



УДК 547.917

© 1993 г. В. В. Барбакадзе, Э. П. Кемертелидзе, Г. Е. Деканосидзе,
А. И. Усов *СТРОЕНИЕ ГАЛАКТОГЛЮКОМАННАНА ИЗ НЕЗРЕЛЫХ ПЛОДОВ
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 незрелых плодов тамуса обыкновенного выделен и очищен осаждением в виде медного комплекса галактоглокоманнан, содержащий *D*-маннозу, *D*-глюкозу и *D*-галактозу в соотношении 4 : 1 : 0,5. По данным метилирования и спектра ¹³C-ЯМР, молекулы полисахарида имеют главную цепь, построенную из 1 → 4-связанных остатков β-*D*-маннопиранозы и β-*D*-глюкопиранозы, а остатки α-*D*-галактопиранозы присоединены в положение 6 некоторых маннозных остатков главной цепи в виде единичных ответвлений.

Тамус обыкновенный (Адамов корень), представитель семейства диоскорейных, находит довольно широкое применение в народной медицине. Корни, листья и плоды этого растения используют как противораковое средство [1] и для лечения гнойничковой сыпи и пародонтоза в стоматологии [2]; кроме того, корни употребляются при ревматических болях, радикулитах и ишиасе [3]. Химический состав растения изучен мало. В одной из предыдущих работ [4] мы сообщали о выделении и предварительной характеристике полисахаридов из плодов тамуса. Было установлено, что высушенные незрелые плоды содержат 27%, а зрелые — только 1,5% водорастворимых полисахаридов. Эти вещества резко различались по моносахаридному составу, на основании которого первый препарат был отнесен к галактоглокоманнанам, тогда как второй представлял собой сложный полисахарид пектинового типа с примесью крахмала.

Данная работа посвящена исследованию строения галактоглокоманнана из незрелых плодов *Tamus communis* L. Выделение полисахарида проводили как описано ранее [4]. Дополнительная очистка осаждением в виде медного комплекса [5] не изменяла моносахаридного состава полимера. Очищенный препарат галактоглокоманнана, $[\alpha]_D^{24} -4^\circ$ (с 1, вода), содержал 96% сахаров и давал при полном кислотном гидролизе *D*-маннозу, *D*-глюкозу и *D*-галактозу в соотношении 4 : 1 : 0,5. Отнесение этих моносахаридов к *D*-ряду было сделано на основании данных их удельных вращений. При гель-хроматографии [6] на колонках с молселектом G-75 и акрилексом P-100 полисахарид давал единственный пик, непосредственно следующий за пиком голубого декстрана-2000 (Pharmacia).

Для выяснения природы межмономерных связей в молекулах галактоглокоманнана был применен метод метилирования. Превращение гидроксильных групп в метиловые эфиры проводили действием метилиодида и щелочи в диметилсульфоксиде [7]. Полнота замещения достигалась в результате трехкратной обработки. Метиловые эфиры моносахаридов, полученные после гидролиза метилированного полисахарида, восстанавливали NaBH₄, ацетилировали и полученные смеси ацетатов частично метилированных полиолов анализировали методом ГЖХ [8]. Идентификацию веществ проводили сравнением с заведомыми образцами и с

Анализ продуктов метилирования галактоглоукоманнана методом ГЖХ

Вещество	Тип замещения	Относительное время удерживания	Относительное содержание
1,5-Ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилманнит	Man1 →	1	1
1,5-Ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилдудульцит	Gal1 →	1,03	6
1,4,5-Три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилманнит	→ 4Man1 →	1,16	41
1,4,5-Три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилсорбит	→ 4Glc1 →	1,18	12
1,4,5,6-Тetra-О-ацетил-2,3-ди-О-метилманнит	→ 6Man →	1,35	6

помощью хроматомасс-спектрометрии [9]. Результаты метилирования галактоглоукоманнана представлены в табл. 1.

Наиболее вероятная интерпретация результатов метилирования состоит в следующем: молекулы галактоглоукоманнана содержат главную цепь, построенную из остатков маннопиранозы и глюкопиранозы с 1 → 4-связями между ними; все остатки галактозы занимают концевые положения, имеют пиранозную форму и присоединены к главной цепи в положения 6 части остатков маннозы в виде единичных ответвлений.

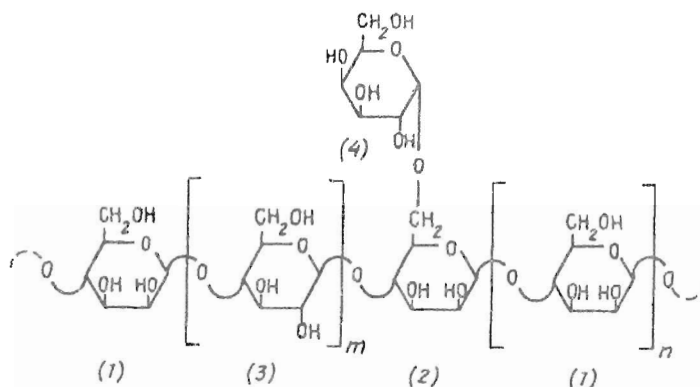
Этот предварительный вывод был полностью подтвержден при анализе спектра ^{13}C -ЯМР галактоглоукоманнана (табл. 2), полное отнесение сигнала в котором было проведено в соответствии с данными работ [10—16]. В этом спектре наиболее интенсивные сигналы соответствуют углеродным атомам остатков маннозы, а менее интенсивные — углеродным атомам остатков глюкозы. Из положения этих сигналов однозначно следует, что остатки глюкозы и маннозы находятся в пиранозной форме: для фуранозных форм этих моносахаридов характерны сигналы C-6 при 64—65 м. д. независимо от конфигурации гликозидных центров [16], но в спектре исследуемого полисахарида эта область свободна. В аномерной области спектра имеются сигналы с химическими сдвигами 101,04 и 103,32 м. д., принадлежащие C-1 остатков β -D-маннопиранозы и β -D-глюкопиранозы соответственно [11, 14]. Количественное соотношение этих остатков, рассчитанное из интегральных интенсивностей сигналов C-1, составляет 3,8 : 1. Сигналы с химическими сдвигами 77,4 и 79,56 м. д. свидетельствуют, что и остатки маннозы, и остатки глюкозы замещены в положении 4 [11, 14]. Важную информацию несут слабые сигналы с химическими сдвигами 99,9 и 69,7 м. д.: первый из них соответствует C-1 остатков α -D-галактопиранозы, а второй — C-6 замещенных в положении 6 остатков маннозы [12, 13]. Как в спектре ^{13}C -ЯМР, так и в ИК-спектре полисахарида, полученного без дополнительной очистки медного комплекса, отсутствуют сигналы (20—21 и 174—176 м. д.) и полосы поглощения (1250 и 1735 cm^{-1}), характерные для О-ацетильных групп.

Таким образом, галактоглоукоманнан из незрелых плодов *T. communis* аналогично многим галактоглоукоманнанам высших растений [17—19] содержит главную цепь из 1 → 4-связанных остатков β -D-маннопиранозы и β -D-глюкопиранозы. К части остатков маннозы главной цепи в положение 6 в виде единичных ответвлений присоединены остатки α -D-галактопиранозы.

Экспериментальная часть

ВХ проводили нисходящим способом на бумаге Filtrac FN-11 в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3). Зоны восстанавливающих сахаров на бумаге обнаруживали кислым фталатом анилина.

ГЖХ ацетатов полиолов проводили на хроматографе Pye-Unicam 104 с пла-

Отнесение сигналов м. д. в спектре ^{13}C -ЯМР галактоглокоманнана из *T. communis*

Остаток сахара	C1	C2	C3	C4	C5	C6
β -D-маннозил						
1	101,04	71,05	72,48	77,4	76,04	61,56
2						69,7
β -D-глюкозил						
3	103,32	74,01	75,07	79,56	75,8	61,56
α -D-галактозил						
4	99,9					

менно-ионизационным детектором (колонка $0,6 \times 120$ см с 3% ECNSS-M на газхроме Q; 180°C , скорость N_2 60 мл/мин), а ацетатов частично метилированных полиолов — на хроматографе Hewlett — Packard 5890 A с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой Ultra-1 и интегратором HP 3393 A (условия: 150°C (1 мин) \rightarrow 290°C , $5^\circ\text{C}/\text{мин}$). Хроматомасс-спектрометрию ацетатов частично метилированных полиолов осуществляли на хроматографе HP 5890 A с масс-селективным детектором HP 5970 B и капиллярной колонкой HP-1 ($0,2 \text{ мм} \times 10 \text{ м}$; хроматография при 130°C (1 мин) \rightarrow 200°C , $5^\circ\text{C}/\text{мин}$, далее $200 \rightarrow 290^\circ\text{C}$, $10^\circ\text{C}/\text{мин}$, энергия ионизирующего пучка электронов 70 эВ).

Спектры ^{13}C -ЯМР получали на спектрометре Bruker AM-300 с рабочей частотой по углероду 75,43 МГц для раствора полисахарида в $^2\text{H}_2\text{O}$ (100 мг в 3,0 мл) при 30°C (внутренний стандарт — метанол, 50,15 м. д. от Me_4Si).

ИК-спектры снимали на приборе UR-10, спектрофотометрические определения проводили на приборе СФ-26, оптическое вращение измеряли на поляриметрах Jasco Dip-360 и АI-ЕПО (ВНИИЭКПРОДМАШ).

Количественное определение общих сахаров выполняли по реакции с фенолом и конц. H_2SO_4 и калибровочному графику для маннозы [20].

Для качественного и количественного определения моносахаридного состава 5 мг полисахаридного препарата в 0,5 мл 2 н. H_2SO_4 нагревали 5 ч при 100°C , нейтрализовали BaCO_3 , фильтрат деионизировали катионитом КУ-2 (H^+ -форма), исследовали БХ, а затем переводили в ацетаты полиолов и анализировали ГЖХ по известному методу [21] с инозитом в качестве внутреннего стандарта.

Очистка галактоглокоманнана с помощью раствора Фелинга [5]. К раствору 100 мг полисахарида в 10 мл воды прибавляли реактив Фелинга до полного осаждения медного комплекса. Через 4 ч осадок центрифугировали, промывали водой и разлагали, растирая при 0°C со спиртом, содержащим 5% по объему конц. HCl . Остаток промывали спиртом до отрицательной реакции на хлор-ион, ацетоном и сушили в вакууме над P_2O_5 . Выход 60 мг. Очищенный таким

способом галактоглокоманнан гидролизovali, восстанавливали NaBH_4 , ацетилировали [21], анализировали ГЖХ и определяли соотношение манноза — глюкоза — галактоза (4 : 1 : 0,5). Маточник после отделения медного комплекса нейтрализовали уксусной кислотой и диализовали. Диализат концентрировали до небольшого объема и выливали в спирт, охлажденный до 0° С; выпавшие в осадок полисахариды промывали ацетоном и сушили в вакууме над P_2O_5 . Выход 8 мг. Гидролизат этой фракции по данным ГЖХ содержал рамнозу, арабинозу, ксилозу, маннозу, глюкозу и галактозу в соотношении 0,15 : 0,3 : 1,2 : 3,6 : 1 : 1,6, а по БХ — небольшое количество уроновой кислоты.

Гидролиз галактоглокоманнана. Гидролизат 0,5 г галактоглокоманнана разделяли препаративной БХ. Зоны, соответствующие галактозе ($R_{\text{Gal}} 1,0$), глюкозе ($R_{\text{Gal}} 1,14$) и маннозе ($R_{\text{Gal}} 1,3$), элюировали водой, элюаты упаривали, получали D-маннозу (выход 170 мг, $[\alpha]_D^{26} +12,5^\circ$ (с 1,2, вода), лит. [22]: $[\alpha]_D +14,2^\circ$), D-глюкозу (выход 39 мг, $[\alpha]_D^{26} +51^\circ$ (с 0,86, вода), лит. [22]: $[\alpha]_D +52,7^\circ$) и D-галактозу (выход 20 мг, $[\alpha]_D^{26} +78^\circ$ (с 0,8, вода), лит. [22]: $[\alpha]_D +80,2^\circ$).

Метилирование галактоглокоманнана [7]. К раствору 8 мг полисахарида в 1 мл DMSO прибавляли 0,2 мл MeI и 20 мг порошка NaOH, перемешивали на магнитной мешалке 2—3 ч при комнатной температуре. Затем разбавляли 2—4 мл воды, прибавляли 2—4 мл хлороформа, встряхивали, диализовали и упаривали досуха. Полноту метилирования контролировали по отсутствию полосы поглощения гидроксильной группы в ИК-спектре при 3400—3600 cm^{-1} . Раствор 2 мг метилированного полисахарида в 0,5 мл муравьиной кислоты нагревали 1 ч при 100° С, упаривали досуха, затем приливали 0,5 мл 2 М трифторуксусной кислоты и нагревали еще 4 ч при 100° С. Полученный раствор упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл 1 М NH_4OH , восстанавливали NaBH_4 , ацетилировали [8] и полученную смесь ацетатов частично метилированных полиолов анализировали ГЖХ и хроматомасс-спектрометрически.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hartwell J. L. // Lloydia. 1969. V. 32. № 1. P. 79—107.
2. Чуроллинов П. // Фитотерапия в дерматологии и косметике / Пер. с болг. под ред. Илиевой А. София: Медицина и физкультура, 1979. С. 132.
3. Гаммерман А. Ф. Лекарственные растения (Растения-целители). М.: Высш. школа, 1976. С. 247—248.
4. Барбакадзе В. В., Гахокидзе Р. А., Шенгелия З. С., Усов А. И. // Химия природ. соед. 1989. № 3. С. 330—335.
5. Джонс Дж. К. Н., Студли Р. Дж. // Методы химии углеводов / Пер. с англ. под ред. Кочеткова Н. К. М.: Мир, 1967. С. 286—288.
6. Детерман Г. // Гель-хроматография / Пер. с нем. под ред. Хохлова А. С. М.: Мир, 1970.
7. Ciucanu I., Kerek F. // Carbohydr. Res. 1984. V. 131. № 2. P. 209—217.
8. Джонс Г. Дж. // Методы исследования углеводов / Пер. с англ. под ред. Хорлина А. Я. М.: Мир, 1975. С. 26—27.
9. Björndal H., Helleqvist C. G., Lindberg B., Svensson S. // Angew. Chem. Engl. Int. Ed. 1970. V. 9. № 5. P. 610—619.
10. Usui T., Mizuno T., Kato K., Tomoda M., Miyajima G. // Agric. Biol. Chem. 1979. V. 43. № 4. P. 863—865.
11. Radjabi-Nassab F., Ramilarison C., Monneret C., Vilkas E. // Biochimie. 1984. V. 66. P. 563—567.
12. Akiyama Y., Eda S., Mori M., Kato K. // Phytochemistry. 1983. V. 22. № 5. P. 1177—1180.
13. Cartier N., Chambat G., Joseleau J. P. // Phytochemistry. 1988. V. 27. № 5. P. 1361—1364.
14. Джумамуратова А., Рахимов Д. А., Шапков А. С., Кондратенко Е. С. // Химия природ. соед. 1982. № 1. С. 14—18.
15. Шапков А. С., Чижов О. С. // Биоорг. химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437—496.
16. Ritchie R. G. S., Cyr N., Kosch B., Koch H. J., Perlin A. S. // Can. J. Chem. 1975. V. 53. № 10. P. 1424—1433.
17. 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.
18. Meier H., Reid J. S. C. // Encyclopedia of Plant Physiology / New Series. Plant Carbohydrates I. Intracellular Carbohydrates. V. 13A / Eds Loewus F. A., Tanner W. Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 1982. P. 418—471.
19. Stephen A. M. // The Polysaccharides. V. 2. / Ed. Aspinall G. O. N. Y.: Acad. Press, 1983. P. 97—193.

20. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 3. P. 350—356.
21. Слонекер Дж. // Методы исследования углеводов / Пер. с англ. под ред. Хорлина А. Я. М.: Мир, 1975. С. 22—25.
22. Stanek J., Cerný M., Kocourek J., Pačák J. // The Monosaccharides / Eds Ernest I., Hebký J. Prague: Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, 1963. P. 96—104.

Поступила в редакцию
1.IX.1992

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

STRUCTURE OF A GALACTOGLUCOMANNAN FROM UNRIPE FRUITS OF *Tamus communis* L. (Dioscoreaceae)

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

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

Hot water extraction of unripe fruits of *Tamus communis* L. followed by precipitation of the copper complex afforded a galactoglucomannan containing *D*-mannose, *D*-glucose, and *D*-galactose at a molar ratio of 4,0:1:0,5. The structure of the polysaccharide was studied by methylation and ¹³C-NMR spectroscopy. Like many other galactoglucomannans of higher plants, the polysaccharide was shown to contain a backbone built of 1→4-linked β-*D*-mannopyranose and β-*D*-glucopyranose residues, α-*D*-galactopyranose residues being attached as single branches to some mannosyl residues of the backbone at position 6.