



УДК 547.458.5

СОЛЬВОЛИТИЧЕСКОЕ ДЕСУЛЬФАТИРОВАНИЕ
ДЕКСТРАНСУЛЬФАТА

Усов А. И., Адамянц К. С.

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

Исследовано влияние катиона и природы растворителя на процесс сольволитического десульфатирования декстрансульфата. Показано, что наилучшие результаты, т. е. удаление большинства сульфатных групп в сочетании с высоким выходом и минимальным изменением полимера за счет побочных реакций, дает нагревание триоктиламмонийной соли декстрансульфата в диоксане.

Проблема удаления сульфатных групп из сульфатированных полисахаридов в условиях, минимально влияющих на их молекулярный вес и структуру, является основной при исследовании этих полимеров классическими методами химии углеводов — метилированием и периодатным окислением.

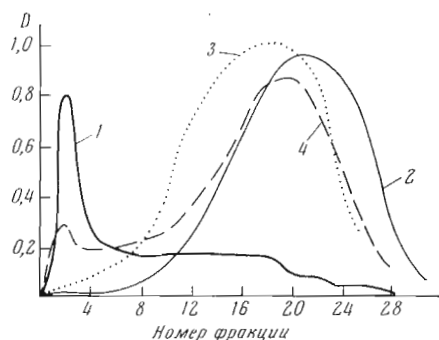
Недавно нами был предложен сольволитический метод удаления остатков серной кислоты из производных моносахаридов и сульфатированного полисахарида красной водоросли *Laingia pacifica* Yamada [1—3]. Исследования показали, что метод сольволитического десульфатирования обладает рядом преимуществ по сравнению с общепринятым в настоящее время методом — кислотным метанолизом [4].

Данная статья посвящена более широкому изучению этой реакции на примере декстрансульфата (I) с использованием различных солей этого полисахарида и разнообразных органических растворителей. Доступность полисахарида (I) делала его удобным для исследования, а высокое содержание сульфата (48% SO_4) позволяло оценить пригодность сольволитического метода десульфатирования в одном из наиболее трудных случаев.

Кислотный метанолиз декстрансульфата. Влияние добавок диоксана и диметилсульфоксида. При изучении десульфатирования Na-соли декстрансульфата в обычных условиях кислотного метанолиза [4] было найдено, что для полного удаления сульфатных групп из полисахарида необходимы четыре последовательные обработки 0,2 М HCl в абс. метаноле при 20° (табл. 1). При этом параллельно с отщеплением сульфата происходит заметная деструкция углеводных цепей полимера, что хорошо иллюстрируется сравнением кривых гель-фильтрации на биогеле А-0,5 м исходного полисахарида и продукта метанолиза (см. рисунок). Весьма неожиданным оказалось изменение моносахаридного состава полимера: кроме глюкозы, которая является единственным моносахаридом в гидролизате исходного декстрансульфата, при гидролизе продуктов его десуль-

фатирования были обнаружены манноза и ксилоза. Идентификация этих моносахаридов проведена методами БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов. Последний метод позволил провести примерную оценку их количественного содержания. Механизм образования этих сахаров в условиях кислотного метанолиза неясен, однако очевидно, что существование этой нежелательной побочной реакции, сопровождающей десульфатирование, необходимо учитывать при подборе условий этого процесса. Поэтому мы в опытах по десульфатированию декстрансульфата вместе с содержанием сульфата и гель-фильтрацией определяли и моносахаридной состав образующихся веществ.

Из предыдущих работ по сольволитическому десульфатированию сульфатов стероидных спиртов следует, что метанол в этой реакции относится



Выходные кривые гель-фильтрации некоторых десульфатированных препаратов декстрансульфата в сравнении с исходной кривой Na-соли на биогеле А-0,5 м: 1 — исходный (Ia); 2 — опыт 1; 3 — опыт 12; 4 — опыт 21

к числу малоэффективных десульфатирующих растворителей; значительно большей активностью обладают эфир, тетрагидрофуран, диоксан [5,6]. Нами в опытах по десульфатированию сульфатов углеводов наилучшие результаты были получены с диоксаном и диметилсульфоксидом (ДМСО) [1—3]. Поэтому интересно было исследовать, какое влияние на процесс десульфатирования декстрансульфата в условиях кислотного метанолиза окажет частичная замена метанола диоксаном или ДМСО. Результаты серии экспериментов приведены в табл. 1.

Как видно из этих данных, во всех без исключения случаях замена части метанола другим растворителем вызывает замедление процесса десульфатирования. Лишь в опытах 3, 6, 7 удалось добиться значительного снижения содержания сульфата и получить продукт реакции с удовлетворительным выходом. По данным гель-фильтрации, деструкция полимера во всех этих опытах происходит примерно в одинаковой степени. В гидролизатах всех десульфатированных образцов, кроме главного компонента — глюкозы, были найдены небольшие количества ксилозы и в отдельных случаях следы маннозы. Таким образом, добавление диоксана или ДМСО при кислотном метанолизе не активизирует, вопреки ожиданиям, реакцию десульфатирования декстрансульфата; возможно, это объясняется нерастворимостью исходного полисахарида в примененных смесях растворителей.

Десульфатирование декстрансульфата в ДМСО при нагревании. Влияние природы катиона. Ранее [3] было установлено, что десульфатирование полисахарида из *Laingia pacifica* при нагревании его раствора в ДМСО существенно зависит от природы катиона. Для изучения аналогичного способа десульфатирования декстрансульфата мы выбрали натриевую, дитилтриметиламмонийную (цетавлоновую), аммонийную и пиридиниевую соли, поскольку первые две формы обычно получают в процессе выделения сульфатированных полисахаридов, а две вторые должны быть наиболее активны в реакции сольволитического десульфатирования (ср. [7, 8]). Результаты нагревания этих солей в ДМСО обычно с добавкой небольшого количества пиридина для уменьшения деструкции полимера [3] приведены в табл. 2.

Как и ожидалось, наилучшие результаты (т. е. значительное снижение содержания сульфата в сочетании с удовлетворительным выходом вещества, опыт 15) были получены при обработке пиридиниевой соли (I); несколько ниже выход десульфатированного полисахарида при ис-

Таблица 1

Десульфатирование декстрансульфата в присутствии 0,2 М НСl
4 обработки по 8 ч при 20°

Номер эксперимента	Растворитель	% SO ₄ после 4 обработок		Выход, % *	Номер эксперимента	Растворитель	% SO ₄ после 4 обработок		Выход, % *
		% SO ₄ после 4 обработок	Выход, % *				% SO ₄ после 4 обработок	Выход, % *	
1	Метанол	0,62	7,4	6	6	Метанол — ДМСО (4 : 1)	7,08	32,4	
2	Метанол — диоксан (4 : 1)	25	32,6		7	Метанол — ДМСО (1 : 1)	8,4	31,3	
3	Метанол — диоксан (1 : 1)	9,45	28		8	Метанол — ДМСО (1 : 4)	18,7	24,3	
4	Метанол — диоксан (1 : 4)	29	33		9	Метанол — ДМСО (2 : 48)	30	23,3	
5	Метанол — диоксан (2 : 48)	39	42						

* В этой серии и во всех последующих экспериментах выход частично десульфатированных препаратов (I) определен в процентах к теоретическому при данной степени десульфатирования (с учетом убыли сульфата).

Таблица 2

Десульфатирование различных солей декстрансульфата при нагревании в ДМСО (100°, 10—15 ч)

Номер эксперимента	Соль (I)	Растворитель	% SO ₄ исходный	Добавки	Выход, %	% SO ₄ конечный
10	Na(Ia)	ДМСО	48	—	29,5	11
11	Na(Ia)	ДМСО + 2% пиридина	48	—	76	24
12	Na(Ia)	То же	48	Py · HCl	60,3	11
13	Na(Ia)	»	48	NH ₄ Cl	54	11,8
14	Na(Ia)	»	48	(C ₂ H ₅) ₃ N · HCl	25	13
15	Py(Iv)	»	40	—	50	9,6 *
16	NH ₄ (Ib)	»	49	—	31,6	9,75
17	Цетавлоновая (Iж)	»	20,6	—	73,5	21
18	То же	»	20,6	NH ₄ Cl	43,5	19,3

* После перевода в Na-соль.

пользовании аммонийной соли (I) (опыт 16). В отличие от полисахарида из *Laingia pacifica*, натриевая соль (I) также десульфатируется при нагревании в ДМСО (опыт 10), но выход продукта при этом еще ниже, а степень деструкции больше, чем в других случаях. Цетавлоновая соль (I) не вступает в реакцию десульфатирования (опыт 17), возможно, из-за нерастворимости в ДМСО даже при нагревании.

Из опытов 12—14 следует, что для повышения эффективности десульфатирования не обязательно переводить Na-соль (I) в другую катионную форму; достаточно добавить в реакционную смесь хлоридат пиридиния, триэтиламмония или хлористый аммоний в количествах, сравнимых по весу с количеством полисахарида. Все три соли вызывают примерно одинаковое снижение содержания сульфата, но при добавлении хлористого триэтиламмония выход дисульфатированного полисахарида значительно ниже (опыт 14). К сожалению, цетавлоновая соль (I) инертна и к нагреванию в ДМСО с добавкой хлористого аммония (опыт 18) *.

Анализ моносахаридного состава ряда образцов, полученных при нагревании солей декстрансульфата в ДМСО, показал, что и в этом случае

* Можно предположить, что десульфатирование Na-соли в отсутствие добавок катализируется кислой формой сульфата или сульфатом пиридиния (если к ДМСО прибавлен пиридин), возникающими при термической деструкции исходного полимера.

Моносахаридный состав десульфатированных препаратов декстрансульфата, %

Номер эксперимента	Глюкоза	Ксилоза	Манноза	Номер эксперимента	Глюкоза	Ксилоза	Манноза
1	64	0,5	0,25	12	52,2	2	Нет
10	62	Есть	Нет	21	80,8	2	Нет
15	65	3,5	Есть	Исходная Na-соль	40,2	Нет	Нет

Таблица 4

Десульфатирование триалкиламмонийных солей декстрансульфата нагреванием в диоксане (90°, 15 ч)

Номер эксперимента	Соль (I)	% SO ₄ исходный	% SO ₄ конечный	Выход, %
19	Триэтиламмонийная (Iг)	35,2	25,2	44,5
20	Трибутиламмонийная (Iд)	25,7	20	34
21	Триоктиламмонийная (Iе)	8,3	4,7*	90

* После перевода в Na-соль.

продукты десульфатирования наряду с главным компонентом — глюкозой — содержат небольшие количества ксилозы и в ряде случаев — следы маннозы (табл. 3).

Десульфатирование триалкиламмонийных солей декстрансульфата в диоксане. Имеющиеся данные по сольволитическому десульфатированию сульфатов полисахаридов свидетельствуют, что успешное проведение этой реакции зависит от природы катиона и растворимости исходного полимера в десульфатирующем растворителе. Учитывая, что соли аминов достаточно активны в этой реакции, мы попытались подобрать такой третичный амин, который бы обеспечивал растворимость (или по крайней мере набухание) соответствующей соли (I) в диоксане. Было установлено, что триэтил- и трибутиламмонийные соли (Iг) и (Iе) не растворяются в диоксане и практически не десульфатируются в выбранных условиях (табл. 4, опыты 19 и 20). Напротив, триоктиламмонийная соль (Iе) сильно набухает в диоксане и при нагревании десульфатируется, давая полисахарид с небольшим содержанием сульфата и весьма высоким выходом (опыт 21). Гель-фильтрация этого полисахарида указывает на меньшую, чем в других случаях, деструкцию (имеется фракция, совпадающая с пиком исходного декстрансульфата, см. рисунок). Моносахаридный состав десульфатированного полисахарида также свидетельствует о гладком протекании процесса (вещество содержит 80% глюкозы, ср. с другими образцами, табл. 3).

Таким образом, можно сделать вывод, что из изученных вариантов десульфатирования наиболее мягким является нагревание триалкиламмонийной соли полисахарида в диоксане при условии, что выбранный катион обеспечивает растворимость или набухание исходной соли в этом растворителе. Аналогичный подход (подбор катиона и обработку в диоксане) можно рекомендовать для удаления сульфата из природных сульфатированных полисахаридов.

Экспериментальная часть

БХ выполняли нисходящим способом на бумаге FN 11 («Filtrak», ГДР) в системах растворителей бутанол-1 — пиридин — вода (6 : 4 : 3) и метилэтилкетон — насыщ. H₃BO₃ — AcOH (9 : 1 : 1). Зоны обнаруживали кислым фталатом анилина. ГЯХ проводили на хроматографе

«Руче» 104 (пламенно-ионизационный детектор, колонки $150 \times 0,6$ см с 3% полинеопентилгликольдиацината на диатомите С, 200 или 210°, N_2 60 мл/мин) с интегратором «Kent Chromalog 2» (Англия). Для анализа моносахаридного состава 5—10 мг полисахарида нагревали с 1 мл 2 н. H_2SO_4 7—8 ч при 100°, нейтрализовали амберлитом IRA — 400 (HCO_3^-), раствор концентрировали и исследовали БХ, после чего обрабатывали $NaBH_4$, ацетилювали и исследовали ацетаты полиолов ГЖХ по методу, описанному в работе [9]. Содержание D-глюкозы в гидролизатах определяли с глюкозооксидазным реагентом «Fermognost» фирмы «VEB Arzneimittelwerk» (ГДР). Количество сульфата определяли по методу Доджсона [10], а в присутствии цетавлона — по модифицированному методу Доджсона [11].

Для гель-фильтрации раствор 2—3 мг полисахарида в 0,5 мл 1 н. Na_2SO_4 наносили на колонку $35 \times 1,5$ см с биогелем А-0,5 m (фирмы «BioRad Labs», США), уравновешенную с 1 н. Na_2SO_4 , и промывали этим раствором, собирая фракции по 1 мл. Содержание углеводов во фракциях определяли по реакции с фенолом и конц. H_2SO_4 [12].

Абсолютные метанол, диоксан, пиридин и ДМСО приготавливали по обычным методикам.

Получение различных солей декстрансульфата (Ia) — (Ie): водный раствор декстрансульфата пропускали через колонку с катионитом КУ-2 (H^+), элюат нейтрализовали соответствующим основанием, диализовали и лиофилизовали. Содержание сульфата в солях (Ia) — (Ie) приведено в табл. 2 и 3. Кривые гель-фильтрации (Iб) — (Iд) практически совпадают с кривой, полученной для (Iа) (см. рисунок).

К 1%-ному водному раствору декстрансульфата при перемешивании прибавляли по каплям 5%-ный водный раствор бромистого цетилтриметиламмония до полноты осаждения. Осадок отделяли центрифугированием, промывали водой и сушили в вакууме над P_2O_5 , получили цетавлоновую соль (Iж).

Десульфатирование декстрансульфата раствором HCl в метаноле и в смеси метанол — диоксан и метанол — ДМСО. Суспензию 0,5 г (Iа) в 50 мл 0,2 М раствора HCl в абс. MeOH перемешивали 8 ч при 20°, разбавляли водой, быстро нейтрализовали $NaHCO_3$, диализовали и лиофилизовали. 10—20 мг полученного вещества использовали для анализов, а главную часть еще трижды обрабатывали, как описано выше. Таким же образом проводили обработку (Iа) 0,2 М раствором HCl в смесях абс. MeOH с диоксаном или ДМСО. Состав смесей и характеристика десульфатированных полисахаридов приведены в табл. 1, кривые гель-фильтрации — на рисунке.

Десульфатирование солей (Iа) и (Iж) в ДМСО. Суспензию 1 г (Iа) — (Iж) в 100 мл ДМСО (в ряде случаев с добавлением 2 мл пиридина или 0,5 г хлоргидратов пиридина, триэтиламина или NH_4Cl , см. табл. 2) перемешивали 10 ч при 100°, после чего диализовали против воды. В случае (Iж) образовавшийся осадок цетавлоновой соли отделяли, промывали и сушили; маточный раствор практически не содержал полисахарида. В остальных случаях растворы после диализа пропускали через колонку с катионитом КУ-2 (H^+), колонку промывали водой, элюат нейтрализовали $NaHCO_3$, снова диализовали и лиофилизовали. Результаты анализа полисахаридов приведены в табл. 2.

Десульфатирование триалкиламмонийных солей декстрансульфата в диоксане. 0,5 г (Iг) — (Iе) суспендировали в 20 мл диоксана с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-1 (облучение с частотой 22 кГц в течение 2 мин), приливали еще 80 мл диоксана и перемешивали 15 ч при 90°. Часть диоксана упаривали в вакууме, остаток разбавляли водой, диализовали и лиофилизовали; в случае (Iе) полисахарид переводили в Na-соль с помощью КУ-2 (H^+), как описано выше. Результаты анализа полисахаридов приведены в табл. 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Usov A. I., Adamyants K. S., Miroshnikova L. I., Shaposhnikova A. A., Kochetkov N. K. (1971) *18*, 336—338.
2. Кочетков Н. К., Усов А. И., Адамянц К. С. (1972) *Ж. общ. химии*, **42**, 1617—1622.
3. Усов А. И., Мирошникова Л. И., Кочетков Н. К. (1972) *Ж. общ. химии*, **42**, 945—949.
4. Kantor T. G., Schubert M. (1957) *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 152—153.
5. McKenna J., Norymberski J. K. (1957) *J. Chem. Soc.*, 3889—3893.
6. Burstein S., Lieberman S. (1958) *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 5235—5239.
7. Goren M. B. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **210**, 116—126.
8. Goren M. B. (1971) *Lipids*, **6**, 40—46.
9. Sloneker J. H. (1972) *Methods in Carbohydrate Chem.*, **6**, 20—24.
10. Dodgson K. S. (1961) *Biochem. J.*, **78**, 312—319; Dodgson K. S., Price R. G. (1962) *Biochem. J.*, **84**, 106—110.
11. Kawai Y., Seno N., Anno K. (1969) *Anal. Biochem.*, **32**, 314—321.
12. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956) *Anal. Chem.*, **28**, 350—356.

Поступила в редакцию*
19.XI.1974 г.

SOLVOLYTIC DESULFATION OF DEXTRAN SULFATE

USOV A. I., ADAMYANTS K. S.

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

The cation and solvent effects on the solvolytic desulfation of dextran sulfate were examined. The best results (i. e., the removal of the most of sulfate groups with high yield and minimum change of the polymer as a result of the side reactions) were achieved upon heating dextran sulfate trioktylammonium salt in dioxan.

* Статья из портфеля редакции «Журнал общей химии», дата поступления — 14.VII.1974 г.