости гидролиза гликозидов наиболее распространенных нейтральных моносахаридов в пиранозной форме близки.

~13,8% и т. д. В действительности выход желаемого олигосахаридов всегда ниже расчетного. Одна из причин этого состоит в большей устойчивости гликозидных связей, расположенных внутри угловидных цепей, по сравнению с концевыми [5—11]. Поэтому отщепившиеся низкомолекулярные фрагменты гликозидных цепей гидролизуются быстрее, чем полимерные цепи, что ведет к дополнительному снижению выхода низкомолекулярных фрагментов [2, 3].

Картина гидролиза еще более усложняется для сильно разветвленных полисахаридов, так как число возможных олигосахаридов увеличивается и поэтому снижается выход каждого из них. Осложнения могут возникнуть и вследствие кислотной реверсии. Так, при действии на раствор *D*-глюкозы и мальтозы 0,1 н. H_2SO_4 (6 ч, 100°) наряду с гидролизом мальтозы наблюдается образование левоглюкозана, изомальтозы, нигерозы, панозы и других олигосахаридов [12]. Выделение продуктов реверсии из гидролизата может привести к ложным выводам о структуре исходного полисахарида.

Согласно статистическим расчетам [2, 3], если бы удалось создать условия гидролиза, при которых олигомеры, раз образовавшись, были бы защищены от дальнейшего распада, их максимальные выходы увеличились бы до $Y_{n(\max)} = 2/n + 1$ и составили для дисахаридов 66,6%, для трисахаридов 50% и т. д. Еще 20 лет назад был найден экспериментальный подход к осуществлению этой идеи [13]. Если полисахарид и полимерный гидролизующий агент поместить в мешок для диализа, то через мембрану пройдут только относительно небольшие молекулы продуктов гидролиза, которые будут таким образом удаляться из сферы реакции и предохраняться от дальнейшего распада.

В первых работах такого рода и некоторых более поздних в качестве полимерного гидролизующего агента применялись ферменты [14—16]. Так, в обычных условиях при ферментативном гидролизе целлюлозы образуются только глюкоза и целлобиоза. Применяв непрерывный диализ, Хаш и Кинг [13] установили, что на самом деле первичными продуктами энзиматического расщепления являются высшие олигосахариды. Позже Пэйнтер [14] провел ферментативное расщепление с непрерывным диализом для некоторых полисахаридов и показал, что суммарный выход олигосахаридов может достигать 60%, а это значительно выше выхода олигомеров, наблюдаемого при проведении реакции в обычных условиях.

Из кислых березы белой (*Betula papyrifera*) * [15] с почти количественным выходом удалось получить две полимергомологические серии сахаров. Нейтральная фракция состояла из ксилозы (34%), ксилобиозы (9%), ксилотриозы (10%), ксилотетраозы (4%) и ксилопентаозы (3%). В кислой фракции были обнаружены альдотетрао- (11%), альдопентао- (11%), альдогексао- (9%) и альдогептао- (5%) уроновые кислоты. Аналогично при ферментативном гидролизе глюкоманнана из банковой сосны в этих условиях выделены ди-, три- и высшие олигосахариды с общим выходом 37% [17]. С подобным выходом (29%) получены олигосахариды и при ферментативном расщеплении с одновременным диализом полисахарида из *Populus tremuloides* [18].

Полимерными гидролизующими агентами могут служить сами полисахариды, содержащие кислотные группы в H^+ -форме. Так, непрерывный диализ через целлофановые мембраны был использован при автогидролизе сульфатированных полисахаридов, содержащих лабильные к кислотам гликозидные связи. При установлении строения *O*-сульфатированных полисахаридов (например, типа капна-каррагинана [19]) наибольшие трудности вызывает локализация *O*-сульфатных групп. Метилирование этих

* Основная цепь кевлапа состоит из остатков $1 \rightarrow 4\beta$ -*D*-ксилопиранозы. Примерно каждый 10-й остаток *D*-ксилопиранозы несет ответвление по $C_{(2)}$ в виде 4-*O*-метил- α -*D*-глюкуроновой кислоты.

полисахаридов дает ненадежные результаты. Применение приема частичного расщепления в ряде случаев позволило локализовать гликозидные и эфирные связи в сульфатированных полисахаридах. Так, при автогидролизе фурцелларана, обработанного избытком катионита, с одновременным диализом [20] с 60 %-ным выходом был получен набор моно- и олигосахаридов. Анализ диализуемой фракции показал наличие в ней *D*-галактозы, 3,6-ангидро-*D*-галактозы, дисахарида каррабиозы (35%) и по крайней мере пяти сульфатированных моно- и олигосахаридов. При автогидролизе с диализом полисахарида из *Cladophora rupestris* [21] через 6 ч недиализуемый материал представлял собой в основном белки (23%). В нейтральной фракции диализата (43%) присутствовали олигосахариды, состоящие из остатков *D*-ксилопиранозы и *D*-галактофуранозы. Из кислой фракции диализата были выделены моно-, ди-, три- и пентасахариды с различными типами связей, размерами циклов моносахаридных остатков и распределением сульфатных групп.

Таким образом, автогидролиз сульфатированных полисахаридов с одновременным диализом позволяет получать олигосахариды с высоким выходом, а определение их строения дает возможность надежно идентифицировать положение *O*-сульфатных групп в моносахаридных остатках.

Интересные результаты были получены при использовании в качестве гидролизующего агента полистиролсульфокислоты, а в качестве субстратов — полисахаридов, содержащих аминсахара. Уже давно было замечено, что полимерные сульфокислоты гидролизуют пептидные связи много быстрее, чем минеральные кислоты [22, 23]. Это, вероятно, обусловлено наличием в субстрате свободных аминогрупп [23]. Так, при нахождении, например, аминогруппы в α -положении к пептидной связи скорость гидролиза последней в присутствии дауэкса 50×8 увеличивается в 60 раз по сравнению с гидролизом минеральной кислоты равной концентрации [23].

Необходимость в диализе в большинстве случаев при этом отпадает, так как полианион кислоты создает у своей поверхности высокую локальную концентрацию противоионов (в данном случае ионов гидроксония), в результате чего в остальном объеме раствора последние практически отсутствуют [22]. Следовательно, любая молекула, несущая положительный заряд, в силу электростатического взаимодействия должна легко адсорбироваться поверхностью полианиона. Ввиду высокой локальной концентрации ионов водорода гидролиз такой макромолекулы на поверхности смолы проходит быстро, а образовавшиеся нейтральные фрагменты переходят в раствор, где кислотность значительно понижена. В связи с этим при гидролизе полисахаридов, содержащих остатки аминсахаров, полимерные кислоты проявляют большую каталитическую активность, чем минеральные кислоты в таких же концентрациях. В то же время полимерные кислоты по сравнению с минеральными являются более мягкими катализаторами. При гидролизе в присутствии катионитов деградация моно- и олигосахаридов происходит в значительно меньшей степени по сравнению с гидролизом минеральными кислотами, особенно в случае полисахаридов, содержащих остатки аминсахаров и уроновых кислот [24]. Очень показательным в этом отношении сравнительное изучение гидролиза овомукоида [25, 26] соляной и серной кислотами, а также в присутствии дауэкса 50×8 . При гидролизе минеральными кислотами получены главным образом моносахариды и немного (1—3%) олигосахариды, а при гидролизе в присутствии полисульфокислоты — ди-, три-, тетра- и пентасахариды с выходом около 20% [25, 26].

Нейтральные полисахариды, как хорошо известно, в присутствии полимерных кислот гидролизуются с меньшей скоростью, чем минеральными кислотами равных концентраций [27]. Это, очевидно, обусловлено низкой концентрацией водородных ионов в объеме раствора и малой вероятностью адсорбции молекулы нейтрального полисахарида на поверхности

смолы. Решение задачи гидролиза полисахаридов в присутствии полимерных кислот было достигнуто, когда в качестве гидролизующего агента применили водорастворимую полистиролсульфокислоту.

Получение водорастворимой полистиролсульфокислоты [28, 29]. Раствор полистирола (4,75 г) в хлороформе (80 мл) перемешивают и при 60° осторожно приливают 30 мл хлорсульфоновой кислоты в 60 мл диоксиана (последние смешивают при 0°) в течение 1 ч. После добавления каждой порции образуется белый осадок, который медленно растворяется. Внеся все количество хлорсульфоновой кислоты, температуру поднимают до 70° и продолжают перемешивание. Через 12 ч осторожно прибавляют смесь 20 мл хлорсульфоновой кислоты в 20 мл диоксиана и еще через 12 ч — опять такое же количество смеси. Через 48 ч, считая от начала опыта, темно-коричневый раствор охлаждают, отгоняют летучие продукты в вакууме. Остаток растворяют в 2 л воды, нейтрализуют 20%-ным раствором NaOH и диализуют против водопроводной воды 4 сут. Полученный раствор (3,2 л) пропускают через колонку катионита и кислый элюат (рН 2,3) диализуют против дистиллированной воды сначала при 20°, затем при 70° и лиофилизируют. Получают примерно 6 г темно-коричневой смолы. Водный раствор 2,84 г смолы в 1 л воды имеет рН 2,2 и нормальность 0,0136. Эквивалентный вес 209, степень моносульфирования 0,806.

Независимыми методами установлено, что водорастворимая полистиролсульфокислота в водных растворах в широких пределах концентраций практически полностью ионизирована [30, 31].

Сравнение скоростей гидролиза 2-дезоксид-2-ацетиамидо-β-метил-D-глюкопиранозидов в растворах HCl и водорастворимой полистиролсульфокислоты [32] показало, что они различаются незначительно. Но в случае N-ацетиллактозамина и N,N'-диацетилхитобиозы водорастворимая полистиролсульфокислота — более эффективный катализатор, и скорость гидролиза в ее присутствии на 50% выше, чем в растворах равных концентраций HCl. 2-Дезокси-2-амино-β-метил-D-глюкопиранозид в растворах этой кислоты гидролизуеться уже в 30 раз быстрее.

Применение водорастворимой полистиролсульфокислоты привело к значительному прогрессу в изучении структуры групповых веществ крови [33—37], а также липополисахаридов [38]. Эта кислота использовалась для гидролиза диэтиламиноэтилированного крахмала [32, 39]. Первоначальная скорость гидролиза для образцов диэтиламиноэтиловых эфиров крахмала с разной степенью замещения в растворах полисульфокислоты в 40—50 раз выше, чем в растворах HCl. Однако в дальнейшем она снижается до 50—75% по мере уменьшения количества основных групп в образцах. Выходы олигосахаридов при этом в 2—4 раза выше, чем при гидролизе HCl. Как показано в работах [32, 39], при уменьшении концентрации водорастворимой полистиролсульфокислоты относительное увеличение скорости гидролиза сравнительно с HCl может составить 500 : 1 и даже 1000 : 1.

Применяют водорастворимую полистиролсульфокислоту и в сочетании с одновременным диализом. Известно, что при частичном гидролизе полисахаридов, содержащих N-ацетилгексозамины, имеют место два конкурирующих процесса, происходящих с практически одинаковыми скоростями [40]: гидролиз гликозидных связей и N-дезацетилирование. Последнее направление реакции затемняет картину распада полисахаридов, поскольку появление свободных аминогрупп резко замедляет гидролиз соседних гликозидных связей. Этого можно избежать при частичном ацетоллизе полисахаридов [41, 42] (см. ниже), но при последующем O-дезацетилировании может иметь место деструкция олигосахаридов [42]. В некоторой степени N-дезацетилирование наблюдается и при применении водорастворимой полистиролсульфокислоты, но если реакцию вести с одновременным диализом, то вероятность этой побочной реакции резко уменьшается. Так, при гидролизе муцина свиного желудка с одновременным диализом в присутствии водорастворимой полистиролсульфокислоты даже после 100 ч N-дезацетилирование не превышало 13%, в то время как при гидролизе без диализа оно достигало 78% за то же время [43]. При гидролизе с одновременным диализом из муцина свиного желудка бы-

ло получено по крайней мере 13 олигосахаридов с общим выходом до 40 %, что более чем втрое превышает выход, который может быть достигнут с помощью минеральных кислот. Из недиализуемого остатка, кроме того, удается получить углевод-пептидный фрагмент, содержащий около 8 % *D*-галактозы и галактозамина [43].

Для нейтральных полисахаридов гидролиз в присутствии водорастворимой полистиролсульфокислоты с одновременным диализом может быть применен, если они содержат кислотолабильные связи, поскольку, как уже отмечалось, концентрация ионов водорода в растворе мала. Так, при гидролизе аскофиллана из бурых водорослей [44] удалось выделить 3-*O*- β -*D*-ксилопиранозил-*L*-фукозу. При гидролизе инулина этой кислотой [29] образуется набор моно- и олигосахаридов, причем выход последних достигает 60 %. Указанный случай может служить образцом при применении этого подхода для частичного гидролиза других полисахаридов.

Методика расщепления инулина на олигофруктаны [29]. К раствору инулина (1 г) в воде (25 мл) добавляют раствор полистиролсульфокислоты (0,0136 н., 25 мл). Смесь диализуют в целлофановом пакете при 60° против дистиллированной воды (1 л). Первоначальная поверхность мембраны — около 4 см² на 1 мл смеси. Через часовые интервалы воду меняют. Через 14 ч диализат (14 л) упаривают и получают 0,94 г сиропа, который далее анализируют обычными методами. Недиализуемую часть обрабатывают окисью цетилтриметиламмония. Отделяют нерастворимую соль полистиролсульфокислоты и фильтрат анализируют подходящими методами.

Выход олигосахаридов при этом находится в прямой зависимости от величины поверхности мембраны, т. е. от соотношения скоростей гидролиза и диализа: чем больше поверхность мембраны, тем ниже выход моносахаридов и больше сохраняется олигосахаридов, особенно высших [29].

Недавно предложена еще одна модификация гидролиза полисахаридов в присутствии водорастворимой полистиролсульфокислоты с одновременным диализом [45, 46]. По сравнению с рассмотренными выше эта методика усложнена включением в цикл колонки с углем, применение которой позволяет в одной операции отделять моносахариды и частично разделять полученные олигосахариды.

Таким образом, применение полимерных кислот для частичного гидролиза самых разнообразных полисахаридов и гликопротеинов позволило резко повысить выход олигосахаридов. Однако при работе с гетерополисахаридами ввиду низкой избирательности кислотного гидролиза расщепление этим путем приводит к образованию весьма сложных смесей. Кроме того, рассматриваемый метод связан с некоторыми экспериментальными трудностями, например с необходимостью концентрирования очень больших объемов водных растворов.

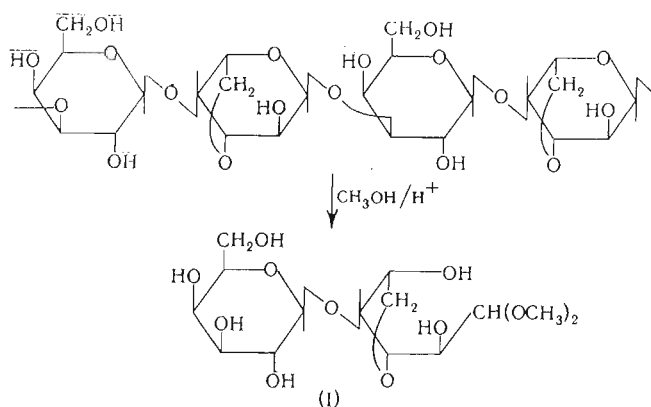
III. ИЗБИРАТЕЛЬНЫЙ КИСЛОТНЫЙ ГИДРОЛИЗ

Выше отмечалось, что гликозидные связи в большинстве случаев мало различаются по своей устойчивости к кислотному гидролизу. Тем не менее существует ряд важных исключений, когда некоторые гликозидные связи оказываются либо гораздо более лабильными, либо несравненно более стабильными, чем «средняя» гликозидная связь. Поскольку кислотный гидролиз применяется для установления строения углеводов и их производных более 150 лет, примеры как того, так и другого рода были выявлены достаточно давно и случаи использования повышенной стабильности или лабильности отдельных специфических типов гликозидных связей для избирательного частичного расщепления полисахаридов весьма многочисленны и хорошо известны [47]. Поэтому практически невозможно в рамках настоящего обзора привести все примеры избирательного кислотного гидролиза полисахаридов; мы даем лишь наиболее характерные и важные.

Высокая чувствительность к кислотам свойственна фуранозидным связям [48]. Обычно для их гидролиза достаточно обработки 0,01 н. кислотой при 100° в течение 3—4 ч. Этим широко пользуются для удаления фуранозидных звеньев, занимающих концевое положение в разветвленных полисахаридах, с целью получения так называемого деградированного полисахарида [2, 49]. Установление строения такого модифицированного полисахарида представляет собой более простую задачу, чем установление строения исходного полимера, и поэтому этот прием часто применяется при изучении структуры полисахаридов камедей, слизей, гемицеллюлоз и т. д. В тех относительно редких случаях, когда фуранозидные остатки находятся наряду с пиранозидными в основной цепи [50—53], мягкий кислотный гидролиз применяют для избирательного расщепления полисахарида на олигосахаридные фрагменты.

Повышенная лабильность по отношению к кислотам характерна также для гликозидных связей 2-, 3- и 4-дезоксисахаров. В качестве примера использования мягкого кислотного гидролиза для их избирательного расщепления можно привести получение деградированных O-специфических антигенов грамотрицательных бактерий из нативных антигенов. Удаление 3,6-дидезоксигексозных остатков, находящихся в разветвлениях, достигается обычно при этом обработкой 1 %-ной уксусной кислотой при 100° в течение 1 ч [54, 55].

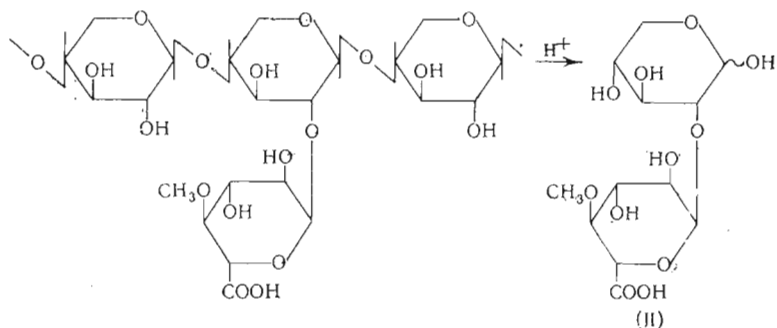
Наличие 3,6-ангидроцикла в гексопиранозных остатках вызывает сильное пространственное напряжение, дестабилизирующее гликозидную связь такого остатка со следующим моносахаридным звеном*. Поскольку сами свободные 3,6-ангидрогексозы и олигосахариды, содержащие их остатки на восстанавливающем конце, легко разрушаются при действии кислот, для избирательного расщепления таких полисахаридов по 3,6-ангидрогексопиранозидным связям применяют преимущественно мягкий метанолиз [56, 57] или меркаптолиз [58, 59], что ведет к образованию соответствующих диметилацеталей или диалкилтиоацеталей, более устойчивых в условиях реакции. Примером может служить метанолиз агарозы, при котором образуется диметилацеталь агаробиозы (I) с необыкновенно высоким для частичного расщепления выходом — 76% [57]:



Для частичного расщепления таких полисахаридов в последние годы начали применять также окислительный гидролиз, заключающийся в одновременном действии кислоты и брома. Образующиеся при этом восстанавливающие сахара легко окисляются бромом до альдоновых кислот, сравнительно устойчивых в этих условиях [60, 61].

* Остатки 3,6-ангидро-*D*- и -*L*-галактозы — обычные компоненты многих полисахаридов красных водорослей.

Повышенная устойчивость к действию кислот характерна для гликозидных связей, образуемых остатками уроновых кислот. Полисахариды, в которых остатки уроновых кислот связаны с остатками нейтральных моносахаридов, сравнительно легко образуют при кислотном гидролизе альдобиоуроновые кислоты. Это свойство, как правило, используется при анализе структуры разнообразных полиуронидов растительного и микробного происхождения. Примером может служить получение 2-О-(4-О-метил- α -D-глюкуронопиранозил)-D-ксилозы (II) частичным гидролизом ксиланов древесины (2 н. H_2SO_4 , 100° , 7 ч) [62].

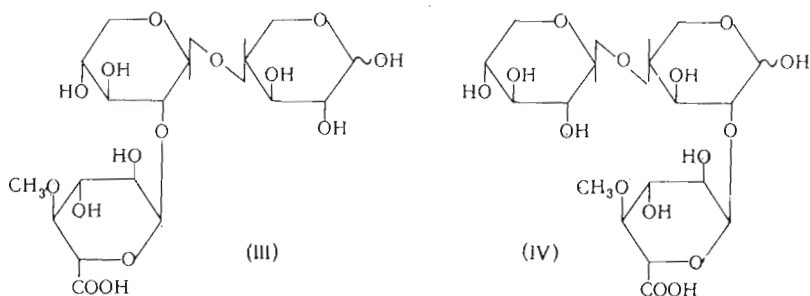


Однако скорость гидролиза гликуронидных связей при относительно низких концентрациях кислот ($pH > 2$) в несколько десятков раз превышает скорость гидролиза гликозидных связей соответствующих нейтральных моносахаридов [63, 64]. Причины этого явления пока неясны, хотя им широко пользуются при гидролизе полиуронидов типа альгиновой кислоты, так как при этом получают олигомергомологи уроновых кислот [65—67].

Повышенной устойчивостью к кислотному гидролизу отличаются и гликозидные связи 2-дезоксид-2-аминосахаров [68]. В отличие от явления устойчивости гликуронидной связи, которое пока не имеет рационального объяснения, этот факт объясняют переходом аминогруппы в кислой среде в аммонийную форму. Электростатический эффект NH_3^+ -группы препятствует протонированию гликозидного атома кислорода и тем самым гидролизу гликозидной связи. Однако аминоксахара, входящие в состав природных биополимеров, как правило, N-ацетилированы. Поэтому использование повышенной устойчивости гликозаминидной связи для целей избирательного частичного расщепления требует предварительного удаления N-ацетильной группы. Последнее вопреки кажущейся простоте представляет собой далеко не тривиальную задачу (см. следующий раздел). Повышенная стабильность гликозаминидной связи к кислотному гидролизу использовалась для получения олигосахаридных фрагментов из углеводсодержащих сложных биополимеров, например при изучении структуры хондроитинсульфата С [69] и групповых веществ крови [70].

Понижение скорости гидролиза гликозидных связей может вызываться и пространственными эффектами. Так, при гидролизе уже упомянувшегося глюкуроноксилана наряду с альдобиоуроновой кислотой получено заметное количество трисахарида О- α -D-(4-О-метилглюкуронопиранозил)-(1 \rightarrow 2)-О- β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 4)-D-ксилозы [71]. Этот факт не может быть объяснен влиянием карбоксильной группы уроновой кислоты, так как образующийся после полного восстановления глюкосулан дает соответствующий нейтральный трисахарид практически с тем же выходом [71, 72]. Очевидно, наличие объемистого заместителя в положении 2 остатка ксилопиранозы препятствует образованию переходного состояния, в котором экваториальные заместители при C_2 и C_3 должны сблизиться [73]. Позднее было показано, что связь между остатками D-ксилопиранозы в трисахариде (III) гидролизуеться в 5 раз медленнее соответствующую

щей связи в трисахариде (IV) [74]:



Хорошо известна модификация кислотного расщепления полисахаридов — ацетолиз *, характерной чертой которого является заметная избирательность для некоторых типов гликозидных связей и повышенный выход олигосахаридов. Он состоит в обработке полисахарида смесью серной и уксусной кислот и уксусного ангидрида. Ацетолиз дает ацетилированные фрагменты, а в отдельных случаях — тот же набор продуктов, что и частичный гидролиз [76], однако, как правило, наблюдаются значительные различия в селективности этих двух методов, что было удачно использовано для установления строения дрожжевых маннанов [77], полисахаридов красных водорослей [78] и восстановленных камедей [79]. Ацетолиз позволяет получать дисахариды с сохранением гликозидных связей β-дезоксигексоз [80], которые при гидролизе, как правило, разрушаются в первую очередь. Причины, определяющие стабильность тех или иных гликозидных связей в условиях ацетолиза, неизвестны, тем не менее ацетолиз весьма широко используется для частичного расщепления полисахаридов.

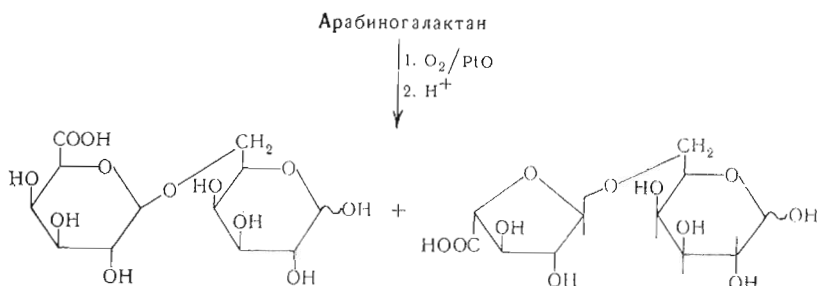
Возможности избирательного кислотного гидролиза могут быть в значительной степени повышены при модификации отдельных моносахаридных остатков полимера, приводящей к изменению устойчивости их гликозидных связей.

Модификация функциональных групп в полисахаридах с целью повышения избирательности кислотного гидролиза

1. *Окисление терминальных остатков сахаров в полисахаридах до уроновых кислот.* Наибольшее влияние на скорость кислотного гидролиза гликозидной связи оказывает природа заместителей при C₂ и C₅ в пиранозиде (соответственно при C₄ в фуранозиде) [81, 82]. В то же время в молекуле полисахарида проще всего осуществить модификацию именно первичных гидроксильных групп. Окисление части остатков нейтральных моносахаридов в молекуле полисахарида в остатки уроновых кислот позволяет повысить устойчивость определенных гликозидных связей к кислотному гидролизу. Это достигается обработкой полисахарида окислами азота [83] или окислением кислородом над платиновыми катализаторами **. С помощью последнего метода удалось показать положение остатков L-арабинофуранозы в арабиногалактане европейской лиственницы [85, 86] и арабинооксиане из ржаной муки [86, 87]. Окисление остатков арабинофуранозы в этих двух случаях позволило предотвратить гидролиз связей, разрушающихся в первую очередь при действии кислот на исходный полисахарид.

* Обзор см. [75].

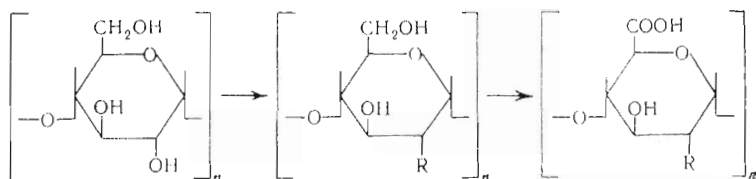
** Обзор см. [84].



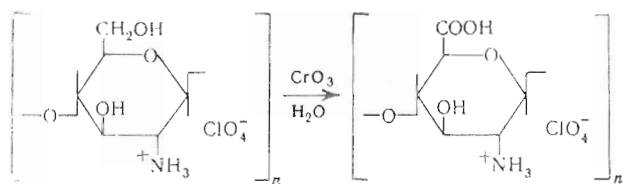
Для выяснения расположения и способа связи терминальных остатков в декстрани из *Leuconostae mesenteroides* NRRLB-512 применялся тот же подход [88]. В результате каталитического окисления и последующего кислотного гидролиза выделили 6-O-(α -D-глюкуронопиранозил)-D-глюкозу, чем однозначно установили место связи терминальных остатков D-глюкопиранозы с основной цепью полисахарида.

В работе [89] при окислении подобного полисахарида кислородом над платиновым катализатором в результате последующего кислотного гидролиза также были выделены биуроновые кислоты и даже смесь тетра- и пентауроновых кислот. К сожалению, каталитическое окисление терминальных остатков сахаров в полисахаридах трудноосуществимо в экспериментальном плане. В работе [88], например, полисахарид окисляли над окисью платины при 70° в течение месяца.

В связи с проблемой синтеза аналогов гепарина было проведено также каталитическое окисление производных амилозы [90]:



(где R = OH, NH₂ или NHCOCF₃) и перхлората хитозана хромовой кислотой [91]:



Для избирательного окисления первичных гидроксильных групп в D-галактопиранозных остатках в карбоксильные предложен метод, состоящий в последовательном действии на полисахарид галактозооксидазы [92] и гипойодита натрия. Этим методом в гуаране удалось окислить приблизительно 30% имеющихся концевых D-галактопиранозных остатков без каких-либо побочных реакций [93]. Аналогично были окислены арабиногалактан из лиственницы западной и галактоманнан из пихты Энгельмана [94].

Делались попытки получать линейные полиурониды [95] и полиальдегиды по C₍₆₎ [96, 97] путем окисления и других реакций первичной спиртовой группы в крахмале и целлюлозе, когда остальные группы защищены.

Но ввиду многостадийности и больших экспериментальных трудностей эти методы, по-видимому, не найдут практического применения для рассмотренного подхода к избирательному расщеплению полисахаридов.

Таким образом, окисление части нейтральных моносахаридов в остатки уроновых кислот тем или иным способом позволяет повысить избирательность кислотного гидролиза полисахаридов. Однако практическое осуществление этого подхода связано с рядом трудностей, обусловленных неполнотой реакции и длительностью процесса во времени.

2. *Получение 6-О-п-толилсульфонилпроизводных сахаров.* Было показано, что введение 6-О-тозильных групп в гексопиранозидные остатки, которое может быть осуществлено путем последовательного тритилирования, алкилирования или ацилирования, детритилирования и тозилрования, повышает стабильность гликозидных связей модифицированных гексопираноз: метанализ соответствующего производного декстрана дал главным образом тозилзамещенную изомальтозу [98]. 6-О-Тозилаты могут быть использованы и для увеличения кислотолабильности гликозидных связей в полисахаридах. Глюкоманнан из *Ceratocystis brunnea* состоит из главной цепи, которая содержит α -D-маннопиранозные остатки, соединенные связями 1 \rightarrow 6, и α -D-глюкопиранозных остатков, не замещенных по C₍₆₎, в боковых цепях. Обработка О-ацетил-О-тозилпроизводного полисахарида щелочью ведет к образованию 3,6-ангидро-D-глюкопиранозных остатков, которые легко удаляются кислотным гидролизом, причем маннановая цепь остается практически незатронутой [99]. Недостаток этих методов заключается в том, что О-тозилпроизводные олигосахаридов с трудом поддаются очистке. Кроме того, многостадийность процесса приводит к относительно низким выходам конечных продуктов.

3. *N-Деацетилирование остатков аминсахаров в полисахаридах.* Выше было отмечено, что остатки гексоаминов, входящих в состав природных полисахаридов, обычно N-ацилированы и что для использования повышенной устойчивости гликозаминидной связи в условиях кислотного гидролиза для целей избирательного расщепления необходимо предварительно удалить N-ацильные группы, поскольку скорости кислотного гидролиза N-ацилгексозаминидных связей и амидной связи сопоставимы со скоростями гидролиза обычных гликопиранозидных связей [40]. Это бывает необходимо и для специфического расщепления путем дезаминирования (см. ниже).

В некоторых, довольно редких, случаях аминогруппа бывает замещена остатком серной кислоты и ее освобождение достигается мягким кислотным гидролизом 0,05 н. H₂SO₄ или HCl при 100° в течение нескольких часов или автогидролизом полисахаридов, предварительно переведенных в H⁺-форму обработкой катионитами [100]. При этом наблюдается О-десульфатирование и другие побочные процессы [101]. Однако аминогруппы в мукополисахаридах обычно ацилированы остатками уксусной кислоты, для удаления которых существует ряд методов.

Так, хитин был частично N-деацетилирован обработкой твердым КОН при 170—190° [102]. В других случаях применяют обработку водными растворами щелочей. Но этот метод не приводит к количественным результатам, так как реакция часто сопровождается значительной деструкцией полисахаридов. Однако в отдельных случаях отмечается высокая степень N-деацетилирования при сохранении основной цепи олигополисахаридов [103—106].

Описанный в 1967 г. метод избирательного расщепления амидных связей в N-ацетиламиносахарах под действием тетрафторбората триэтилоксония [107] для соответствующих полисахаридов не имеет большого значения, так как в этом случае требуется предварительное получение производных полисахаридов, растворимых в органических растворителях. Кроме того, последующее удаление защитных О-ацильных групп щелочной обработкой полученных продуктов часто сопровождается нежелательными

побочными реакциями [42]. По аналогичным причинам для мукополисахаридов малоприменимо и N-деацетилирование при действии PCl_5 [108].

Данные об N-деацетилировании мукополисахаридов под действием гидразина или гидразингидрата противоречивы. С одной стороны, сообщалось, что гидразинолиз, например, гликопептида яичного альбумина [109] или мукополисахарида из клеточных стенок *Micrococcus lysodeicticus* [110] происходит достаточно полно и не сопровождается заметной деструкцией полимеров. Большинство авторов, однако, приводят данные, которые показывают, что в условиях гидразинолиза мукополисахаридов может происходить их деградация, а освобождающиеся при этом моно- и олигосахариды претерпевают дальнейшие превращения. Из D-галактозы, например, в условиях гидразинолиза образуются L-фуцит, 2-дезоксид-L-фуцит и другие продукты [111]. В этих же условиях в 4', 6'-O-этилиденметил- β -псевдоцеллобиуронозиде может распадаться до 89% гликозидных связей [112]. Со значительным расщеплением гликозидных связей протекает гидразинолиз хондроитинсульфата [113, 114]. В продуктах реакции были обнаружены некоторые количества 2,5-ангидрогексоз, ангидропентоз [113—115]. В случае Na-соли гиалуроновой кислоты также наблюдается частичная деградация гликозидных связей [115].

Групповые вещества крови А также претерпевают значительную деструкцию при гидразинолизе [116—118]. Это может быть обусловлено расщеплением пептидной цепи с последующей β -элиминацией остатков сахаров. Значительное расщепление гликозидных связей наблюдали и при гидразинолизе муцина из слизистой желудка свиньи [119]. Аналогичные данные опубликованы для липополисахаридов *Salmonella* [120, 121], гликофинголипидов [122] и эндотоксина из *Serratia marcescens* [123], а также для ряда олигосахаридов, выделенных из плазмы крови [124]. В общем случае гидразинолиз безводным гидразином или гидразингидратом для мукополисахаридов проходит неоднозначно, часто сопровождается значительной деградацией гликозидных связей, и степень N-деацетилирования редко превышает 70—80% [125—127].

Однако в настоящее время в этом направлении намечился некоторый прогресс. Так, при обработке α_1 -кислого гликопротеина безводным гидразином в присутствии каталитических количеств гидразинсульфата происходило его деацетилирование и выход олигосахаридной фракции составил 93% количества углеводов исходного полисахарида [128]. В последние годы эта модификация гидразинолиза снова привлекла внимание исследователей и получила дальнейшее развитие в ряде работ [104—106, 129]. На некоторых модельных соединениях с различными типами гликозидных связей было показано практически количественное N-деацетилирование без заметного расщепления гликозидных связей [104—106], и только в случае аминсахаров, имеющих заместитель при $C_{(3)}$ пиранозного остатка, отщепление ацетильной группы от атома азота происходит не всегда с количественным выходом [129]. Практически количественное N-деацетилирование было продемонстрировано на двух полисахаридах из *Shigella dysenteriae* [130—132].

N-Деацетилирование *O*-специфического полисахарида из *Shigella dysenteriae*, тип 6 [131, 132]. Полисахарид (0,1 г) восстанавливают $NaBH_4$ в 3 мл воды 2 ч, подкисляют CH_3COOH , деионизируют гель-хроматографией на сефадексе G-25 и лиофилизируют. Восстановленный полисахарид высушивают 6 ч в вакууме над P_2O_5 при 70° и затем нагревают в 2 мл безводного гидразина со 100 мг гидразинсульфата в запаянной ампуле 20 ч при 105°. Гидразин упаривают и остаток высушивают над серной кислотой в вакууме, подвергают гель-хроматографии на сефадексе G-50, фракции, выходящие с холостым объемом колонки, лиофилизируют и получают 0,072 г N-деацетилированного полисахарида. Последующее изучение этого полимера методами кислотного гидролиза и дезаминирования, а также спектральными методами показало отсутствие N-ацетильных групп и какого-либо расщепления гликозидных связей.

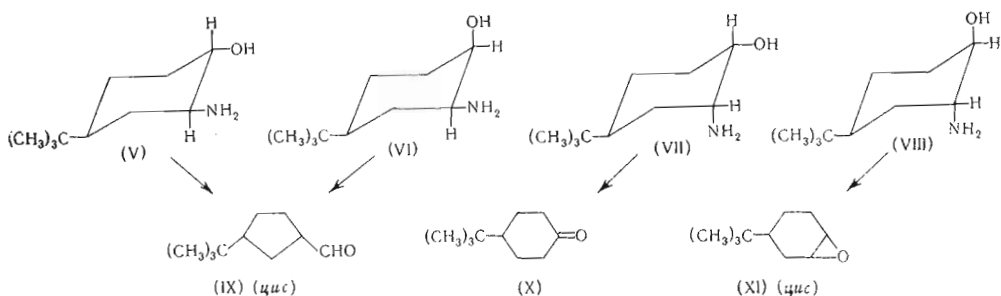
Таким образом, несмотря на недостаточную изученность последней модификации гидразинолиза и некоторые ограничения в случае наличия свя-

зей 1 → 3 в остатке гликозаминидов, ее можно рекомендовать для избирательного N-деацетилирования полисахаридов, содержащих аминосахара, с целью последующего кислотного гидролиза или других методов расщепления.

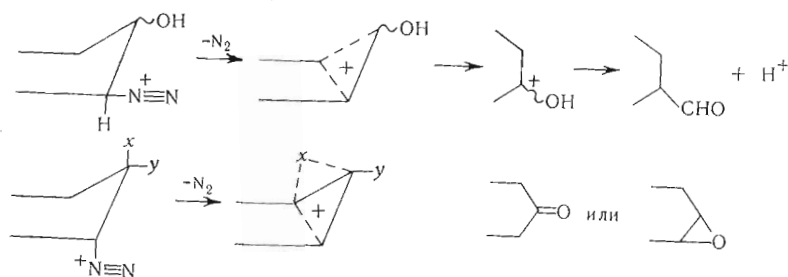
III. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАСЩЕПЛЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ЦЕПЕЙ

Эта группа методов основана на использовании специфических реакций функциональных групп, отличных от гидроксильной, в первую очередь аминогрупп в гексозаминах и карбоксильных групп в уроновых кислотах. Наиболее разработанным из этой группы методов расщепления является деаминарование гексозаминов.

1. *Деаминарование 2-дезоксид-2-аминосахаров.* Деаминарование аминосахаров можно объяснить по аналогии с хорошо изученной перегруппировкой 4-*трет*-бутил-2-аминоциклогексанолов под действием азотистой кислоты [133]:



Как видно из приведенной схемы и таблицы, из аминциклогексанолов (V) и (VI), где аминогруппа занимает экваториальное положение, образуется только альдегид (IX), причем, как и следовало ожидать, в *цис*-конфигурации. Для соединений (VII) и (VIII) в зависимости от конфигурации соседнего гидроксила может получаться или кетон (X), или *цис*- α -окись (XI). Механизм реакции во всех случаях состоит в образовании иона диазония, который распадается с 1,2-трансучастием одного из соседних атомов.

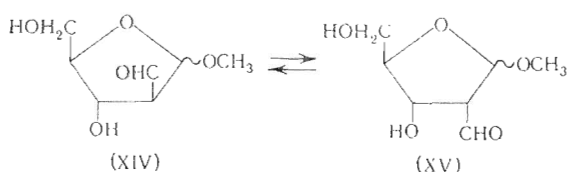


если $x = \text{H}$, то $y = \text{OH}$ и наоборот.

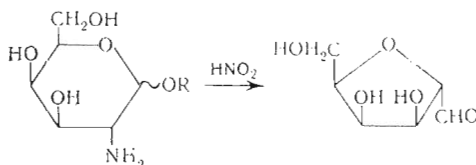
В соединениях (V) и (VI) в 1,2-*транс*-положении к аминогруппе находится углеродный атом $\text{C}_{(6)}$ и результатом реакции является образование альдегида (IX). В соединениях (VII) и (VIII) в 1,2-*транс*-положении находится водород и гидроксильная группа при $\text{C}_{(1)}$ соответственно, взаимодействие которых с реакционным центром при $\text{C}_{(2)}$ и объясняет образование продуктов (X) и (XI).

В случае 2-амино-2-дезоксид-*D*-гликозидов деаминарование протекает аналогично. Давно известно, что 2-амино-2-дезоксид-*D*-гликопираноза при обработке азотистой кислотой претерпевает перегруппировку с образованием 2,5-ангидро-*D*-маннозы [134—136] (так называемая хитоза, образу-

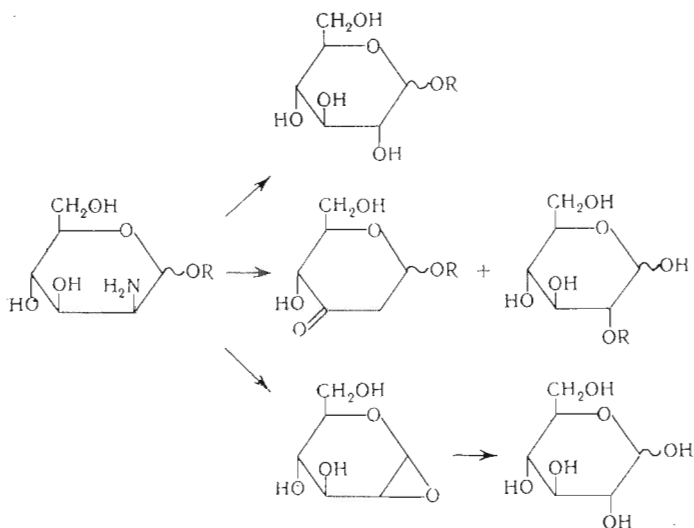
образующихся после реакции аминсахаров с азотистой кислотой) может в значительной степени изомеризоваться, что необходимо учитывать при дезаминировании мукополисахаридов:



Поскольку конфигурации реакционных центров в *D*-глюкозамине и *D*-галактозамине одинаковы, в последнем случае также образуется в основном соответствующее ангидропроизводное *D*-галаксы:



Для маннозамина, где аминогруппа занимает в отличие от глюкозамина и галактозамина аксиальное положение, состав продуктов дезаминирования особенно сильно зависит от условий реакции.



При обработке производных маннозамина азотистой кислотой при повышенных температурах или окисью ртути в значительных количествах образуется 2,5-ангидро-*D*-глюкоза [142]. Было высказано предположение [143], что в этих условиях маннозамин может реагировать в конформации 4C_1 , где аминогруппа занимает экваториальное положение. Углеродный атом $C_{(2)}$ промежуточного соединения, как и в случае глюкозамина или галактозамина, атакуется парой электронов атома кислорода $O_{(5)}$, причем разрывается связь $C_{(1)} - O_{(5)}$ и с обращением конфигурации при $C_{(2)}$ образуется 2,5-ангидро-*D*-глюкоза. При дезаминировании маннозамина в обычных условиях атака растворителя с более доступной стороны преимущественно приводит к обращению конфигурации при этом центре с образованием нейтральных гексоз. Наряду с этим могут образовываться 2-дезоксизулозы и иногда наблюдается 1,2-сдвиг заместителя при $C_{(1)}$ [144—147], протекающий аналогично для производных пиропозидов [149—154] и ами-

ноциклогексанолов [133], которые содержат экваториальную гидроксильную группу в вицинальном положении к аксиальной аминогруппе. Кроме того, направление распада производных маннозамина при дезаминировании определяется природой агликона и конфигурацией связи $C_{(1)}$ — агликон.

Таким образом, течение реакции дезаминирования производных 2-амино-2-дезоксигексопиранозидов водными растворами азотистой кислоты зависит от ориентации аминогруппы и групп, которые находятся в вицинальном положении и антипараллельны ей. Когда аминогруппа занимает экваториальное положение, то основным, если не исключительным, направлением реакции становится атака неподеленной парой кольцевого атома кислорода по $C_{(2)}$ с тыльной стороны по отношению к диазогруппе. Это приводит к обращению конфигурации при $C_{(2)}$ и образованию 2,5-ангидрогексоз. Если аминогруппа занимает аксиальное положение (маннозамина), то, как говорилось выше, основными продуктами реакции являются нейтральные гексозы. И наконец, если соседние гидроксильные группы аксиальны, то, как и в случае соответствующих циклогексанолов, в качестве промежуточных или конечных продуктов могут получаться эпоксипроизводные.

Реакция дезаминирования обычно проводится при комнатной температуре, небольшом охлаждении (до 0°) или нагревании до 50° путем добавления нитрита натрия к раствору полисахарида в водной уксусной кислоте различной концентрации.

На скорость реакции существенно влияет конфигурация гликозаминидной связи [139, 144] *. β -Изомеры гликозаминидов распадаются значительно быстрее α -изомеров. Это обстоятельство предложено использовать для определения конфигурации гликозаминидных связей в мукополисахаридах путем сравнения кинетики их распада с кинетикой распада α - и β -метил-*D*-глюкозаминидов. Так, например, хитозан, очевидно, содержит главным образом β -глюкозаминидные связи, так как кинетика его распада аналогична кинетике распада 2-дезоксигексопиранозидов. И наоборот, для гепарина, где остаток глюкозамина связан в основном α -связями, кинетическая кривая близка к кривой дезаминирования α -метил-*D*-глюкозаминида.

Несмотря на кажущуюся простоту условий реакций, при ее проведении иногда встречаются осложнения, природа которых неясна. Так, гликозаминиды, имеющие заместитель при $C_{(3)}$, в условиях дезаминирования распадаются неполностью [129, 155]. При дезаминировании гепарина, например, в зависимости от источника и способа выделения находят *L*-идуроновою кислоту [156, 157], количество которой может колебаться от 50 до 90% (и от 30 до 55% в гепарансульфатах). В то же время остаток *D*-глюкуроновою кислоты в 4-О-(2-дезоксигексопиранозил)- α -*D*-глюкуроновою кислоте при дезаминировании в гораздо более мягких условиях полностью превращается в *L*-идуроновою кислоту [158]. Даже при -15° по крайней мере треть остатков *D*-глюкуроновою кислоты превращается в *L*-идуроновою. Таким образом, расщепление гликозидной связи между $C_{(4)}$ -атомом *D*-глюкуроновою кислоты и атомом $C_{(1)}$ остатка гликозаминида может сопровождаться эимеризацией глюкуроновою кислоты при $C_{(5)}$ [158].

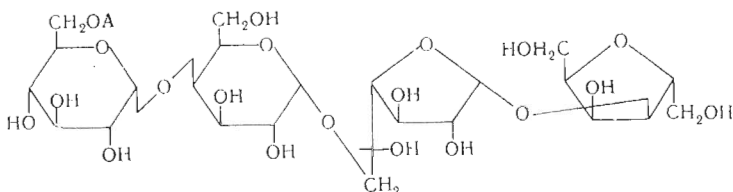
Кроме того, направление реакции в значительной степени зависит от природы заместителя при атоме азота и применяемых условий. Например, при обработке гепарина 0,24 М раствором нитрита натрия в 1,8 М CH_3COOH при комнатной температуре в течение 80 мин превращению подвергаются как *N*-сульфатированные остатки аминоксахаров, так и остатки, содержащие свободные аминогруппы. В то же время при обработке 3,9 М раствором нитрита натрия в 0,28 М CH_3COOH в течение 10 мин расщепляются

* По данным других авторов [145], это влияние не столь заметно.

только гликозидные связи аминсахаров со свободной аминогруппой, что делает возможным их раздельное определение [159]. Еще более удивительно поведение мукополисахаридов в условиях дезаминирования, предложенных Сифонелли [160] (70%-ный раствор диглима, -20° , 12 ч): расщепляются только N-сульфатированные остатки аминсахаров (см. ниже).

Несмотря на перечисленные выше побочные реакции, дезаминирование под действием азотистой кислоты широко применяется для установления строения мукополисахаридов различной природы [144, 161—166], хитина [167], гепарина [168—174], хондроитинсульфата [145, 175], сфингс-липидов [176], тейхоевых кислот [177—181] и т. д.

При дезаминировании O-специфического полисахарида из *Shigella dysenteriae* (тип 3) нитритом натрия в 15%-ной CH_3COOH при комнатной температуре в течение 40 мин в качестве единственного продукта реакции с высоким выходом выделили пентасахарид, являющийся модифицированным повторяющимся звеном этого полисахарида [130]:



где А — остаток неизвестного сахара.

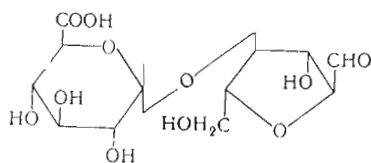
Аналогично из O-специфического полисахарида *Shigella dysenteriae* (тип 6) после N-дезацетилирования, дезаминирования и восстановления получили с высоким выходом 2,5-ангидро-3-O-[(6-O- α -D-галактопиранозил)- α -D-глюкопиранозал]-D-талит [131, 132]. Это практически единственные примеры успешного применения избирательного N-дезацетилирования полисахаридов гидразинолизом в присутствии гидразинсульфата и последующего дезаминирования по остаткам аминсахаров.

Методика дезаминирования полисахарида, продуцируемого Shigella dysenteriae, тип 6. К 25 мг N-дезацетилированного полисахарида в 1 мл воды добавляют по 1,5 мл растворов 5%-ного нитрита натрия и 33%-ной CH_3COOH . Через 40 мин смесь обрабатывают катионитом КУ-2 (H^+ -форма), амфилизируют, восстанавливают NaBH_4 , обрабатывают КУ-2, упаривают. Борную кислоту удаляют упариванием с метанолом, остаток хроматографируют на бумаге в системе этилацетат — CH_3COOH — HCOOH — вода (18 : 3 : 1 : 4) и зоны с $R_{\text{лактоза}}$ 0,76 и 1,10 элюируют водой. Получено 5,2 мг 2,5-ангидро-3-O-[(6-O- α -D-галактопиранозил)- α -D-глюкопиранозил]-D-талита и 0,6 мг другого олигосахарида, в состав которого входит D-глюкоза и D-галактоза.

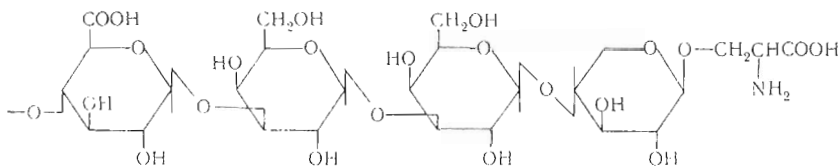
В остальных случаях результаты были не столь однозначны. Так, при обработке капсульного полисахарида из *Pneumococcus* (тип 1) нитритом натрия в CH_3COOH в течение 2 дней при комнатной температуре было обнаружено 5 олигосахаридов [182]. Аналогично при щелочном гидролизе α_1 -кислого полисахарида с последующим дезаминированием азотистой кислотой удалось выделить три изомерных трисахарида, различающихся местом присоединения остатка N-ацетилнейраминовой кислоты [103, 116]. При изучении строения полисахарида из клеточной стенки *Micrococcus lysodeikticus*, в состав которого входит 2-дезоксид-2-ацетиламино-D-маннуроновая кислота, рассматриваемым методом удалось модифицировать полисахарид и в дальнейшем выделить фрагменты, строение которых полностью соответствует ранее предложенной структуре полисахарида и согласуется с рассмотренным выше механизмом распада маннозамина под влиянием азотистой кислоты [154, 183, 184].

Поскольку реакция дезаминирования проводится в сравнительно мягких условиях, в ряде случаев удается выделить и O-сульфатированные

фрагменты. Так, при обработке N-десульфатированного гепарина азотистой кислотой в течение 48 ч при 20° с высоким выходом была получена смесь моно- и дисульфатов дисахарида [170]:



В перечисленных выше работах реакция проводилась обычно при комнатной температуре, иногда при нагревании до 50° [180]. В этих условиях расщепляются только мукополисахариды, имеющие свободные аминогруппы. Сифонелли нашел условия, при которых азотистая кислота взаимодействует только с остатками N-сульфатированных аминосахаров [160, 185]. Эта реакция проводится при температуре —20° с растворами азотистой кислоты в 60—70%-ном диглиме [186] в течение 10—12 ч. Благодаря низкой температуре реакции удается избежать какой-либо деструкции полисахаридов. Реакция дезаминирования мукополисахаридов в этом варианте широко использовалась для изучения строения гепаритинсульфата [160, 184, 187, 188], гепарина [189—196], гепарансульфата [197—199] и дермантансульфата [200], а также успешно применена для изучения области ковалентной связи углеводов и белка в гликопротеинах [160, 191, 192, 200, 201]. Это дало возможность показать, что мукополисахариды привязаны к белку O-гликозидной связью через серин [202]. Детальное изучение соседнего к пептиду участка углеводной цепи в гепарине [191, 192, 203], хондроитин-4-сульфате [204] и дермантансульфате [200] выявило наличие в нем последовательности

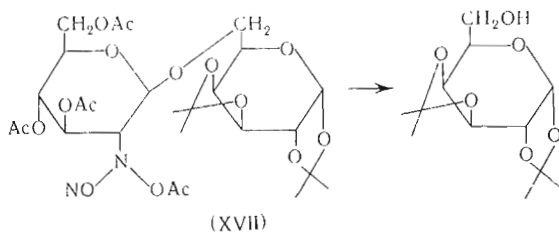


По-видимому, в гепаритинсульфате эта область связи с белком построена аналогично [160].

Модификация избирательного расщепления мукополисахаридов, предложенная Сифонелли, широко применяется для отдельного определения остатков аминосахаров с сульфатированной, ацетилированной или свободной аминогруппой [187, 193, 194, 196—198], а также в других аналитических целях [198].

Недавно с использованием модельных соединений был описан новый подход, который, возможно, найдет применение для избирательного расщепления гликозамидных связей без предварительного удаления N-ацетильной группы хотя бы в олигосахаридах. Первая стадия этого подхода состоит в получении N-нитрозо-N-ацетилпроизводных ацетатов аминосахаров, которые являются кристаллическими веществами, относительно устойчивыми при низких температурах [205]. При хранении их растворов в хлороформе, уксусном ангидриде или водном ацетоне происходит распад и среди продуктов реакции обнаруживается 2,5-ангидро-D-манноза [206], присутствие которой указывает на разрыв гликозамидной связи. Из продуктов распада, образующихся при хранении раствора N-нитрозо-N-ацетилпроизводного дисахарида (XVII) в водном ацетоне, удалось выделить дивозпропилиденгалактозу с выходом 58%, что демонстрирует принципиальную возможность использования этого подхода для изби-

рательного расщепления гликозаминидов без предварительного удаления N-ацетильных групп.



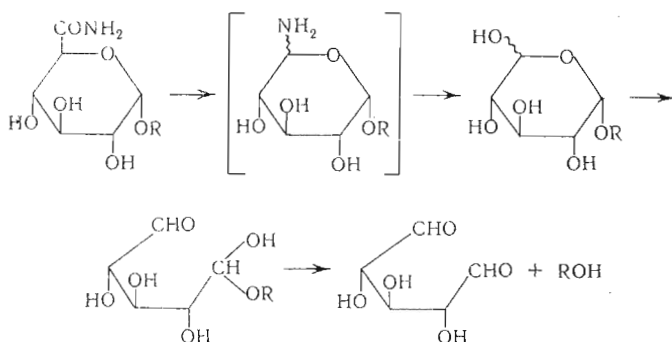
Однако этот метод требует тщательной экспериментальной разработки, подбора оптимальных условий реакции, выяснения механизма распада и установления строения всех продуктов, образующихся при этом.

Приведенные выше данные по избирательному N-деацетилированию и последующему дезаминированию показывают, что этот подход является одним из наиболее общих и хорошо разработанных для полисахаридов, содержащих аминоксахара. С его помощью было установлено строение большого числа важнейших мукополисахаридов, включая область ковалентной связи между углеводной частью и белком. Таким образом, достоинства этого метода неоспоримы и подтверждены множеством примеров.

Однако в разработке этого метода есть существенные пробелы: отсутствуют систематические исследования как стадии избирательного N-деацетилирования, так и последующего дезаминирования. Для избирательного N-деацетилирования только наметился общий подход, включающий обработку полисахаридов безводным гидразином в присутствии каталитических количеств гидразинсульфата. Систематических исследований стадии дезаминирования, за исключением варианта Сифонелли, также не проводилось. Условия реакции в каждой группе исследований настолько отличаются друг от друга, что это приводит к различным выводам даже при изучении одного и того же объекта.

2. Избирательное расщепление остатков уроновых кислот.

а) Распад амидов полиуронидов по реакции Гофмана. Наличие карбоксильной группы в моносахаридных остатках — «слабого» звена, которое в первую очередь может быть использовано для селективного расщепления полисахаридной цепи, — дает широкие возможности для избирательной модификации полимерной молекулы. Одним из подходов является избирательное расщепление амидов полиуронидов под действием гипохлорита натрия. В основе метода лежит ряд реакций: остатки уроновых кислот в полиурониде переводятся в амиды одним из подходящих способов; полученные амиды по реакции Гофмана [207] превращаются в 5-аминопентоциранозы, которые подобно гликозиламинам [208, 209] должны расщепляться кислотами в очень мягких условиях:

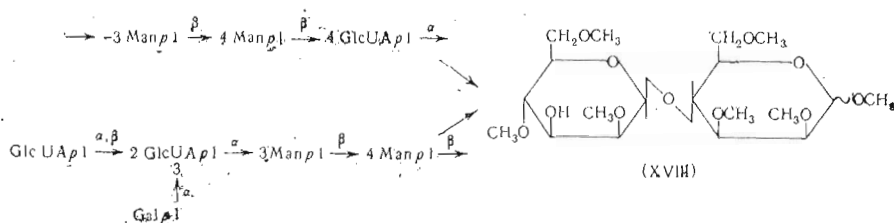


Таким путем достигается избирательное ослабление гликуронидной связи, которое позволяет расщепить ее в условиях, когда другие типы гликозидных связей должны быть вполне устойчивыми.

Первоначально рассматриваемый подход детально исследовался на модельных соединениях, в качестве которых использовались алкилгликозиды полностью метилированных и свободных амидов уроновых кислот [210, 211]. В результате было показано, что гофмановская перегруппировка амидов уроновых кислот имеет четко выраженный максимум по выходу конечных продуктов, лежащий в пределах рН 12,2—13,2. Напротив, условия последующего кислотного гидролиза сказываются на выходе конечных продуктов в незначительной степени. Выход агликона составляет обычно более 80%. Из реакционной смеси после соответствующих обработок были выделены пентиты или пентодиальдозы, соответствующие исходным гликуронидам, что указывает на отсутствие в условиях реакции каких-либо изменений стереохимии при C₍₂₎ — C₍₄₎-углеродных атомах сахарного остатка [212].

В дальнейшем эта реакция была распространена на полимеры. В полисахаридах остатки уроновых кислот могут входить в основную цепь или являться боковыми ответвлениями. Применение реакции Гофмана к амидам полиуронидов этих классов должно привести к качественно различным результатам. Если в первом случае можно надеяться на получение олигосахаридных фрагментов, то во втором полимерная природа исходного вещества практически не должна изменяться. Так, при обработке амида ксилана березы белой, несущего остатки 4-O-Me-D-гликуроновой кислоты в качестве боковых ответвлений [213], гипохлоритом натрия в условиях реакции Гофмана [214, 215] происходит отщепление остатков уроновой кислоты, и после однократной обработки ее относительное содержание падает на 83—94%. Аналогичные данные получены для одной из фракций O-сульфатированного фукана (10% уроновой кислоты в боковых ответвлениях) [216]. В результате однократной обработки амида фукана гипохлоритом натрия понижение содержания уроновой кислоты составило 60%. Таким образом, указанный подход эффективен для избирательного удаления концевых остатков уроновых кислот в полиуронидах.

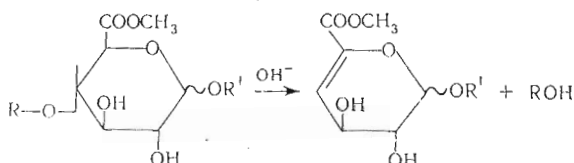
Однако наибольший интерес представляет применение гофмановского распада к полисахаридам, содержащим остатки уроновой кислоты в основной цепи. Обработка амидов таких полисахаридов гипохлоритом натрия должна привести к расщеплению их строго избирательно на блоки по звеньям уроновых кислот. Успешное применение гофмановского распада удалось продемонстрировать на двух внеклеточных полисахаридах, продуцируемых липомицетами [217, 218]. В результате однократной обработки амидов указанных полисахаридов, предварительно подвергавшихся метилированию по методу Хакомори, был выделен маннобиозид (XVIII):



Следует обратить внимание на неожиданный результат распада амидов метилированных полиуронидов, где остатки уроновых кислот входят в основную цепь. Исходя из схемы распада амидов уроновых кислот и опытов на модельных соединениях [210, 211] можно было ожидать, что на восстанавливающем конце олигосахаридных фрагментов будут находиться пентиты, образующиеся при восстановлении пентодиальдоз — конечных

Кроме того, известно несколько примеров применения водорастворимых карбодимидов для восстановления полиуронидов [157, 164] и структурной модификации карбоксильной группы в остатках глюконовой кислоты гепарина [221], что делает возможность применения этого реагента для специфического расщепления полиуронидов более реальной.

б) β -Элиминирование заместителя при $C_{(4)}$ в остатках уроновых кислот. Известна способность производных уроновых кислот отщеплять заместитель при $C_{(4)}$ под действием оснований, что должно вести к избирательному расщеплению полисахаридной цепи, если этим заместителем является полигликан:



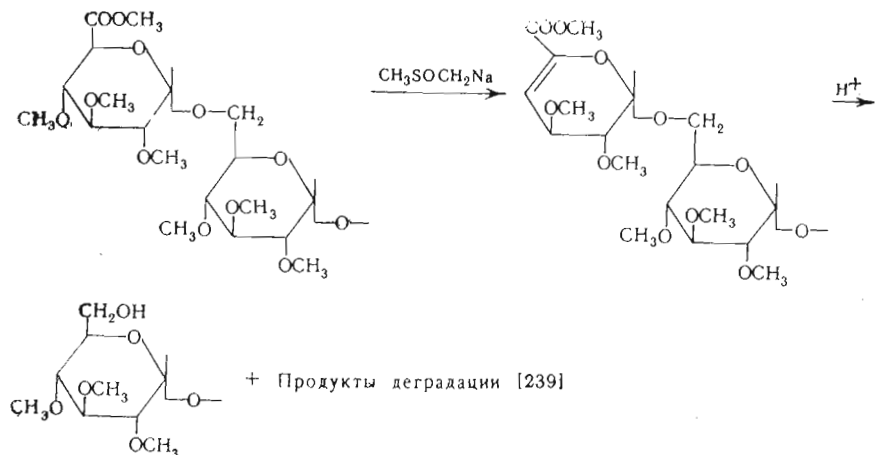
В 1974 г. был опубликован обзор [222] по реакции β -элиминирования уроновых кислот. Поэтому мы ограничимся лишь обсуждением тех работ, которые имеют непосредственное отношение к разработке метода избирательного расщепления полисахаридных цепей.

В реакцию β -элиминирования вступают только эфиры уроновых кислот, но не сами кислоты. Чем выше процент этерификации остатков уроновых кислот в полисахариде, тем глубже проходит процесс его распада [223]. Скорость реакции зависит также от температуры и pH среды. Скорость деполимеризации пектина из цитрусовых, например, сильно возрастает с повышением температуры [224]: достаточно 5-минутного нагревания раствора при pH 8,8 и температуре 100° , чтобы его вязкость уменьшилась в 22 раза [225]. В кислой среде пектины более устойчивы. Так, при нагревании 0,5%-ного раствора пектина при 100° в течение 6 ч в 0,02 н. H_2SO_4 отщепляются лишь боковые цепи нейтральных сахаров [226, 227], в то время как при нагревании того же пектина при pH 6,8 вязкость его растворов быстро падает вследствие распада полиуронидной основной цепи.

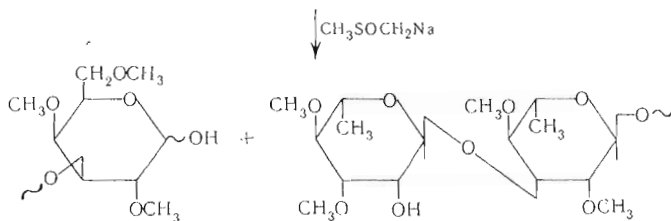
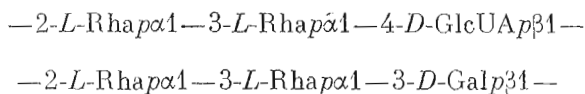
На основе реакции β -элиминации в 1967 г. [225] был предложен метод избирательного расщепления полиуронидов, имеющих 1 \rightarrow 4-гексуронидную связь. Авторы объясняют неудачи в этом направлении в предыдущих работах тем, что при β -элиминировании имеет место конкурирующая реакция омыления сложноэфирных групп. Вероятно, это объяснение правильно, поскольку реакция с модельными соединениями в безводных средах приводит к повышению выхода ненасыщенных производных уроновых кислот [228—232].

Первоначально в опытах был использован 2-оксиэтиловый эфир альгиновой кислоты, которая, по-видимому, построена из 1 \rightarrow 4-связанных остатков *D*-маннуроновой и *L*-гулууроновой кислот [233, 234]. При обработке суспензии 2-оксиэтилальгината в метаноле метилатом натрия в течение 1 ч наблюдается быстрое растворение части осадка. Растворившееся вещество имеет максимум поглощения в УФ-спектре при 235 нм, что говорит о присутствии в нем группировки $C=C-C=O$. Этот продукт был разделен колоночной хроматографией на серию олигосахаридов, общий выход которых достигал 30%. Если реакцию проводить в течение более длительного времени, то максимум поглощения в УФ-спектре при 235 нм постепенно исчезает, а в длинноволновой части спектра появляются новые полосы, показывающие, что $\Delta^{4,5}$ -уроновые кислоты претерпевают дальнейший распад. Позже в работах такого рода были использованы метиловые эфиры полиуронидов или их липофильные производные, получающиеся

при взаимодействии полисахаридов с метилвиниловым эфиром. В качестве оснований применяли метилат натрия в метаноле или раствор диметилсульфенилнатрия в диметилсульфоксиде [235, 236]. В этих работах и большинстве последующих основными объектами исследования были полисахариды, где остатки уроновых кислот занимали терминальное положение или входили в боковые ответвления [237—240]. При отщеплении остатков уроновых кислот получались модифицированные полисахариды, у которых возникало ограниченное число свободных гидроксильных групп, что открывало широкие возможности для их последующей деградации и других структурных исследований:



Однако в одной из последних работ этот подход нашел применение и для полисахаридов, содержащих уроновую кислоту в основной цепи. Исследование структуры полисахарида из *Klebsiella* (тип 81) этим методом позволило окончательно установить строение его повторяющегося звена [241]:



Щелочная деградация метилирования полисахарида из *Klebsiella*, тип 81 [240]. Раствор тщательно высушенного метилированного полисахарида (180 мг) и *n*-толуолсульфокислоты (5 мг) в смеси (32 мл) диметилсульфоксида и 2,2-диметоксипропана (19 : 1) перемешивают в токе азота при комнатной температуре в течение 30 мин. К смеси осторожно добавляют 2 М раствор диметилсульфенилнатрия в диметилсульфоксиде (15 мл) и перемешивают еще 30 мин, после чего оставляют на ночь при комнатной температуре. Смесь разбавляют 50%-ной уксусной кислотой и продукт выделяют экстракцией хлороформом. После упаривания хлороформа остаток обрабатывают 10%-ной уксусной кислотой при 100° в течение 1 ч, охлаждают и лиофилизируют. Остаток далее исследуют подходящим методом.

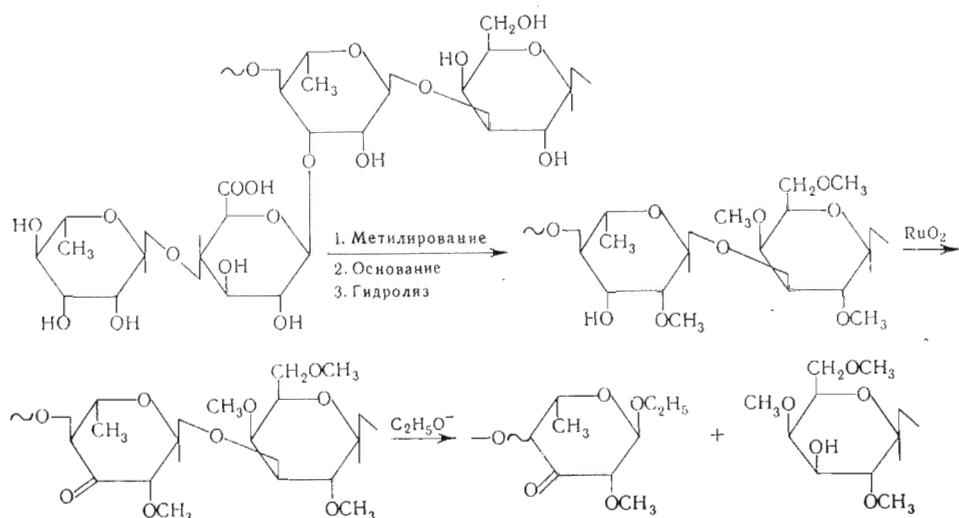
Рассмотренные в этом разделе методы специфического расщепления начинают приобретать важное значение в установлении строения полиуронидов. Для изучения полисахаридов с остатками уроновых кислот, входящими в боковые ответвления, успешно применялись как распад амидов полиуронидов, так и метод, основанный на реакции β -элиминирования заместителя по $C_{(4)}$ в остатке уроновой кислоты. Причем первый метод применялся к незамещенным полиуронидам, в то время как второй — чаще к их метиловым эфирам. В общем случае применение того или иного метода для избирательного отщепления боковых ответвлений остатков уроновых кислот диктуется конкретными требованиями к конечному веществу. Если, например, решается задача установления положения остатков уроновых кислот в полисахариде, то, естественно, необходимо применить распад, основанный на реакции β -элиминирования заместителя при $C_{(4)}$. И наоборот, когда для каких-либо целей нужна основная цепь полимера, не содержащая остатков уроновых кислот, необходимо применить распад амидов полиуронидов по реакции Гофмана. Последний подход удобнее и тем, что реакция осуществляется в водных растворах.

Для полисахаридов, содержащих остатки уроновых кислот в основной цепи, оба метода применялись только для метилированных производных и приводили к качественно одинаковым результатам. Однако метод, основанный на реакции β -элиминирования заместителя при $C_{(4)}$ остатка уроновой кислоты для этих полисахаридов, разработан недостаточно полно. С экспериментальной точки зрения распад метиловых эфиров полисахаридов под влиянием щелочей более удобен, так как позволяет избежать операции по получению амидов уроновых кислот, представляющей собой непростую задачу. Очевидно, этот метод можно значительно упростить, совместив метилирование полисахарида по способу Хакомори ($\text{NaN}, \text{CH}_3\text{SOCH}_3$) и последующий распад полученного метилового эфира полиуронида под влиянием того же реагента ($\text{NaCH}_2\text{SOCH}_3$). Это, по-видимому, даст лучший результат, так как позволит исключить из процесса очень трудоемкую операцию выделения и очистки метиловых эфиров полисахаридов. Кроме того, последующая обработка тридейтеройодистым метилом приведет к деметилированию освободившихся гидроксильных групп и позволит надежно идентифицировать с помощью масс-спектрометрии некоторые типы гликозидных связей в полиурониде.

3. β -Элиминирование в остатках кето- и 6-толилсульфонилсахаров. Недавно предложен еще один метод избирательного расщепления, также основанный на реакции β -элиминирования, но уже в кетосахарах [242]. Он включает в себя первоначальный частичный гидролиз кислотолабильных связей в метилированных полисахаридах и затем окисление освободившихся гидроксильных групп двуокисью рутения. При этом метоксильная или гликозилосигруппа, находящаяся в β -положении к кетогруппе, должна легко элиминироваться под действием оснований. Первоначально авторы исследовали эту реакцию на модельных соединениях и показали, что она идет количественно [243, 244]. В работе [242] успешное применение метода демонстрируется на двух полисахаридах из *Salmonella typhimurium* LT2, где в качестве боковых ответвлений присутствует легко удаляемая кислотным гидролизом абеквоза, и на капсульном полисахариде из *Klebsiella* (тип 47), где удаление боковых ответвлений достигается путем расщепления остатка уроновой кислоты за счет β -элиминирования под действием оснований (см. схему).

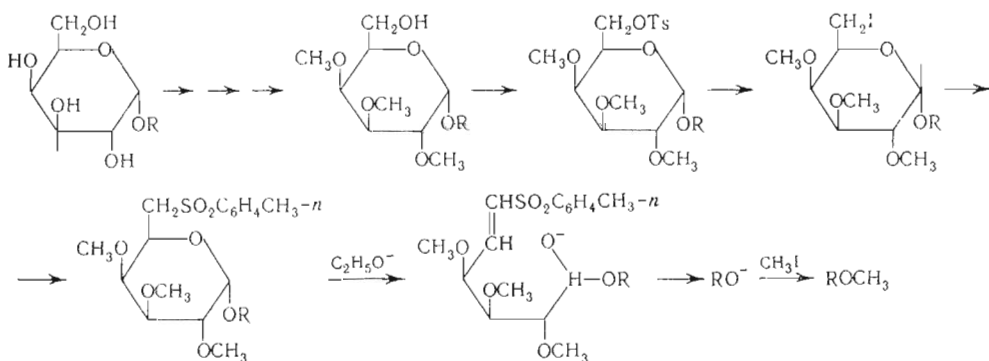
Аналогичным путем устанавливалось строение и других полисахаридов из *Klebsiella* — типа 28 и 59 [240, 241].

Неоднократно отмечалось, что 6-дезоксиг-6-нитропиранозиды под влиянием 0,1 н. NaOH или 0,01 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (100° , 20 мин) с практически количественным выходом перегруппировываются в производные инозита [245]. Аналогичная перегруппировка имела место и в случае 6-дезоксиг-6-*n*-толилсульфонил-*D*-гликопиранозидов [246]. Авторы полагали, что указан-



ную реакцию можно будет распространить на полисахариды, имеющие ограниченное число первичных спиртовых групп. Но при попытке осуществить этот подход на полисахаридах они столкнулись с большими трудностями. Из-за низкой растворимости полисахаридов в обычных органических растворителях замена первичной гидроксильной группы на *n*-толилсульфонилгруппу оказалась невозможной. Другие попытки, включая приготовление липофильных производных декстрана со свободной первичной спиртовой группой, например полное триметилсилирование и последующее избирательное удаление триметилсилильной группы при $C_{(6)}$ [247], были не более успешны, и авторы отказались от намерения распространить эту реакцию на полисахариды [88].

Позже была предпринята еще одна попытка применить этот подход к гетерогалактану, продуцируемому *Polyporus squamosus* [248]:

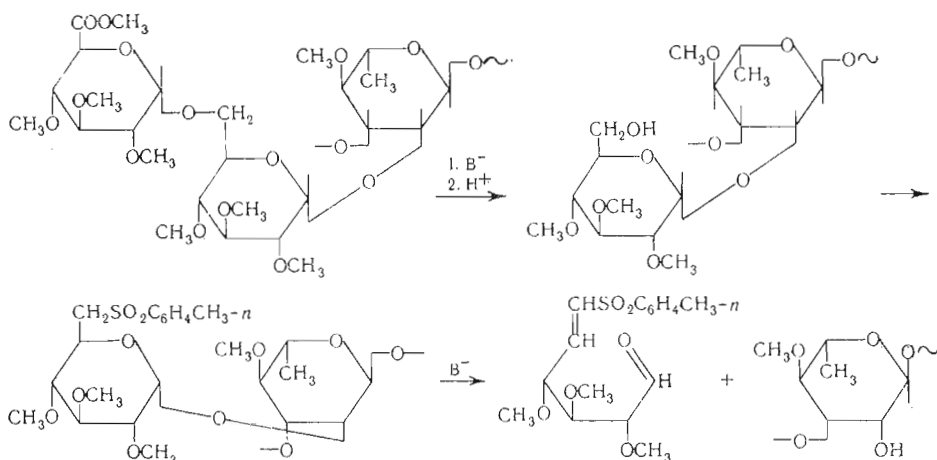


где R — полисахаридная цепь.

Все стадии этой схемы проведены без выделения и характеристики промежуточных продуктов. Схема вызывает ряд принципиальных возражений. Главший ее недостаток — многостадийность. Даже если принять, что каждая стадия проходит с выходом 90%, то конечное соединение должно было бы получиться с выходом не более 40%. Однако ввиду общеизвестных трудностей при проведении реакций на полимерах реальный выход конечных продуктов должен быть гораздо ниже. Поэтому необходима большая осторожность в интерпретации результатов: с одной стороны, мно-

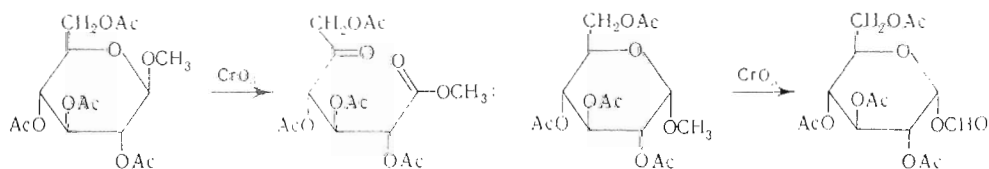
гостадийность процесса должна привести к потере информации из-за низких выходов, с другой — побочные процессы, возможные на каждой стадии, могут вызвать появление артефактов. Очевидно, предложенный вариант вряд ли найдет применение для избирательного расщепления полисахаридов.

Более успешное применение этого подхода, основанного на β -элиминировании 6-толилсульфонилсахаров, было продемонстрировано позже при сочетании его с другими методами: первичный гидроксил липофильного производного полисахарида количественно освобождался в результате небольшого числа операций [237, 249]. Таким путем, например, было достигнуто строго избирательное отщепление боковых ответвлений в капсульном полисахариде из *Pneumococcus*, тип II [237]:

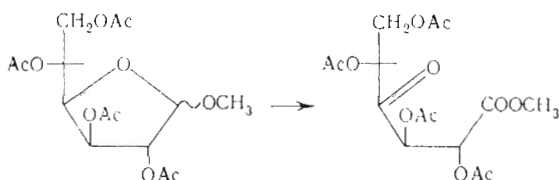


Методы, перечисленные в этом разделе, носят частный характер и применяются сравнительно редко, для изучения полисахаридов, имеющих кислотолабильные группы или остатки сахаров, легко удаляемые каким-либо другим методом.

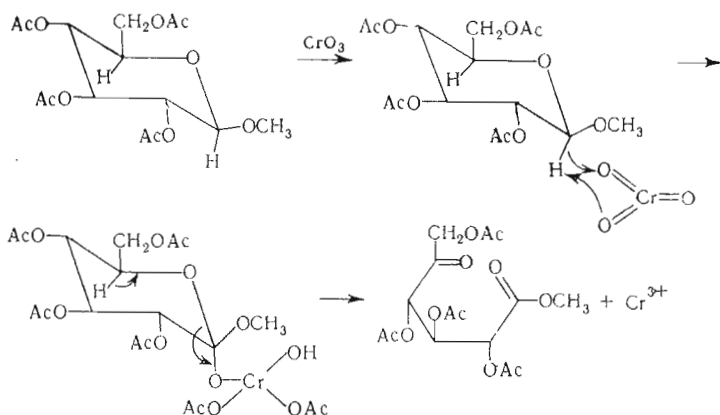
4. Окисление β -D-гликопиранозидов хромовым ангидридом. Под воздействием ангидрида хромовой кислоты на простые метиловые эфиры в уксусной кислоте происходит их окисление в формиаты [250, 251]. При попытке удалить аналогичным образом метильную группу при C₍₁₎ в ацетатах метилгликопиранозидов Анджел и Джеймс [252, 253] получили неожиданные результаты. Оказалось, что хромовый ангидрид в уксусной кислоте легко окисляет полностью ацетилированные гексопиранозиды с аксиальным протоном при C₍₁₎ (β -D-аномеры) в эфиры 5-кетоальдоновых кислот, тогда как аномарные гексопиранозиды (α -D-) с экваториальным атомом водорода при C₍₁₎ устойчивы к действию окислителя и лишь незначительная часть их превращается в соответствующие 1-O-формилпроизводные:



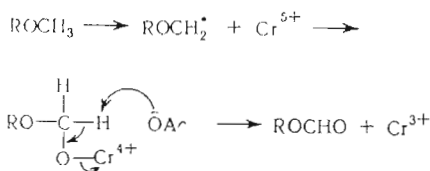
Метилгликофуранозиды независимо от конфигурации гликозидного центра в этих условиях быстро окисляются в метиловые эфиры 4-кетоальдоновых кислот [252, 253]:



Механизм окисления метилгликопиранозидов под влиянием ангидрида хромовой кислоты исследован мало. Была предложена схема, объясняющая образование наблюдаемых продуктов реакции, для β -аномеров [254]:



Окисление α -аномеров метилгексопиранозидов, возможно, происходит следующим путем:



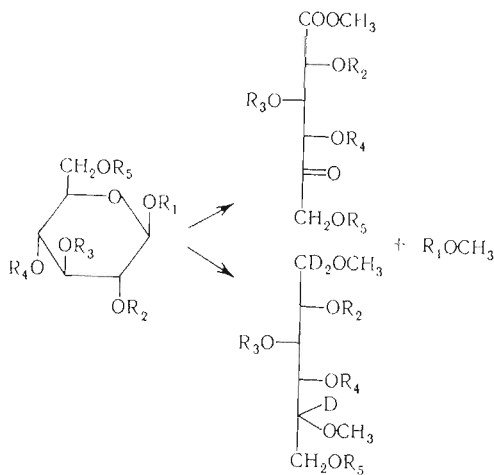
Преимущественное окисление β -метил-*D*-гексопиранозидов по гликозидному центру объясняют в рамках этих предположительных механизмов дополнительной стабилизацией переходного состояния за счет перекрывания несвязывающих орбиталей на атомах $\text{C}_{(1)}$ и $\text{O}_{(5)}$, которое невозможно в α -метил-*D*-гексопиранозиде по стерическим причинам.

Приведенные данные позволяют заключить, что обработка трехокисью хрома в уксусной кислоте ацетатов гликозидов, по-видимому, может стать общим методом для определения конфигурации гликозидных связей в ацетатах олиго- и полисахаридов. Впервые эта возможность исследовалась в работе [255]. На большом числе ацетатов олигосахаридов было показана

но, что остатки α -*D*-гексопиранозидов не взаимодействуют с трехокисью хрома, в то время как 80—100% β -*D*-гексопиранозидных остатков окисляются. Аналогичный ход реакций наблюдали и при окислении полисахаридов — гуарана (основная цепь состоит из остатков *D*-маннопиранозы, соединенных β 1→4-связями, 60% которых несут разветвления в 6-м положении в виде одиночных α -*D*-галактопиранозных остатков) и полисахарида из *Salmonella typhimurium*, имеющего фрагменты 3-*O*- β -(*L*-рамнопиранозил)-*D*-галактопиранозы [255]. В последующие годы эта реакция нашла широкое применение для определения конфигураций гликозидных связей в олиго- [256] и полисахаридах [51, 105, 130—132, 257—262].

В работе [255] высказывалось также предположение, что сочетание окисления полисахаридов хромовым ангидридом с метилированием образовавшихся продуктов по методу Хакомори [263] должно привести к расщеплению всех окисленных гликозидных связей, т. е. к контролируемой деградации полисахаридов. Так, при проведении указанной последовательности реакций из капсульного полисахарида *Pneumococcus* (тип II) методом хроматомасс-спектрометрии в олигосахаридной области был идентифицирован ряд дисахаридов [262].

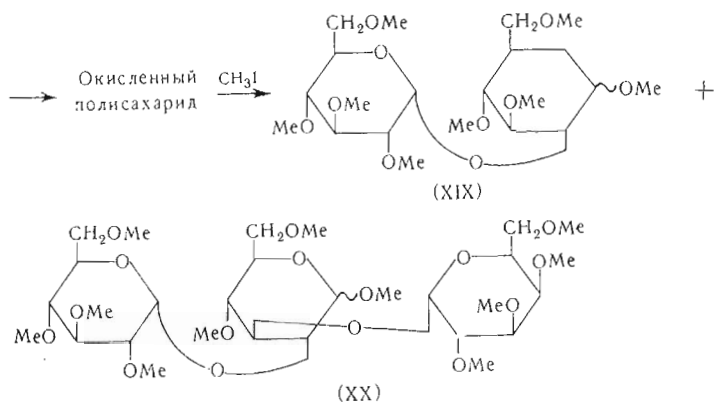
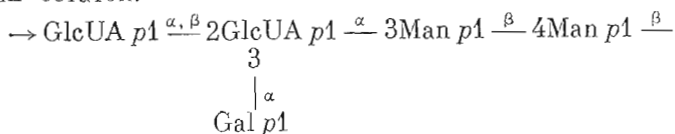
Более подробно этот подход к избирательному расщеплению полисахаридов исследовался в работе [264]. Для выделения фрагментов, образующихся при окислении полисахаридов, авторы использовали два способа. Первый состоит в том, что окисленное вещество сразу метилируют по методу Хакомори [263] в надежде выделить соединения с остатками 5-кетоальдоновой кислоты на восстанавливаемом конце, которые возникают при окислении моносахаридных звеньев, имеющих β -*D*-конфигурацию гликозидной связи [253, 255]. При втором способе смесь продуктов окисления предварительно восстанавливали NaBH_4 или NaBD_4 и затем метилировали по методу Хакомори:



где R_1 , R_2 , R_3 , R_4 и R_5 — моносахаридные остатки или Me.

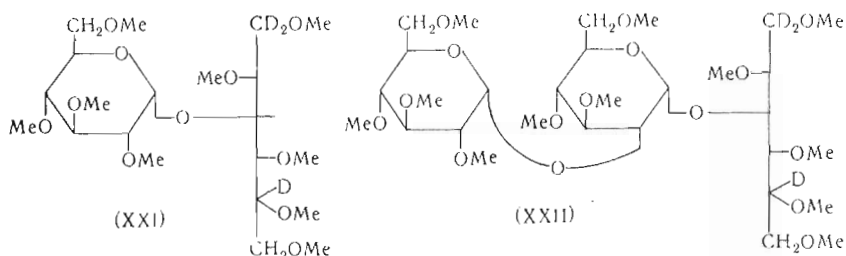
При окислении с последующим метилированием ацетата восстановленного внеклеточного полисахарида из *Lipomyces tetrasporus* с выходом 20% была выделена смесь ди- (XIX) и трисахаридов (XX) в отношении 3,3 : 1. Таким образом, выделение этих олигосахаридов из окисленного полисахарида путем прямого метилирования свидетельствует о том, что в процессе обработки происходит отщепление остатка 5-кетоальдоновой кислоты (вероятно, по механизму β -элиминирования на стадии метилирования по методу Хакомори) и метилированию подвергается следующий за ней моно-

сахаридный остаток:



Очевидно, связь между этими фрагментами и следующим моносахаридом должна иметь α -D-конфигурацию; в противном случае восстанавливающий концевой моносахарид подвергался бы окислению.

При втором способе выделения продуктов окисления (с предварительным восстановлением NaBH_4 или NaBD_4 и последующим метилированием) выход олигосахаридной фракции был значительно выше (35%). На восстанавливающем конце выделенных олигомеров (XXI) и (XXII) находились полиолы, образование которых на основании положения дейтерия можно было отнести за счет 5-кетоальдоновой кислоты:

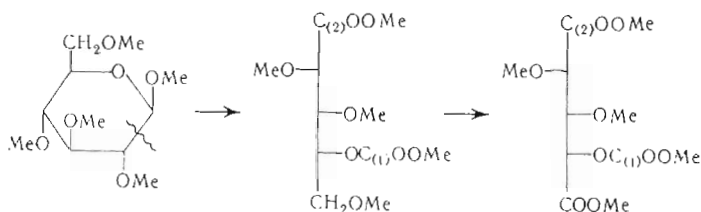


Таким образом, рассмотренный в этом разделе метод избирательного расщепления полисахаридов окислением трехокисью хрома в уксусной кислоте представляется очень перспективным. Использование его наряду с определением конфигураций гликозидных связей позволяет получить олигосахаридные фрагменты такого типа, которые не могут быть получены другими методами избирательного распада.

Окисление ацетата восстановленного клеточного галактоглобуриноманнана из *Lipomyces tetrasporus* [264]. Навеску ацетата полисахарида (100—300 мг), высушенного в вакууме над P_2O_5 (60°, 10 ч), добавляют к трехкратному избытку (300—900 мг) сухой трехокиси хрома в ледяной CH_3COOH^* из расчета 3 мл кислоты на 100 мг полисахарида. Окисление проводят в течение 1,5 ч при 50° на водяной бане при интенсивном перемешивании. Реакционную массу разбавляют водой, нейтрализуют CaCO_3 и экстрагируют хлороформом. Экстракт сушат Na_2SO_4 , фильтруют и упаривают. Часть вещества метилируют по методу Хакомори, другую предварительно восстанавливают NaBH_4 или NaBD_4 (50%-ный метанол, 10 ч) и затем метилируют. Полученные продукты делят путем колоночной хроматографии на SiO_2 и анализируют подходящими методами.

* При проведении реакции в уксусном ангидриде достигается более полное растворение ацетата полисахарида и трехокиси хрома.

Была сделана неудачная попытка распространить рассмотренный выше метод на метиловые эфиры олиго- и полисахаридов [265]. Если бы окисление метиловых эфиров оказалось избирательным, из одного опыта удалось бы получить информацию не только о конфигурации гликозидных связей, но и об их положении. Однако окисление метилированных метилгликопиранозидов привело к неожиданным результатам. Оказалось, что направление окисления в значительной степени зависит от условий реакции, от выбора растворителя и характера заместителя при $C_{(5)}$ пиранозного кольца, а также от конфигурации гликозидной связи. Основным направлением распада метилированных моносахаридов становится разрыв $C_{(1)} - C_{(2)}$ -связи, а не образование 5-кетоальдоновых кислот, что можно было бы ожидать по аналогии с ацетатами гексопиранозидов:



Однако, несмотря на многочисленные опыты, условий, в которых полностью метилированные β -метилгексопиранозиды окислялись бы в подходящие продукты, а α -метилгексопиранозиды оставались в основном неизменными, найти не удалось. Поэтому перспективы применения окисления трехокисью хрома для избирательного расщепления гликозидных связей полных метиловых эфиров олиго- и полисахаридов выглядят малообещающими.

Очень близка к описанной выше изученная недавно реакция окисления гликозидов озоном [266—268]. Этот реагент по характеру своего действия аналогичен трехокиси хрома. Он вызывает строго избирательное окисление гликозидов, имеющих аксиальный протон при $C_{(1)}$, в эфиры альдоновых кислот. Так как реакцию обычно проводят в среде уксусного ангидрида, освобождающийся гидроксил при $C_{(5)}$ успевает проацетилироваться, и в результате образуется полный ацетат метилового эфира альдоновой кислоты с выходом, близким к количественному. Соединения с экваториальным протоном при $C_{(1)}$ ($\alpha - D$ -, $\beta - L$ -) в эту реакцию не вступают. По-видимому, метод найдет широкое применение в химии полисахаридов, несмотря на некоторые осложнения в аппаратуре и длительность реакции по сравнению с окислением хромовым ангидридом.

* * *

Выше говорилось, что полисахариды значительно отличаются друг от друга по моносахаридному составу, размерам циклов, конфигурациям и положениям гликозидных связей между моносахаридами. Существующие в настоящее время методы установления их первичной структуры недостаточно универсальны, в каждом конкретном случае требуют индивидуального подхода к их применению и часто оказываются неудовлетворительными. Быстрый прогресс наших знаний о структуре специфических полисахаридов и их биологической функции требует развития новых методов исследования полисахаридных структур. В химии белков и нуклеиновых кислот широкое распространение получили так называемые блочные методы, включающие в себя специфический разрыв полимера на блоки, установление строения этих олигомерных блоков и последующее воссоздание структуры исходной полимерной молекулы. Для полисахаридов такой путь пока не реализован. Единственным в принципе общим подходом здесь является неспецифический кислотный гидролиз, который, однако, на практике дает удовлетворительные результаты только для простых полисахаридных структур.

Ввиду большого разнообразия полисахаридов вряд ли удастся найти общий строго специфический метод их расщепления. Из рассмотренных в настоящем обзоре методов на такую роль с известными ограничениями может претендовать только окисление ацетатов полисахаридов трехокисью хрома. Этим методом можно исследовать любые классы полисахаридов, за исключением пентозанов и полиуронидов. Последние, однако, могут быть окислены трехокисью хрома после предварительного восстановления карбонильных групп в первичноспиртовые. Очень близок по своей сути к этому подходу метод избирательного окисления ацетатов гликозидов озоном, который в будущем, вероятно, найдет применение в химии полисахаридов.

Другие методы, рассмотренные нами (дезаминирование гликозаминидов, избирательное расщепление по остаткам уроновых кислот), носят менее общий характер, хотя их перспективность для определенных классов полисахаридов достаточно полно продемонстрирована на большом числе примеров. Особенно перспективным кажется применение водорастворимых карбодиимидов для расщепления остатков уроновых кислот. Распространение этого метода на полиурониды позволит, минуя стадии получения гидрофобных производных, избирательно расщепить их в очень мягких условиях.

Сравнительно общий характер носит гидролиз полисахаридов на полимерных смолах. Хотя кислотный гидролиз и малоспецифичен, эта модификация позволяет резко повысить выход олигосахаридов и в случае линейных гомополисахаридов значительно упростить установление их строения.

Другие методы и частные реакции, рассмотренные в обзоре, менее интересны. Однако некоторые из них могут послужить основой для разработки методов строго избирательного расщепления гликозидных связей различной природы. Большой интерес к задаче частичного расщепления полисахаридов, проявляемый многими исследователями в ряде ведущих углеводных лабораторий мира, позволяет надеяться, что в ближайшие годы будут найдены принципиально новые подходы к решению этой интересной проблемы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Greenwood C. T., Milne E. A. (1968) *Advances Carbohydr. Chem.*, **23**, 282—366.
2. Capon B. (1969) *Chem. Rev.*, **69**, 407—498.
3. Kuhn W. (1930) *Ber.*, **63**, 1503—1509.
4. Painter T. J. (1963) *J. Chem. Soc.*, 779—783; (1964) 1978—1986.
5. Simha R. (1954) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **53**, 515—521.
6. Jones R. W., Dimler R. J., Rist C. E. (1955) *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 1659—1663.
7. Freudenberg K., Blomqvist G. (1935) *Ber.*, **68**, 2070—2082.
8. Weintraub M. S., French D. (1970) *Carbohydr. Res.*, **15**, 241—262.
9. Höök J. E., Lindberg B. (1968) *Acta chem. scand.*, **22**, 921—926.
10. Meller A. (1970) *Carbohydr. Res.*, **13**, 455—461.
11. Feather M. S., Harris J. F. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 5661—5664.
12. Manners D. J., Mercer G. A. (1965) *J. Chem. Soc.*, 2150—2156.
13. Hash J. H., King K. W. (1954) *Science*, **120**, 1033—1034.
14. Painter T. J. (1959) *Can. J. Chem.*, **37**, 497—499.
15. Timell T. E. (1959) *Chem. and Ind.*, 999—1001.
16. Comtat J., Joselean J. P., Bosso C., Barnoud F. (1974) *Carbohydr. Res.*, **38**, 217—224.
17. Perila O., Bishop C. T. (1961) *Can. J. Chem.*, **39**, 815—826.
18. Jones J. K. N., Merler E., Wise L. E. (1957) *Can. J. Chem.*, **35**, 634—645.
19. Percival E. (1968) *Carbohydr. Res.*, **7**, 272—283.
20. Painter T. J. (1959) *Chem. and Ind.*, 1488—1490.
21. Bourne E. J., Johnson P. G., Percival E. (1970) *J. Chem. Soc. (C)*, 1561—1569.
22. Kern W., Herold W., Scherhag B. (1955) *Macromol. Chem.*, **17**, 231—240.
23. Whitaker J. R., Deatherage F. E. (1955) *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 5298—5303.
24. Hoffman P., Linker A., Meyer K. (1958) *Fed. Proc.*, **17**, 1078—1082.
25. Montreuil J., Chosson A. (1962) *C. r. Acad. sci.*, **255**, 3071—3072.
26. Chosson A., Montreuil J., Scheppler N. (1962) *C. r. Acad. sci.*, **255**, 3261—3262.
27. Wadman W. H. (1952) *J. Chem. Soc.*, 3051—3055.

28. Signer R., Demagistri A., Müller C. (1956) *Macromol. Chem.*, **18—19**, 139—150.
29. Painter T. J. (1960) *Chem. and Ind.*, 1214—1215.
30. Lapanje S., Rice S. A. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 496—497.
31. Kotin L., Nagasawa M. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 1026—1028.
32. Painter T. J., Morgan W. T. J. (1961) *Chem. and Ind.*, 437—438.
33. Painter T. J., Watkins W. M., Morgan W. T. J. (1962) *Nature*, **193**, 1042—1044.
34. Painter T. J., Cheese J. A. F. L., Morgan W. T. J. (1962) *Chem. and Ind.*, 1535—1536.
35. Painter T. J., Watkins W. M., Morgan W. T. J. (1963) *Nature*, **199**, 282—283.
36. Painter T. J., Rege V. P., Morgan W. T. J. (1963) *Nature*, **199**, 569—570.
37. Rege V. P., Painter T. J., Watkins W. M., Morgan W. T. J. (1964) *Nature*, **203**, 360—363.
38. Morton J. J., Stewart J. C. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **29**, 308—318.
39. Painter T. J. (1962) *J. Chem. Soc.*, 3932—3940.
40. Foster A. B., Horton D., Stacey M. (1957) *J. Chem. Soc.*, 81—86.
41. Masamune H., Sinomara H., Okuyama T. (1958) *J. Exp. Med.*, **68**, 165—171.
42. Haskell T. H., Hanessian S. (1963) *J. Org. Chem.*, **28**, 2599—2603.
43. Painter T. J., Morgan W. T. J. (1961) *Nature*, **191**, 39—40.
44. Larsen B. (1967) *Acta chem. scand.*, **21**, 1395—1396.
45. Galanos C., Lüderitz O., Himmelspach K. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **8**, 332—336.
46. Yuen Min Choy, Dutton G. G. S. (1973) *Can. J. Chem.*, **51**, 3015—3020.
47. Smith F., Montgomery R. (1959) *The Chemistry of Plant Gums and Mucilages and some related Polysaccharides*, N. Y. — London.
48. Haworth K. N., Hirst E. L. (1930) *J. Chem. Soc.*, 2615—2618.
49. Jones J. K. N., Smith F. (1949) *Advances Carbohydr. Chem.*, **4**, 243—293.
50. Dixon J. R., Roberts W. K., Mills G. T., Buchanan J. G., Baddiley J. (1968) *Carbohydr. Res.*, **8**, 262—263.
51. Dmitriev B. A., Backinowsky L. V., Lvov V. L., Kochetkov N. K., Hofman L. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **50**, 539—547.
52. Berst M., Hellerqvist C. G., Lindberg B., Lüderitz O., Svensson S., Westphal O. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **11**, 353—359.
53. Lindberg B., Lönngren J., Nimmich W. (1972) *Carbohydr. Res.*, **23**, 47—54.
54. Hellerqvist C. G., Lindberg B., Lönngren J., Lindberg A. A. (1971) *Acta chem. scand.*, **25**, 939—944.
55. Hellerqvist C. G., Lindberg B., Pilotti A., Lindberg A. A. (1971) *Carbohydr. Res.*, **16**, 297—302.
56. Hirase S. (1957) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **30**, 70—79.
57. Araki C., Hirase S. (1954) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **27**, 109—114.
58. O'Neill A. N., Stewart D. K. R. (1956) *Can. J. Chem.*, **34**, 1700—1703.
59. Hirase S., Araki C. (1954) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **27**, 105—109.
60. Anderson N. S., Dolan T. C. S., Rees D. A. (1968) *J. Chem. Soc. (C)*, 596—601.
61. Anderson N. S., Dolan T. C. S., Rees D. A. (1973) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2173—2176.
62. Jones J. K. N., Wise L. E. (1952) *J. Chem. Soc.*, 2750—2756, 3389—3393.
63. Capon B., Chosh B. C. (1965) *Chem. Commun.*, 586—587.
64. Saunders M. D., Timell T. E. (1968) *Carbohydr. Res.*, **6**, 12—17.
65. Haug A., Larsen B., Smidsrod O. (1966) *Acta chem. scand.*, **20**, 183—190; (1967) **21**, 691—704.
66. Smidsrod O., Larsen B., Haug A. (1976) *Carbohydr. Res.*, **5**, 371—386.
67. Haug A., Larsen B., Smidsrod O., Painter T. (1969) *Acta chem. scand.*, **23**, 2955—2962.
68. Wolfrom M. L., Montgomery R., Karabinos J. V., Rathgeb P. (1950) *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 5796—5803.
69. Onodera K., Komano T., Hirano S. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **83**, 20—26.
70. Rege V. P., Painter T. J., Watkins W. M., Morgan W. T. J. (1963) *Nature*, **200**, 532—534.
71. McKee S. C., Dickey E. E. (1963) *J. Org. Chem.*, **28**, 1561—1563.
72. Hamilton J. K., Thompson N. S. (1957) *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 6464—6473.
73. Edward J. T. (1955) *Chem. and Ind.*, 1102—1105.
74. Roy N., Timell T. E. (1968) *Carbohydr. Res.*, **6**, 482—487.
75. Guthrie R. D., McCarthy J. F. (1967) *Advances Carbohydr. Chem.*, **22**, 11—24.
76. Peat S., Whelan W. J., Adwards T. E. (1961) *J. Chem. Soc.*, 29—37.
77. Gorin P. A. J., Spencer J. F. T., Magus R. J. (1969) *Can. J. Chem.*, **47**, 3569—3576.
78. Кочетков Н. К., Усов А. И., Пехтер М. А. (1971) *Ж. общ. химии*, **41**, 1160—1167.
79. Aspinall G. O., Churlson A. J., Hirst E. L., Young R. (1963) *J. Chem. Soc.*, 1696—1702.
80. Aspinall G. O., Sanderson G. R. (1970) *J. Chem. Soc. (C)*, 2259—2264.
81. Timell T. E., Enterman W., Spencer F., Soltes E. J. (1965) *Can. J. Chem.*, **43**, 2296—2305.
82. Feather M. S., Harris J. F. (1965) *J. Org. Chem.*, **30**, 153—157.

83. McGee P. A., Fowler W. E., Taylor E. W., Unruh C. C., Kenyon W. O. (1947) *J. Amer. Chem. Soc.*, **69**, 355—364.
84. Heyns K., Paulsen H. (1962) *Advances Carbohydr. Chem.*, **17**, 169—191.
85. Aspinall G. O., Cairncross J. M., Nicolson A. (1959) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **270**—273.
86. Aspinall G. O., Nicolson A. (1960) *J. Chem. Soc.*, 2503—2507.
87. Aspinall G. O., Cairncross J. M. (1960) *J. Chem. Soc.*, 3998—4000.
88. Lindberg B., Svensson S. (1968) *Acta chem. scand.*, **22**, 1907—1912.
89. Miyaji H., Misaki A. (1973) *Carbohydr. Res.*, **29**, 277—279.
90. Horton D. A., Just E. K. (1973) *Carbohydr. Res.*, **30**, 349—357.
91. Horton D. A., Just E. K. (1973) *Carbohydr. Res.*, **29**, 173—179.
92. Cooper A. D., Smith W., Bacila M., Medina A. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 445—448.
93. Avigal G., Amaral D., Asensio C., Horecker B. L. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 2736—2743.
94. Roges J. K., Thompson N. S. (1968) *Carbohydr. Res.*, **7**, 66—75.
95. Hirasaka Y. (1963) *Yakugaku Zasshi*, **89**, 976—984; *Chem. Abstr.* (1964) **60**, 4233h.
96. Clode D. M., Horton D. A., Meshreki M. H., Shoji H. (1969) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 695—697.
97. Clode D. M., Horton D. A. (1970) *Carbohydr. Res.*, **12**, 477—486.
98. Rees D. A., Richardson N. G., Wight N. J., Hirst E. L. (1969) *Carbohydr. Res.*, **9**, 451—459.
99. Gorin P. A. J., Spencer J. F. T. (1970) *Carbohydr. Res.*, **13**, 339—346.
100. Eisenman R. A., Balasubramanian A. S., Marx W. (1967) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **119**, 387—397.
101. Helbert J. R., Marini M. A. (1963) *Biochemistry*, **2**, 1101—1106.
102. Barker S. A., Foster A. B., Stacey M., Webber J. M. (1958) *J. Chem. Soc.*, 2218—2227.
103. Isemura M., Schmid K. (1971) *Biochem. J.*, **124**, 591—604.
104. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K. (1973) *Carbohydr. Res.*, **30**, 45—50.
105. Дмитриев Б. А., Книрель Ю. А., Кочетков Н. К. (1974) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 411—416.
106. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K. (1973) *Carbohydr. Res.*, **29**, 451—457.
107. Hanessian S. (1967) *Tetrahedron Lett.*, 1549—1552.
108. Watanabe K. A., Beránek J., Friedman H. A., Fox J. J. (1965) *J. Org. Chem.*, **30**, 2735—2739.
109. Каверзнева Е. Д., Ци Де Фан (1961) *Биохимия*, **26**, 783—786.
110. Hase S., Matsushima Y. (1970) *J. Biochem.*, **68**, 723—730.
111. Jones J. K. N., Reid P., Turvey J. R. (1965) *Can. J. Chem.*, **43**, 983—985.
112. Fujinaga M., Matsushima Y. (1967) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **40**, 1706—1709.
113. Matsushima Y., Fujii N. (1957) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **30**, 48—50.
114. Onodera K., Komano T., Hirano S. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **83**, 20—26.
115. Yosizawa Z., Sato T. (1961) *Biochim. et biophys. acta*, **52**, 591—593.
116. Yosizawa Z. (1961) *Biochim. et biophys. acta*, **52**, 588—591.
117. Yosizawa W., Sato T. (1962) *J. Biochem.*, **51**, 233—241.
118. Yosizawa W. (1962) *J. Biochem.*, **51**, 1—11.
119. Каверзнева Е. Д., Лацук В. X. (1966) *Биохимия*, **31**, 137—142.
120. Gmeiner J., Luderitz O., Westphal O. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **7**, 370—379.
121. Bruneteau M., Volk W. A., Sigh P. P., Luderitz O. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **43**, 501—508.
122. Wilhelms O.-H., Luderitz O., Westphal O. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **48**, 89—101.
123. Tarcsay L., Wang C. S., Li S.-C., Alaupovic P. (1973) *Biochemistry*, **12**, 1948—1955.
124. Sato T., Yosizawa Z., Kotoku T., Masubuchi M. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **29**, 642—645.
125. Wolfrom M. L., Juliano B. O. (1960) *J. Amer. Chem. Soc.*, **82**, 2588—2592.
126. Sato T., Yosizawa Z., Mashbuchi F., Yamauchi F. (1967) *Carbohydr. Res.*, **5**, 387—398.
127. Tarcsay L., Jann B., Jann K. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **23**, 505—514.
128. Yosizawa Z., Sato T., Schmid K. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **121**, 417—420.
129. Fujinaga M., Matsushima Y. (1966) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **39**, 185—190.
130. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K. (1975) *Carbohydr. Res.*, **40**, 365—374.
131. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K. (1975) *Carbohydr. Res.*, **44**, 77—85.
132. Дмитриев Б. А., Книрель Ю. А., Гофман И. Л., Кочетков Н. К. (1975) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 2302—2308.
133. Cherst M., Felkin H., Sicher J., Šipoŝ F., Tichý M. (1965) *J. Chem. Soc.*, 2513—2521.

134. Ledderhose G. (1880) *Z. Physiol. Chem.*, **4**, 139—147.
135. Fischer E., Tiemann F. (1894) *Ber.*, **27**, 138—147.
136. Levene P. A. (1918) *J. Biol. Chem.*, **36**, 89—94.
137. Meyer K. H., Wehrli H. (1937) *Helv. chim. acta*, **20**, 361—364.
138. Bera B. C., Foster A. B., Stacey M. (1956) *J. Chem. Soc.*, 4531—4535.
139. Foster A. B., Martlew E. F., Stacey M. (1953) *Chem. and Ind.*, 825—827.
140. Horton D., Philips K. D. (1973) *Carbohydr. Res.*, **30**, 367—374.
141. Erbing Ch., Lindberg B., Svensson S. (1973) *Acta chem. scand.*, **27**, 3699—3704.
142. Levene P. A. (1919) *J. Biol. Chem.*, **39**, 69—76.
143. Shafizaden F. (1958) *Advances Carbohydr. Chem.*, **13**, 9—47.
144. Shively J. E., Conrad H. E. (1970) *Biochemistry*, **9**, 33—43.
145. Horton D., Philips K. D. (1972) *Carbohydr. Res.*, **21**, 417—419.
146. Ng Ying Kin N. M. K., Williams J. M. (1971) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1123—1124.
147. Llewellyn J. W., Williams J. M. (1973) *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1997—2000.
148. Wiggins L. F. (1946) *Nature*, **157**, 300.
149. Bashford V. G., Wiggins L. F. (1950) *Nature*, **165**, 566.
150. Micheel F., Neier W., Riedel T. (1967) *Ber.*, **100**, 2401—2409.
151. Ashmawy A. E. E., Horton D., Magbanwa L. G., Tronchet J. M. J. (1968) *Carbohydr. Res.*, **6**, 299—309.
152. Defaye J., Nakamura T. (1971) *Carbohydr. Res.*, **16**, 133—144.
153. Angyal S. J., Murdoch J. S. (1969) *Austral. J. Chem.*, **22**, 2417—2428.
154. Hase S., Matsushima Y. (1972) *J. Biochem.*, **72**, 1117—1128.
155. Yosizawa Z. (1964) *Nature*, **201**, 926—927.
156. Perlin A. S., Sanderson G. R. (1970) *Carbohydr. Res.*, **12**, 183—192.
157. Taylor R. L., Shively J. E., Cifonelli J. A. (1973) *Biochemistry*, **12**, 3633—3637.
158. Yamauchi F., Kosakai M., Yosizawa Z. (1968) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **33**, 721—725.
159. Lindahl U., Bäckström G., Jansson L., Hallen A. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 7234—7241.
160. Cifonelli J. A. (1968) *Carbohydr. Res.*, **8**, 233—242.
161. Dische Z., Borenfreund E. (1950) *J. Biol. Chem.*, **184**, 517—522.
162. Lagunoff D., Warren G. (1962) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **99**, 396—400.
163. Hase S., Matsushima Y. (1969) *J. Biochem.*, **66**, 57—62.
164. Taylor R. L., Conrad H. E. (1972) *Biochemistry*, **11**, 1383—1388.
165. O'Brien J. F., Gerritsen T., Helmuth A. C. (1973) *Anal. Biochem.*, **56**, 465—479.
166. Cifonelli J. A., King J. (1971) *Carbohydr. Res.*, **12**, 391—403.
167. Schorigin P., Makarowa-Semljanskaja N. N. (1935) *Ber.*, **68**, 965—969.
168. Foster A. B., Martlew E. F., Stacey M., Taylor P. J. M., Webber J. M. (1961) *J. Chem. Soc.*, 1204—1208.
169. Durant G. J., Hendrickson U. R., Montgomery R. (1962) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **99**, 418—425.
170. Foster A. B., Harrison R., Inch T. D., Stacey M., Webber J. M. (1963) *J. Chem. Soc.*, 2279—2286.
171. Perlin A. S., Mazurek M. (1968) *Carbohydr. Res.*, **7**, 369—379.
172. Wolfrom M. L., Honda S., Wang P. Y. (1969) *Carbohydr. Res.*, **10**, 259—265.
173. Wolfrom M. L., Wang P. Y., Honda S. (1969) *Carbohydr. Res.*, **11**, 179—185.
174. Perlin A. S., Ng Ying Kin N. M. K., Bhattacharjee S. S. (1972) *Can. J. Chem.*, **50**, 2437—2441.
175. Perlin A. S., Casu B., Sanderson G. R. (1970) *Can. J. Chem.*, **48**, 2260—2268.
176. Carter H. E., Brooks S., Gigg R. H., Stobach D. R., Suami T. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 743—746.
177. Ellwood D. C., Kelemen M. V., Baddiley J. (1963) *Biochem. J.*, **86**, 213—225.
178. Rao E. V., Buchanan J. G., Baddiley J. (1966) *Biochem. J.*, **100**, 801—810.
179. Brundish D. E., Baddiley J. (1968) *Biochem. J.*, **110**, 573—582.
180. Rao E. V., Watson M. J., Buchanan J. G., Baddiley J. (1969) *Biochem. J.*, **111**, 547—556.
181. Watson M. J., Baddiley J. (1974) *Biochem. J.*, **137**, 399—404.
182. Guy R. C. E., How M. J., Stacey M. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 5106—5111.
183. Iiase S., Matsushima Y. (1971) *J. Biochem.*, **69**, 559—565.
184. Hase S., Tsuji Y., Matsushima Y. (1972) *J. Biochem.*, **72**, 1549—1555.
185. Cifonelli J. A. (1964) *Fed. Proc.*, **23**, 484—487.
186. Scanley C. S. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 3888—3890.
187. Knecht J., Dorfman A. (1965) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **21**, 509—515.
188. Cifonelli J. A., King J. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **215**, 273—279.
189. Cifonelli J. A. (1965) *Fed. Proc.*, **24**, 354—356.
190. Cifonelli J. A. (1966) *Fed. Proc.*, **25**, 742—745.
191. Lindahl U. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **130**, 361—367.
192. Helting T., Lindahl U. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 5442—5447.
193. Lindahl U., Axelsson O. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 74—82.

194. Cifonelli J. A. (1974) *Carbohydr. Res.*, **37**, 145—154.
195. Lim T. W., Leder J. G., Bach G., Neufeld E. F. (1974) *Carbohydr. Res.*, **37**, 103—109.
196. Jansson L., Ögren S., Lindahl U. (1975) *Biochem. J.*, **145**, 53—62.
197. Margolis R. U., Atherton D. M. (1972) *Biochem. et biophys. acta*, **273**, 368—373.
198. Höök M., Lindahl U., Iverus P. H. (1974) *Biochem. J.*, **137**, 33—43.
199. Hovingh P., Linker A. (1974) *Carbohydr. Res.*, **37**, 181—192.
200. Stern E. L., Lindahl U., Roden L. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 5707—5715.
201. Knecht J., Cifonelli J. A., Dorfman A. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 4652—4661.
202. Lindahl U., Cifonelli J. A., Lindahl B., Roden L. (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 2817—2820.
203. Lindahl U., Roden L. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 2113—2119.
204. Roden L., Smith R. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 5949—5954.
205. Llewellyn J. W., Williams (1971) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1386—1387.
206. Llewellyn J. W., Williams J. M. (1973) *Carbohydr. Res.*, **28**, 339—343.
207. Уэйлис Е. С., Лен Дж. Ф. (1951) в сб. *Органические реакции*, т. 3, с. 255, Изд-во иностр. лит.
208. Overend W. G., Shafizaden F., Stacey M. (1950) *J. Chem. Soc.*, 671—677.
209. Simon H., Palm D. (1965) *Ber.*, **98**, 433—445.
210. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Sviridov A. F. (1967) *Carbohydr. Res.*, **4**, 362—363.
211. Кочетков Н. К., Чижев О. С., Свиридов А. Ф. (1967) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 2316—2320.
212. Кочетков Н. К., Чижев О. С., Свиридов А. Ф. (1969) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1920—1928.
213. Wang P. V., Bolker M. J., Purves C. B. (1967) *Tappi*, **50**, 123—125.
214. Кочетков Н. К., Чижев О. С., Свиридов А. Ф. (1968) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 2089—2093.
215. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Sviridov A. F. (1970) *Carbohydr. Res.*, **14**, 277—285.
216. Main A., Percival E. (1973) *Carbohydr. Res.*, **26**, 147—161.
217. Кочетков Н. К., Горин С. Е., Свиридов А. Ф., Чижев О. С., Голубев В. И., Бабьева И. П., Поделько А. Я. (1973) *Изв. АН СССР, Сер. хим.*, 2304—2311.
218. Кочетков Н. К., Чижев О. С., Свиридов А. Ф., Горин С. Е., Бабьева И. П. (1975) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 2774—2780.
219. Saier M. H., Ballou C. E. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 992—1005.
220. Ballou C. E. (1968) *Accounts Chem. Res.*, **1**, 3666—3670.
221. Danishefsky I., Siskovic E. (1971) *Carbohydr. Res.*, **16**, 199—205.
222. Kiss J. (1974) *Advances Carbohydr. Chem.*, **29**.
223. Albersheim P., Neukom H., Dauel H. (1960) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **90**, 46—51.
224. Neukom H., Dauel H. (1958) *Chem. and Ind.*, 683—685.
225. McCleary C. W., Rees D. A., Samuel J. W. B., Steele Y. W. (1967) *Carbohydr. Res.*, **5**, 492—495.
226. Barrett A. J., Northcote D. H. (1965) *Biochem. J.*, **94**, 617—627.
227. Stoddart R. W., Barrett A. J., Northcote D. H. (1967) *Biochem. J.*, **102**, 194—204.
228. Linker A., Hoffman P., Meyer K., Sampson P., Korn E. D. (1960) *J. Biol. Chem.*, **235**, 3061—3065.
229. Suzuki S. (1960) *J. Biol. Chem.*, **235**, 3580—3588.
230. Ludowicz J., Venneslang B., Dorfman A. (1971) *J. Biol. Chem.*, **236**, 335—339.
231. Albersheim P., Neukom H., Dauel H. (1970) *Helv. chim. acta*, **43**, 1422—1426.
232. Albersheim P., Killias U. (1962) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **97**, 107—115.
233. Hirst E. L., Percival E. E., Wold J. K. (1964) *J. Chem. Soc.*, 1493—1499.
234. Hirst E. L., Rees D. A. (1965) *J. Chem. Soc.*, 1182—1187.
235. Lindberg B., Lönngren J., Thompson J. L. (1973) *Carbohydr. Res.*, **28**, 351—362.
236. Björndal H., Lindberg B., Lönngren J., Mészáros M., Thompson J. L., Nimmich W. (1973) *Carbohydr. Res.*, **31**, 93—100.
237. Kenne L., Lindberg B., Svensson S. (1975) *Carbohydr. Res.*, **40**, 69—77.
238. Curvall M., Lindberg B., Lönngren J. (1975) *Carbohydr. Res.*, **41**, 235—239.
239. Lindberg B., Lönngren J., Ruden U. (1975) *Carbohydr. Res.*, **42**, 83—94.
240. Curvall M., Lindberg B., Lönngren J., Nimmich W. (1975) *Carbohydr. Res.*, **42**, 73—82.
241. Curvall M., Lindberg B., Lönngren J., Nimmich W. (1975) *Carbohydr. Res.*, **42**, 95—105.
242. Kenne L., Lönngren J., Svensson S. (1973) *Acta chem. scand.*, **27**, 3692—3698.
243. Kenne L., Svensson S. (1972) *Acta chem. scand.*, **26**, 2144—2146.
244. Kenne L., Larm O., Svensson S. (1972) *Acta chem. scand.*, **26**, 2473—2476.
245. Baer H. H., Rank W. (1965) *Can J. Chem.*, **43**, 3330—3337, 3462—3471.
246. Lindberg B., Lundström H. (1968) *Acta chem. scand.*, **22**, 1907—1912.
247. Hurst D. T., McInnes A. G. (1965) *Can. J. Chem.*, **43**, 1998—2011.
248. Björndal H., Wagström B. (1969) *Acta chem. scand.*, **23**, 3313—3320.
249. Björndal H., Hellerqvist C. G., Lindberg B., Svensson S. (1970) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **9**, 610—623.
250. Harrison J. T., Harrison S. (1966) *Chem. Commun.*, 752.

251. Angyal S. J., James K. (1969) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 617—618.
252. Angyal S. J., James K. (1970) *Carbohydr. Res.*, **12**, 147—149.
253. Angyal S. J., James K. (1970) *Austral. J. Chem.*, **23**, 1209—1221.
254. Bertolini M., Glaudemans C. P. J. (1971) *Carbohydr. Res.*, **17**, 449—452.
255. Hoffman J., Lindberg B., Svensson S. (1972) *Acta chem. scand.*, **26**, 661—666.
256. Dick W. E., Weisleder D., Hodge J. E. (1971) *Carbohydr. Res.*, **18**, 115—123.
257. Hellerqvist C. G., Hoffman J., Lindberg B., Pillotti A., Lindberg A. A. (1971) *Acta chem. scand.*, **25**, 1512—1513.
258. Nurminen M., Hellerqvist C. G. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **22**, 500—505.
259. Lindberg B., Lönngren J., Thompson J. L. (1972) *Carbohydr. Res.*, **25**, 49—57.
260. Hellerqvist C. G., Hoffman J., Lindberg A. A., Lindberg B. (1972) *Acta chem. scand.*, **26**, 3282—3286.
261. Curvall M., Lindberg B., Lönngren J., Nimmich W. (1973) *Acta chem. scand.*, **27**, 2645—2649.
262. Larm O., Lindberg B., Svensson S. (1973) *Carbohydr. Res.*, **31**, 120—126.
263. Nakomori S. (1964) *J. Biochem.*, **55**, 205—208.
264. Кочетков Н. К., Чижов О. С., Свиридов А. Ф., Горин С. Е., Бабьева И. П. (1975) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 2774—2780.
265. Кочетков Н. К., Чижов О. С., Свиридов А. Ф., Сент-Кирайи И., Каденцев В. И. (1976) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 712—721.
266. Deslongchamps P., Moreau C. (1971) *Can. J. Chem.*, **49**, 2465—2467.
267. Deslongchamps P., Moreau C., Fréhel D., Atlani P. (1972) *Can. J. Chem.*, **50**, 3402—3404.
268. Deslongchamps P., Atlani P., Fréhel D., Malaval A., Moreau C. (1974) *Can. J. Chem.*, **52**, 3651—3664.

Поступила в редакцию
2.X.1975

CHEMICAL METHODS FOR PARTIAL DEGRADATION OF POLYSACCHARIDES

SVIRIDOV A. F., CHIZHOV O. S.

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

The chemical methods of random, selective and specific partial degradation of polysaccharides are discussed.
