

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ ПРИРОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Генералов Евгений Александрович

аспирант, лаборатория пролиферации клеток

e-mail: generals1179@gmail.com

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

В обзоре обсуждаются физико-химические свойства природных полисахаридов и методы их изучения, разработанные за последнее время: различные виды хроматографии – гелепроникающая и высокоэффективная жидкостная, ЯМР- и ИК-спектроскопия, рентгеноструктурный анализ, а также ферментативный и кислотный гидролиз. Рассмотрены также некоторые биологические функции полисахаридов, такие как иммуномодуляция, радиопротекция, стимуляция роста растений, иммуноадаптивность. Обсуждаются явления кооперативности, возникающие при передаче сигналов с участием полисахаридов. Приводится полный набор данных о спектральных, структурных и физико-химических свойствах, присущих полисахаридам. Обсуждаются проблемы связи структуры и биологической активности природных углеводов на примере *Helianthus Tuberosus* L., *Rhodiola Rosea*, *Radix Astragali*.

Ключевые слова: углеводы, полисахариды, методы анализа, ЯМР, ФТИР, рентгеноструктурный анализ, гидролиз, хроматография.

Исследование природных полисахаридов представляет интерес прежде всего по причине их роли как регулятора молекулярных и клеточных процессов, интерпретация которых невозможна без знания их физико-химических характеристик и структурно-функциональных отношений. Полисахариды являются важнейшим классом биоорганических соединений как в фундаментальном, так и в практическом аспекте. В живой природе полисахариды выполняют разнообразные функции: структурную (хитин, целлюлоза), сигнальную и защитную (входят в состав рецепторов и клеточных оболочек: глюкоза, манноза и др.), а также участвуют в процессах трансформации энергии: ее производства и накопления.

Примером служит цикл трикарбоновых кислот: гидролиз глюкозы ведет к синтезу АТФ, то есть приводит к преобразованию свободной энергии в АТФ. Пример другой, менее распространенной функции полисахаридов – удержание воды в клетках растений в засушливые периоды.

Кроме того, природные полисахариды участвуют в образовании субклеточных структур, входят в состав некоторых рецепторов, а также выполняют сигнальные функции. Примером сигнальной функции являются инкрустирующие полисахариды и водорастворимые пектины – гетерополисахариды с 20–30-процентным содержанием уроновых кислот и полипептидной цепью. Комплексы такого типа могут служить остовом для клеток и тканей. К примеру, водорастворимый пектин связывает клеточные оболочки с гемицеллюлозой.

Экстрагированные и очищенные полисахариды растений оказывают ярко выраженное регенеративное, противовоспалительное, антиоксидантное, гепатопротекторное и противорадиационное воздействие, стимулируют процессы кроветворения, активируют функции иммунной системы при введении в организм как здоровых животных, так и животных с различными видами патологий. Применительно к растениям использование полисахаридов позволяет увеличить биомассу, энергию

прорастания и устойчивость к патогенам. С учетом их низкой аллергенности и мутагенности, а также побочных действий полисахариды являются весьма перспективным объектом исследований с практической – медицинской точки зрения [Adriana 2009: 1; Harkins 2014: 16; Smith 1985: 39].

Защитную функцию выполняют сильно заряженные полисахариды слизистых оболочек – камеди и слизи. Например, гиалуроновая кислота имеет высокую вязкость, и это обуславливает ее барьерную функцию, обеспечивающую непроницаемость соединительной ткани для патогенных микроорганизмов [Хелдт 2011: 79].

Некоторые полисахариды оказывают оптимизирующее действие на отдельные параметры обмена веществ организма. Образуя комплекс с белками и липопротеидами плазмы крови, полисахариды снижают уровень липемии и склерозирования сосудов. Например: каррагинан, ламинарид и сульфогалактозаны, выделенные из красных водорослей, проявляют гипохолестеринемический эффект, а сульфопроизводные крахмала, пектина и целлюлозы при введении крысам, больным липедемией, вызывают снижение уровня жиров и осветление крови [Афанасьев 1999: 54; Воротынская 1995: 57]. При введении крахмала усиливается превращение холестерина в желчные кислоты и их обмен, усиливается синтез рибофлавина кишечными бактериями [Мансимова 1998: 68].

Полисахариды, выделенные из растений, зачастую обладают иммуномодулирующими свойствами, стимулируют фагоцитоз, увеличивают количество иммуноглобулинов в крови и активируют гуморальный иммунитет. Так, например, полисахарид алоэ древовидного повышает регенеративные способности поджелудочной железы у животных, вызывает активацию гранулоцитов, макрофагов и лейкоцитов посредством повышенной выработки цитокинов, активный рост и увеличение числа соединительнотканых клеток и продуцируемых ими элементов соединительной ткани [Shepetkin 2006: 37; Маркизов 1994: 69]. Углевод из *Ganoderma lucidum* – β -глюкан стимулирует дифференцировку лейкозных моноцитов в дендритные клетки в ходе пролиферации за счет интерлейкина GM-CSF/IL-4 и линии клеток THP-1 [Chan 2008: 4]. На основе иммуномодулирующих свойств были обнаружены иммуноаdjувантные свойства $\beta(1\rightarrow4)$ глюкана «АДВА». Биологическая активность проверялась в опытах по синтезу антител к эритроцитам барана, полисахаридному антигену менингококка, белковому экзотоксину возбудителя столбняка и гемагглютиниnam вируса гриппа [Генералов 2013: 60].

Углеводы из *Asteraceae* и *Tiliacea* индуцируют появление гуморальных иммуностимулирующих веществ в надосадочной жидкости клеток тимуса и селезенки [Конопля 1998: 63]. Введение растительных гетерополисахаридов в организм крыс с иммерсионным охлаждением усиливает функции макрофагов и нейтрофилов. Полисахарид из *Matricaria chamomilla* L. действует на животных, подвергнутых охлаждению, схожим образом [Потиевский 1999: 73; Чекулаева 2002: 82]; он состоит из основной цепи $\alpha(1\rightarrow4)$ D-галактуроновой кислоты с добавлениями 10% арабинозы, 21% ксилозы, 15% галактозы, 7% глюкозы и 2% рамнозы [Janeske 1964: 18].

Гетерополисахарид из *Venusta Magnifica* стимулирует регенерацию и репарацию гепатоцитов экспериментальных животных при внутривенном и пероральном введении [Choi 2010: 6]. Было также обнаружено, что фукоиданы достаточно эффективны в борьбе с аспирином-индуцированными язвами [Raghavendran 2011: 31; Генералов 2013: 59], а полисахарид «Ульцэп» из картофеля – с язвенными заболеваниями. «Ульцэп» является активатором регенеративно-репаративных процессов в слизистой оболочке желудка. Введение приводит к полному восстановлению функциональных тканей, в том числе и железистых протоков [Генералов 2013: 59].

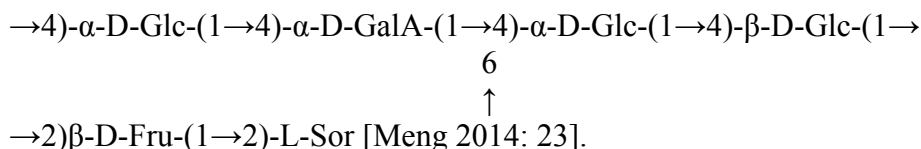
Введение растительных полисахаридов животным с асептическим воспалением и ожоговыми ранами стимулирует иммунитет путем активации макрофагов и нейтрофилов, фагоцитоза, а также синтеза медиаторов, активирующих Т- и В-лимфоциты, плазматические клетки селезенки, повышающих клеточность селезенки, тимуса, костного мозга и количество лимфатических фолликулов в структуре селезенки [Сычев 2004.: 77].

Попадая в различные ткани организма, полисахариды воздействуют на систему макрофагов и моноцитов, усиливая их иммунологические функции, ускоряя пролиферацию лимфоцитов в селезенке, тимусе и лимфоузлах. Следствием этого воздействия является: увеличение синтеза сигнальных молекул, активизирующих лимфоциты, лейкоциты и систему комплемента, стимуляция фагоцитоза, увеличение численности моноцитов и макрофагов [Ooi 2000: 27; Сычев 2006: 76; Чекановская 2001: 81]. В нескольких работах была показана цитотоксичность углеводов и активация апоптоза в трансформированных клетках [Dore 2013: 10; Senthilkumar 2013: 36]. Углевод ламинарид вызывает задержку роста саркомы-37 у крыс. Так же противораковая активность наблюдалась у полисахаридов золотарника, щавеля, клевера и молодых побегов бамбука [Коссиор 2000: 64]. Та же активность обнаружена у полисахаридов растений семейства Rosacea, состоящих в основном из 4,6-дисульфатированных 3-О-гликозилированных α -D-глюкопиранозильных и 2,4-дисульфатированных 3-О-гликозилированных α -L-фукопиранозильных остатков (в молекулярном соотношении 3:1) [Cui 2005: 7], и Asteracea – $\beta(2\rightarrow1)$ D-фруктофураноза с остатками глюкозы [Nergarda 2004: 26].

Вместе с тем полисахариды, воздействуя на стволовые клетки, стимулируют гемопоэз у здоровых, анемичных и облученных животных в костном мозге и в селезенке, стимулируя миелоидный, эритроидный и лимфоидный ростки кроветворения, что приводит к увеличению эритробластных островков в костном мозге и число эритроцитов в крови [Сычев 2000: 76; 2006: 77]. С этим, помимо прямого взаимодействия полимеров с продуктами ионизации, связывают радиопротекторные свойства карбогидратов [Kim 2008: 20; Shi 2006: 38; Генералов 2014: 58].

Известен полисахарид из *Helianthus Tuberosus*, обладающий радиопротекторными свойствами [Генералов 2014: 58]. Наряду с радиопротекторными свойствами полисахариды повышают устойчивость к интоксикации. Пектины различного происхождения связывают ионы Pb^{2+} , Hg^{2+} in vitro. Например, при введении пектинов морским свинкам резко увеличивается экскреция ионов металлов через кишечник и снижается интенсивность интоксикации. Полисахариды применялись для профилактики отравлений ртутью и свинцом. Пектин подсолнечника проявляет антидотные свойства при отравлениях кобальтом и стронцием [Максимова 2000: 67]. При внедрении полисахарида из *Spirulina Platensis* со структурой – $\alpha(1\rightarrow4)$ связанный глюкан с частыми боковыми $\alpha(1\rightarrow6)$ связанными глюкозилами [Madhavi-Sekharam 1989: 22] после облучения и химиотерапии подопытных мышей наблюдался рост числа клеток крови и костного мозга [Despande 1978: 9]. Механизм приводится ниже.

Полисахарид из *Dimocarpus longan* обладает иммуномодулирующими свойствами, обладает седативным эффектом, предотвращает развитие амнезии, снимает бессонницу и продлевает жизнь [Park 2010: 28; Yia 2012: 50; Zhang 2001: 52]. Спиртовые экстракты из *Dimocarpus longan* снижают уровень пролактина в сыворотке крови у самок крыс [Xu 2002: 47], а водные – проявляют эффективность при использовании против рака шейки матки в экспериментах с линией клеток JTC26 [Yang 2008: 49]. Было показано, что такой полисахарид обладает структурой:



Разнообразие биологических активностей ставит новые задачи: установление структуры и физико-химических свойств углеводов, разработка методов, дающих воспроизводимые и достоверные результаты по определению состава экстрактов из различных растений и их фракций, имеет целью определение активных центров полисахаридов. Данная обзорная статья позволяет ознакомиться с современными исследованиями в этой области.

Методы физико-химического анализа полисахаридов

1. Гидролиз

Метод гидролиза позволяет установить характер связи и структурные особенности полисахаридов. Гидролиз протекает в кислотной среде минеральных кислот или в присутствии ферментов. Установление моносахаридного состава возможно при полном гидролизе, в других случаях присутствуют остатки олигосахаридов. Для различных типов гликозидных связей существуют различные ферменты. Кислотный гидролиз будет рассмотрен отдельно.

1.1. Ферментативный гидролиз. Наиболее распространенный фермент – амилаза (гликозил-гидралаза) встречается трех типов – α , β , γ . Фермент α -амилаза (α -1,4-гликозидаза) расщепляет α -1,4-гликозидные связи в любом месте цепи углевода, для работы фермента необходимо только наличие трех и более остатков глюкозы в молекуле полисахарида. Для расщепления α -1,6-гликозидной связи требуется γ -амилаза, отщепляющая от невозстанавливающего конца остатки α -D-глюкозы, с образованием β -D-глюкозы. β -амилаза расщепляет вторую с конца α -1,4-гликозидную связь.

Лактаза (β -гликозидазный комплекс) расщепляет β -1,4-гликозидные связи между галактозой и глюкозой в лактозе.

Фермент мурамидаза (лизозим) относится к классу гидролаз, гидролизует β -1,4-гликозидные связи в пептидогликанах между остатками N-ацетилглюкозамина и N-ацетилглюкозаминовой кислоты. Гидролиз происходит за счет наличия гидрофобного кармана в эллипсоидной молекуле фермента, в которой субстрат удерживается за счет связывания последовательности цепи полисахарида NAM-NAG-NAM-NAG-NAM-NAG и гидролизуется. При встраивании полисахарида в щель за счет гидрофобных взаимодействий происходит его конформационное изменение с изгибом в районе 4 сахарного остатка. Взаимодействие остатков Asp-52 и Glu-35 с C-O связью 4-го сахара приводит к расщеплению последней за счет молекулы воды, что обуславливается связыванием донорного протона Glu-35 с C, что делает связь CO нестабильной. В то же время Asp-52 стабилизирует CO электростатически или путем ковалентного связывания углерода. Дальнейшая нуклеофильная атака на COO- приводит к высвобождению фрагментов полисахаридной цепи из молекулы фермента. При этом происходит конформационное превращение окисного кольца моносахаридов из конформации «кресло» в «ванну» [Jolles 1984: 19].

β -Глюкозидазы (β -D-глюкозидглюкогидролаза), другое название этих ферментов – целлобиазы, гидролизуют последнюю от нередуцирующего конца β -1,4-связь в β -D-глюкозидах, высвобождая β -D-глюкозу. β -Глюкозидаза проявляет широкую субстратную специфичность; некоторые ферменты этой группы гидролизуют также β -D-галактозиды, α -L-арабинозиды или β -D-ксилозиды [Наумов 2011: 71].

β -D-Глюканазы – группа ферментов, катализирующих расщепление β -глюканов с β -1,2-, β -1,3-, β -1,4- и β -1,6-связями. В эту группу входят шесть различных энзимов: 1,4-(1,3:1,4)- β -D-глюкан-4-глюканогидролаза гидролизует β -1,4-связи в целлюлозе и других β -глюканах с неспецифическим гидролизом связей неконцевых звеньев; 1,3-(1,3:1,4)- β -D-глюкан-3(4)-глюканогидролаза – фермент, катализирующий гидролиз внутренних β -1,3- или β -1,4-связей в β -глюканах, имеющих замещенный глюкозный остаток в положении C_3 ; 1,3- β -D-глюканглюканогидролаза гидролизует преимущественно 1,3- β -глюкозидные связи в 1,3- β -D-глюканах; 1,3-1,4- β -D-глюкан-4-глюканогидролаза гидролизует 1,4- β -глюкозидные связи в β -D-глюканах с 1,3- и 1,4-связи; 1,6- β -D-глюканглюканогидролаза гидролизует β -1,6-связи в случайном порядке внутри молекулы субстрата; 1,2- β -D-глюканглюканогидролаза расщепляет внутримолекулярные β -1,2-связи в 1,2- β -D-глюканах [Zhong 2010: 53].

β -Ксиланазы – ферменты, катализирующие расщепление β -гликозидных связей в β -ксиланах, к ним относятся: 1,4- β -D-ксиланксилогидролаза (катализирует гидролитическое расщепление 1,4- β -ксилозидных связей в ксиланах); 1,3- β -D-ксиланксилогидролаза (может рандомизированно разрушать 1,3- β -D-ксилозидные связи в 1,3- β -D-ксиланах); 1,4- β -D-ксиланксилогидролаза (гидролизует 1,4- β -D-ксиланы путем последовательного отщепления от нередуцирующего конца полисахарида остатка D-ксилозы); α -L-арабинофуранозидарабинофураногидролаза (катализирует гидролиз конечного нередуцирующего звена в α -арабинозидах, содержащих 1,3- и/или 1,5-связи, в виде α -L-арабинозы); 1,3- β -ксиланксилогидролаза (способна последовательно отщеплять от нередуцирующего конца 1,3- β -D-ксиланов остатки ксилозы) [Harding 2005: 15].

Ферменты, именуемые эндоглюканазами, гидролизуют гликозидные связи, удаленные от конца цепи. Наибольшее сродство у этих ферментов наблюдается к тем олигосахаридам, которые включают в свой состав от шести и более остатков глюкозы. Для отщепления концевых элементарных звеньев в живой природе присутствуют экзоглюканазы, обнаружено всего два фермента этой группы: экзо-1,4-глюкозидаза и целлобиогидролаза. Эти ферменты способны отщеплять глюкозу или целлобиозу с нередуцирующего конца полисахаридов. Гидролиз межзвеньевых связей у олигосахаридов обеспечивают глюкозидазы.

Целлюлазы относятся к классу карбогидраз (*O*-гликозид-гидролаз) и включают несколько ферментов: 1,4- β -D-глюкан-глюканогидролаза, способная случайным образом гидролизовать в β -глюканах β -1,4-связи; кроме целлоолигосахаридов образуются глюкоза и целлотриозы; 1,4- β -D-глюкан-глюкогидролаза, гидролизующая 1,4-связи в 1,4- β -D-глюканах с последовательным отщеплением глюкозных остатков; 1,4- β -D-глюкан-целлобиогидролаза, отщепляющая целлобиозу с нередуцирующих концов целлоолигосахаридов; β -D-глюкозид-глюкогидролаза, отщепляющая гидролитически концевые нередуцирующие остатки β -D-глюкозы; может гидролизовать β -D-глюкозиды и целлобиозу [Москвин 2006: 71, Поконова 2002: 72].

На примере лизоцима видно, что для ферментов характерна специфичность (в аспекте физико-химических свойств) активного центра и субстрата, в некоторых случаях они более специфичны – лизоцим, а в других менее – 1,4- β -D-глюкан-глюканогидролаза.

1.2. Кислотный гидролиз. Для подготовки полисахарида к последующему моносахаридному анализу и установления типов связей используется кислотный гидролиз. В качестве гидролизующего вещества в кислотном гидролизе используются минеральные кислоты. Основная проблема заключается в подборе подходящих условий: температуры, молярности, времени выдержки для конкретного полисахарида. В настоящее время наибольшей популярностью пользуется трифторуксусная кислота

[Fry 2000: 11; Goubet 2002: 13; Guneb 2003: 14; Sun 2008: 43], которая участвует в жестком гидролизе. Для расщепления О-гликозидных связей используется мягкий щелочной гидролиз с 0.2 нормальным NaOH [Stroop 2002: 42]. Жесткий гидролиз используется для гидролиза N-гликозидной связи (при этом применяется двунормальный HCl [Gerwig 1991: 12] или 0.5–2 нормальный NaOH [Pomin et al: 30]) и представляет собой более концентрированный насыщенный раствор, чем при мягком гидролизе. Серная кислота тоже используется для гидролиза полисахаридов и нейтрализуется солями бария [Nejatzadeh-Barandozi 2012: 25]. Её преимущества заключаются в эффективном расщеплении гликозидных связей, возможности работать при сравнительно малых температурах – около 23°C [Трофимова 2005: 78]. Оксониевые соединения, образующиеся в результате гидролиза концентрированными кислотами, затрудняют анализ моносахаридного состава. Некоторые исследователи прибегают к гидролизу метановой кислотой [Rezanka 2007: 33]. Практически при любом кислотном гидролизе требуется повышенная температура: 100°C и выше.

Для анализа типа и размера окисного кольца и групп, входящих в состав полисахарида, используются методы Хеурса, Пурди и Хэдсона–Джексона, деграции Смита. Методы Хеурса и Пурди основываются на замещении свободных гидроксильных групп на метоксильные ($-O-CH_3$) с дальнейшим окислением продукта метилирования. В методе Хеурса это достигается за счет применения диметилсульфата в присутствии щелочи, а в методе Пурди – йодистого метила в присутствии оксида серебра. Метод Хэдсона–Джексона заключается в окислении моносахарида йодной кислотой, что приводит к разрыву цепи между углеродами и к полному её распаду. Однако в гликозидах (продукт замещения полуацетального гидроксила в моносахаридах) такое окисление приводит к возникновению продуктов реакции, соответствующих своим характеристиками и количеством исходному соединению [Кочетков 1960: 65].

2. Хроматографические методики

Для анализа моно- и олигосахаридного состава используются хроматографические методики. Моносахаридный состав изучают различными методами. Мы остановимся на хроматографических. Существует несколько способов классификации хроматографических методик. Один из них – по агрегатным состояниям подвижной и неподвижной фазы: газожидкостная, газотвердофазная, жидкотвердофазная, жидкожидкофазная, флюиднотвердофазная, флюидно-жидкотвердофазная. Также хроматограммы подразделяются по механизму разделения: адсорбционная, распределительная, ионообменная, эксклюзионная, аффинная, осадочная, лигандная, хиральная [Беккер 2009: 55].

2.1. Гельпроникающая хроматография. Для сепарации и фракционирования углеводов с широким спектром молекулярных масс используется эксклюзионная хроматография. Разделение образца происходит между растворителем, находящимся внутри пор сорбента, и растворителем, протекающим между его частицами. Образцы различных размеров и способности проникать в поры неподвижной фазы имеют разное время удержания. Для разделения полисахаридов по фракциям различной молекулярной массы используется гельпроникающая хроматография (ГПХ). ГПХ – подвид эксклюзионной хроматографии, в которой неподвижной фазой является гель, используется для определения распределения молекулярных масс (гидродинамических объемов) составных частей нанесенного образца [Striegel 2009: 41]. Основным преимуществом метода является возможность разделения веществ молекулярных масс от 10^{-2} до 10^8 Да, что делает этот метод незаменимым при работе с полимерами.

Для разделения особо крупных полимеров в качестве маркеров для определения молекулярных масс выходящих образцов используются декстраны (также являющиеся

полисахаридами): декстран 270, декстран 600, голубой декстран и декстран из *Leuconostoc mesenteroids*.

2.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, HPLC).

Одним из наиболее распространенных методов хроматографии является высокоэффективная жидкостная хроматография. ВЭЖХ подразделяется на нормально-фазовую, обращенно-фазовую и эксклюзионную хроматографию. В первом случае неподвижная фаза более полярна, чем подвижная фаза, во втором – наоборот. В общем этот метод основан на разделении компонентов смеси по различному распределению между двумя несмешивающимися фазами – подвижной и неподвижной. На границе раздела этих фаз основную роль в разделении играют различные силы, в основном Ван-дер-Ваальса. В обращенно-фазовой и нормально-фазовой хроматографии эффект разделения достигается за счет разной полярности подвижной и стационарной фаз.

Основная особенность ВЭЖХ состоит в том, что образец для анализа должен быть полностью растворим в подвижной фазе и сорбироваться в стационарной. При этом фазы не должны взаимодействовать друг с другом и с образцом химически. В колонках ВЭЖХ подвижная фаза прокачивается вместе с веществом через колонку со стационарной фазой под высоким давлением (до 35 МПа).

Колонки заполнены зернами (сорбент) размером от 3 до 10 мкм. Анализируемые вещества движутся по колонке с различными скоростями, что приводит к различному времени выхода и регистрации на детекторе. Детектирование веществ при выходе из колонки производится различными типами детекторов: спектрофотометрическими, светорассеяния, масс-спектроскопическими, электрохимическими, флуориметрическими, рефрактометрическими и пламенно-ионизационными. Сорбент в колонке отвечает за эффективность и селективность разделения компонентов, описание компонента качественно производится за счет времени удержания, а количественно – за счет величины аналитического сигнала, площади под пиком на хроматограмме или величины пика по интенсивности.

В обращенно-фазовой хроматографии причиной сорбции являются диполь-дипольные взаимодействия полярных молекул элюента, за счет этого происходит сольвофобное¹ вытеснение менее полярных молекул из полярной среды элюента к неполярной поверхности сорбата. Неподвижная фаза при этом является акцептором сорбата и удерживает его за счет слабых дисперсионных сил, что приводит к разделению по размеру, дипольному моменту, поляризуемости и способности к гидрофобным взаимодействиям неполярной части молекулы, которая «стремится» к уменьшению неполярной поверхности при сорбции.

Разница между нормально-фазовой и обращенно-фазовой хроматографией заключается в различных процессах сорбции на полярных поверхностях. В первом случае между сорбентом и элюентом образуются ассоциаты за счет кулоновского взаимодействия или водородных связей. Во втором ассоциаты образуются за счет сольвофобных взаимодействий в подвижной фазе.

Нормально-фазовая хроматография (НФХ) разделяет анализируемые вещества на основе их сродства к полярной неподвижной поверхности, способности элюента участвовать в полярных взаимодействиях с поверхностью сорбента. Этот тип ВЭЖХ основан на использовании неполярных подвижных фаз (хлороформ, ацетонитрил) и эффективен при разделении аналитов, хорошо растворимых в неполярных растворителях. Образец связывается и удерживается полярной неподвижной фазой. Адсорбция увеличивается за счет повышения полярности анализируемого вещества. Сила взаимодействия зависит не только от функциональных групп, присутствующих в

¹ Сольвофобность – понятие, характеризующее сродство вещества к растворителям. Гидрофобность – сольвофобность по отношению к воде.

структуре молекулы аналита, но и от стерических факторов, что позволяет разделять структурные изомеры [Хенке 2009: 80].

В зависимости от условий разделения происходит изменение времени удержания. Например, при условии состава элюента 80% ацетонитрила и 20% воды, при потоке в 1 мл/мин и температуре 30°C, удастся разделить лишь фукозу, ксилозу, фруктозу и глюкозу.

При изменении параметров на 75% ацетонитрила и 25% воды и поток в 0.6 мл/мин уже удастся разделить фруктозу, глюкозу, сахарозу, лактозу и мальтозу, если увеличить поток до 1 мл/мин – фруктозу, сорбозу, галактозу, глюкозу, ксилобиозу, сахарозу, лактозу и мальтозу, что является весьма широким спектром разделения [Denko 2012: 8; Lui 2012: 21; Yamamoto 2004: 48].

Использование более полярных растворителей в подвижной фазе будет уменьшать время удерживания аналитов, в то время как более гидрофобные растворители, как правило, вызывают замедленную элюцию.

В итоге проведения хроматографического анализа исследователь получает хроматограмму, описание которой укладывается в ряд последовательных шагов: определение времени удержания образца, описание пиков. Пик – качественная и количественная характеристика хроматограммы, зависимость концентрации пробы в подвижной фазе на выходе из колонки от времени. Для идентификации соединения в смеси сравнивают полученные данные с референсным образцом [Яшин 1976: 84].

3. Спектроскопия

3.1. Инфракрасная спектроскопия (ИКС, IRS, FTIR). ИКС отражает колебания характерных частот органических соединений, а в сложных белках и углеводах позволяет определять характерные частоты функциональных групп. Очень важным является обнаружение характеристической частоты, которая соответствует определенному нормальному колебанию атомной группировки одинаковой частоты для структурно-родственных молекул, имеющих в своем составе данную группировку. Эти частоты позволяют идентифицировать органические соединения. Инфракрасные спектры возникают за счет переходов между колебательными и вращательными уровнями основного электронного состояния при поглощении падающего излучения. Однако не все колебания будут обнаружены, так как не все колебания сопровождаются изменением электрического дипольного момента μ связи. Колебание становится активным в ИК-спектре при условии, что первая производная по нормальной координате не равна нулю: $\frac{d\mu}{dr} \neq 0$. В силу этого свойства полярные соединения соответствуют самым интенсивным полосам поглощения.

ИК-спектр делится на три области: ближнюю – от 12000 до 4000 см^{-1} , среднюю – от 4000 до 200 см^{-1} , дальнюю – от 200 до 10 см^{-1} . Дальняя область позволяет обнаружить тяжелые молекулы органических соединений, ближняя – легкие молекулы: воду, углекислый газ и т.д. Интервал частот 4000–2500 см^{-1} принадлежит области валентных колебаний простых связей X-H: O-H, N-H, C-H, S-H, а для валентных колебаний простых связей типа X-Y: C-C, C-N, C-O и деформационных колебаний простых связей X-H: C-H, O-H, N-H – 1500–500 см^{-1} . Область определения функциональных групп лежит в интервале от 3600 до 2100 см^{-1} , также включает в себя валентные колебания простых связей C-H, O-H, N-H, C-H, S-H. В интервале от 3600 до 3200 см^{-1} можно обнаружить водородные связи в молекуле. От 2100 до 1200 см^{-1} лежит область колебания кратных связей $X=Y$, $X\equiv Y$: C=C, C=O, C=N, C $\equiv$ C, C $\equiv$ N, что позволяет определить наличие в структуре ароматических и гетероароматических колец [Васильев 2007: 57]. Интервалу от 1300 до 200 см^{-1} принадлежит «область

отпечатков пальцев» – диапазон частот, в котором положение и интенсивность полос поглощения индивидуально для каждого органического соединения. Это область валентных колебаний: C-C, C-N, C-O и деформационных колебаний: C-H, N-H, O-H. Анализ соединения следует начинать с двух областей: 3600–2100 и 2100–1200 см^{-1} в силу их повышенной информативности. При обнаружении характерных полос колебаний в этих областях следует проверить область 1200–200 см^{-1} для подтверждения.

Для определения природы углеродного остова подразделяют три типа колебаний: C-H-деформация, C-C-деформационное колебание кольца и C-H-колебание. На длине волны 3100–3000 см^{-1} обнаружена =C-H в ароматических соединениях, а C-H приходится на 3000 см^{-1} для насыщенных алифатических углеводородов. Ароматические углеводороды проявляют C-C деформационное колебание кольца в областях: 1600–1585 см^{-1} и 1500–1400 см^{-1} . Простые ковалентные связи C-H определяются в интервале 900–675 см^{-1} и в зависимости от волнового числа проявляют различную гибридизацию: для sp^3 – от 2850 до 3000 см^{-1} , для sp^2 – более 3000 см^{-1} , для sp соответствует ~ 3300 см^{-1} . Слабое поглощение в интервале 3080–3030 см^{-1} , сопутствующее среднему поглощению в области 1600–1475 см^{-1} колебаний кольца, соответствует наличию ароматического кольца. Сигнал в районе 1605 см^{-1} является следствием ароматичности молекулы. Неароматичность молекулы определяется отсутствием сильного поглощения в области 900–650 см^{-1} [Купцов 2013: 66; Сильверстейн и соавт. 2012: 75].

Углерод-углеродная связь бывает различных типов, и для ее определения также используется спектральный метод. При наличии C=C -связи возникает сигнал в области 1680–1640 см^{-1} . В интервале 2260–2100 см^{-1} обнаруживается соединение $\text{-C}\equiv\text{C-}$. Деформационное колебание =C-H группы наблюдается в интервале 1000–650 см^{-1} , а группы $\text{-C}\equiv\text{C-H}$ – 700–600 см^{-1} . Валентные колебания $\text{-C}\equiv\text{C-H}$ наблюдаются в 3330–3270 см^{-1} . Наличие дублета при волновом числе 1380 см^{-1} означает наличие более чем одной метильной группы у одного углерода [Volland 1999: 46].

Для определения C=O группы необходимо провести анализ спектра в области 1820–1660 см^{-1} . При ее наличии следует продолжить рассмотрение. Если наблюдается две слабые полосы поглощения в 2850 и 2750 см^{-1} , то обнаруживается поглощение на нижнем значении волнового числа группы C-H. Этот эффект возникает из-за валентных колебаний O=C-H , связи возле 2830 см^{-1} перекрываются обычно с валентными колебаниями C-H. Тем не менее наличие умеренной связи в области 2720 см^{-1} поможет определить, является ли соединение альдегидным (возникает ли плечеобразный пик). Широкая полоса в интервале 3300–2500 см^{-1} с максимумом в середине интервала наблюдается вследствие валентных колебаний O-H-группы карбоксильных кислот, так как они, в основном, образуют водород-связанные димеры. Две или более сильно поглощающие связи в области 1300–1000 см^{-1} возникают из-за валентных колебаний C-O в эфирах. Если ни один из приведенных случаев не наблюдается, то это означает, что исследователь имеет дело с кетонной молекулой [Sternhell 2008: 40, Hu 2012: 17].

При отсутствии C=O -поглощения следует рассмотреть наличие:

1. N-H-валентных колебаний аминов в области 3300–3000 см^{-1} , при которых пик будет слабее и острее, нежели при наличии O-H-валентных колебаний спиртов в том же интервале. При наличии двух полос: первая рассматривается как указатель на главный амин, в то время как вторая – на вторичный.

2. Слабая или средняя полоса поглощения в области $1250\text{--}1020\text{ см}^{-1}$ служит индикатором наличия C-N-валентных колебаний алифатических аминов. Также наличие сильной полосы в области $1335\text{--}1250\text{ см}^{-1}$ означает присутствие ароматических аминов.

3. Средняя полоса поглощения в интервале $2260\text{--}2220\text{ см}^{-1}$ означает присутствие нитрила $\text{C}\equiv\text{N}$. Изомер изоцианата создает интенсивную полосу поглощения в области $2275\text{--}2240\text{ см}^{-1}$.

Для определения присутствия амидной группы проверяют наличие полосы поглощения карбонильной группы в области $1700\text{--}1640\text{ см}^{-1}$. Дополнительно к этому проверяется наличие поглощения N-H-группы в интервале $3500\text{--}3100\text{ см}^{-1}$. Главные амиды имеют две N-H-полосы поглощения. В случае с нитрогруппой N-O проверяют поглощение в области $1550\text{--}1365\text{ см}^{-1}$. С другой стороны, при присоединении нитрогруппы к ароматическому кольцу наблюдается поглощение при $1550\text{--}1475$ и $1360\text{--}1290\text{ см}^{-1}$ [Rezanka 2007: 33; Rodrigues 2001: 34].

В ИК-спектре полисахарида с молекулярной массой $1\text{--}2\text{ МДа}$ отмечаются полосы поглощения: 3338 см^{-1} (ОН); $2922, 2853\text{ см}^{-1}$ (C-H); $2361, 2342\text{ см}^{-1}$ ($=\text{N}^+\text{H}^-$, $\equiv\text{NH}^+$, $=\text{NH}^{+2}$); $1651, 1645\text{ см}^{-1}$ (C=C, кристаллизационная вода) $1028, 1076, 1150\text{ см}^{-1}$ (C-O, C-O-C, кольцевые колебания пиранозного цикла); в области $1000\text{--}1200\text{ см}^{-1}$ (сильная и широкая полоса) – характеризует ОН-группу, связанную водородной связью; сильное поглощение на 1074 и 1034 см^{-1} , среднее поглощение на 1148 см^{-1} , при наличии колебаний пиранозного кольца, означают структуру, присущую β -глюкану. В ИК-спектре проявляются характерные для полисахаридных структур полосы поглощения [Генералов 2015: 61; Москвин 2006: 70; Поконова 2002: 72].

3.2. ЯМР-спектроскопия. Дополнительным мощным методом анализа полисахаридов является ЯМР-спектроскопия, которая позволяет установить структуру углеводов, включая моносакхаридный состав полисахаридов, установить α, β -аномерные конфигурации, определение паттерна связей и последовательностей моносакхаридов и/или олигосахаридов. Принцип действия основан на магнитной активности некоторых ядер.

Сигналы ^1H ЯМР более чувствительны, чем ^{13}C , ввиду их природного изобилия. В результате сильные ^1H -сигналы могут использоваться для количественного изучения углеводов. Однако большинство сигналов протонов принадлежат области химических сдвигов от 3 до 5 м.д., что приводит к сильному перекрыванию сигналов от разных протонов. Таким образом, одномерная ЯМР-спектроскопия не позволит получить точное строение полисахаридов [Cui 2005: 7].

Хотя у ^{13}C ЯМР и более слабый сигнал, но при этом химические сдвиги протонов имеют более широкую область значений и вероятность их перекрывания значительно ниже. Аномерные углеводы дают сигнал в области $90\text{--}110\text{ ppm}$, а нонамерные – $60\text{--}85\text{ ppm}$. У дезоксиполисахаридов --CH_3 -группа проявляется в виде сигнала в более широкой области значений от 15 до 20 ppm. Сигналы от α -аномерных углеводов в большинстве своем лежат в области $95\text{--}103\text{ ppm}$, а β -аномерных – $101\text{--}105\text{ ppm}$. У полисахаридов, содержащих уроновые кислоты, сигналы от карбоксильных углеводов принадлежат области $170\text{--}180\text{ ppm}$. Сигналы углеродов гидроксильных групп (C6 в пиранозах и C5 в фуранозах) принадлежат области $60\text{--}64\text{ ppm}$, а сигналы от углеродов с вторичными гидроксильными группами (C2,3,4 в пиранозах и C2,3 в фуранозах) – $65\text{--}87\text{ ppm}$. Существует феномен – сдвиг гликозилирования: сигнал алкилированного атома углерода (C5 в пиранозах и C4 в фуранозах) сдвигается от 5 до 10 ppm в сторону меньшего поля, а при замещении сахарного кольца на другой моносакхарид происходит сдвиг от 4 до 10 ppm [Генералов 2014: 62; Преч 2006: 74].

В силу комплексности и разветвленности полисахариды сложны для структурного изучения. К примеру, структура полисахарида из *Helianthus tuberosus L.* на рисунке. Чаще всего конформационно кольцо моносахаридов может быть в виде «кресла» или «ванны». Обе конформации имеют стандартные значения косвенного спин-спинового взаимодействия, что позволяет методами ^{13}C и ^1H ЯМР их определять. Для полного определения структуры необходимо знать и характер гликозидной связи. Методы двумерного ЯМР-анализа позволяют определить ее вид.

2. Обсуждение

Благодаря использованию различных методов исследования физико-химии полисахаридов были получены важные данные. Результаты хроматографического анализа, к примеру, ГПХ, позволяют установить молекулярные массы полисахаридов и примесных веществ в исходном экстракте и разделить их. Показано, что молекулярная масса полисахаридов сильно варьируется от небольших – бемипарин, молекулярная масса которого составляет 3.6 кДа [Thakur 2011: 45], до значительных – 10 МДа – крахмал [Planes 2003: 29].

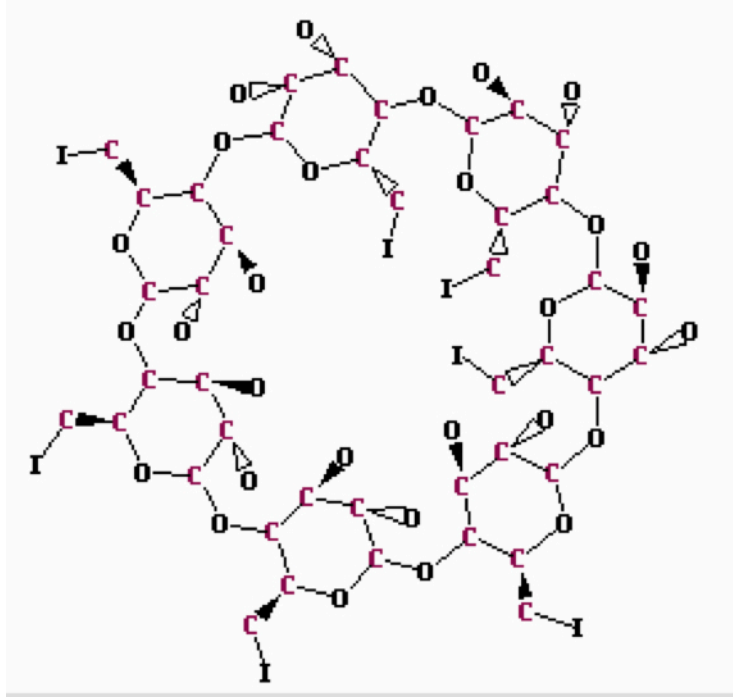
Использование химического анализа – обработка специфическими ферментами вкупе с разного рода спектроскопией (ИК, УФ, ЯМР, ЭПР) – позволяет установить активные центры, виды гликозидных связей, разветвленность, молекулярную массу, моносахаридный состав и прочие необходимые для понимания молекулярных механизмов работы полисахаридных молекул данные. К примеру: наличие глюкозы или маннозы (обнаруженное хроматографическими методами, в частности HPLC), доступной для связывания, позволяет утверждать, что данный полисахарид взаимодействует с рецептором CD206, присутствующим на миелоидных дендритных клетках, моноцитах и макрофагах [Yokoyama 1998: 51]. Также остатки маннозы, связываясь с лектиновыми рецепторами миелоидных клеток: CD205, CD209, CD207 и Дектин-2, изменяют их конформацию, что приводит к передаче внутриклеточного сигнала через киназу Syk или ГТФазу Ras, что было установлено при помощи иммунохимических, хроматографических и спектроскопических методов [Ruiz-May 2014: 35; Ярилин 2010: 83]; либо интернализуются до стадии поздних эндосом. Для β -глюканов существуют другие виды рецепторов – Дектин-1 (активация клеточного иммунитета через тирозинсодержащий активационный мотив ITAM) [Rand 2013: 32], CR-3 (пролиферация иммунокомпетентных клеток) [Tailleux 2003: 44], TLR-6 (стимулирование продукции цитокинов) [Nakao 2005: 24]. Из них только рецепторы Дектин1 и 2 являются Ca^{2+} независимыми. С другой стороны, сильно разветвленные полисахариды – как гомо-, так и гетерополисахариды – могут связывать как несколько однотипных рецепторов, приводя к их димеризации, так и различных рецепторов.

С помощью анализа методом ЯМР можно определить наличие различных атомов, несвойственных моносахаридам, входящих в состав полисахаридной молекулы. Например, серы, благодаря которой углевод способен инактивировать свободные радикалы в организме. Атомы серы связывают свободные радикалы, предотвращая окисление мембран клеток организма. Также возможно, что «направленное» взаимодействие серосодержащих групп углевода с сульфгидрильными группами критически важных для выживания организма биологических молекул изолирует последние от воздействия свободных радикалов. Будучи отрицательно или положительно заряженными, полисахариды могут выступать в качестве ионных буферных систем [Aydogan 2014: 3]. Вместе с тем ионные полисахариды могут выступать в качестве компонентов систем доставки лекарств, необходимых для регулирования высвобождения лекарственных средств при изменении pH, ионной природы, концентрации, электрического или магнитных полей, температуры, окислительно-восстановительного потенциала и других факторов [Alvarez-Lorenzo

2013: 2]. Таким образом, некоторые полисахариды могут также выступать в качестве природных антиоксидантов [Chen 2014: 5].

Закключение

Рассмотрены некоторые биологические функции полисахаридов. Приведены сведения о спектральных, структурных и физико-химических особенностях некоторых полисахаридов. Обсуждаются имеющиеся в литературе данные о взаимосвязи химической структуры и биологической активности природных углеводов. Для полноценного и всестороннего изучения углеводов необходимо совмещать различные физико-химические, молекулярные и биологические методики, некоторые из которых описаны в данном обзоре. Наиболее перспективным методом для экстракции является гельпроникающая хроматография и тангенциальное фильтрование, а для анализа моносахаридного состава – высокоэффективная жидкостная хроматография. Для первичного анализа структуры удобно использовать ИК-спектроскопию, для более детального изучения – ЯМР-спектроскопию. Данные методы расширяют возможности фундаментальных исследований в обосновании схожести белковых и полисахаридных молекул и прикладных исследований в синтезировании, тестировании и определении активных центров полисахаридных структур и комплексов на их основании. Однако без предварительной пробоподготовки, основанной на различных видах гидролиза, невозможно воспользоваться передовыми методиками. Пробоподготовка представляет собой наиболее трудоемкую стадию в изучении полисахаридов. Помимо пробоподготовки, полисахариды отличаются от белков и нуклеиновых кислот параметрами их исследования: областями фингерпринта, близкими временами элюции, повышенной гетерогенностью сигналов и др. Описанные выше методики направлены на установление структуры и состава полисахаридов, обладающих определенными биологическими свойствами. На основе полисахаридов создаются лекарственные препараты, радиопротекторы и иммуноадьюванты. Относительно слабые побочные действия полисахаридов делают их конкурентоспособными по сравнению с аналогами.



Структура полисахарида из *Helianthus tuberosus* L.

Библиографический список

Adriana A., Concetta G., Giovanna S. et al. An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: Antiviral activity on immunocompetent cells // *Immunology Letters*. 2009. 123 (2). P. 132–137.

Alvarez-Lorenzo C., Blanco-Fernandez B., Puga A. M., Concheiro A. Crosslinked ionic polysaccharide for stimuli-sensitive drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. 65 (9). P. 1148–1171.

Aydogan M. N., Taskin M., Canli O. et al. Tris-sucrose buffer system: a new specially designed medium for extracellular invertase production by immobilized of isolated yeast *Cryptococcus laurentii* MT-61 // *Folia Microbiol (Praha)*. 2014. 59 (1). P. 9–16.

Chan W. K., Cheung C. C. H., Law H. K. W. et al. Ganoderma lucidum polysaccharides can induce human monocytic leukemia cells into dendritic cells with immune-stimulatory function // *Journal of hematology and oncology*. 2008. 1 (19).

Chen Q., Chen J., Du H. et al. Structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from the pulp of *Elaeagnus angustifolia* L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. 15 (7). P. 11446–11455.

Choi J., Raghavendran H. R. B., Sung N. – Y. et al. Effect of fucoidan on aspirin-induced stomach ulceration in rats // *Chemico-Biological Interactions*. 2010. 183. P. 249–254.

Cui S. W. Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties and Applications. L.: Taylor and Francis Group. 2005.

Denko K. K. Shodex HPLC Columns and Instruments 2011–2012. Japan. Showa. 2012.

Despande V., Eriksson K. E., Pettersson B. Production, purification and partial characterization of 1,4-5-glucosidase enzyme from *Sporotichum pulverulentum* // *Eur. J. Biochem.* 1978. 90 (1). P. 191–198.

Dore C. M. P. G., Alves M. G. C. F., Santos N.D. et al. Antiangiogenic activity and direct antitumor effect from a sulfated polysaccharide isolated from seaweed // *Microvascular Research*. 2013. 88. P. 12–18.

Fry S.C. The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis. CW.: Blackburn Press. 2000.

Gerwig G. J., Kamerling J. P., Vliegenthart J. F. G., et al. Primary Structure of O-linked carbohydrate chains in the cellulosome of different *Clostridium thermocellum* strains // *Eur. J. Biochem.* 1991. 196. P. 115–122.

Goubet F., Jackson P., Deery M. J., Dupree P. Polysaccharide Analysis Using Carbohydrate Gel Electrophoresis: A Method to Study Plant Cell Wall Polysaccharides and Polysaccharide Hydrolases *Analytical Biochemistry*. 2002. 300. P. 53–68.

Güneş U., Mualla B. Hydrolysis of Polysaccharides with 77% Sulfuric Acid for Quantitative Saccharification // *Turk J Agric For*. 2003. 27. P. 361–365.

Harding S. E., Rowe A. J. From Analytical Ultracentrifugation: Techniques and Methods. Chapter 12: Analysis of Polysaccharide Size, Shape and Interactions By. The Royal Society of Chemistry. Nottingham. 2005.

Harkins A. L., Duri S., Kloth L. C., Tran C. D. Chitosan-cellulose composite for wound dressing material // *Journal of biomedical materials research*. 2014. 00B. 000–000.

Hu Y., Yu G., Zhao X. et al. Structural characterization of natural ideal 6-O-sulfated agarose from red alga *Gloiopeltis furcata* // *Carbohydr. Polym.* 2012. 89. P. 883–889.

Janecke H., Weisser W. Über das polysaccharide aus flires *Chamomillae* // *Planta Med.* 1964. 12. P. 528–540.

Jolles P., Jolles J. Lisozyme. *Molec. and cell biochem.* 1984. 63 (2). Pp. 165–89.

Kim H.-J., Kim M.-H., Byon Y.-Y. et al. Radioprotective effects of an acidic polysaccharide of *Panax ginseng* on bone marrow cells // *Journal of Veterinary Science*. 2008. 9 (1). P. 39.

Lui E. M. K., Azike C. G., Guerrero-Analco J. A., et al. Bioactive Polysaccharides of American Ginseng *Panax quinquefolius* L. in Modulation of Immune Function: Phytochemical and Pharmacological Characterization. InTech. 2012.

Madhavi-Sekharam K., Venkatamaran L. V., Salimath P. V. Structural studies of a glucan isolated from blue-green algae *Spirulina platensis* // *Food Chemistry*. 1989. 31 (2). P. 85-91.

Meng F. – Y., Ning Y. – L., Qi J., He Z. et al. Structure and antitumor activity and immunomodulatory activity of a water-soluble polysaccharide from *Dimocarpus Longan* pulp // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. 15. P. 5140–5162.

Nakao Y., Funami K., Kikkawa S. et al. Surface-expressed TLR-6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglycan in human cells // *The Journal of Immunology*. 2005. 174. P. 1566–1573.

Nejatzadeh-Barandozi F., Tahmasebi S. FT-IR study of the polysaccharides isolated from the skin juice, gel juice, and flower of *Aloe vera* tissues affected by fertilizer treatment // *Organic and Medicinal Chemistry Letters*. 2012. 2 (33).

Nergarda C. S., Diallob D., Michaelsen T. E. et al. Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *J. Ethnopharm.* 2004. 91. P. 141–152.

Ooi V. E. C., Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes // *Current Medical Chemistry*. 2000. 7. P. 715–729.

Park S. J., Park D. H., Kim D. H. et al. The memory-enhancing effects of *Euphoria longan* fruit extract in mice // *J. Ethnopharmacol.* 2010. 128. P. 160–165.

Planes A. Review of bemiparin sodium – a new second-generation low molecular weight heparin and its applications in venous thromboembolism // *Expert Opin. Pharmacother.* 2003. 4 (9). P. 1551–1561.

Pomin V. H., Valente A. P., Pereira M. S., Mourão P. A. S. Mild acid hydrolysis of sulfated fucans: a selective 2-desulfation reaction and an alternative approach for preparing tailored sulfated oligosaccharides // *Glycobiology*. 2005. 15 (12). P. 1376–1385.

Raghavendran H. R. B., Srinivasan P., Rekha S. Immunomodulatory activity of fucoidan against aspirin-induced gastric mucosal damage in rats // *International Immunopharmacology*. 2011. 11. P. 157–163.

Rand T. G., Robinson C., Rajaraman D. et al. Induction of Dectin-1 and asthma-associated signal transduction pathways in RAW 264.7 cells by a triple-helical (1,3)- β -D-glucan, curdlan // *Arch. Toxicol.* 2013. 204. P. 1042–1044.

Rezanka T., Folia K. S. Structural Analysis of a polysaccharide *Chlorella kessleri* by means of gas-chromatography-mass spectrometry of its saccharide alditols // *Microbiol.* 2007. 52 (3). P. 246–252.

Rodrigues J., Puls J., Faix O., Pereira H. Determination of monosaccharide composition of *Eucalyptus globules* wood by FTIR spectroscopy // *Holzforschung*. 2001. 55. P. 265–269.

Ruiz-May E., Catala C., Rose J. K. N-glycoprotein enrichment by lectin affinity chromatography // *Methods Mol. Biol.* 2014. 1072. P. 633–643.

Senthikumar K., Manivasagan P., Venkatesan J., Kim S.-K. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013. 60. P. 366–374.

Shepetkin I. A., Quinn M. T. Botanical polysaccharides. Macrophage immunomodulation and therapeutic potential // *International Immunopharmacology*. 2006. 6. P. 317–333.

Shi J., Cheng C., Zhao H. et al. In vivo anti-radiation activities of the *Ulva pertusa* polysaccharides and polysaccharide–iron(III) complex // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013. 60. P. 341–346.

Smith T. F., Aelvoet L., Morrison D. C. The effect of bacterial lipopolysaccharide (LPS) on histamine release from human basophils. *Immunopathology*. 1985. 34 (3). P. 355–365.

Sternhell S., Kalman J. R. Organic Structures from Spectra. 4th Edition. John Wiley and sons, Ltd. 2008.

Striegel A. M., Yau W. W., Kirkland J. J., Bly D. D. Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography, 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc. 2009.

Stroop C. J. M., Xu Q., Retzlaff M. et al. Structural analysis and chemical depolymerization of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 1 // *Carbohydrate Research*. 2002. 337. P. 335–344.

Sun Y., Liu J. Structural characterization of a water-soluble polysaccharide from the Roots of *Codonopsis pilosula* and its immunity activity // *Int. J. of Biol. Macromol.* 2008. 43. P. 279–282.

Tailleux L., Shwartz O., Hermann J. L. et al. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells // *J. Exp. Med.* 2003. 197 (1). P. 121–127.

Thakur K. G., Sekar G. D-Glucose as green ligand for selective copper-catalyzed phenol synthesis from aryl halides with an easy catalyst removal // *Chemical Communications*. 2011. 47. P. 6692–6694.

Volland W. Organic compound identification using infrared spectroscopy. WA.: Bellevue 1999.

Xu L.Z., Wang H.G., Geng X.F., Leng, P. The effect of ethanol extract pseudo-seed coat of *Euphoria longan* steud on pituitary-gonad axis in female rats // *Chin. Med.* 2002. 10. P. 57–59.

Yamamoto C., Okamoto Y. Chiral Separation by HPLC Using Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases // *Chiral Separations Methods in Molecular Biology*. 2004. 243. P. 173–181.

Yang B., Zhao M. M., Shi J. et al. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp // *Food Chem.* 2008. 106. P. 685–690.

Yia Y., Zhang M. W., Liao S. T et al. Structural features and immunomodulatory activities of polysaccharides of longan pulp // *Carbohydr. Polym.* 2012. 87. P. 636–643.

Yokoyama W., Renner-Nantz J. J., Shoemaker C. F. Starch molecular mass and size by size-exclusion chromatography in DMSO–LiBr coupled with multiple angled laser light scattering // *Cereal Chemistry*. 1998. 75 (4). P. 530–535.

Zhang H.-Q., Lin A.-P., Sun Y., Deng Y.-M. Chemo- and radio-protective effects of polysaccharide of *Spirulina Platensis* on hemopoietic system of mice and dogs // *Acta Pharmacol Sin.* 2001. 22 (12). P. 1121–1124.

Zhong K., Wang Q., He Y., He X. Evaluation of radicals scavenging, immunity-modulatory and antitumor activities of longan polysaccharides with ultrasonic extraction on in S180 tumor mice models // *Int. J. Biol. Macromol.* 2010. 47. P. 356–360.

Афанасьев В. А., Бровкина И. Л., Прокопенко Л. Г. Человек и его здоровье: сб. науч. работ. Курск. 1999. 2. С. 71–73.

Беккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика. Методы хроматографии и капиллярного электрофореза. М.: Техносфера, 2009.

Васильев А. В., Гриненко Е. В., Щукина А. О., Федulina Т. Г. Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений. СПб.: СПбГЛТА, 2007.

Воротынская С. Л., Витовская Г. А., Гиришович М. З. и др. // Химико-фармацевтический журнал. 1995. 4. С. 41–43.

Генералов Е. А. Структура и радиопротекторные свойства нетоксичного полисахарида из *Helianthus Tuberosus* L. // Биофизика. 2014. 59 (3). С. 439–445.

Генералов Е. А. Влияние полисахарида "Ульцэп" на течение язвенной болезни. V Science4Health 2013. Материалы конференции. М. 2013.

Генералов Е. А. Изучение структуры и иммуноадаптивной активности глюкана «АДВА» // ВМУ. Серия 3. Физика. Астрономия. 2013. 6. С. 35–41.

Генералов Е. А. Спектральные характеристики и моносахаридный состав противовирусного полисахаридного индуктора интерферона из *Helianthus Tuberosus* L. // Биофизика. 2015. 60 (1). С. 65–72.

Генералов Е. А. Природные полисахариды. Германия: LAP Lambert Academic Publishing. 2014.

Конопля Е. Н., Прокопенко Л. Г., Конопля Н. А., Сухомлинов Ю. А. // Фармацевтическая наука в решении вопросов лекарственного обеспечения: сб. ст. М. 1998. С. 266–270.

Коссиор Л. А., Караваева А. В., Ананьева Е. П. // Четвертый Международный съезд «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». Материалы съезда. СПб. 2000. С. 168–172.

Кочетков Н. К., Торгов И. В., Ботвинник М. М. Химия природных соединений. К.: Наука, 1960.

Купцов А. Х., Жижин Г. Н. Фурье-КР и Фурье-ИК спектры полимеров. М.: Техносфера, 2013.

Максимова О. В., Максимов М. Ф., Конопля Е. Н. // Человек и его здоровье. сб. науч. работ. К., 2000. 3. С. 208–209.

Мансимова О. В., Конопля Е. Н., Сухомлинов Ю. А. // Человек и его здоровье: сб. науч. работ. Курск. 1998. С. 120–121.

Маркизов П. В. Тибетская медицина: Состояние и перспективы исследований. Сб. науч. работ. Улан-Удэ. 1994. С. 150–154.

Москвин А. В. Новый справочник химика и технолога. Общие сведения. Строение вещества. СПб.: АНО НПО «Профессионал», 2006.

Наумов Д. Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз // Биохимия. 2011. 76 (6). С. 764–780.

Поконова Ю. В., Стархова В. И. Новый справочник химика и технолога. Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ. Ч. 1–2. СПб.: АНО НПО «МириСемья», 2002.

Потиевский Э. Г. // Мор. медицинский журнал. 1999. 2. С. 45–46.

Преч Е., Бюльманн Ф., Аффольтер К. Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2006.

Сильвестерс Р., Вебстер Ф., Кимпл Д. Спектрометрическая идентификация органических соединений. М.: Бином, 2012. 557 с.

Сычев И. А., Порядин Г. В., Смирнов В. М. Бюл. Эксп. Б. и мед. 2006. 5. С. 530–533.

Сычев И. А., Смирнов В. М. // Вестник РГМУ. 2004. 6 (37). С. 85–95.

Трофимова Н. Н., Гордиенко И. И., Бабкин В. А. Изучение зависимости выхода редуцирующих веществ от параметров кислотного гидролиза целлолигнина лиственницы // Химия растительного сырья. 2005. 4. С. 25–28.

Хелдт Г.-В. Биохимия растений / под ред. А.М. Носова, В.В. Чуба. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011.

Хенке Х. Жидкостная хроматография. М.: Техносфера, 2009.

Чекановская Л. А., Генералов А. В. Влияние препарата гамма-плант на продукцию ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 мононуклеарами периферической крови человека *in vitro* // Вопросы медицинской химии. 2001. 47 (2). С. 263–273.

Чекулаева Г. Ю. // Актуальные вопросы общей патологии: сб. Рязань: РязГМУ. 2002. 1. С. 53–55.

Ярилин А. А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2010. 752 с.

Яшин Я. И. Физико-химические основы хроматографического разделения. М.: Химия. 1976.