



УДК 582.272.134:547.458.7

ПОЛЯРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЧЕРНОМОРСКОЙ БУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ *Colpomenia peregrina* (Sauv.) Hamel

© 2004 г. А. И. Усов**, Г. П. Смирнова*, З. Каменарска**,
Ст. Димитрова-Конаклиева***, К. Л. Стефанов**, С. С. Попов**

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

**Институт органической химии с центром фитохимии;
Болгарская Академия наук, София 1113, Болгария;

***Медицинский университет, факультет фармации,
София 1000, Болгария

Поступила в редакцию 04.11.2002 г. Принята к печати 12.08.2003 г.

В бутанольном экстракте биомассы черноморской бурой водоросли *Colpomenia peregrina* с помощью ГЖХ-МС триметилсилильных производных идентифицированы 24 соединения, в том числе алифатические гидроксиды и кетокислоты, ароматические кислоты, глицерин, маннит, флоридозид и моносахариды. Исследован также полисахаридный состав биомассы, в которой обнаружено высокое содержание альгината и ламинарана и сравнительно небольшое количество фукоидана. Полисахариды выделены с помощью фракционной экстракции биомассы и очищены переосаждением или ионообменной хроматографией. Строение альгината и ламинарана охарактеризовано спектрами ^{13}C -ЯМР и в случае ламинарана дополнительно подтверждено методом метилирования. Особенностью альгината этой водоросли является значительное преобладание в его составе остатков гулурановой кислоты (G) над остатками маннурановой кислоты (M, соотношение M/G 0.48). Ламинаран представляет собой обычный для бурых водорослей β -глюкан со связями 1 \rightarrow 3 в главной цепи и 1 \rightarrow 6 в разветвлениях. Фукоидан оказался гетерополисахаридом, содержащим, кроме остатков фукозы и сульфата, другие нейтральные моносахариды и уроновые кислоты.

Ключевые слова: водоросли, *Phaeophyta*, *Colpomenia peregrina*, полярные вещества, полисахариды, альгинат, ламинаран, фукоидан.

ВВЕДЕНИЕ

Водоросль *Colpomenia peregrina* (Sauv.) Hamel является представителем семейства Scytosiphonaceae, входящего в порядок Scytosiphonales отдела бурых водорослей (Phaeophyta). Известны всего два участка болгарского побережья Черного моря, где встречается этот вид, хотя в других районах Мирового океана он представлен более широко. Имеется большое количество работ, посвященных биологии этой водоросли, в которых изучались фенология и жизненный цикл [1–3], влияние условий на продуктивность и фотосинтез [4–7], в том числе в культуре [8], а также молекулярная систематика [9, 10]. Данные о химическом составе *C. peregrina* в литературе практически отсутствуют. Что касается других представителей рода *Colpomenia*, то имеются лишь упоминания о составе фенольных соединений [11], жирных кислот и стероидов [12–14] в *C. sinuosa*, о выделении из этой водоросли необычного цитотоксического

бромфенола $\text{C}_6\text{-C}_4\text{-C}_6$ (колпола) [15], о наличии ингибиторов ДНК-полимеразы [16] и веществ с противовирусной активностью [17] в *C. bullosa*, а также сведения о составе водорастворимых сульфатированных полисахаридов (фукоиданов), содержащихся в обоих названных видах [18–21]. В этих последних работах отмечен довольно низкий выход фукоиданов по сравнению с другими бурыми водорослями (так, в *C. sinuosa* найдено наименьшее количество фукозосодержащих полисахаридов из девяти исследованных индийских видов [18]). В составе полисахаридов, кроме фукозы, были найдены другие нейтральные моносахариды и уроновые кислоты в количествах, сравнимых или даже превосходящих содержание фукозы [19–21].

В предыдущей статье, посвященной неполярным компонентам биомассы *C. peregrina*, изучались липиды и стероиды [22], причем было установлено, что по составу этих соединений данный вид заметно отличается от других бурых водорослей. В биомассе было обнаружено высокое содержание холестерина и 24-метилхолестерина, тогда как обычный для бурых водорослей

Автор для переписки (тел.: (095) 137-67-91; факс: (095) 135-53-28; эл. почта: usov@ioc.ac.ru).

фукостерин присутствовал в очень небольших количествах. В водоросли были найдены также редкие α -галактолипиды. В соответствии с современной классификацией [23], род *Colpomenia* относится к довольно примитивным бурым водорослям, чем и может объясняться необычный химический состав его представителей. Найденные особенности липофильных соединений *C. peregrina* позволяли предположить, что анализ полярных компонентов биомассы также представляет несомненный интерес. В данной работе изучены две группы таких соединений: низкомолекулярные вещества, извлекаемые *n*-бутанолом из экстрактов, полученных при обработке водоросли смесью метанола и хлороформа, и полисахариды, экстрагируемые водными растворами из обезжиренной водорослевой биомассы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полярные вещества, остающиеся в водно-метанольном слое при экстракции липофильных соединений из биомассы, извлекали *n*-бутанолом и превращали в триметилсилильные (ТМС) производные, пригодные для разделения методом ГЖХ. Идентификацию соединений проводили сравнением их масс-спектров с масс-спектрами заведомых образцов, а для веществ с близкими масс-спектрами использовали дополнительно времена удерживания при ГЖХ. Полученные результаты суммированы в табл. 1.

Как видно из этой таблицы, состав смеси полярных соединений, экстрагированных из *C. peregrina*, достаточно сложен. Как и в случае других черноморских бурых водорослей, в этой смеси имеются органические кислоты, главным образом окисленные (гидрокси-, оксо- или дикарбоновые). 2,3,4-Тригидроксимасляная и 2,3-дигидроксипропионовая кислоты, по всей вероятности, связаны биогенетически соответственно с 2,3,4-тригидроксипропионалем и глицериновым альдегидом, которые в свою очередь участвуют в обмене углеводов. Ароматические кислоты, благодаря хорошо известной для таких кислот и фенолов антибактериальной и антигрибковой активности, могут выполнять защитные функции. Из этой серии соединений в водоросли обнаружены бензойная, 4-гидроксибензойная, фенилуксусная и α -гидроксифенилуксусная кислоты. Найдена также никотиновая кислота, которая обладает множественной биологической активностью. Однако, в отличие от других черноморских водорослей, в *C. peregrina* отмечено очень низкое содержание свободных аминокислот, что более характерно для ряда средиземноморских видов.

Главные пики на хроматограмме относятся к углеводам и родственным веществам. Наиболее интенсивные пики принадлежат ТМС-производным маннита, глицерина, глюкозы и фруктозы.

Таблица 1. Состав *n*-бутанольного экстракта биомассы *C. peregrina*

Вещество	Содержание*, %
Монокарбоновые кислоты	0.2
Миристиновая кислота	0.1
Стеариновая кислота	0.1
Гидроксикислоты	0.3
3-Гидроксимасляная кислота	0.1
2,3-Дигидроксипропионовая кислота	0.1
2,3,4-Тригидроксимасляная кислота	0.1
Кетокислоты	0.1
4-Метил-2-оксвалериановая кислота	0.1
Дикарбоновые кислоты	<0.1
Янтарная кислота	<0.1
Аминокислоты	0.1
Валин	0.1
5-Оксопролин	<0.1
Ароматические кислоты	0.2
Фенилуксусная кислота	<0.1
2-Гидроксифенилуксусная кислота	<0.1
Бензойная кислота	0.2
4-Гидроксибензойная кислота	<0.1
Азотсодержащие соединения	0.1
3-Пиридинкарбоновая кислота	0.1
Триметиламин	<0.1
Углеводы и полиолы	56.1
Глицерин	8.9
2,3,4-Тригидроксипропиональ	0.1
Глюкоза	7.0
Фруктоза	6.0
Маннит	27.8
<i>мио</i> -Инозит	0.2
Ксилит	0.2
Флоридозид	5.5
Сахароза	0.4

* Содержание приведено в процентах от общего ионного тока при ГЖХ-МС.

Весьма неожиданным было обнаружение ТМС-производного флоридозида (2-*O*- α -*D*-галактопиранозил-*D*-глицерина), который считается характерным компонентом красных, а не бурых водорослей. По-видимому, наличие этого вещества нуждается в дополнительном подтверждении независимыми методами. В небольших количествах найдены также ТМС-производные ксилита, *мио*-инозита и дисахарида сахарозы. Следует подчерк-

Таблица 2. Содержание нейтральных моносахаридов в гидролизатах препаратов разных ступеней фракционирования *S. peregrina**, полисахаридных фракций 1–8, полученных в результате фракционной экстракции *S. peregrina*, и полисахаридов, очищенных ионообменной хроматографией (для фракции альгината б приведено также содержание уроновых кислот, а для очищенных фукоиданов – содержание уроновых кислот и сульфата)

Препарат	Fuc	Xyl	Man	Glc	Gal
ОБ	2.6	1.4	1.9	4.9	1.1
АПФ	4.5	5.7	1.8	21.5	2.6
АПА	4.8	3.0	1.7	4.2	1.3
Фракция 1	24.4	2.9	0.9	2.7	11.8
2	6.8	21.8	2.6	19.8	1.9
3	0.7	0.8	0.6	55.4	–
4	6.6	3.1	2.7	5.6	1.9
5	9.6	6.2	5.2	20.2	2.3
6**	0.1	–	–	–	0.2
7	8.9	5.7	5.4	10.7	5.2
8	0.2	0.3	0.2	2.7	0.2
Ламинаран	–	–	0.4	88.2	–
Фукоидан Ф-0.5***	12.3	10.1	6.4	10.6	4.3
Фукоидан Ф-1.0***	35.4	3.9	0.7	1.7	16.9

* В процентах от навески препарата по данным количественной ГЖХ гидролизатов в виде ацетатов полиолов. ОБ – обезжиренная биомасса; АПФ и АПА – аналитические препараты фукоидана и альгината; фракции 1–8 – полисахаридные фракции, полученные в результате фракционной экстракции *S. peregrina*; ламинаран и фукоиданы Ф-0.5 и Ф-1.0 – очищенные полисахариды из фракций 3 и 1.

** Содержание уроновых кислот 89.8%.

*** Фукоиданы Ф-0.5 и Ф-1.0 содержат соответственно 16.5 и 6.4% уроновых кислот и 6.0 и 16.1% SO_3Na .

нуть, что интенсивность пиков на хроматограмме зависит не только от количества вещества, но и от характера его масс-спектрометрической фрагментации, вследствие чего приводимые количественные данные весьма приблизительны.

Для предварительной оценки полисахаридного состава обезжиренной биомассы был проведен ее кислотный гидролиз с последующим определением освобождающихся моносахаридов в виде ацетатов полиолов методом ГЖХ. Полученные результаты приведены в табл. 2. Низкое содержание фукозы и сравнимые с ним количества ксилозы и галактозы в гидролизате позволили предположить, что фукоидан водоросли представляет собой в действительности сложный гетерополисахарид. Глюкоза в гидролизате соответствовала наличию в биомассе значительных количеств ламинарана.

Далее полисахаридный состав биомассы исследовался с помощью аналитической методики фракционной экстракции с последующим раздельным спектрофотометрическим определением фукоидана и альгината [24]. По этим данным, биомасса содержала всего 0.8% фукоидана и существенно большее количество (19.6%) альгината. Полисахаридные препараты, полученные после лиофилизации аналитических препаратов фукоидана и альгината (табл. 2), гидролизовали для

определения состава нейтральных сахаров, а для альгината был получен спектр ^{13}C -ЯМР. Данные гидролиза подтвердили, что фракция кислоторастворимых полисахаридов содержит много ламинарана. Одновременно было установлено, что часть фукоидана не растворяется в разбавленной кислоте, попадает в качестве примеси в щелочной экстракт вместе с альгинатом и препятствует получению удовлетворительных спектров ЯМР этого полисахарида.

Более надежные данные о полисахаридном составе водоросли были получены в результате препаративного выделения отдельных полисахаридов. Для этой цели использовали фракционную экстракцию обезжиренной биомассы (ср. [25]). Вначале обработкой разбавленным раствором хлорида кальция при умеренном нагревании извлекали фукоидан и ламинаран, которые разделяли, осаждая фукоидан цетавлоном и переводя затем осадок в водорастворимую натриевую соль. Далее остаток биомассы обрабатывали разбавленной соляной кислотой для удаления двухвалентных катионов (при этом получали дополнительное количество фукоидана). Наконец, экстракцией раствором карбоната натрия извлекали альгинат, который выделяли в чистом виде после обесцвечивания и подкисления экстракта. На этот раз образец альгината имел спектр ^{13}C -ЯМР,

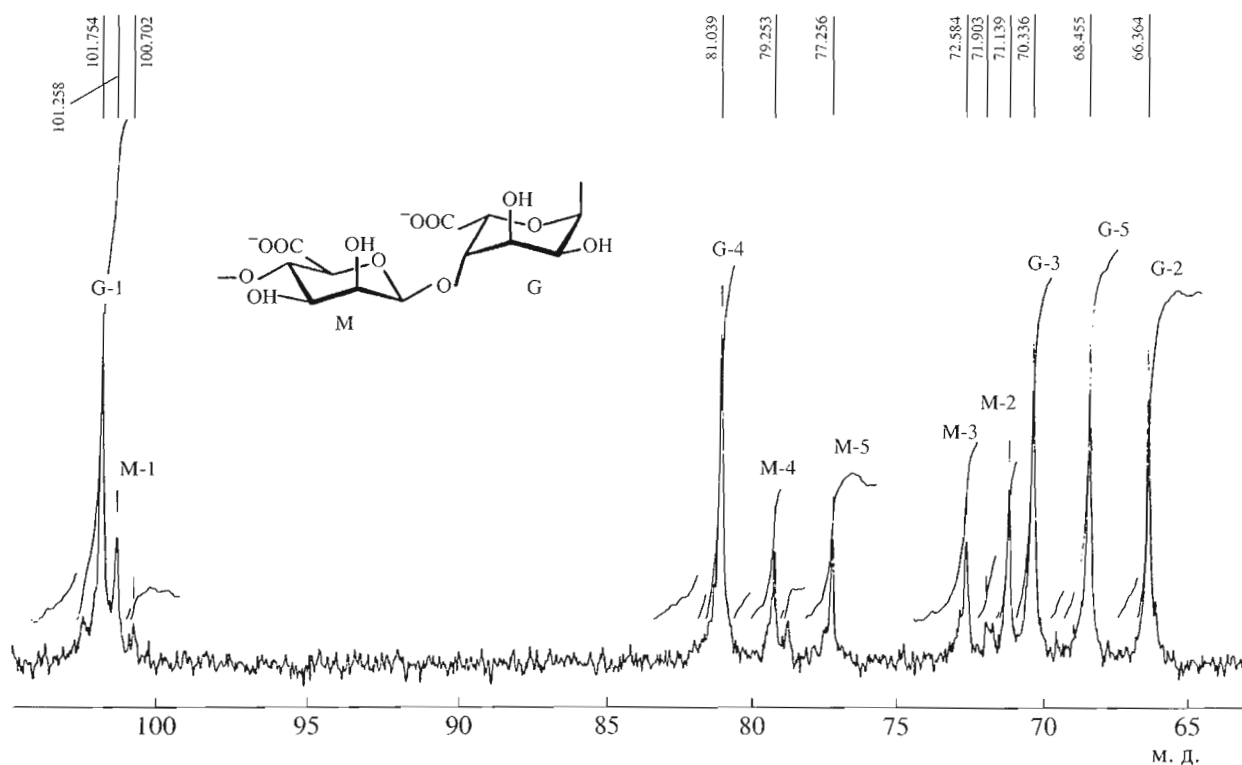


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР альгината натрия из *C. peregrina*. G-1–G-5, M-1–M-5 – обозначения атомов углерода остатков α -L-гулурановой и β -D-маннурановой кислот.

типичный для этого класса полисахаридов [26] (рис. 1), что позволило рассчитать соотношение мономеров в полимерной молекуле. Оказалось, что в альгинате из *C. peregrina* содержание остатков α -L-гулурановой кислоты (G) значительно преобладает над содержанием остатков β -D-маннурановой кислоты (M) (соотношение M/G = 0.48). Как известно, в альгинатах из большинства бурых водорослей, напротив, главным компонентом является маннурановая кислота [27].

Препаративная экстракция привела к получению в общей сложности восьми полисахаридных фракций (см. “Эксперимент. часть”). Состав нейтральных сахаров, полученных при гидролизе этих фракций, приведен в табл. 2. Основываясь на этих данных, для окончательной очистки ламинарана мы использовали фракцию 3, а для выделения фукоидана – фракцию 1. Обе эти фракции хроматографировали на колонке с DEAE-сефацелем, вымывая нейтральный ламинаран водой, а сульфатированный фукоидан – солевыми растворами возрастающей концентрации. В последнем случае были получены две фракции фукоидана, различающиеся степенью сульфатирования (табл. 2).

Очищенный ламинаран состоит практически только из глюкозы. Небольшое количество маннита, найденное в гидролизате (один остаток на

220 остатков глюкозы), очевидно, объясняется тем, что некоторая часть молекул полисахарида содержит остаток маннита на “восстанавливаемом” конце. Такой структурный элемент неоднократно обнаруживали в ламинаранах, выделенных из других видов бурых водорослей [28]. Оптическое вращение полисахарида и спектр ^{13}C -ЯМР (рис. 2) не оставляют сомнений в том, что главным структурным элементом полимерных молекул являются цепи из (1 \rightarrow 3)-связанных остатков β -D-глюкопиранозы (ср., например, [25]). Этот вывод был подтвержден результатами метилирования ламинарана. В продуктах метилирования, наряду с ожидаемой 2,4,6-три-O-метилглюкозой, было найдено некоторое количество 2,4-ди-O-метилглюкозы и соответствующее ей количество 2,3,4,6-тетра-O-метилглюкозы, что указывает на наличие разветвлений в положениях 6 (1 \rightarrow 3)-связанных цепей полисахарида (в среднем одно разветвление на каждые восемь моносахаридных остатков). Связи 1 \rightarrow 6 в линейных участках цепей обнаружены не были. Таким образом, ламинаран из *C. peregrina* аналогичен по своей структуре так называемым “растворимым” ламинаранам, содержащимся во многих видах ламинариевых водорослей [29].

Фукоиданы, выделенные из разных видов бурых водорослей, могут существенно различаться

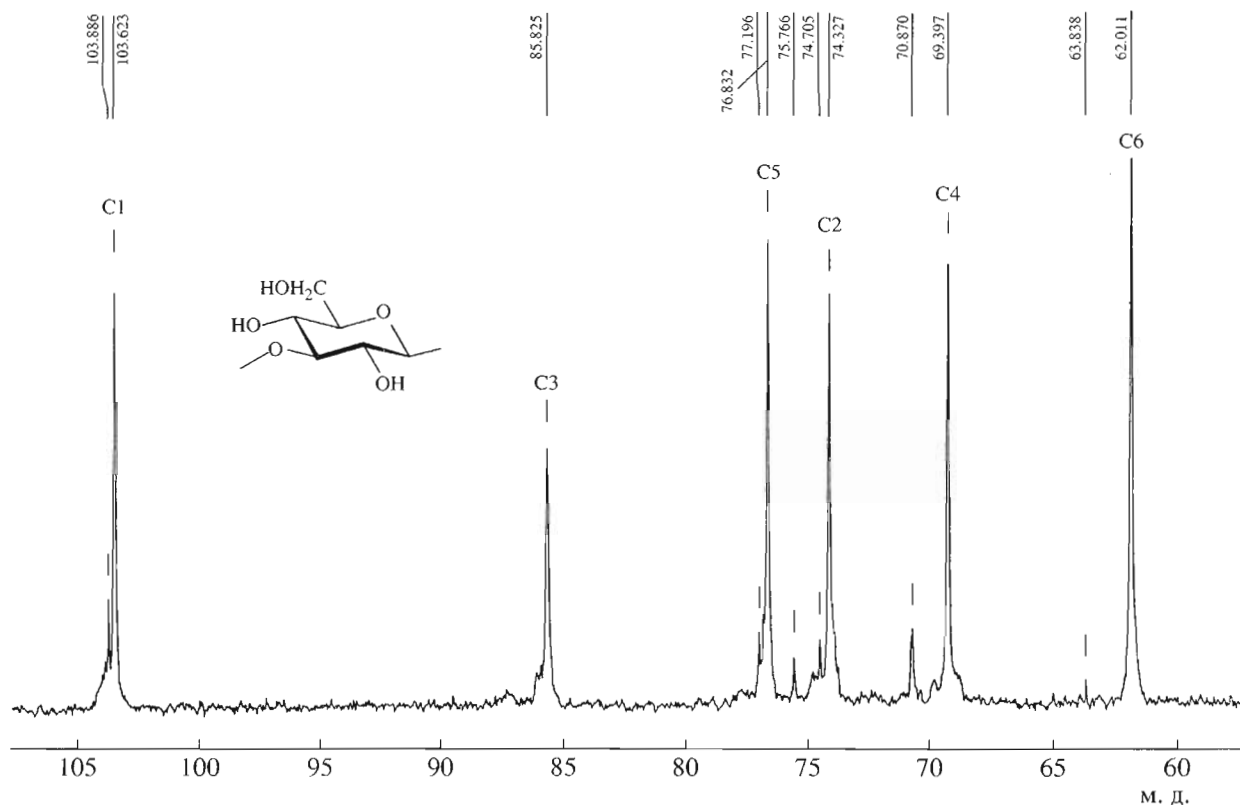


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР ламинарана из *C. peregrina*.

по составу и строению. Изредка они представляют собой простые фукансульфаты, но даже в этом случае установление их строения чрезвычайно затруднено отсутствием регулярности в построении молекул (см., например, [30, 31]). Обе фракции фукоидана, выделенные из *C. peregrina*, кроме фукозы и сульфата, содержали дополнительно другие нейтральные моносахариды, а также уруновые кислоты (табл. 2). Детальный структурный анализ таких сульфатированных гетерополисахаридов еще более сложен и должен быть предметом самостоятельного исследования.

Таким образом, по составу полярных веществ черноморская *C. peregrina* в целом подобна другим бурым водорослям, но имеет ряд особенностей, к которым можно отнести почти полное отсутствие свободных аминокислот, нетипичный мономерный состав альгината, сложный фукоидан. В то время как набор низкомолекулярных веществ, попадающих в бутанольный экстракт, определяется, по-видимому, главным образом экологическими факторами, сведения о полисахаридном составе (вместе с данными о стеринах и сложных липидах [22]) могут, вероятно, использоваться как хемотаксономическая характеристика вида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сбор *C. peregrina*. Водоросли собирали в районе Китен в южной части болгарского побережья Черного моря в мае 2000 г. Образец после определения, выполненного Ст. Димитровой-Конаклиевой, был помещен в гербарий факультета фармации Медицинского университета Софии.

Исследование *n*-бутанольного экстракта. Свежие водоросли (42 г в пересчете на сухой вес) последовательно экстрагировали метанолом (700 мл), смесью метанол-хлороформ, 1 : 1 (700 мл) и хлороформом (700 мл). Экстракты объединяли, прибавляли воду (300 мл), хлороформный слой отделяли и упаривали досуха, выход остатка 1.6 г. Водно-метанольный раствор экстрагировали *n*-бутанолом (2 × 300 мл), и бутанольный экстракт упаривали досуха, выход остатка 2.5 г. К 5 мг этого препарата, растворенным в 50 мкл абсолютного пиридина, прибавляли 75 мкл бис(триметилсилил)трифторацетамида. Смесь нагревали 30 мин при 80°C и анализировали методом ГЖХ-МС на приборе Hewlett-Packard 6890 + MS5973 с капиллярной колонкой HP-5 (23 м × 0.2 мм, пленка 0.5 мкм) в токе гелия (линейная скорость 31 см/с) при программировании температуры от 100 до 315°C со скоростью 5°/мин с последующим выдерживанием при 315°C в течение 10 мин. Для

ионизации использовали пучок электронов с энергией 70 эВ при температуре детектора 250°C. Идентификацию соединений проводили с помощью компьютерной библиотеки масс-спектров (NIST 98 MS Data Library) и прямым сравнением с заводскими образцами триметилсиллилпроизводных полиолов, моносахаридов и сахарозы.

Анализ углеводов. Аналитическое определение фукоидана и альгината в биомассе с помощью дифференциальной экстракции, обесцвечивания экстрактов и спектрофотометрического определения фукозы и урановых кислот проводили как описано в работе [24], после чего растворы полисахаридов лиофилизовали и получали аналитические препараты фукоидана (АПФ) и альгината (АПА).

Для анализа нейтральных моносахаридов методом ГЖХ навески сухой обезжиренной биомассы или полисахаридных фракций (5–20 мг) нагревали с 2 М CF_3COOH (1 мл, содержащий 0.9 мг мио-инозита в качестве внутреннего стандарта) при 100°C в течение 8 ч. Кислоту удаляли трехкратным упариванием гидролизатов с 10 мл этанола. Нейтральные моносахариды в гидролизатах переводили в ацетаты полиолов [32] восстановлением NaBH_4 с последующим ацетилированием смесью уксусного ангидрида с пиридином (1 : 1) или в ацетаты альдононитрилов [33] по реакции с гидроксиламином и уксусным ангидридом в пиридине. Полученные производные анализировали методом ГЖХ на хроматографе Hewlett-Packard 5890А, снабженном пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой HP Ultra-2 и интегратором HP 3393А. Температуру колонки программировали от 175 до 290°C со скоростью 10°/мин. Вещества идентифицировали сравнением с заводскими образцами по временам удерживания. Соотношение площадей пиков ацетата мио-инозита и исследуемых соединений использовали для количественных измерений.

Выделение полисахаридных фракций. Суспензию измельченной обезжиренной биомассы *S. peregrina* (13.8 г) в 2% водном растворе CaCl_2 (250 мл) перемешивали 6 ч при 75°C. Экстракт отделяли центрифугированием, а осадок еще раз обрабатывали в тех же условиях. К объединенному экстракту приливали 10% водный раствор цетавлона (бромиды цетилтриметиламмония), выпавший осадок отделяли, суспендировали в 20% этанольном растворе NaI (50 мл), перемешивали три дня, осадок отделяли, еще дважды обрабатывали этанольным NaI в тех же условиях, после чего промывали этанолом, растворяли в воде, диализовали и лиофилизовали, получали фракцию фукоидана в виде Na-соли (**фракция 1**), выход 0.1 г. Маточный раствор после отделения цетавлоновых солей диализовали, выпавший при этом осадок отделяли, промывали этанолом, ацетоном и

высушивали в вакууме, получали **фракцию 2**, выход 0.27 г. Водный раствор после отделения фракции 2 концентрировали в вакууме до объема 20 мл, приливали этанол до объема 200 мл, выпавший осадок высушивали, как указано выше, получали фракцию ламинарана (**фракция 3**), выход 0.33 г.

Остаток биомассы после экстракции раствором CaCl_2 заливали 0.1 М HCl (250 мл), перемешивали 6 ч при комнатной температуре, суспензию центрифугировали, и осадок еще три раза обрабатывали тем же раствором при 20, 50 и 70°C. Кислые экстракты объединяли, концентрировали в вакууме до объема 75 мл и нейтрализовали, прибавляя небольшими порциями твердый NaOH . Выпавший осадок отделяли и высушивали сменной растворителей, получали сильно окрашенную **фракцию 4**, выход 0.44 г. Маточный раствор после отделения этой фракции диализовали и лиофилизовали, получали **фракцию 5**, выход 0.24 г.

К остатку биомассы после обработки кислотой приливали 3% водный раствор Na_2CO_3 (250 мл). Суспензию перемешивали 6 ч при 50°C, интенсивно окрашенный экстракт отделяли центрифугированием, а остаток обрабатывали еще два раза в тех же условиях. К объединенным экстрактам приливали при перемешивании 1.8 мл брома, в результате чего в течение нескольких минут темнотный цвет раствора изменился на светло-желтый. Смесью оставляли на ночь, прибавляли около 25 мл конц. HCl до отчетливой кислой реакции, выпавший бесцветный осадок альгиновой кислоты отделяли центрифугированием, дважды промывали водой, затем растворяли в воде, осторожно прибавляя небольшими порциями твердый NaOH до слабощелочной реакции, диализовали и лиофилизовали, получали альгинат Na (**фракция 6**), выход 2.5 г, $[\alpha]_D^{20} -108.3^\circ$ (с 0.3; вода). Кислый маточный раствор диализовали, концентрировали и лиофилизовали, получали **фракцию 7**, выход 0.89 г.

Остаток водоросли многократно промывали водой и сушили сменной растворителей, получали **фракцию 8**, выход 8.6 г.

Хроматографическая очистка ламинарана и фукоидана. Фракцию 3 суспендировали в 10 мл воды, перемешивали несколько часов при 70°C, нерастворившийся материал отделяли центрифугированием, а раствор наносили на колонку 17 × 1.5 см с DEAE-сефацелом (Cl^-), которую промывали водой до исчезновения в элюате положительной реакции на углеводы с фенолом и конц. H_2SO_4 [34]. Водный элюат диализовали, концентрировали и лиофилизовали, получали очищенный ламинаран, выход 0.15 г, $[\alpha]_D^{20} +5.9^\circ$ (с 1.0; вода).

На ту же колонку наносили водный раствор фракции 1. В водном элюате углеводы отсутствовали. Далее колонку промывали 0.5, 1.0, 1.5 и 2.0 М

растворами NaCl, два первых солевых элюата, содержащие углеводный материал, диализовали и лиофилизировали, получали две фракции очищенного фукоидана, Φ -0.5, $[\alpha]_D^{20}$ -36.0° (с 0.5; вода), и Φ -1.0, $[\alpha]_D^{20}$ -86.0° (с 0.5; вода), с выходом соответственно 20 и 40 мг. Состав очищенных полисахаридов см. в табл. 2.

Метилирование ламинарана. К раствору 18 мг ламинарана в 5 мл воды прибавляли 20 мг NaBH_4 , оставляли на ночь, затем подкисляли уксусной кислотой, диализовали и лиофилизировали. Полученное вещество растворяли в 2 мл DMSO и метилировали действием метилиодида и NaOH по методу Чиукану и Керека [35]. Реакционную смесь разбавляли водой и хлороформом, диализовали, хлороформный раствор упаривали, остаток хроматографировали на колонке с сефадексом LH-20 при промывании смесью хлороформ-метанол, 1 : 1. Фракцию, выходящую вслед за свободным объемом колонки, упаривали, остаток гидролизировали, и гидролизат переводили в ацетаты полиолов как описано выше для анализа нейтральных сахаров. Полученные вещества идентифицировали ГЖХ-МС. В смеси обнаружены ацетаты 2,3,4,6-тетра-*O*-метил-, 2,4,6-три-*O*-метил- и 2,4-ди-*O*-метилсорбита в соотношении 1 : 6 : 1.

Спектроскопия ЯМР. Спектры ^{13}C -ЯМР ламинарана и альгината регистрировали на приборе Bruker AM-300 для 3% растворов полисахаридов в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 60°C с метанолом (δ_{C} 50.15 м. д.) в качестве внутреннего стандарта.

Прочие методы анализа. Содержание сульфата в полисахаридах определяли турбидиметрически [36] после гидролиза в 2 М трифторуксусной кислоте (100°C , 8 ч). Содержание уоновых кислот определяли спектрофотометрически по реакции с 3,5-диметилфенолом и конц. H_2SO_4 [37] и калибровочному графику для заведомого альгината натрия (BDH, Англия). Для спектрофотометрических измерений использовали Ultrospec 4050 (ЛКВ Biochrom, Англия), оптическую активность измеряли на автоматическом поляриметре ПУ-5 (Россия).

Авторы выражают благодарность Национальному научному фонду Болгарии (проект X-1101) и Министерству промышленности, науки и технологий РФ (грант № 02-4205) за частичную финансовую поддержку этой работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vandermeulen H., DeWreede R.E. // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1986. V. 99. P. 31–47.
2. Kogame K., Yamagishi Y. // Phycologia. 1997. V. 36. P. 337–344.
3. Yamagishi Y., Kogame K. // Bot. Mar. 1998. V. 41. P. 217–222.
4. Oates B.R. // Mar. Biol. (Berlin). 1985. V. 89. P. 109–119.
5. Oates B.R. // Bot. Mar. 1988. V. 31. P. 57–63.
6. Matta J.L., Chapman D.J. // Mar. Biol. (Berlin). 1991. V. 108. P. 303–313.
7. Matta J.L., Chapman D.J. // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1995. V. 189. P. 13–27.
8. Vandermeulen H. // J. Phycol. 1986. V. 22. P. 138–144.
9. Tan I.H., Druehl L.D. // Hydrobiologia. 1993. V. 260/261. P. 699–704.
10. Kogame K., Horiguchi T., Masuda M. // Phycologia. 1999. V. 38. P. 496–502.
11. Zavodnik N. // Proc. Int. Seaweed Symp. 1981. V. 10. P. 543–548.
12. Shaikh W., Shameel M., Ahmad V.U., Usmanghani K. // Bot. Mar. 1991. V. 34. P. 77–79.
13. Kaniyas G.D., Scaltsa H., Tsitsa E., Loukis A., Bitis J. // Fresenius' J. Anal. Chem. 1992. V. 344. P. 334–339.
14. Heiba H.I., Al-Easa H.S., Rizk A.-F.M. // Plant Foods Hum. Nutr. 1997. V. 51. P. 27–34.
15. Green D., Kashman Y., Miroz A. // J. Nat. Prod. 1993. V. 56. P. 1201.
16. Jin H.-J., Kim J.-H., Sohn C.H., DeWreede R.E., Choi T.-J., Towers G.H.N., Hudson J.B., Hong Y.-K. // J. Appl. Phycol. 1997. V. 9. P. 383–388.
17. Hudson J.B., Kim J.H., Lee M.K., DeWreede R.E., Hong Y.K. // J. Appl. Phycol. 1998. V. 10. P. 427–434.
18. Parekh R.G., Mehta B.R., Dave M.J., Garg S.K. // Salt Res. Ind. 1982. V. 18. P. 10–11.
19. Fujikawa T., Nakashima K. // Nihon Nogei Kagaku Kaishi. 1975. V. 49. P. 455–461 (in Japanese). C.A. 1976. V. 84. P. 28042.
20. Mori H., Sasaki S.F., Nisizawa K. // Bull. Jap. Soc. Phycol. 1977. V. 25 (Suppl.). P. 169–187.
21. Hussein M.M. // Phytochemistry. 1975. V. 14. P. 1866–1868.
22. Stefanov K., Bankova V., Dimitrova-Konaklieva St., Aldinova R., Dimitrov K., Popov S. // Bot. Mar. 1996. V. 39. P. 475–478.
23. Botanical Monographs/V. 17. The Biology of Seaweeds // Eds Lobban C.S., Wynne M.J. Berkeley, Calif.: University of California Press, 1981. 786 pp.
24. Усов А.И., Смирнова Г.П., Клочкова Н.Г. // Биоорган. химия. 2001. Т. 27. С. 450–454.
25. Усов А.И., Смирнова Г.П., Билан М.И., Шауков А.С. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 437–445.
26. Grasdalen H., Larsen B., Smidsrod O. // Carbohydr. Res. 1981. V. 89. P. 179–191.
27. Haug A., Larsen B., Smidsrod O. // Carbohydr. Res. 1974. V. 32. P. 217–225.
28. Усов А.И., Чижов А.О. // Изв. АН. Сер. хим. 1993. № 10. С. 1660–1664.
29. Stone B.A., Clarke A.E. Chemistry and Biology of (1 \rightarrow 3)- β -Glucans. Victoria, Australia: La Trobe University Press, 1992. P. 277–278.
30. Chizhov A.O., Dell A., Morris H.R., Haslam S.M., McDowell R.A., Shashkov A.S., Nifant'ev N.E., Khatuntseva E.A., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 1999. V. 320. P. 108–119.

31. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 719–730.
32. Слонекер Дж. Методы исследования углеводов. Пер. с англ. под ред. А.Я.Хорлина. М.: Мир, 1975. С. 22–25.
33. Morrison I.M. // J. Chromatogr. 1975. V. 108. P. 361–364.
34. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.
35. Ciucanu I., Kerek F. // Carbohydr. Res. 1984. V. 131. P. 209–217.
36. Dodgson K.S., Price R.G. // Biochem. J. 1962. V. 84. P. 106–110.
37. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Mar. 1995. V. 38. P. 43–51.

Polar Constituents of Brown Seaweed *Colpomenia peregrina* (Sauv.) Hamel from the Black Sea

A. I. Usov*# G. P. Smirnova*, Z. Kamenarska**,
St. Dimitrova-Konaklieva***, K. L. Stefanov**, and S. S. Popov**

Phone: +7 (095) 137-6791; fax: +7 (095) 135-5328; e-mail: usov@ioc.ac.ru

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

**Institute of Organic Chemistry with Center of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences,
Sofia 1113, Bulgaria

***Department of Pharmacy, Medical University,
Sofia 1000, Bulgaria

GC-MS of trimethylsilyl derivatives of the compounds present in the butanolic extract of biomass of brown seaweed *Colpomenia peregrina* from the Black Sea aided in identification of 24 components, including aliphatic hydroxy and keto and aromatic acids, glycerol, mannitol, floridoside, and monosaccharides. The polysaccharide composition of the biomass was also studied, with high sodium alginate and laminaran contents and a comparatively low level of fucoidan being revealed. The polysaccharides were isolated from the biomass by fractional extraction and purified by precipitation or ion exchange chromatography. The structures of alginic acid and laminaran were deduced from ^{13}C NMR spectra and confirmed, in the case of laminaran, by methylation analysis. The sodium alginate was shown to contain more guluronic (G) than mannuronic acid (M) residues, the M/G ratio being 0.48. Laminaran was demonstrated to be a β -glucan with 1 \rightarrow 3 linkages in its backbone and 1 \rightarrow 6 linkages in its branching points, which is characteristic of brown algae. Fucoidan turned out to be a complex heteropolysaccharide containing, in addition to fucose and sulfate, other neutral monosaccharides and uronic acids. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: algae, *Colpomenia peregrina*, fucoidan, laminaran, Phaeophyta, polar compounds, polysaccharides, sodium alginate