



УДК 547.458.02:577.114.5.088

© 1993 В. В. Барбакадзе, Э. П. Кемертелидзе,
Г. Е. Деканосидзе, А. И. Усов*

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛЮКАНОВ ИЗ КОРНЕЙ ТАМУСА ОБЫКНОВЕННОГО *Tamus communis* L. (Dioscoreaceae)

Институт фармакохимии им. И. Г. Кутателадзе АН Грузии, Тбилиси;

* Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

Из корней тамуса обыкновенного выделены два препарата глюкана, различающиеся растворимостью в воде. По данным спектров ^{13}C -ЯМР, амилолиза, количественного определения в виде иодных комплексов и метилирования, оба глюкана представляют собой крахмалоподобные полисахариды, причем более растворимый является амилопектином со средней длиной неразветвленных участков цепей около 20 остатков глюкозы, а менее растворимый — смесью амилопектина и амилозы в соотношении около 2 : 1.

Ранее мы сообщали о выделении и предварительном исследовании полисахаридов из зрелых и незрелых плодов тамуса обыкновенного *Tamus communis* L. [1], а также об установлении строения галактоглюкоманнана из незрелых плодов этого растения [2]. Данная работа посвящена изучению строения полисахаридов корней *T. communis*. Заготовку растения и экстракцию полисахаридов горячей водой осуществляли по методике, описанной ранее [1]. Полисахаридный препарат I выпадал при стоянии охлажденного водного экстракта; его выход (считая на обезжиренный органическими растворителями исходный материал) составил 7,5%. Полисахаридный препарат II получали осаждением из маточного раствора этанолом с выходом 18,3%. Оба препарата после высушивания не растворялись в воде при комнатной температуре. Для дополнительной очистки вещества растворяли в 1 н. NaOH, обрабатывали небольшим количеством хлорита натрия и уксусной кислоты, после чего диализовали и лиофилизовали. Полученные таким образом полисахариды давали при гидролизе только D-глюкозу, идентифицированную с помощью хроматографии и поляриметрии, и обладали высоким положительным удельным вращением, что указывало на преобладающую α -конфигурацию гликозидных центров.

Близкое родство выделенных глюканов и их принадлежность к крахмалоподобным полисахаридам были установлены с помощью спектров ^{13}C -ЯМР, снятых для растворов полисахаридов в 2,5% NaOH. Оказалось, что оба препарата дают практически идентичные спектры, содержащие шесть интенсивных сигналов, которые соответствуют хорошо известному спектру амилозы [3, 4]. Из положения этих сигналов однозначно следует, что остатки глюкозы в молекулах полисахаридов находятся в пиранозной форме: для фуранозной формы характерны сигналы C-6 при 64—65 м.д. независимо от конфигурации гликозидных центров [5], но в спектрах исследуемых веществ эта область свободна. В аномерной области спектров имеются сигналы с химическим сдвигом 102,6 м.д., принадлежащие C-1 остатков α -D-глюкопиранозы [4]. На α -конфигурацию указывает также константа спин-спинового взаимодействия $J_{\text{C1-H}}$, равная 168,5 Гц [6]. Наличие

Вещество	Тип замещения	Относительное время удерживания	Относительное содержание	
			глюкан I	глюкан II
1,5-Ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилсорбит	Glc1→	1,00	1	1
1,4,5-Три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилсорбит	→4Glc1→	1,18	23	18,3
1,4,5,6-Тetra-О-ацетил-2,3-ди-О-метилсорбит	→4Glc1→ 6 ↑	1,37	0,75	1

сигналов с химическим сдвигом 80,3 м.д. свидетельствует, что остатки глюкозы замещены в положение 4 [4].

Подтверждение крахмалоподобной природы выделенных глюканов было получено при изучении амилолиза и образования иодных комплексов. Количественное определение с помощью амилотического реагента фирмы Boehringer показало, что не менее 99% каждого из препаратов представляет собой крахмал. Спектрофотометрия иодных комплексов при двух длинах волн [7] позволила установить, что глюкан II является амилопектином (возможное содержание амилозы не превышает 1,5%), тогда как глюкан I — это смесь амилозы и амилопектина с соотношением 32 : 68.

Дополнительные доказательства природы межмономерных связей и степени разветвленности молекул глюканов были получены методом метилирования. Техника метилирования в DMSO со щелочью и анализ продуктов гидролиза метилированных полисахаридов с помощью ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии подробно описаны в наших предыдущих работах [2, 8]. Результаты метилирования глюканов I и II (таблица) свидетельствуют о том, что в главных цепях обоих глюканов остатки *D*-глюкопиранозы соединены связями 1 → 4, а некоторое количество боковых цепей присоединено к главным цепям связями 1 → 6. Глюкан I действительно обладает меньшей средней степенью разветвленности, что, по-видимому, и является главной причиной отличия его от глюкана II по растворимости в воде при экстракции.

Таким образом, оба глюкана, выделенные из корней *T. communis*, относятся к крахмалоподобным полисахаридам. Более растворимый глюкан II — это амилопектин со средней длиной неразветвленных участков цепей около 20 глюкозных остатков, тогда как менее растворимый глюкан I — смесь амилозы и амилопектина в соотношении около 1 : 2.

Экспериментальная часть

Выделение полисахаридов. Корни *T. communis* были собраны в начале августа 1989 г. в окрестностях Тбилиси. Предварительную обработку материала и экстракцию горячей водой проводили, как описано ранее [1]. Для экстракции использовали 93 г обезжиренных корней. Осадок, выпавший после охлаждения водного экстракта, отделяли центрифугированием, промывали ацетоном и высушивали в вакууме над P_2O_5 . Получали препарат I с выходом 7 г. Маточный раствор диализовали, концентрировали в вакууме и приливали 4 объема этанола. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном и высушивали, как описано выше. Получали препарат II с выходом 17 г.

1 г препарата I или II растворяли в 250 мл 1 н. NaOH, к окрашенным растворам прибавляли по 0,5 г $NaClO_2$ и после растворения соли приливали уксусную кислоту до отчетливой кислой реакции. Далее растворы диализовали и лиофилизовали. Получали глюкан I, $[\alpha]_D^{26} +167,5^\circ$ (с 1,8; 1 М NaOH),

и глюкоза II, $[\alpha]_D^{26} +178,5^\circ$ (c 1,5; 1 М NaOH). Выходы на стадии обесцвечивания составили 90—95%.

Гидролиз глюкоз I и II. Для качественного и количественного определения моносахаридного состава 5 мг глюкоза I или II в 0,5 мл 2 М трифторуксусной кислоты нагревали 5 ч при 121° С. Гидролизат упаривали досуха, исследовали БХ, а затем переводили в ацетаты полиолов и анализировали ГЖХ по известному методу [9] с инозитом в качестве внутреннего стандарта. Навески по 0,2 г глюкоза I или II гидролизвали как описано выше, получали D-глюкозу, $[\alpha]_D^{25} +50,5^\circ$ (c 1,25; вода) и $[\alpha]_D^{25} +49^\circ$ (c 0,95; вода) соответственно; лит. [10]: $[\alpha]_D +52,7^\circ$.

Спектроскопия ^{13}C -ЯМР. Спектры ^{13}C -ЯМР глюкоз получали на спектрометре Bruker AM-300 с рабочей частотой по углероду 75,43 МГц для растворов полисахаридов в 2,5% NaOH в D_2O (100 мг в 4 мл) при 30° С. Внутренний стандарт — метанол (50,15 м.д. от тетраметилсилана). Оба глюкоза дали идентичные спектры: 102,57 (С-1), 73,63 (С-2), 75,24 (С-3), 80,30 (С-4), 72,54 (С-5) и 61,64 (С-6) м.д.

Спектрофотометрия иодных комплексов. К навескам по 40 мг амилозы (Serva), амилопектина (Gee Lawson), глюкоза I или глюкоза II приливали последовательно по 1 мл этанола, 2 мл 10% NaOH и 10 мл воды, растворяли полисахариды при нагревании до 75 — 80° С и объем растворов доводили до 100 мл. Далее к аликвотам по 0,5 мл полученных растворов прибавляли по капле 1 М серной кислоты, 0,5 мл раствора иода (0,02 г I_2 + 0,2 г KI в 100 мл воды) и приливали по 4 мл воды. В отличие от методики [7] дополнительное количество KI не прибавляли, так как эта операция приводила к выпадению иодных комплексов полисахаридов в осадок. Растворы перемешивали и измеряли оптическую плотность при 720 и 780 нм; разность этих величин использовали при построении калибровочных графиков для определения амилозы и амилопектина. Установлено, что при одинаковых концентрациях разность оптических плотностей для амилозы превышает соответствующую величину для амилопектина в 4 раза. Этим методом показано, что содержание амилозы в глюкоза I составляет 32%, а в глюкоза II не превышает 1,5%.

Ферментативное определение крахмала. Для ферментативного определения крахмала использовались растворы полисахаридов, приготовленные для спектрофотометрии иодных комплексов (после нейтрализации AcOH), и набор реагентов для анализа крахмала фирмы Boehringer Mannheim. При этом амилоза и амилопектин дали идентичные калибровочные графики; содержание крахмала в глюкозах I и II при определении этим методом составило не менее 99%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барбакадзе В. В., Гахокидзе Р. А., Шенгелия З. С., Усов А. И. // Химия природ. соед. 1989. № 3. С. 330—335.
2. Барбакадзе В. В., Кемертелидзе Э. П., Деканосидзе Г. Е., Усов А. И. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 2. С. 223—227.
3. Usui T., Yamaoka N., Matsuda K., Tuzimura K., Sugiyama H., Seto S. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1973. № 20. P. 2425—2432.
4. Colson P., Jennings H. J., Smith J. C. P. // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. № 26. P. 8081—8087.
5. Ritchie R. G. S., Cyr N., Korsek H. J., Perlin A. S. // Can. J. Chem. 1975. V. 53. № 10. P. 1424—1433.
6. Шашков А. С., Чижов О. С. // Биоорган. химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437—496.
7. Sanyal M., Situkara Rao V., De K. B. // Z. anal. Chem. 1974. B. 271. № 3. S. 208.
8. Барбакадзе В. В., Кемертелидзе Э. П., Деканосидзе Г. Е., Беруцашвили Т. Г., Усов А. И. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 5. С. 671—679.
9. Слонехер Дж. // Методы исследования углеводов / Пер. с англ. под ред. А. Я. Хорлина. М.: Мир, 1975. С. 22—25.

V. V. Barbakadze, E. P. Kemertelidze, H. E. Dekanosidze,
A. I. Usov*

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF GLUCANS FROM
ROOTS OF *Tamus communis* L. (Dioscoreaceae)

I. G. Kutateladze Institute of Pharmacochemistry, Academy of Sciences of
Georgia, Tbilisi;

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

Two glucan preparations differing in solubility in cold water were isolated from roots of *Tamus communis* L. by the hot water extraction. According to ^{13}C NMR spectra, amylolysis, spectrophotometry of iodine complexes and methylation data, both glucans are starch-like polysaccharides. The more soluble glucan is an amylopectin having one branching point per every 20 α -D-glucopyranose residues, whereas the less soluble glucan is a mixture of amylopectin and amylose at a ratio of about 2 : 1.