



УДК 547.458.02 : 577.114.5.088

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

СТРОЕНИЕ ГЛЮКОМАННАНА ИЗ КОРНЕВИЩ КУПЕНЫ
Polygonatum glaberrimum С. КОСН (LILIACEAE)

Институт фармакохимии им. И. Г. Кутателадзе АН Грузии, Тбилиси;
* Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

Из корневищ купены *Polygonatum glaberrimum* выделен экстракцией горячей водой и очищен хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе (после удаления фруктана мягким кислотным гидролизом) ацетилированный глюкоманнан, содержащий *D*-маннозу, *D*-глюкозу и ацетильные группы в соотношении 8 : 1 : 3,5. По данным метилирования и спектра ¹³С-ЯМР, молекулы полисахарида представляют собой линейные цепи, построенные из 1 → 4-связанных остатков β-*D*-маннопиранозы и β-*D*-глюкопиранозы, причем ацетильные группы занимают в остатках маннозы положения 6 или 2 в соотношении 2 : 1.

Глюкоманнаны растений обладают рядом ценных свойств, делающих их перспективными для практического использования в медицине, фармакологической, химической, пищевой и других отраслях промышленности [1, 2]. В одной из наших предыдущих работ [3] было показано, что источником глюкоманнана могут служить корневища купены *Polygonatum glaberrimum*. Данная работа посвящена исследованию строения этого полисахарида. В качестве исходного материала для его получения была использована полисахаридная фракция, выделенная при экстракции корневищ купены горячей водой с выходом около 13% и содержащая глюкоманнан в качестве главного компонента [3]. Эта фракция состояла на 84% из углеводов, причем 35% приходилось на долю фруктозы. Крахмал в ней практически отсутствовал, а в продуктах полного кислотного гидролиза были найдены арабиноза, манноза, галактоза, глюкоза в соотношении 0,18 : 9,6 : 0,4 : 1 и небольшое количество уроновых кислот. На этом основании можно было рассматривать суммарную полисахаридную фракцию как смесь глюкоманнана и фруктана с незначительной примесью кислого арабиногалактана.

В ИК-спектре этой фракции присутствовали полосы поглощения при 1730 и 1240 см⁻¹, характерные для ацетильных групп [4]. Сигналы углеродных атомов этих групп при 21,1—21,4 м.д. и в районе 175 м.д. [5] наблюдались также в спектре ¹³С-ЯМР препарата. Это могло означать, что нативный глюкоманнан является ацетилированным полисахаридом (ср. [6, 7]). Хотя спектр ¹³С-ЯМР смеси полисахаридов не поддавался полной расшифровке, в нем можно было выделить серию сигналов, характерных для растительных фруктофурананов. В частности, в области резонансов С-5 остатков фруктофуранозы наблюдались два сигнала с химическими сдвигами 82,24 и 81,20 м.д., относящиеся соответственно к 1-О- и 6-О-замещенным остаткам β-*D*-фруктофуранозы (ср. [8]). По всей вероятности, фруктан *P. glaberrimum* принадлежит к часто встречающемуся

Анализ продуктов метилирования глюкоманнана методом ГЖХ
в виде ацетатов полиолов

Соединение	Тип замещения	Относительное время удерживания	Относительное содержание
1,5-Ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилманнит	Man1 →	1,0	1
1,4,5-Три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилманнит	→4Man1 →	1,17	42
1,4,5-Три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилсорбит	→4Glc1 →	1,18	6

Таблица 2

Отнесение сигналов (м. д.) в спектре ¹³C-ЯМР глюкоманнана из *P. glaberrimum**

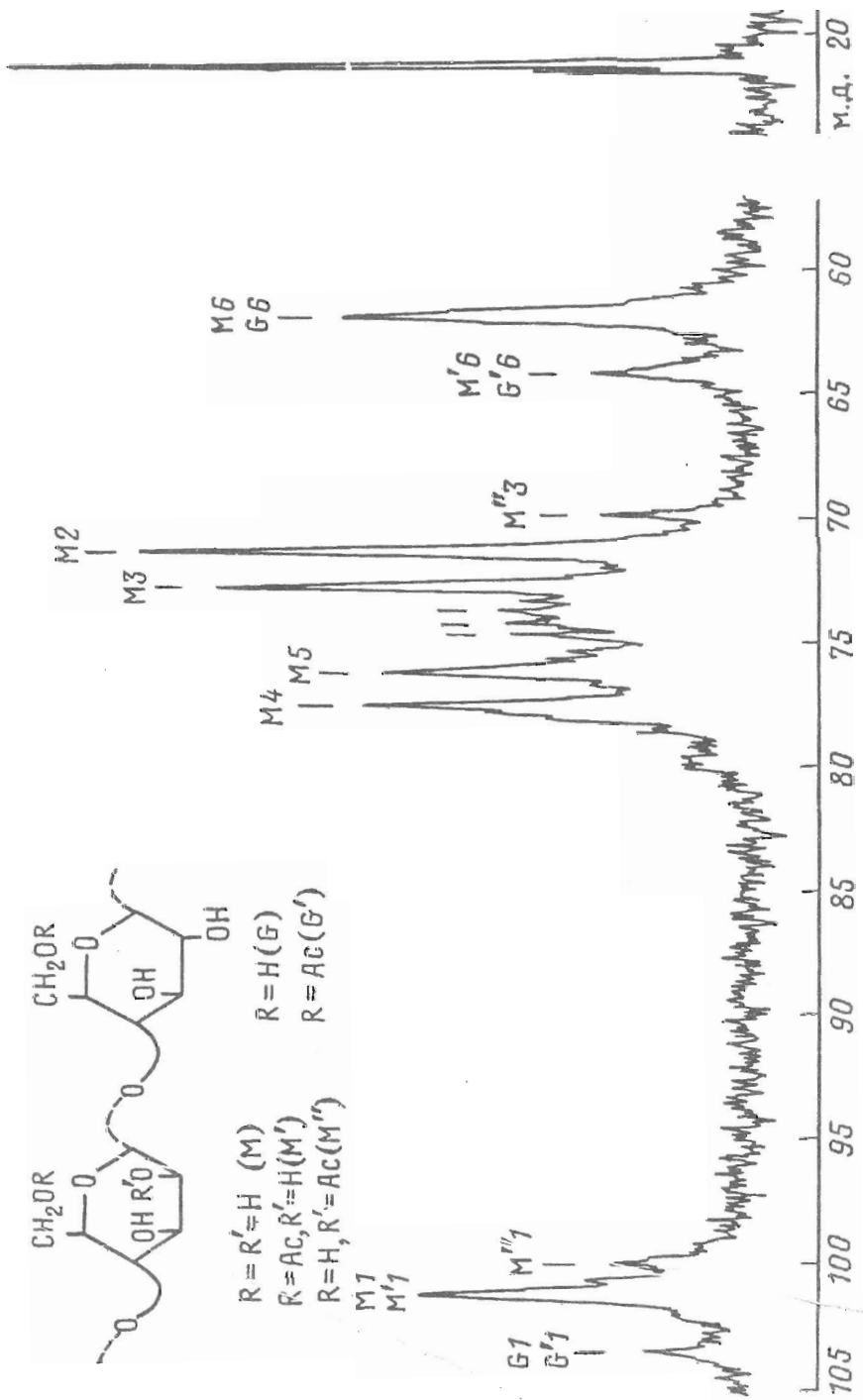
Моносахаридный остаток	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
→4Manβ1 → (M)	101,1	71,2	72,6	77,5	76,1	61,7
→4Manβ1 → (M')					73,5	64,1
6 Ac						
→4Manβ1 → (M'')	99,7	74,1	69,7			
2 Ac						
→4Glcβ1 → (G)	103,4	74,5	76,4	80,0	75,6	61,7
→4Glcβ1 → (G')						64,1
6 Ac						

* Спектр содержит также сигналы при 21,2 и 21,5 м. д. (CH₃) и 173,9 и 174,7 м. д. (C=O) ацетильных групп.

в растениях смешанному типу фруктанов, молекулы которых содержат структурные элементы как инулинового, так и леванового типа [7].

Для получения чистого глюкоманнана было испробовано несколько способов. Осаждение в виде медного комплекса [9] приводило к дезацетилированному глюкоманнану, но не позволяло полностью удалить примеси арабиногалактана и фруктана: полученный препарат содержал 6% фруктозы и давал при полном кислотном гидролизе кроме маннозы и глюкозы также небольшие количества арабинозы и галактозы; при этом полисахарид терял растворимость в воде (ср. [10]). При действии 0,1 н. NaOH на смесь полисахаридов также происходило отщепление ацетильных групп и выпадение в осадок дезацетилированного глюкоманнана; очищенный таким способом полисахарид давал при гидролизе только D-маннозу и D-глюкозу в соотношении 8 : 1. Отнесение этих моносахаридов к D-ряду было сделано после их препаративного выделения из гидролизата и определения удельного вращения.

Ацетилированный глюкоманнан удалось выделить из смеси после мягкого кислотного гидролиза в условиях избирательного расщепления фуранозидных связей, который привел к удалению фруктана, и хроматографии на DEAE-целлюлозе в карбонатной форме [11], с помощью которой была отделена примесь кислого арабиногалактана. Выход водорастворимого ацетилированного глюкоманнана составил 40% от исходной смеси полисахаридов; препарат содержал 10,2%



Спектр ¹³С-ЯМР ацетилированного глюкоманна из *P. glaberrimus* (область резонанса карбонильных групп не показана)

ацетильных групп. При гель-хроматографии на колонках с молселектом G-75 и акрилексом P-100 этот полисахарид давал единственный пик, непосредственно следующий за пиком голубого декстрана 2000 (Pharmacia).

Для выяснения природы межмоносахаридных связей в молекулах глюкоманнана был применен метод метилирования. В качестве исходного соединения использовался дезацетилованный полисахарид, полученный осаждением щелочью. Техника метилирования и анализа продуктов гидролиза метилированного полисахарида методами ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии подробно описана в нашей предыдущей работе [12]. Полнота метилирования достигалась в результате трехкратной обработки полисахарида метилиодидом и щелочью в диметилсульфоксиде [13]. Результаты метилирования глюкоманнана представлены в табл. 1. Как видно из этих данных, в продуктах гидролиза метилированного полисахарида отсутствуют ди- и монометильные производные гексоз, и, следовательно, молекулы глюкоманнана представляют собой линейные цепи, построенные из остатков маннопиранозы и глюкопиранозы с 1 → 4-связями между ними (фуранозные структуры со связями 1 → 5 можно исключить на основании устойчивости полисахарида к мягкому кислотному гидролизу).

Водорастворимый ацетилованный глюкоманнан был охарактеризован спектром ¹³C-ЯМР. При анализе спектра (табл. 2) отнесение сигналов было проведено в соответствии с данными работ [14—17]. Как и следовало ожидать, наиболее интенсивные сигналы в спектре соответствуют шести углеродным атомам 4-О-замещенного остатка β-D-маннопиранозы (рисунок). В аномерной области кроме дополнительного сигнала с химическим сдвигом 103,4 м. д., относящегося к C-1 4-О-замещенного остатка β-D-глюкопиранозы, имеется также сигнал при 99,7 м. д., который можно приписать C-1 остатков β-D-маннопиранозы, ацетилованных в положение 2 (смещение сигнала C-1 в сильное поле на 1,4 м. д. за счет β-эффекта ацетилирования). Такое отнесение подтверждается наличием в спектре сигнала равной интенсивности с химическим сдвигом 69,7 м. д., который должен принадлежать C-3 остатков β-D-маннопиранозы, ацетилованных по C-2 (смещение сигнала C-3 в сильное поле на 2,8 м. д. за счет β-эффекта ацетилирования). Однако главная часть ацетильных групп находится при C-6 остатков β-D-маннопиранозы (а возможно, также и β-D-глюкопиранозы), что следует из наличия сигнала при 64,1 м. д., принадлежащего C-6 ацетилованных моносахаридных остатков (смещение в слабое поле на 2,4 м. д. за счет α-эффекта ацетилирования). Сравнивая интенсивности сигналов углеродных атомов моносахаридных остатков, несущих и не несущих ацетильные группы, можно заключить, что в полисахариде ацетилировано свыше одной трети мономерных звеньев, причем в положении 6 замещено ацетильными группами около 25% остатков β-D-маннопиранозы и β-D-глюкопиранозы, а в положении 2 — около 13% остатков β-D-маннопиранозы.

Таким образом, глюкоманнан из корневищ купены *P. glaberrimum*, подобно многим другим глюкоманнанам высших растений [6, 7], представляет собой линейный полимер из 1 → 4-связанных остатков β-D-маннопиранозы и β-D-глюкопиранозы, которые входят в состав полисахарида в соотношении 8 : 1. Кроме того, полисахарид характеризуется довольно высокой степенью ацетилирования; главная часть ацетильных групп связана с первичными гидроксильными группами моносахаридных остатков, а меньшая находится в положении 2 остатков β-D-маннопиранозы.

Экспериментальная часть

Общие методы анализа состава, условия хроматографического разделения моносахаридов и их производных, масс-спектрометрии, спектрометрии ¹³C-ЯМР, способ метилирования глюкоманнана и анализа продуктов гидролиза метилированного полисахарида см. в работах [8, 12].

Очистка глюкоманнана с помощью раствора Фелинга [9]. 90 мг смеси полисахаридов, полученной при экстракции корней купены горячей водой [3],

растворяли в 9 мл воды. К раствору прибавляли реактив Фелинга до полного осаждения медного комплекса глюкоманнана (4 мл). Через 4 ч осадок отделяли центрифугированием, промывали водой, растирали при 0° С с этанолом, содержащим 5% по объему конц. HCl, промывали этанолом до отрицательной реакции на хлор-ион, затем ацетоном и высушивали в вакууме над P₂O₅. Полученный препарат (выход 56 мг) содержал 6% фруктозы (спектрофотометрическое определение с резорцином — HCl) и давал при полном кислотном гидролизе арабинозу, маннозу, галактозу и глюкозу в соотношении 0,064 : 8,2 : 0,1 : 1 (ГЖХ в виде ацетатов полиолов). Маточный раствор после отделения медного комплекса нейтрализовали уксусной кислотой и диализовали. Полученный бесцветный раствор концентрировали в вакууме и выливали в 4 объема этанола, охлажденного до 0°С. Выпавший осадок промывали ацетоном и высушивали в вакууме над P₂O₅. Получали полисахаридный препарат, содержащий 62,5% фруктозы, а также маннозу, глюкозу, галактозу и следы арабинозы, рамнозы, ксилозы и уроновой кислоты (качественная БХ).

Очистка глюкоманнана омылением щелочью. 100 мг исходной смеси полисахаридов растворяли в 16 мл 0,1 н. NaOH и выдерживали 3 ч при комнатной температуре. Далее раствор нейтрализовали уксусной кислотой, выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали несколько раз водой, затем ацетоном и сушили в вакууме над P₂O₅, получали глюкоманнан (выход 50 мг), в составе которого обнаружили только маннозу и глюкозу в соотношении 8 : 1. Маточный раствор обрабатывали как описано выше. Получали полисахаридный препарат (выход 18 мг), содержащий 75% фруктозы, а также рамнозу, арабинозу, ксилозу, маннозу, галактозу и глюкозу в соотношении 0,5 : 0,36 : 0,26 : 5,9 : 1,67 : 1.

Очистка глюкоманнана мягким гидролизом и хроматографией на DEAE-целлюлозе. Раствор 0,5 г исходной смеси полисахаридов в 50 мл 0,05 М трифторуксусной кислоты нагревали 45 мин при 100° С, раствор диализовали, концентрировали до небольшого объема и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой. Условия хроматографирования описаны в работе [3]. Водный элюат лиофилизовали, получали ацетилованный глюкоманнан (выход 200 мг, $[\alpha]_D^{25}$ —32° (с 1, вода)), в составе которого найдены манноза и глюкоза в соотношении 8 : 1 (фруктоза отсутствовала), а также 10,2% ацетильных групп (количественное определение по методике из работы [18]).

Полный кислотный гидролиз глюкоманнана. Суспензию 0,4 г глюкоманнана, очищенного омылением щелочью, в 40 мл 2 М трифторуксусной кислоты нагревали 5 ч при 121° С, кислоту удаляли многократным упариванием с водой и продукты гидролиза разделяли препаративной БХ в системе растворителей бутанол-1 — пиридин — вода, 6 : 4 : 3. Зоны, соответствующие по подвижности глюкозе ($R_{\text{глю}} 1,0$) и маннозе ($R_{\text{ман}} 1,14$), элюировали водой. После упаривания элюатов получали D-маннозу (выход 134 мг, $[\alpha]_D^{24} +12^\circ$ (с 1,26, вода), лит. [19]: $[\alpha]_D +14,2^\circ$) и D-глюкозу (выход 16 мг, $[\alpha]_D^{24} +49^\circ$ (с 0,73, вода), лит. [19]: $[\alpha]_D +52,7^\circ$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Щербухин В. Д., Афанасьева Е. М., Кузнецов А. А. // Раст. ресурсы. 1984. Т. 20. № 3. С. 416—430.
2. Щербухина Н. К., Кириллина В. Л., Щербухин В. Д. // Раст. ресурсы. 1974. Т. 10. № 4. С. 578—582.
3. Барбакадзе В. В., Гахокидзе Р. А., Шенгелия З. С., Усов А. И. // Химия природ. соед. 1989. № 3. С. 330—335.
4. Сложеникина Л. В., Щербухин В. Д., Степаненко Б. Н. // Докл. АН СССР. 1963. Т. 153. № 4. С. 960—963.
5. Шапков А. С., Чижов О. С. // Бюорган. химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437—496.

6. *Bewley J. D., Reid J. S. G.*//Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants/Eds Dey P. M., Dixon R. A. London: Acad. Press, 1985. P. 289—303.
7. *Meier H., Reid J. S. G.*//Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Plant Carbohydrates/Eds Loewus F. A., Tanner W. Berlin: Springer-Verlag, 1982. V. 13A. P. 418—471.
8. *Барбакадзе В. В., Кемертелидзе Э. П., Беручаишвили Т. Г., Усов А. И.*//Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 5. С. 671—679.
9. *Джонс Дж. К. Н., Студли Р. Дж.* //Методы химии углеводов/Пер. с англ. под ред. Кочеткова Н. К. М.: Мир, 1967. С. 286—288.
10. *Whistler R. L.*//Adv. Chem. Ser. 1973. V. 117. P. 242—254.
11. *Siddiqui J. R., Wood P. J.*//Carbohydr. Res. 1971. V. 16. № 2. P. 452—454.
12. *Барбакадзе В. В., Кемертелидзе Э. П., Деканосидзе Г. Е., Усов А. И.*//Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 2. С. 223—227.
13. *Ciucanu I., Kerek F.*//Carbohydr. Res. 1984. V. 131. № 2. P. 209—217.
14. *Usui T., Mizuno T., Kato K., Tomoda M., Miyajima G.*//Agric. Biol. Chem. 1979. V. 43. № 4. P. 863—865.
15. *Radjabi-Nassab F., Ramiliarison C., Monneret C., Vilkas E.*//Biochimie. 1984. V. 66. № 7—8. P. 563—567.
16. *Джумамуратова А., Рахимов Д. А., Шашков А. С., Кондратенко Е. С.*//Химия природ. соед. 1982. № 1. С. 14—18.
17. *Щербухин В. Д., Шашков А. С.*//Прикл. биохимия и микробиология. 1981. Т. 17. № 4. С. 621—628.
18. *Hestrin S.*//J. Biol. Chem. 1949. V. 180. № 1. P. 249—261.
19. *Stanek J., Cerny M., Kocourek J., Pacak J.* //The Monosaccharides/Eds Ernest J., Hebyk J. Prague: Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, 1963. P. 96—104.

Поступила в редакцию
30.III.1993

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

**STRUCTURE OF A GLUCOMANNAN FROM RHIZOMES OF
Polygonatum glaberrimum C. KOCH (LILIACEAE)**

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

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

Hot water extraction of rhizomes of *Polygonatum glaberrimum* C. Koch. followed by mild acid hydrolysis (to remove a fructan) and chromatography on DEAE-cellulose afforded an acetylated glucomannan containing *D*-mannose, *D*-glucose, and acetyl groups at a molar ratio of 8 : 1 : 3,5. According to the methylation analysis and ¹³C NMR spectral data, the polysaccharide molecules have a linear backbone of 1 → 4-linked β-*D*-mannopyranose and β-*D*-glucopyranose residues. Acetyl groups occupy positions 6 of, probably, both monosaccharide residues as well as position 2 of β-*D*-mannopyranose residues at a ratio of about 2 : 1.