

Ажибаева З.С.

ПОЛИСАХАРИДЫ ACANTOPHYLLUM SUBGLABRUM И СТРУКТУРА ГЛЮКОАРАБИНОГАЛАКТАНА

Agibaeva Z.S.

POLYSACCHARIDES ACANTOPHYLLUM SUBGLABRUM AND STRUCTURE GLYUKOARABINOGALAKTANA

УДК:547.917

Изучается структура водорастворимых полисахаридов, выделенных из корней растений химическим методами. Применяли кислотный гидролиз, определение угла удельного вращения, периодатное окисление, метилирование по методу Хакомори, БХ, ГЖХ – хроматографии и ИК – спектроскопии. Было доказано, что выделенный полисахарид является глюкоарабиногалактан.

The structure of water-soluble polysaccharides isolated from the roots of plants by chemical methods . We used acid hydrolysis, determination of the specific rotation the angel; periodate oxidation of, methylation by the method of Hakomori, BH, GLC - chromatography and IR spectroscopy. It was proved, that the selected polysaccharide is the glyukoarabinogalaktan.

Обсуждение результатов

Растения *A. subglabrum* произрастают сплошными зарослями на пустырях и пастбищах. Сырье заготавливали в Чуйской долине в фазе плодоношения.

Из одной навески сырья сначала были выделены спирторастворимые сахара (СПС) [1], сесквитерпеновые лактоны (СЛ) [2], водорастворимые полисахариды (ВРПС) [3], пектиновые вещества (ПВ) и гемицеллюлоза(ГЦ) [4] (табл. 1).

Таблица 1

Выделенные продукты из растения *A. subglabrum*

Орган растений, тип углевода	СПС, %	СЛ, %	ВРПС, %	пв,%	ГЦ,%
Корни	4,4	0,6	12,6	4,0	5,5
Смесь н/ч (листьев, стеблей, плодов)	3,5	0,3	3,5	2,4	3,6

Как видно из табл. 1, в корнях растений преобладают водорастворимые полисахариды (12,6), поэтому в дальнейшем мы и занялись их изучением.

Выделенные ВРПС представляют собой гигроскопичный слегка желтоватый порошок, хорошо растворимый в воде. При полном кислотном гидролизе образцов при помощи бумажной хроматографии (БХ) в системе с проявителем был идентифицирован рядс, что указывает на то, что эти полисахара являются глюкоарабиногалактоном. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Мономерный состав полисахаридов

Орган растений	Тип углевода	Соотношение моносахаридов					
		Gal	Glc	Man	Xyl	Ara	Rha
Корни	ВРПС	33,5	13,5	-	1,0	1,0	1,5
	пв	1,5	1,7	1,0	-	6,0	1,1
	ГЦ	3,5	7,2	3,0	4,2	2,2	1,0
Н/ч	ВРПС	47,6	-	2,0	1,0	2,2	2,0
	пв	7,2	7,5	2,0	1,0	2,5	5,0
	ГЦ	15,3	15,0	"4,3	4,4	2,0	1,0

Изучается структура водорастворимых полисахаридов, выделенных из корней растений химическими методами. Применяли кислотный гидролиз, определение угла удельного вращения, периодатное окисление, метилирование по методу Хакомори, БХ. ГЖХ-хроматографии и ИК- спектроскопии. Было доказано, что выделенный полисахарид является глюкоарабиногалактан.

Присутствие уроновой кислоты говорит о том, что выделенные ВРПС являются смесью нейтральных и кислых полисахаридов. ВРПС разделяли на колонке с ДЭАЭ - целлюлозой в карбонатной форме. Выход нейтрального полисахарида (НПС), который элюировался водой, составляет 53% от веса исходного ВРПС. В гидролизатах, полученных при гидролизе НПС серной кислотой обнаружили глюкозу, галактозу и арабинозу, следовательно, НПС является глюкоарабиногалактоном. Выход полисахарида, который элюировался 0,5 н раствором NaOH, составляет 17%. Кислый полисахарид (КПС) (после кислотного гидролиза) содержит галактозу, глюкозу, арабинозу, рамнозу и галактурооновую кислоту.

Гель - хроматографией на сефадексе G-75 [5] было установлено, что НПС оказались полидисперсными, молекулярная масса (ММ) которых составляла от 2000 до 4500.

Для получения гомогенного полисахарида НПС фракционировали, осаждали этиловым спиртом из 5% - ного водного раствора и получили четыре фракции со свойствами, показанными в табл.3.

Как видно из таблицы 3, фракции I, II, III отличаются по ММ и по выходу (фракцию IV не изучали так, как она составляет незначительное количество). Значения угла удельного вращения [6] определяли на сахариметре СУ-3. Полисахариды (фракции I, II и III) не дают реакции с йодом на крахмал.

Таблица 3

Характеристика фракции I, II и III НПС

Фракция	Выход, % фракции от веса НПС	$[\alpha]_D^{20}$ (C 1,0; H ₂ O)	Вязкость $\eta_{отн}$ (C 1,0; H ₂ O)	ММ по гель-хроматографии	Соотношение Сахаров Glc: Gal: Ara	Степень полимеризации (СП)
I	16,0	169°	1,0	4400	4:13:1	2400
II	74,0	174°	1,02	3800	1,2:5,5:1	2100
III	7,5	181°	1,01	2000	6,5:17:1	1100
IV	-	-	-	-	-	-

По данным гель - хроматографии на сефадексе G-50 фракции I, II и III оказались гомогенными, ММ фракций определяли по кривой по известным декстрановым стандартам [7].

В количественном отношении преобладало содержание фракции II, структуру которой мы изучали в дальнейшем.

Глюкоарабиногалактан - слегка желтоватый аморфный порошок, хорошо растворимый в воде, с образованием вязких растворов.

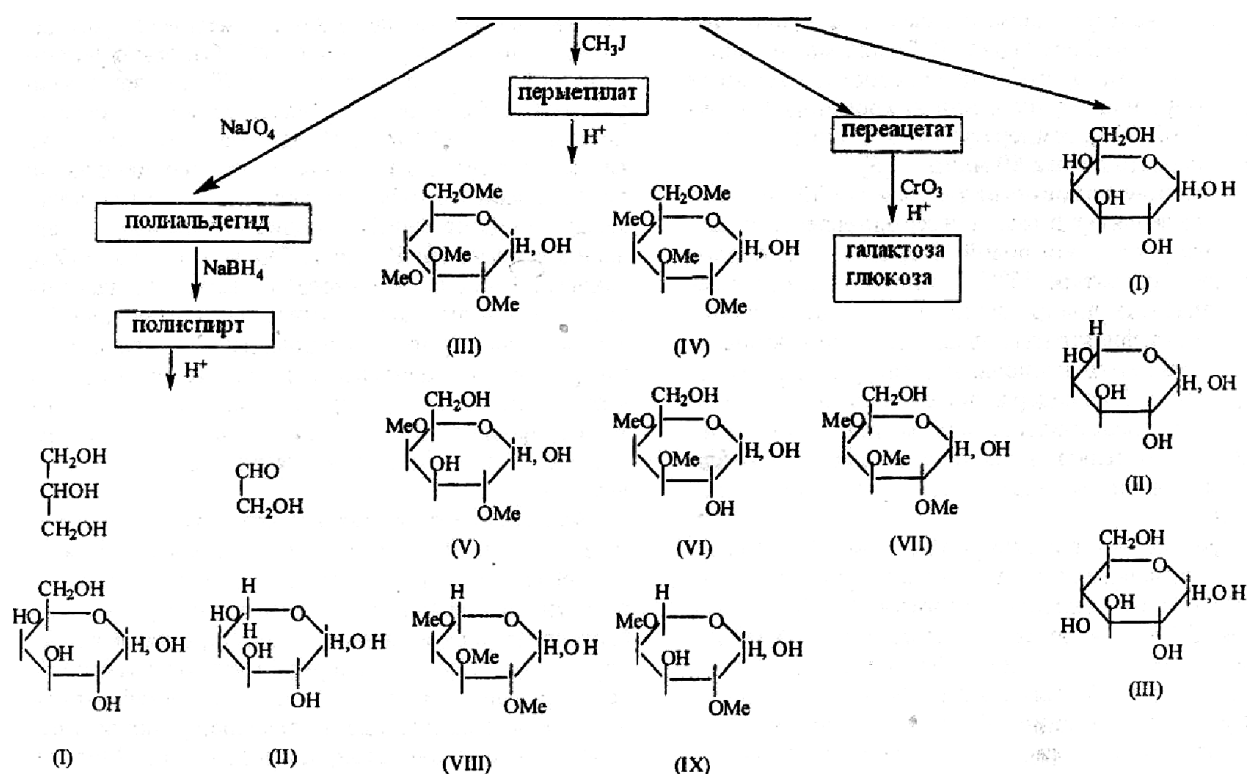
В Ж- спектрах глюкоарабиногалактонов присутствуют полосы поглощения 860,920, 1080,1153,1420, 1658, 2932, 3360, 3475 см-1 и отсутствуют полосы поглощения, соответствующие метальным, ацетильным и сульфатным группам.

Для установления строения глюкоарабиногалакта- на применяли методы метилирования [9], периодатно- го [8] и хромового окисления (схема 1).

Периодатное окисление фракций II полисахарида проводили при комнатной температуре 0,1н раствором периодата натрия. Пробу на анализ отбирали через каждые 24 часа. Установлено что для полного окисления достаточно 130 часов, далее расход периодата натрия не менялся.

При периодатном окислении на 1 моль ангидрозвена полисахарида расходуется 1,3 моль периодата натрия, при этом выделяется 0,50 моль муравьиной кислоты. После восстановления боргидридом натрия, в продуктах распада по Смити методами БХ и ГЖХ обнаружили глицерин, галактозу и арабинозу, что свидетельствует о нагичии 1→2, 1→3 и 1→6 связи между моносахаридными остатками арбинозы и галактозы, имеющие 1→3 гликозидные связи.

Изучение строения глюкоарабиногалактана фракции II из A. Subglabrum



Затем глюкоарабиногалактан метилировали по методу Хакомори [9]. Этот метод используется для выяснения природы моносахаридных связей в молекуле полисахаридов. Для полного метилирования фракции II достаточно было провести двухкратное метилирование. Полноту метилирования контролировали тонкослойной хроматографией (ТСХ) в системе метанол-хлороформ (1:9), проявителем использовали конц H_2SO_4 .

Как правило, метилированные продукты плохо растворяются в воде, поэтому сначала проводили формолиз, а затем кислотный гидролиз. Продукты анализировали БХ, ТСХ и ГЖХ и идентифицировали (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) и (IX) в соотношениях 4:3:2:4:7:1:2 соответственно.

Наличие 2,3,4 - три-О-Ме -Galp (VII) говорит о том, что главная цепь полисахарида имеет (1→6) связанные остатки Galp D - галактозы, обнаружение 2,3,4,6- тетра О- Ме -Galp (III) и 2,3,4,6 - тетра- О-Ме - Glerp (IV) указывают на то, что на невосстанавливающихся концах находятся остатки Д - галактозы и Д- глюкозы. Присутствие 3,4-ди-О-Ме- Galp (VI) и 2,4- ди- О- Ме- Galp (V) доказывает, что в основной цепи глюкоарабиногалактана по С-2 и С-3 галактопиранозы имеют разветвления. Обнаружение 2,3,4- три- О- Ме- Агар (VIII) и 2,4 - ди -О - Ме- Агар (IX) показывает, что короткая цепочка находится в боковой цепи, где L- арабинопиранозные остатки связаны между собой 1-3 связями.

Фракцию II глюкоарабиногалактан подвергали хромовому окислению и в продуктах окисления присутствовали остатки глюкозы и галактозы. Окислению подвергаются остатки арабинопиранозы, которые соединены между собой Р - гликозидными связями, поэтому свободные остатки арабинозы в этом случае не обнаруживаются. Следовательно, в основной цепи фракции II остатки Д - галактозы соединены Р- гликозидной связью.

Заключение

Выше указанные данные позволили установить, что нейтральный полисахарид, выделенный из корней *A. subglabrum* является смесью трех Сахаров глюкоарабиногалактанов, состоящих из Д-глюкопиранозных, Д-галактопиранозных и Д- арабинопиранозных остатков.

Экспериментальная часть.

Бумажную хроматографию (БХ) проводили на бумаге Filtrax FW- 7,11 (ГДР) нисходящим методом с использованием системы н бутанол - пиридин - вода (6:4:3). Для обнаружения соединений применяли проявитель- кислый анилинфталат с последующим нагреванием при 110°C в сушильном шкафу.

Тонкослойную хроматографию проводили на силуфолу UV - 254 (Chemapol). При этом использовали следующие системы:

1. н бутанол - пиридин - вода (6:4:3);
2. хлороформ - метанол (9:1);
3. Бензол-ацетон (2:1).

Для обнаружения соединений применяли следующие проявители:

1. Кислый анилинфталат;
2. Периодат натрия;
4. Концентрированная серная кислота.

ИК- спектры снимали на приборе UR- 20 в таблетках КВг. [6]

Газожидкостную хроматографию (ГЖХ) образцов проводили на приборе "Цвет 101" с плазменно- ионизационным детектором. Условия: сорбент - 20%-ный поли-1,4-бутандаолсукцинимид на хроматоне W-AW-DMCS (0,16 x200), температура 190°C, газ- носитель- гелий, скорость потока 60 мл/мин. [6]

Выделение полисахарида. Навеску 300 г сырья после выделения фруктозанов и сесквитерпеновых лактонов экстрагировали водой (1:6) в течение одного часа при температуре 75°C при постоянном перемешивании. После фильтрации экстракцию шрота повторяли еще раз, фильтраты объединяли. Отфильтрованный экстракт концентрировали в вакууме при температуре 30-35°C до содержания сухих веществ 10% и осаждали полисахариды этиловым спиртом (1:2). Через 24 часа отделяли выпавший осадок, промывали 96%-ным этиловым спиртом, ацетоном, эфиром. Выход 75г.

Определение молекулярной массы (ММ). Навеску 0,02 г отдельных фракций полисахарида растворяли в 2 мл воды и вносили в колонку (1,2x54) с сефадексом G-75. Элюент собирали по 2,0 мл. Колонку калибровали пропуская образцы декстранов с ММ 10000 ($V_e = 37,8$ мл), инулина 5000 ($V_e = 48,6$ мл).

Фракционирование. К 100 мл 2% -ного водного раствора полисахарида добавляли последовательно 5 раз по 50 мл этанола и получили 4 фракции. Каждую фракцию отделяли центрифугированием и промыванием этанолом и ацетоном. Угол удельного вращения определяли на сахариметре СУ - 3 в трубке длиной 10 см, объемом 6,5 мл при 22°C.

Кислотный гидролиз. По 0,1 г образцов по 10 мл 0,5% - ной HCl гидролизovali на кипящей водяной бане в течение 45 мин. Гидролизат нейтрализовывали карбонатом кальция до pH 7, фильтровали, концентрировали на роторном испарителе. Остаток анализировали методом БХ в системе 1, проявитель 1. На хроматограммах были обнаружены глюкоза, галактоза, рамноза, ксилоза и галактуронозная кислота.

Периодатное окисление и распад по Смитту. Навески 0,2 г образцов полисахарида растворяли в 50 мл воды, добавляли 10 мл 0,5н раствора периодата натрия. Смесь выдерживали в темноте при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Через сутки отбирали пробы на анализ. Расход периодата натрия оставался постоянным в течении 130 часов и далее не изменялся. Выделившуюся муравьиную кислоту определяли титрованием 0,1 н раствором едкого натрия.

По окончании избыток периодат-иона удаляли прибавлением 3 капель этиленгликоля, далее смесь восстанавливали боргидридом натрия (0,12) фильтровали и полученную смесь подвергали диализу, затем нейтрализовали на катионите КУ -2 (H⁺ - форма) до нейтральной реакции. Раствор концентрировали под вакуумом, прибавляли 2-4 мл 0,5н серной кислоты и гидролизovali на кипящей водяной бане в течение 4-х часов. После гидролиза смесь нейтрализовали в вакууме, остаток анализировали Методом БХ (система 1, проявители 2,3).

Метилирование по Хакомори. Навеску 0,02 г полисахарида растворяли в 2 мл диметилсульфоксида (ДМСО) при температуре 40-50°С. Отдельно растворяли 0,01 г гидрида натрия в 2 мл ДМСО при температуре 40-50°С в течение 3 часов до появления зелено- синей окраски, затем объединяли его с раствором глюкофруктана и выдерживали при перемешивании на магнитной мешалке в течение 5- 6 часов в токе азота. Далее прибавляли 1 мл иодистого метила и оставляли в темноте 10-12 часов. Смесь разлагали добавлением 3-4 капель 10% -ного раствора гипосульфита натрия и диализовали. Раствор экстрагировали 4-хкратно хлороформом, объединяли все хлороформные экстракты и концентрировали до сиропа. Полноту метилирования контролировали методом ТСХ (система 1, проявитель - реагент -1). Для достижения исчерпывающего метилирования операцию повторяли дважды.

Формолиз и гидролиз перметилатов. Полностью метилированный продукт концентрировали до сиропа, добавляли 5 мл муравьиной кислоты, нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 часа, далее прибавляли метанол и упаривали досуха, остаток гидролизovali в 2,5 мл 0,5 н серной кислоты в течение 6 часов на кипящей водяной бане. После нейтрализации карбонатом бария до нейтральной реакции смесь фильтровали и концентрировали до сиропа. Метилированные продукты анализировали методом ТСХ (система 2,3, проявитель - реагент 1,4). Количественное соотношение метилированных соединений определяли методом ГЖХ.

Литература:

1. Плеханова Н.В., Турдумамбетов К., Бердинеева А., Федорченко Г.П. Способ получения фруктозанов. А.С. № 955928 СССР. -1981. - БИ. №33
2. Луговская С. А., Плеханова Н.В.,Орозбаев К. Алантолактан из *Inula grandis* // Химия природных соединений. - 1976.-X21.-С. 110.
3. Турдумамбетов К.,Усубалиева Г.К., Жоробекова Ш.Ж. Исследование углеводов *C. sporodoccephala* Jus и установление структуры их глюкофруктанов // Известия НАБ КР. 1999.-№2.-С. 34-38.
4. Афанасьева Е.М. Полисахариды клубнекорней некоторых видов *Egremurus* Bisb. // Растительные ресурсы. -1972. -Т. 8.-№2.-С. 192-200.
5. Детерман Г. Гель - хроматография. - М. - 1970.
6. Verstraeten L.M. Y. Infrared spectra of some 2 - kestoses. // Anal. Chem. -1964. - V. 36. - № 6. - P. 1040 -1044.
7. Dubies M., Gilles K.A.,Homilton J., Reber P.A., Smiith F. Colormetric method for determination of sugars fhd related substamces. // Anal. Chem. - 1955. V. 28. - № 3. - P.350 - 356.
8. Smith F., Montgomery R. The chemistry of Plant Cums and Mucilages // Reinold Publishing corp: New York: London, 1959. - V.6. - P. 197-201.
9. Nakomori S.A. Rapidermethylation of glucolipid and Polysacharides, catalized by methyl sylatinil carbanion in dimethylsulfoxide // J. Biochem (Tokyo). -1964. - V.55. - P. 205 -208.

Рецензент: к.хим.н. Литвиненко Т.А.