



УДК 547.458.02:577.114.5.088

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛЮКОМАННА ИЗ ЛУКОВИЦ ПРОЛЕСКИ *Scilla sibirica* HAW. (LILIACEAE)

© 1996 г. В. В. Барбакадзе, И. Л. Таргамадзе, А. И. Усов*[#]

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

* Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
117913, Москва, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 12.05.95 г.

Из луковиц пролески *Scilla sibirica* выделен экстракцией горячей водой и очищен амилолизом и хроматографией на DEAE-целлюлозе (после удаления фруктана мягким кислотным гидролизом) ацетилированный глюкоманнан, содержащий *D*-маннозу, *D*-глюкозу и ацетильные группы в соотношении 7.7 : 1 : 2.4. По данным метилирования и спектра ¹³C-ЯМР, молекулы полисахарида представляют собой линейные цепи, построенные из 1 → 4-связанных остатков β-*D*-маннопиранозы и β-*D*-глюкопиранозы, причем ацетильные группы, по-видимому, случайным образом распределены по всем возможным гидроксильным группам моносахаридных остатков.

Ключевые слова: ацетилированный глюкоманнан; *Scilla sibirica*.

Пролеска *Scilla sibirica* широко распространена в лесах и кустарниках по всему Кавказу [1]. Из биологически активных соединений, содержащихся в растениях этого вида и других представителях рода *Scilla*, внимание исследователей привлекали сапонины, флавоноиды, алкалоиды [2]. В то же время полисахаридный состав этих растений изучен недостаточно: описаны лишь обнаружение амилопектина и инулина в луковицах *S. chinensis* [3], а также выделение и структурная характеристика глюкоманнана из семян *S. non-scripta* [4]. Продолжая изучение полисахаридов растений семейства Liliaceae, мы посвятили данную работу выделению и установлению строения глюкоманнана из луковиц *S. sibirica*.

Суммарный препарат водорастворимых полисахаридов был получен при экстракции луковиц *S. sibirica* горячей водой с выходом 12.5%. Он состоял на 83% из углеводов, причем 10% приходилось на долю фруктозы. В продуктах полного кислотного гидролиза были найдены также арабиноза, манноза, галактоза, глюкоза и галактуронозная кислота (последний моносахарид был идентифицирован методом ГЖХ в виде ацетата полиола после двукратного восстановления, как описано в работе [5]). На этом основании можно было рассматривать суммарный полисахаридный препарат как смесь глюкоманнана, крахмала,

фруктана и кислого арабиногалактана. Для удаления крахмала препарат подвергали амилолизу [6], после чего фруктан разрушали мягким кислотным гидролизом в условиях избирательного расщепления фуранозидных связей [7], а кислый арабиногалактан отделяли ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в карбонатной форме [8]. Выход очищенного таким способом глюкоманнана составил 21% от суммарного препарата. При полном кислотном гидролизе с последующим количественным определением освобождающихся моносахаридов методом ГЖХ в виде ацетатов альдононитрилов [9] в глюкоманнана было найдено 86.6% сахаров, из которых на маннозу приходилось 76.6%, а на глюкозу – 10%. Отнесение этих моносахаридов к *D*-ряду было сделано после препаративного выделения их из гидролизата и определения удельного вращения. В ИК-спектре полисахарида присутствовали полосы поглощения при 1730 и 1240 см⁻¹, характерные для ацетильных групп [10]. Сигналы углеродных атомов этих групп при 21.4 м. д. и в районе 175 м. д. [11] наблюдались также в спектре ¹³C-ЯМР препарата. Это могло означать, что нативный глюкоманнан является ацетилированным полисахаридом. Действительно, при количественном определении в полисахариде было найдено 6.2% ацетильных групп. Глюкоманнан довольно хорошо растворялся в воде, давая прозрачные вязкие растворы, и имел отрицательное удельное

[#] Автор для переписки.

вращение, $[\alpha]_D^{25} - 39.5^\circ$ (c 1; вода), указывающее, как и в других растительных глюкоманнанах, на β -конфигурацию гликозидных центров [12]. 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. Использовались методики метилирования и анализа продуктов гидролиза метилированного полисахарида в виде ацетатов полиолов методами ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии, аналогичные описанным в одной из наших предыдущих работ [13]. Деацетилирование и превращение гидроксильных групп в метиловые эфиры достигались в результате трехкратной обработки полисахарида метилиодидом и щелочью в диметилсульфоксиде [14]. Полноту метилирования определяли по отсутствию полосы поглощения гидроксильной группы при $3400 - 3600 \text{ см}^{-1}$ в ИК-спектре препарата. В продуктах гидролиза метилированного полисахарида были обнаружены ацетаты 2,3,6-три-О-метилманнита и 2,3,6-три-О-метилсорбита в соотношении 5.3 : 1 и небольшое количество ацетата 2,3,4,6-тетра-О-метилманнита, происходящего из концевых невосстанавливающих моносахаридных остатков. Ди- и монометиловые производные гексоз отсутствовали; это означало, что молекулы глюкоманнана линейны и построены из остатков маннопиранозы и глюкопиранозы с $1 \rightarrow 4$ -связями между ними (фуранозные структуры со связями $1 \rightarrow 5$ можно исключить на основании устойчивости полисахарида к мягкому кислотному гидролизу).

Водорастворимый ацетилованный глюкоманнан был охарактеризован спектром ^{13}C -ЯМР, анализ которого проводили как описано в работе [7]. Спектр подтвердил результаты метилирования полисахарида. Положение шести главных сигналов в спектре (С-1 101.2; С-2 71.2; С-3 72.7; С-4 77.5; С-5 76.2; С-6 61.8 м. д.) соответствуют резонансам углеродных атомов 4-замещенного остатка β -D-маннопиранозы, тогда как аналогичная серия минорных сигналов (С-1 103.5; С-2 74.6; С-4 78.7; С-5 75.6 м. д.) обусловлена наличием в образце 4-замещенных остатков β -D-глюкопиранозы. Исходя из интенсивности сигнала при 21.4 м. д. (CH_3 ацетилованных групп), можно заключить, что в полисахариде ацетилован приблизительно каждый четвертый моносахарид. В то же время незначительная интенсивность сигналов при 64.1 м. д. (С-6 ацетилованных по этому положению гексопиранозных остатков) и при 99.7 м. д. (С-1 ацетилованных по С-2 остатков D-маннопиранозы) свидетельствует, что ацети-

льные группы не занимают предпочтительно эти положения, как в случае полисахарида из купены [7], а довольно хаотически распределены по всем возможным гидроксильным группам полимерной молекулы, как это наблюдалось, например, в случае глюкоманнанов из *Aloe plicatilis* [15] и ряда других представителей семейства Liliaceae [16].

Таким образом, глюкоманнан из лукович пролески *S. sibirica* подобно многим известным глюкоманнанам высших растений [12, 17] представляет собой линейный полимер из $1 \rightarrow 4$ -связанных остатков β -D-маннопиранозы и β -D-глюкопиранозы, которые входят в состав данного полисахарида в соотношении 7.7 : 1. Кроме того, полисахарид ацетилован, и ацетиловые группы случайным образом распределены по гидроксильным группам полисахаридной цепи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Луковичи *S. sibirica* собирали в окрестностях Тбилиси в апреле 1993 г. Предварительную обработку растительного материала и выделение суммарного препарата водорастворимых полисахаридов проводили как описано ранее [5].

Для количественного определения моносахаридного состава 5 мг полисахарида в 1 мл 2 М трифторуксусной кислоты, содержащей мио-инозит (внутренний стандарт, 0.9 мг/мл), нагревали 8 ч при 100°C , гидролизат трижды упаривали досуха в вакууме, прибавляя по 10 мл этанола. Полученные сахара переводили в ацетилованные альдононитрилы по стандартной методике [9] и определяли методом ГЖХ.

ГЖХ выполняли на хроматографе Hewlett-Packard 5890А с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой HP Ultra-1 и интегратором HP 3393А. Условия: 150°C (1 мин) \rightarrow 290°C , $5^\circ/\text{мин}$ для ацетатов частично метилованных полиолов и 175°C (1 мин) \rightarrow 290°C , $10^\circ/\text{мин}$ для ацетилованных альдононитрилов. Хроматомасс-спектрометрию ацетатов частично метилованных полиолов проводили на таком же хроматографе с масс-селективным детектором HP 5970В. 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 2% раствора полисахарида в $^2\text{H}_2\text{O}$ 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 поляриметре Jasco DIP-360.

Очистка глюкоманнана амилолизом, мягким гидролизом и хроматографией на DEAE-целлюлозе. Суммарный препарат водорастворимых полисахаридов (0.5 г) подвергали амилолизу, как описано в работе [5], получали полимерный остаток с выходом 205 мг. Раствор 200 мг этого препарата в 20 мл 0.05 М трифторуксусной кислоты нагревали 45 мин при 100°C, диализовали, концентрировали в вакууме до небольшого объема и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой в карбонатной форме. Условия хроматографирования описаны в работе [5]. Водный элюат лиофилизировали, получали ацетилированный глюкоманнан с выходом 105 мг, $[\alpha]_D^{24} -39.5^\circ$ (с 1.064; вода), в составе которого найдены манноза и глюкоза в соотношении 7.7 : 1 (другие сахара отсутствовали), а также 6.2% ацетильных групп (количественное спектрофотометрическое определение по реакции с гидроксиламином – FeCl₃ [18]).

Полный кислотный гидролиз глюкоманнана. Раствор 0.4 г глюкоманнана в 40 мл 2 М трифторуксусной кислоты нагревали 5 ч при 121°C, кислоту удаляли многократным упариванием с водой и продукты гидролиза разделяли с помощью препаративной БХ в системе растворителей бутанол-1-пиридин-вода, 6 : 4 : 3. Зоны, соответствующие по подвижности глюкозе (R_{Glc} 1.0) и маннозе (R_{Glc} 1.12), элюировали водой. После упаривания элюатов получали D-маннозу (выход 122 мг, $[\alpha]_D^{24} +12.5^\circ$ (с 1.34; вода), лит. [19]: $[\alpha]_D +14.2^\circ$) и D-глюкозу (выход 13 мг, $[\alpha]_D^{24} +49.5^\circ$ (с 0.76; вода), лит. [19]: $[\alpha]_D +52.7^\circ$).

Метилирование глюкоманнана. К раствору 10 мг полисахарида в 1 мл DMSO прибавляли 0.2 мл MeI и 20 мг порошкообразного NaOH. После перемешивания на магнитной мешалке в течение 2 - 3 ч при комнатной температуре реакционную смесь разбавляли 4 мл воды, прибавляли 4 мл хлороформа, перемешивали, диализовали и упаривали досуха. После трехкратной обработки в описанных условиях поглощения при 3400 - 3600 см⁻¹ в ИК-спектре образца отсутствовала. Раствор 2 мг метилированного полисахарида в 0.5 мл 85% муравьиной кислоты нагревали 1 ч при 100°C, упаривали досуха, к остатку приливали 0.5 мл 2 М трифторуксусной кислоты и нагревали еще 4 ч при 100°C. Полученный раствор упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл 1 М NH₄OH, обрабатывали избытком NaBH₄ и ацетилировали [20]. В полученной смеси методами ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии обнаружили ацетаты 2,3,4,6-тетра-О-метилманнита, 2,3,6-три-О-метилманнита и 2,3,6-три-О-метилсорбита в соотношении 1 : 32 : 6.

Авторы приносят глубокую благодарность сотруднику ИОХ РАН А.С. Шашкову за получение и участие в интерпретации спектра ¹³C-ЯМР глюкоманнана, а также сотруднику Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН В.Л. Садовской за проведение хроматомасс-спектрометрического анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Декоративные травянистые растения для открытого грунта. Т. 2 / Ред. Н.А. Аврорин. Л.: Наука, 1977. С. 201 - 206.
2. Растительные ресурсы России и сопредельных государств: цветковые растения, их химический состав, использование; семейства *Butomaceae* - *Turphaceae* / Ред. П.Б. Соколов. СПб.: Наука, 1994. С. 50.
3. Nakatsu S. // *Seikagaku*. 1971. V. 43. P. 823 - 826; С. А. 1972. V. 77. 2762 p.
4. Thompson J.L., Jones J.K.N. // *Can. J. Chem.* 1964. V. 42. P. 1088 - 1091.
5. Барбакадзе В.В., Гахокидзе Р.А., Шенгелия З.С., Усов А.И. // *Химия природ. соед.* 1989. С. 330 - 335.
6. Peat S., Turvey J.R., Evans J.M. // *J. Chem. Soc.* 1959. P. 3341 - 3344.
7. Барбакадзе В.В., Кемертелидзе Э.П., Деканосидзе Г.Е., Усов А.И. // *Биоорганич. химия*. 1993. Т. 19. С. 805 - 810.
8. Siddiqui J.R., Wood P.J. // *Carbohydr. Res.* 1971. V. 16. P. 452 - 454.
9. Morrison I.M. // *J. Chromatogr.* 1975. V. 108. P. 361 - 364.
10. Сложеникина Л.В., Щербухин В.Д., Степаненко Б.Н. // *Докл. АН СССР*. 1963. Т. 153. С. 960 - 963.
11. Шашков А.С., Чижов О.С. // *Биоорганич. химия*. 1976. Т. 2. С. 437 - 496.
12. Meier H., Reid J.S.G. // *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Plant Carbohydrates*. V. 13A / Eds F.A. Loewus, W. Tanner. В.: Springer-Verlag, 1982. P. 418 - 471.
13. Барбакадзе В.В., Кемертелидзе Э.П., Деканосидзе Г.Е., Усов А.И. // *Биоорганич. химия*. 1993. Т. 19. С. 223 - 227.
14. Ciucanu I., Kerek F. // *Carbohydr. Res.* 1984. V. 131. P. 209 - 217.
15. Paulsen B.S., Fagerheim E., Overbye E. // *Carbohydr. Res.* 1978. V. 60. P. 345 - 351.
16. Tomoda M., Satoh N. // *Chem. Pharm. Bull.* 1979. V. 27. P. 468 - 474.
17. Bewley J.D., Reid J.S.G. // *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants* / Eds P.M. Dey, R.A. Dixon. L.: Acad. Press, 1985. P. 289 - 303.
18. Hestrin S. // *J. Biol. Chem.* 1949. V. 180. P. 249 - 261.

19. Stanek J., Cerny M., Kocourek J., Pacak J. // The Monosaccharides / Eds I. Ernest, J. Hebky. Prague: Publ. House Czech. Acad. Sci., 1963. P. 96 - 104.
20. Джонс Г.Дж. // Методы исследования углеводов: Пер. с англ. / Ред. А.Я. Хорлин. М.: Мир, 1975. С. 26 - 37.

Isolation and Investigation of a Glucomannan from *Scilla sibirica* Haw. (Liliaceae) Bulbs

V. V. Barbakadze*, I. L. Targamadze*, and A. I. Usov**¹

* Kutateladze Institute of Pharmacochemistry, Academy of Sciences of the Republic of Georgia, Tbilisi, 380059 Georgia

** Zelinskii Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 117913 Russia

Abstract—An acetylated glucomannan containing *D*-mannose, *D*-glucose, and acetyl groups in a 7.7 : 1 : 2.4 ratio was isolated from the *Scilla sibirica* bulbs by hot water extraction and purified by amylolysis and chromatography on DEAE-cellulose (after elimination of fructan by mild acid hydrolysis). According to the methylation and ¹³C NMR data, the polysaccharide molecule has a linear backbone built up of 1 → 4-linked β-*D*-mannopyranose and β-*D*-glucopyranose residues. The acetyl groups seem to be randomly distributed among all the hydroxyl groups of the polymeric chain.

Key words: acetylated glucomannan, *Scilla sibirica*.

¹To whom correspondence should be addressed.