



УДК 577.114:547.458.88:539.143.43

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИСАХАРИДОВ ПИЖМЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© 2001 г. А. Я. Полле, Р. Г. Оводова<sup>#</sup>, А. С. Шашков\*, Ю. С. ОводовИнститут физиологии Коми НЦ УрО РАН,  
167982, Сыктывкар, Первомайская, 50;

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

Поступила в редакцию 17.07.2000 г. Принята к печати 04.08.2000 г.

Из соцветий, побегов и корней пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), широко распространенной на Европейском севере России, экстракцией 0.75% водным оксалатом аммония выделены полисахаридные фракции: соответственно танацетаны TVF, TVS и TVR. В состав углеводной цепи танацетана TVF входят остатки *D*-галактуроновой кислоты (61.4%), арабинозы (14.7%), галактозы (10.2%) и рамнозы (3.7%) в качестве основных компонентов, остатки ксилозы, глюкозы, маннозы, апиозы и 2-*O*-метилксилозы в следовых количествах. Танацетаны TVS и TVR различаются по количественному моносахаридному составу и содержат 67 и 28% галактуроновой кислоты соответственно. В результате частичного кислотного гидролиза танацетана TVF получен полисахаридный фрагмент TVF1, который представляет собой  $\alpha$ -1,4-*D*-галактуронан (содержание GalA 98.2%). Ферментативное расщепление пектиназой ( $\alpha$ -1,4-*D*-полигалактуронозой) приводит к фрагменту TVF3, содержащему кроме остатков GalA (28.4%), остатки Aga (27.1%) и Gal (17.3%). Методом ЯМР идентифицированы концевые остатки  $\alpha$ -Aga и  $\beta$ -Galp и показано присутствие остатков  $\alpha$ -Aga, замещенных в 3.5- и 5-положения. Таким образом, доказано, что танацетан TVF является пектиновым полисахаридом.

**Ключевые слова:** полисахариды; пижма; пектины, арабиногалактаны; танацетаны; ЯМР-спектрокопия полисахаридов.

### ВВЕДЕНИЕ

Растения рода *Tanacetum* включают около 200 видов, многие из которых входят в состав флоры Европы и, в частности, России [1]. Пижма обыкновенная *T. vulgare* широко распространена во многих районах России, включая Республику Коми. Из различных видов пижмы выделено большое число физиологически активных низкомолекулярных соединений, в первую очередь, флавоноидов и терпеноидов [1].

Большой интерес к пижме *T. vulgare* определяется ее широким использованием в народной медицине для лечения кишечных заболеваний, язвенной болезни, ревматизма, а также наличием высокой антибактериальной и антигельминтной активности соединений, входящих в ее состав [1, 2]. В то же время о химическом строении и физиологической активности полисахаридов пижмы *T. vulgare* имеются лишь очень ограниченные сведения.

Ранее [3] установлено, что сумма полисахаридов обладает выраженной противоязвенной активностью. При предварительном изучении полисахаридов, выделенных из пижмы *T. vulgare* в фазе массового цветения, было показано, что

49.3% веса сухого полисахаридного препарата составляет галактуроновая кислота, на основании чего сделан вывод о возможной принадлежности полисахаридов пижмы *T. vulgare* к классу пектинов [3]. Другие сведения о химической структуре и биологической активности полисахаридов, относящиеся к данному растению, в литературе отсутствуют.

Ранее нами было описано выделение из сухого сырья надземной части пижмы *T. vulgare* последовательной экстракцией водой и водными растворами различных фракций пектинового полисахарида, названного танацетаном, и выявлено антиатерогенное действие полисахаридов *T. vulgare*, в частности, связывание липопротеидов низкой плотности [4].

Настоящая работа посвящена выделению и общей химической характеристике полисахаридов пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выделения танацетанов из *T. vulgare* нами был взят за основу метод [5], в котором используется экстракция водным раствором оксалата аммония свежесобранного растительного сырья, предварительно обработанного водным раствором фор-

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел./факс: (8212) 42-10-01; e-mail: ovoys@physiol.komisc.ru).

**Таблица 1.** Характеристика танацетанов из соцветий (TVF), побегов (TVS) и корней (TVR) *T. vulgare*

Характеристика	TVF	TVS	TVR
Выход*, %	2.0	1.3	0.7
Содержание, %			
Белок	4.0	12.9	34.9
GalA	61.4	67.1	28.2
Ara	14.7	3.9	1.1
Gal	10.2	3.0	1.5
Rha	3.7	1.5	0.6
Glc	0.5	0.8	2.2
Man	0.3	0.4	0.4
Xyl	0.4	0.6	0.1
Api	сл.	–	–
2MeXyl	сл.	–	–

\* В пересчете на сырой вес растительного сырья.

**Таблица 2.** Характеристика фрагментов танацетана TVF после частичного кислотного гидролиза (TVF1) и ферментализации (TVF2, TVF3)

Характеристика	TVF1	TVF2	TVF3
Выход*, %	48.1	23.7	13.5
Содержание, %			
Белок	0.8	10.1	10.7
GalA	98.2	29.9	28.4
Ara	–	28.1	27.1
Gal	1.0	16.8	17.3
Rha	1.0	11.6	11.9
Glc	0.5	2.2	3.0
Man	–	0.9	1.3
Xyl	–	сл.	1.0
Api	–	сл.	сл.
2MeXyl	–	сл.	сл.

\* От исходного танацетана TVF.

малина и подкисленной водой (рН 4). Благодаря этому методу из соцветий, побегов и корней *T. vulgare* получены соответственно танацетаны TVF, TVS и TVR с выходами 2.0, 1.3 и 0.7% в пересчете на сырой растительный материал (табл. 1).

Как видно из табл. 1, в состав углеводной цепи танацетанов TVF и TVS входят остатки галактуроновой кислоты, арабинозы, галактозы и рамнозы в качестве основных компонентов, а остатки ксилозы, глюкозы, маннозы, апиозы и 2-О-метилксилозы присутствуют в следовых количествах. Танацетан TVR, выделенный из корней, заметно отличается по количественному моносахаридному составу и характеризуется низким содержанием галактуроновой кислоты и повышенным содержанием белка (табл. 1).

Галактуроновая кислота была получена при полном кислотном гидролизе танацетанов TVF,

TVS и TVR 2 М трифторуксусной кислотой (TFA) и идентифицирована с помощью газо-жидкостной хроматографии в виде перацетата метилгликозидов [6].

В результате частичного кислотного гидролиза танацетана TVF разбавленной TFA (0.1 М, 100°C, 3 ч) был получен фрагмент танацетана TVF1, который представляет собой полигалактуронан с содержанием остатков галактуроновой кислоты 98.2% (табл. 2) и имеет высокое положительное удельное вращение  $[\alpha]_D^{20} + 246.3^\circ$  (с 0.1; вода), характерное для  $\alpha$ -1,4-*D*-галактуронана. Из этих данных следует, что галактуроновая кислота, входящая в состав танацетана TVF, имеет *D*-конфигурацию.

Как видно из рис. 1, спектральные данные свидетельствуют о наличии в углеводной цепи участков из  $\alpha$ -1,4-связанных остатков *D*-галактуроно-

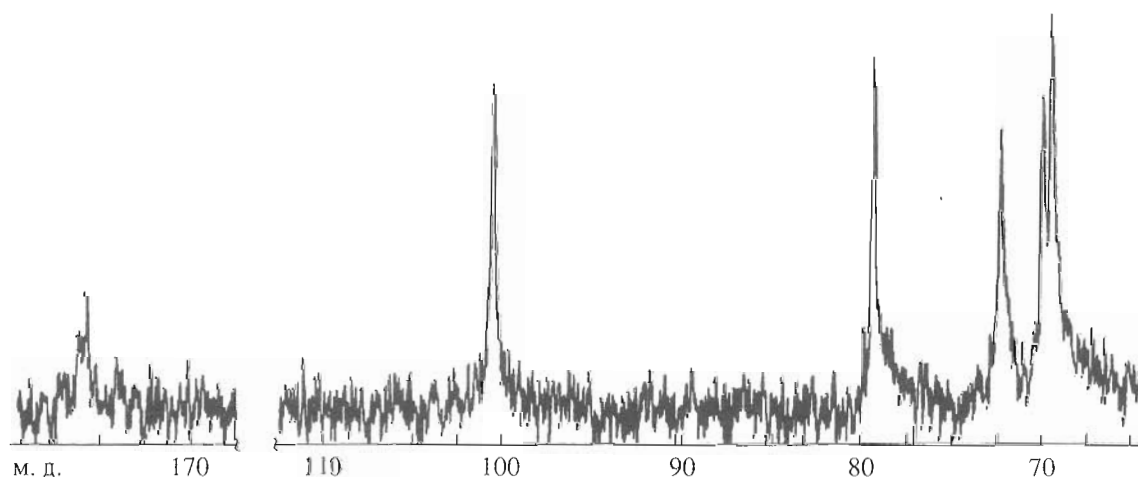


Рис. 1. Спектр <sup>13</sup>С-ЯМР  $\alpha$ -1,4-*D*-галактуронана TVF1.

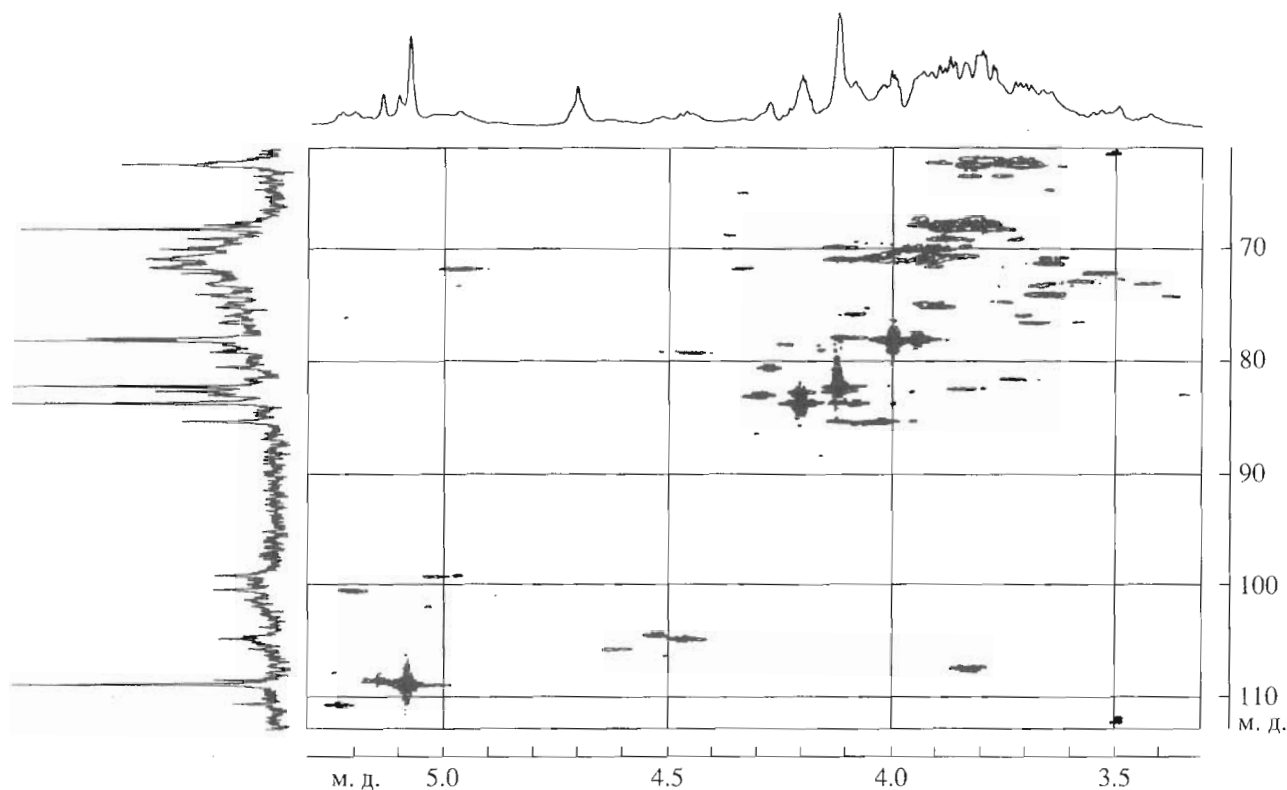


Рис. 2. Спектр  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC фрагмента TVF3.

вой кислоты, которые дают сигнал аномального углеродного атома при 100.6 м.д. Положение сигналов (69.5; 70.0; 79.4; 72.3 и 175.9 м.д.) остальных атомов остатков *D*-галактуроновой кислоты соответствует таковому для  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров заведомого  $\alpha$ -1,4-*D*-галактопиранозилуронана [7].

Хорошо известно, что пектиновые полисахариды, содержащие остатки  $\alpha$ -1,4-*D*-связанной галактуроновой кислоты, подвергаются ферментативному расщеплению пектиназой ( $\alpha$ -1,4-*D*-полигалактуронозой). После обработки TVF этим ферментом (3 ч) получен полисахаридный фрагмент TVF2, состоящий 23.7% исходного танацетана TVF, и, следовательно,  $\alpha$ -1,4-*D*-галактуронан представляет собой главную углеводную цепь танацетана. В состав углеводной цепи фрагмента TVF2 входят остатки галактуроновой кислоты, арабинозы, галактозы и рамнозы в качестве основных компонентов, остатки ксилозы, глюкозы, маннозы, апиозы и 2-*O*-метилксилозы в следовых количествах (табл. 2). В супернатанте после ферментативного расщепления с помощью хроматографии на бумаге была обнаружена свободная галактуроно-вая кислота.

При дальнейшем ферментативном гидролизе пектиназой фрагмента TVF2 получен полисахаридный фрагмент TVF3, имеющий положительное

удельное вращение  $[\alpha]_D^{20} + 20^\circ$  (с 0.1; вода). В качестве главных компонентов углеводной цепи в состав фрагмента TVF3 входят остатки галактуроно-вой кислоты, арабинозы, галактозы и рамно-зы. Как видно из табл. 2, фрагменты TVF2 и TVF3 практически не отличаются друг от друга, что свидетельствует о полноте ферментативного гид-ролиза, достигаемой уже при однократной обра-ботке ферментом.

Положение сигналов в гетероядерном спектре  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC (рис. 2) полисахаридного фрагмента TVF3 указывает на наличие остатков  $\alpha$ -арабино-фуранозы, замещенных в 3.5- и 5-положения, а также терминальных остатков  $\alpha$ -арабинофура-нозы и  $\beta$ -галактопиранозы (табл. 3) [8]. Сигналы рамнопиранозы обнаружены только в протонном спектре, в COSY и TOCSY (H1 5.03; H2 4.04; H3 3.82; H4 3.40; H5 3.60; H6 1.22). H-C-корреляция не содержит пиков остатка рамнозы, так что тип замещения остатков данного моносахарида опре-делить не удалось. Сигналы, принадлежащие галак-туроновой кислоте не обнаружены, возможно, из-за частичного перекрытия их в протонном спек-тре с сигналами арабинозы и сильного уширения. В спектре ROESY достоверны лишь пики H1/H2, H4, H5a, H5b арабинофуранозы, подтверждаю-щие наличие 1  $\rightarrow$  5-связи.

Таблица 3. Положение сигналов в спектрах <sup>13</sup>C-ЯМР и <sup>1</sup>H-ЯМР полисахаридного фрагмента TVF3

Остаток*	Химические сдвиги, δ, м.д. <sup>13</sup> C и <sup>1</sup> H					
	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
α-Araf-(1 → 5	108.4/5.13	82.5/4.12	78.0/3.94	84.3/4.02	62.6/3.82; 3.71	–
α-Araf-(1 → 3	110.3/5.22	82.7/4.20	78.0/3.94	84.3/4.12	62.6/3.82; 3.79	–
→ 5)-α-Araf-(1 →	108.8/5.08	82.2/4.12	78.1/4.00	83.8/4.20	68.2/3.87; 3.79	–
→ 3,5)-α-Araf-(1 →	108.7/5.11	80.5/4.28	84.3/4.08	83.0/4.30	67.9/3.93; 3.83	–
β-Galp-(1 →	104.8/4.47	72.2/3.53	74.0/3.66	70.9/4.11	76.4/3.68	62.1/3.78

\* Интерпретация данных сделана как описано для пектина томатов в работе [8].

Результаты частичного кислотного и ферментативного гидролиза танацетана TVF подтверждают, что он является пектиновым полисахаридом.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Растительный материал.** Сбор надземной части *T. vulgare* проводили в фазу массового цветения растения в июле в окрестностях г. Сыктывкара. Корни *T. vulgare* собирали в октябре, когда растение завершило стадию плодоношения.

**Общие аналитические методы.** Общее содержание гликуроновых кислот определяли по реакции с конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и с 3,5-диметилфенолом [9] и калибровочному графику для галактуроновой кислоты, содержание белка – по методу Лоури [10] и калибровочному графику для сывороточного бычьего альбумина. Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Ultrospec 3000 (Англия).

Спектры ЯМР снимали на приборе DRX-500 фирмы Bruker (Германия) для 3–5% растворов полисахаридов в D<sub>2</sub>O при 343 К (внутренний стандарт – ацетон, δ<sub>H</sub> 2.225 м.д., δ<sub>C</sub> 31.45 м.д.). Для снятия двумерных спектров использовали стандартные методики фирмы Bruker.

Оптическое вращение определяли на приборе Polartronic MНZ (Германия) при 20°C в воде.

ГЖХ выполняли на приборе Hewlett-Packard 4890А (США) с плазменно-ионизационным детектором и интегратором HP 3395А на капиллярной колонке RTX-1 (0.25 мм × 30 м), газ-носитель – аргон. Качественное и количественное определение нейтральных моносахаридов проводили в виде соответствующих ацетатов полиолов [10]. Галактуроновую кислоту идентифицировали в виде полных ацетатов метилгликозидов по методике [6]. Температурный режим: для ацетатов полиолов – 175°C (1 мин) → 250°C (2 мин), Δ3°/мин; для метилгликозидов – 150°C (1 мин) → 290°C (2 мин), Δ5°/мин.

Для нисходящей БХ использовали систему растворителей *n*-бутанол–пиридин–вода, 6 : 4 : 3 на бумаге Filtrak FN-4, обнаружение моносахаридов до-

стигалось с помощью кислого анилинфталата при 105°C.

Все водные растворы концентрировали в вакууме при 40–45°C, центрифугировали при 5000–6000 об./мин в течение 10–20 мин, высушивали лиофильно.

**Получение полисахаридных фракций.** Из свежесобранных соцветий (1714 г), побегов (970 г) и корней (260 г) *T. vulgare* выделили танацетаны TVF, TVS и TVR с выходами 33.9, 13.1 и 1.9 г соответственно по методу, описанному ранее [5].

**Полный кислотный гидролиз.** К навеске 3–5 мг полисахаридной фракции приливали 1 мл 2 М TFA, содержащей *мио*-инозит (0.5 мг/мл) в качестве внутреннего стандарта. Смесь нагревали 4 ч при 100°C, кислоту удаляли многократным упариванием досуха с метанолом. Моносахариды идентифицировали методом ГЖХ [11].

**Частичный кислотный гидролиз.** К танацетану TVF (105.1 мг) добавляли 20 мл 0.1 М TFA и нагревали 3 ч при 100°C. Не растворившийся остаток отделяли центрифугированием, промывали метанолом до отсутствия моносахаридов в супернатанте, растворяли в воде с добавлением аммиака до рН 5.0 и лиофилизировали. Получили полисахаридный фрагмент TVF1 (выход 50.6 мг).

**Ферментативный гидролиз.** Танацетан TVF (499.3 мг) растворяли в 50 мл воды, добавляли водный раствор пектиназы (10 мг, Ferbak, Berlin), смесь инкубировали в диализном мешке с одновременным диализом против дист. воды при 37°C в течение 3 ч. Пектиназу дезактивировали кипячением при 100°C и удаляли центрифугированием. Полученный раствор концентрировали и осаждали четырьмя объемами 96% этанола. Выпавший осадок отделяли центрифугированием и промывали метанолом до отсутствия свободной галактуроновой кислоты, растворяли в воде и лиофилизировали. Получили фрагмент TVF2 (118.4 мг). Полученный фрагмент TVF2 (100 мг) растворяли в 10 мл воды, добавляли 2 мг пектиназы и обрабатывали как описано выше. Получили полисахаридный фрагмент TVF3 (67.4 мг).



Авторы выражают благодарность к.х.н. Билан М.И. (Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва) за оказанную техническую помощь.

Работа поддержана Научным советом "Химия и технология переработки возобновляемого растительного сырья", грант ХТРС № 8.1.13.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abad M.J., Bermejo P., Villar A. // *Phytother. Res.* 1995. V. 9. P. 79–92.
2. Минаева В.Г. Лекарственные растения Сибири. Новосибирск: Наука, 1970. С. 157–158.
3. Сыроева К.Н., Горин А.Г., Яковлев А.И. // *Раст. ресурсы.* 1979. Т. 15. С. 89–91.
4. Полле А.Я., Оводова Р.Г., Попов С.В. // *Хим. раст. сырья.* 1999. № 1. С. 33–38.
5. Ovodova R.G., Vaskovsky V.E., Ovodov Yu.S. // *Carbohydr. Res.* 1968. V. 6. P. 328–332.
6. Perepelov A.V., Babicka D., Shashkov A.S., Arbatsky N.P., Senchenkova S.N., Rozalski A., Knirel Y.A. // *Carbohydr. Res.* 1999. V. 318. P. 186–192.
7. Odonmažig P., Badga D., Ebringerova A., Alföldi J. // *Carbohydr. Res.* 1992. V. 226. P. 353–358.
8. Pressey R., Himmelsbaeh D.S. // *Carbohydr. Res.* 1984. V. 127. P. 356–359.
9. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // *Bot. Marina.* 1995. V. 38. P. 43–51.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
11. York W.S., Darvill A.G., McNeil M.A., Stevenson T.T., Albersheim P. // *Meth. Enzymol.* 1985. V. 118. P. 3–40.

## Isolation and General Characterization of Polysaccharides from Tansy *Tanacetum vulgare* L.

A. Ya. Polle\*, R. G. Ovodova\*<sup>#</sup>, A. S. Shashkov\*\*, and Yu. S. Ovodov\*

\**Institute of Physiology, Komi Science Centre, The Urals Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Pervomaiskaya 50, Syktyvkar, 167982 Russia*

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

Using extraction with 0.75% aqueous ammonium oxalate, the following polysaccharide fractions were isolated: tanacetans TVF, TVS, and TVR from ~~flowers~~ stems, sprouts, and roots, respectively, of *Tanacetum vulgare* L., spread throughout the European North of Russia. The sugar chain of tanacetan TVF consists of *D*-galacturonic acid (61.4%), arabinose (14.7%), galactose (10.2%), and rhamnose (3.7%) as the main constituents as well as xylose, glucose, mannose, apiose, and 2-*O*-methylxylose in trace amounts. Tanacetans TVS and TVR were shown to differ in the sugar quantitative composition. They contain 67 and 28% galacturonic acid, respectively. A partial acid hydrolysis of the tanacetan TVF gave a polysaccharide fragment TVF1,  $\alpha$ -1,4-*D*-galacturonan (GalA 98.2%). Digestion with pectinase ( $\alpha$ -1,4-*D*-polygalacturonase) resulted in fragment TVF3, containing residues of arabinose (27.1%) and galactose (17.3%). NMR spectroscopy allowed detection of the terminal residues of  $\alpha$ -Araf and  $\beta$ -Galp as well as of the residues of  $\alpha$ -Araf substituted in 3,5- and 5-positions. Thus, tanacetan TVF was proved to be a pectic polysaccharide.

*Key words: polysaccharide, tansy Tanacetum vulgare L., pectins, arabinogalactans, tanacetans, NMR spectroscopy of polysaccharides*

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; tel/fax +7(8212) 421001; e-mail: ovoys@physiol.komisc.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.