

УДК 547.917

Ажибаева Зулайка Сулаймановна

к.х.н., доцент,

кафедра естественнонаучных дисциплин ОшГУ

г. Ош. zajibaeva@oshsu.kg, zulaika75@mail.ru

Ажибаева Зулайка Сулаймановна

Ош мамлекеттик университетинин жаратылыш таануу кафедрасынын доценти, х.и.к.,

Ош шаары

Azhibaeva Zulaika Sulaymanovna

candidate of chemical science, associate professor, department of natural sciences

of Osh State University Osh city

Турдумамбетов Кенешбек

д.х.н., профессор

Институт химии и фитотехнологий НАН при Президенте КР

г. Бишкек. him-teh-ugl@mail.ru

Турдумамбетов Кенешбек

Химия илимдеринин доктору, профессор Кыргызстан Республикасынын Президентине караштуу Улуттук илимдер академиясынын Химия жана фитотехнологиялар институту Бишкек.

Turdumambetov Keneshbek

doctor of chemical sciences, professor of the Institute of Chemistry and Phytotechnologies of the National Academy of Sciences under the President of the Kyrgyz Republic, Bishkek

ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛИСАХАРИДНОГО КОМПЛЕКСА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ *ACANTHOPHYLLUM SUBGLABRUM*

***ACANTHOPHYLLUM SUBGLABRUM* ӨСҮМДҮГҮНӨН БӨЛҮНҮП АЛЫНГАН ПОЛИСАХАРИДДИК КОМПЛЕКСТИН ФИЗИКА-ХИМИЯЛЫК КАСИЕТТЕРИНИН МҮНӨЗДӨМӨСҮ**

CHARACTERIZATION OF THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF THE POLYSACCHARIDE COMPLEX ISOLATED FROM *ACANTHOPHYLLUM SUBGLABRUM*

Аннотация. Выделен и изучен полисахаридный комплекс (ПСК) из надземной части и корней *Acanthophyllum subglabrum* (AS). ПСК AS содержит 83,64±5.93% гексоз, 21.22±2.48% уроновых кислот, 2.27±0.27% белка, нейтральные моносахариды представлены глюкозой, галактозой, арабинозой (мольные соотношения:1.2:5.5:1.0), а также присутствовали следовые количества ксилозы. С помощью ионообменной хроматографии выделено четыре основных компонента. Структура полученных полисахаридов (ПС) 1-4 охарактеризована с помощью физико-химических методов, таких как ИК-спектроскопия, высокоэффективная эксклюзионная и газожидкостная хроматография, реакции с конго красным.

Установлено, что все ПС характеризуются различным содержанием гексоз (от 32.46±2.63 до 83.64±5.93%), уроновых кислот (от 7.56±0.17 до 21.22±2.48%) и незначительной примесью белка (от 0.75±0.13 до 2.28±0.17%). Полученные полисахариды представляют собой высокоомогенные образцы, различного по составу. Мажорный компонент ПСAS-1-4 представлен галактозой.

Ключевые слова: колючелистник (*Acanthophyllum subglabrum*), полисахариды, ионообменная хроматография, мономерный состав, вязкость, полисахариды, гексозы.

Аннотация. *Acanthophyllum subglabrum* (AS) өсүмдүгүнүн жер бетиндеги бөлүктөрүнөн жана тамырларынан полисахариддик комплекс (ПСК) бөлүнүп алып, изилденген. AS ПСК $83,64 \pm 5,93\%$ гексозаларды, $21,22 \pm 2,48\%$ урон кислоталарын, $2,27 \pm 0,27\%$ белокту камтыйт, нейтралдуу моносахариддери молярдык катышы: 1,2:5,5:1,0 болгон глюкоза, галактоза, арабиноза жана ксилозанын калдыктары болгон. Төрт негизги компонент ион алмашуу хроматографиясын колдонуу менен бөлүнүп алынган. Алынган полисахариддердин (ПС) 1-4 түзүмү физика-химиялык ыкмаларды колдонуу менен мүнөздөлгөн, мисалы, IR спектроскопиясы, жогорку эффективдүү өлчөмдүү жана газ-суюктук хроматографиясы жана Конго кызылы менен реакциялар.

Бардык ПС гексоздордун ($32,46 \pm 2,63$ тен $83,64 \pm 5,93\%$ ке чейин), урон кислоталарынын ($7,56 \pm 0,17$ ден $21,22 \pm 2,48\%$ ке чейин) жана белоктун бир аз саны ($0,75 \pm 2,8\%$ тен $0,75 \pm 2,1\%$ ке чейин) ар кандай курамы менен мүнөздөлөөрү аныкталган. Алынган полисахариддер мономердик курамы боюнча ар түрдүү, бир тектүү үлгүлөр болуп саналат. ПС AS-1-4 негизги компоненти галактоза менен берилген.

Негизги сөздөр: *Acanthophyllum subglabrum*, полисахариддер, ион алмашуу хроматографиясы, мономерлердин курамы, илешкектүүлүк, полисахариддер, гексозалар.

Abstract. The polysaccharide complex (PSC) from the aerial parts and roots of *Acanthophyllum subglabrum* (AS) was isolated and studied. The AS PSC contains $83.64 \pm 5.93\%$ hexoses, $21.22 \pm 2.48\%$ uronic acids, $2.27 \pm 0.27\%$ protein, neutral monosaccharides are represented by glucose, galactose, arabinose (molar ratios: 1.2:5.5:1.0), and trace amounts of xylose were also present. Four main components were isolated using ion-exchange chromatography.

Four main components were isolated using ion-exchange chromatography. The structure of the obtained polysaccharides (PS) 1-4 was characterized using physicochemical methods, such as IR spectroscopy, high-performance size-exclusion and gas-liquid chromatography, and reactions with Congo red. It was found that all PS are characterized by different contents of hexoses (from 32.46 ± 2.63 to $83.64 \pm 5.93\%$), uronic acids (from 7.56 ± 0.17 to $21.22 \pm 2.48\%$) and an insignificant admixture of protein (from 0.75 ± 0.13 to $2.28 \pm 0.17\%$). The obtained polysaccharides are highly homogeneous samples, varying in monomeric composition. The major component of PSAS-1-4 is represented by galactose.

Key words: *Acanthophyllum subglabrum*, polysaccharides, ion exchange chromatography, monomer composition, viscosity, polysaccharides, hexoses.

Введение.

Научный интерес к природным растительным полисахаридам, обусловлен их нетоксичностью, доступностью, уникальными физико-химическими и фармакологическими свойствами [1–3]. Большинство изученных полимеров являются биосовместимыми, биоразлагаемыми и не обладают токсичностью, аллергенностью. В связи с этим не вызывают значительных побочных эффектов, перспективны для их возможного использования в практической медицине [4–6].

Род Колючелистник (*Acanthophyllum*) является одним из перспективных представителей семейства Гвоздичные (*Caryophyllaceae*), содержащих в своем составе полисахариды [7–8], обладающие противовоспалительной, желчегонной и ростстиму-

лирующей активностью, которая была установлена в исследованиях для *Acanthophyllum borsczowii*, *Acanthophyllum knorringianum* и *Acanthophyllum pungens*. [9].

Acanthophyllum Subglabrum - произрастающие по всей территории Кыргызстана многолетнее сапониноносное растение, растут на сухих склонах предгорий, пастбищах, сенокосах и шлейфах гор, являются сорняками

Установлено, что разные факторы, включая способ получения полисахаридов, моносахаридный состав, тип гликозидных связей, размер молекул (молекулярная масса) и общую молекулярную конформацию, способны оказывать влияние на активность полисахаридов [10, 11]. Несмотря на рост числа исследований химического состава и биологической активности растений рода *Acantho-*

phyllum, группа полисахаридов с химической точки зрения все еще остается недостаточно изученной.

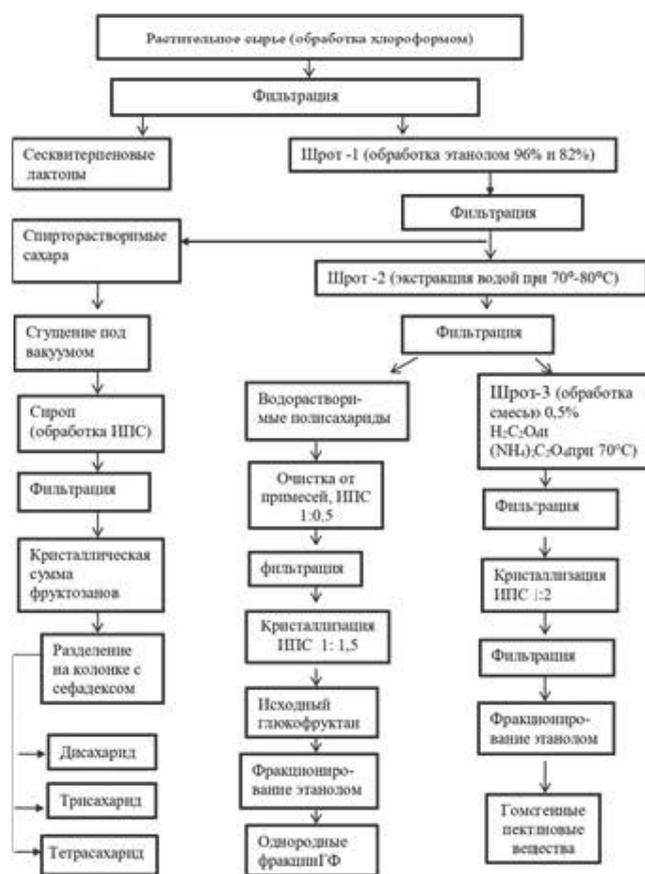
Цель исследования – изучение химического состава и установление физико-химических параметров полисахаридов выделенных из *Acanthorhynchium subglabrum*.

Экспериментальная часть

Объект исследования. Надземная часть и корни колючелистника (*Acanthorhynchium subglabrum*) заготовлены во время цветения и плодоношения на территории Кыргызстана. Все образцы растений

подвергались воздушно-теновой сушке хранились согласно утвержденным правилам. Предварительно очищенные и измельченные воздушно-сухие корни и надземные части растений экстрагировали в аппарате Сокслета хлороформом для удаления низкомолекулярных примесей и красящих веществ, алкалоидов, т.е. веществ неуглеводного характера (блок - схема 1). Сырье высушивали на воздухе до удаления запаха растворителей.

Затем удаляли олигосахариды обработкой 96% и 82% этиловым спиртом.



Блок-схема 1. Разделение углеводов и сесквитерпеновых лактонов

Экстракция водорастворимых полисахаридов. Для выделения водорастворимых полисахаридов экстрагировали трижды водой на водяной бане при 70-80°C с обратным холодильником (соотношение сырья и экстрагента 1: 20,1: 15,1:15). Продолжительность каждой экстракции – 2ч. Полученные водные экстракты объединяли и упаривали на роторном испарителе при температуре

50°C до 1/5 объема. Из полученного концентрата водорастворимые полисахариды осаждали добавлением четырехкратного объема 96% этилового спирта и оставляли при 4°C на ночь. Осадок отделяли с помощью центрифугирования, промывали этиловым спиртом и лиофильно высушили.

Общие аналитические методы. Для изучения ПСК и индивидуальных ПС по содержа-

нию гексоз и уроновых кислот использовали спектрофотометрические фенол-серный и 3,5-диметилфенолсерный метод (фенол – стандарт глюкоза); (3,5-диметилфенол – стандарт галактурановая кислота). Примесь белка определяли методом Лоури с предварительным осаждением с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. Спектрофотометрические исследования проводили в кварцевых кюветках 10 мм на спектрофотометре СФ-2000.

Ионообменная хроматография. Выделение ПС проводили методом ионообменной хроматографии с использованием DEAE-целлюлозы (Cl- форма, 20×3,5 см) марки DEAE 52 в режиме градиентного элюирования равными объемами (500 мл) воды очищенной и раствор аминатрияхлорида (0.01; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 М) по увеличению концентрации, скорость потока подвижной фазы 3,0 мл/мин. Фракции (15 мл) элюата собирали и анализировали фенол-серным методом [12,13]. Фракции, дающие положительную реакцию на углеводы, объединяли, упаривали, диализировали до удаления NaCl с кондуктометрической детекцией как описано выше, замораживали и лиофильно высушивали.

Гель-фильтрация полисахаридов. Нейтральные и элюированные при 0.1М NaCl полисахариды (по 20 мг) растворяли в 2 мл воды и наносили на колонку (70×1.8 см) с Sephadex G-100. Колонку элюировали дистиллированной водой со скоростью потока 40мл/ч. Содержание углеводов в образцах определяли фенол-сернокислотным методом, используя глюкозу в качестве стандарта. Отбирали

фракции объемом 13мл.

Фракции, соответствующие отдельным пикам, объединяли, концентрировали до минимального объема, диализовали и лиофильно высушивали.

ИК-спектроскопия. ИК-спектры образцов снимали на ИК-Фурье спектрометре IRTracer-100 SHIMADZU (Япония), системы 2000 в диапазоне частот 400–4000 см⁻¹. Для съемки спектров изучаемых образцов снимали методом спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (ATR) в инфракрасной области с преобразованием Фурье-спектроскопии.

Результаты и обсуждение

Выход ПСКАС из колючелистника составил 1.92±0.38%. Содержание гексоз в пересчете на глюкозу – 54.99±0.53%, уроновых кислот в пересчете на галактурановую кислоту – 12.99±0.26%, примеси белка – 5.24±0.04%. Значение средневесовой молекулярной массы составило 175.90±21.87 кДа, среднечисловой – 27.10±5.35 кДа. Мономерный состав представлен 4 моносахаридами галактоза – глюкоза – арабиноза – рамноза в соотношении 1.67 : 1.00 : 1.42 : 1.20 соответственно.

В результате фракционирования установлено, что ПСКАС состоит из четырех фракций ПС (ПС AS 1-4).

Согласно данным, приведенным в таблице 1, все выделенные ПС характеризуются различным содержанием компонентов углеводной природы и низким содержанием примеси белка. С ростом концентрации элюента наблюдали увеличение содержания уроновых кислот и молекулярных масс в выделенных фракциях в 8.21 и 3.04 раза соответственно.

Таблица 1. Химическая характеристика фракций ПС

Фракция	Выход, %	Гексозы, %	Уроновые кислоты, %	Белок, %	$[\alpha]_D^{20}$ (C1,0; H ₂ O)	ММ по гель-хромат	Вязкость, $\eta_{отн}$ (C1,0; H ₂ O)
ПКАС-1	39.02±0.47	83.64±5.93	7.56±0.17	2.27±0.27	169°	4400	1,0
ПКАС-2	17.58±0.44	53.49±2.25	21.22±2.48	1.79±0.43	174°	3800	1,02
ПКАС-3	12.28±0.49	44.62±2.65	20.03±0.74	0.75±0.13	177°	2600	1,02
ПКАС-4	8.93±0.46	32.46±2.63	11.91±0.66	2.28±0.17	181°	2000	1,01

Согласно данным таблицы 2, ПС AS-1 содержит в своем составе наибольшее количество нейтральных сахаров, мажорный компонент представлен галактозой (до 67.5%), содержание арабинозы и глюкозы – меньше в 1.95 и 2.62 раза соответственно. Преоблада-

ющий моносахарид, обнаруженный в ПСAS-3 и ПСAS-4 – арабиноза, кроме этого в образцах ПС AS-3 и ПС AS-4 идентифицированы остатки ксилозы. Максимальное содержание уроновых кислот установлено для ПС AS-3 и ПС AS-4.

Таблица 2. Мономерный состав фракций ПС AS.

Фракция	Мономерный состав			
	Glc	Gal	Xyl	Ara
ПСAS-1	14.64±0.3	67.5±0.5	-	12.2±0.3
ПСAS-2	25.4±0.4	51.9±0.2	-	22.7±0.5
ПСAS-3	31.3±0.4	47.1±0.2	6.1±0.1	15.2±0.4
ПСAS-4	34.1±0.3	45.9±0.1	5.9±0.4	14.1±0.3

Для всех образцов наблюдается увеличение максимума поглощения при прибавлении раствора конго красного, что соответствует образованию комплекса между КК и исследуемым образцом. При прибавлении натрия гидроксида к образцам ПСAS-1, ПСAS-2, ПСAS-3, ПСAS-4 не наблюдали гипсохромного сдвига, что характерно для отсутствия структуры тройной спирали.

На ИК-спектрах во всех образцах наблюдали широкую интенсивную полосу поглощения в области 3600–3200 см⁻¹, обусловленную валентными колебаниями О-Н группы, и полосы поглощения около 2932–2924 см⁻¹ характерные для валентных и деформационных колебаний С-Н в углеводных кольцах. На спектрах присутствуют схожие профили поглощения во всем исследуемом диапазоне волновых чисел, отличающиеся лишь значениями относительных оптических плотно-

стей при волновых числах 1658 и 1740 и 625 см⁻¹, характеристичным для валентных колебаний карбоксильных групп, что объясняется различным относительным содержанием во фракциях остатков уроновых кислот.

Поглощение при 1420 см⁻¹ представляет собой асимметрические валентные колебания С-Н связи (СН₂ групп), соответствующие полисахаридам. Характерные пики для С-О-С связи в пиранозном кольце моносахаридной единицы полисахаридов наблюдались при 1153 см⁻¹. Полосы поглощения валентных колебаний, соответствующие гликозидным связям С-О-С между моносахаридными остатками, наблюдались в области 1080 см⁻¹. Поглощение при 1037 см⁻¹ представляет собой валентные колебания С-О от боковых карбинольных групп (С-ОН). Характерные сигналы деформационных колебаний α-гликозидных связей между пиранозными формами полисахаридов обнаружены при 860 см⁻¹.

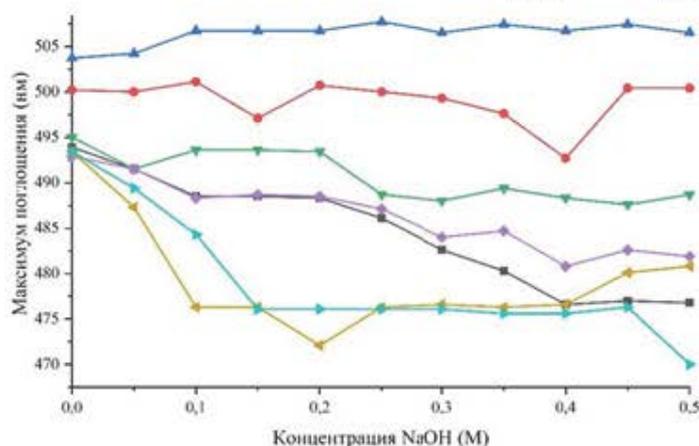


Рис.1. Зависимость максимума поглощения от концентрации NaOH

Определение средней молярной массы ВРПС вискозиметрическим методом. Вискозиметрическим методом определяли среднюю молекулярную массу ПСКАС полученного из *Acanthophyllum subglabrum*. Эксперимент проводили с помощью капиллярного вискозиметра Оствальда с измерением истечения воды и водных растворов полисахаридов различных концентраций (C). Жидкости были взяты одинаковых объемов (15мл) для определения относительной вязкости растворов полисахаридов с помощью уравнения Пуазейля-Гагена:

$$Q = \frac{V}{t} = \frac{\pi r^4 \Delta p}{8 \eta l} \quad (2)$$

где Q – объемная скорость течения, равная отношению объема жидкости V ко времени t его протекания по капилляру с радиусом r и длиной l ; Δp – разность давлений на концах капилляра, вызывающая течение жидкости), зная время их вытекания:

$$\eta_{отн.} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \quad (3)$$

где η и η_0 – динамическая вязкость раствора полисахарида и воды соответственно; t и t_0 – время их вытекания.

Для определения удельной и приведенной вязкости растворов использовали уравнения:

$$\eta_{уд.} = \eta_{отн.} \cdot C^{-1}$$

$$\eta_{прив} = \eta_{уд.} \cdot C = \eta$$

Среднюю молярную массу ВРПС определяли с помощью уравнения Марка-Хаувинка-Куна, содержащего в себе характеристическую вязкость $[\eta]$:

$$[\eta] = KM^\alpha$$

где K и α – константы, постоянные для данного полимергомологического ряда и растворителя (константа α учитывает гибкость макромолекул)

Для определения характеристической вязкости $[\eta]$ использовали графический способ с построением зависимостей приведенной вязкости растворов полисахаридов от их концентрации.

Таблица 3. Вязкость водных растворов ПСКАС выделенных из *A. subglabrum* (при температуре 22 °C)

№	Концентрация C , %	Время истечения t , с	$\eta_{отн}$	$\eta_{уд}$	$\eta_{пр}$	Характеристическая вязкость $[\eta]$	Молярная масса M , г/моль
ПСКАС выделенных из корней <i>A. subglabrum</i>							
H ₂ O	–	24.72	–	–	–		
1	0.2	25.09	1.02	0.02	0.07		
2	0.4	26.82	1.09	0.09	0.21	0.8167	12440
3	0.6	28.78	1.16	0.16	0.27		
4	0.8	31.33	1.27	0.27	0.33		
5	1.00	34.64	1.40	0.40			
ПСКАС выделенных из надземной части <i>A. subglabrum</i>							
H ₂ O	–	24.72	–	–	–		
1	0.2	25.01	1.01	0.02	0.06		
2	0.4	26.57	1.07	0.08	0.20	0.8006	11280
3	0.6	28.53	1.15	0.15	0.26		
4	0.8	31.24	1.26	0.26	0.32		
5	1.00	34.69	1.40	0.39			

Заключение

Изучен полисахаридный комплекс ПСК, выделенный из *Acanthophyllum subglabrum*. Установлено, что в его состав входит 4 основных компонента (ПС AS-1-4), характеризующихся различным содержанием гексоз (от 32.46±2.63 до 83.64±5.93%), наличием в составе уроновых кислот (от 7.56±0.17 до 21.22±2.48%), что было также подтверждено результатами ИК-спектроскопии, и незначительной примеси белка. В результате изучения молекулярно-массовых характеристик установлена высокая гомогенность всех образцов. Мажорный компонент ПС AS-1, ПС AS-2, ПС AS-3, ПС AS-4 – представлен галактозой.

Наибольшую молярную массу и, следовательно, самый большой размер молекул и

меньшую растворимость имеют ПСК AS выделенные из корней *A. subglabrum* ($M_{\text{ПСК AS}} = 12240 \text{ г/моль}$).

Проведенные исследования позволяют предположить, что исследованные фракции ПС, выделенные из *Acanthophyllum subglabrum*, являются перспективными объектами для дальнейшего изучения взаимосвязи между структурой полисахаридов и проявляемой активностью. Образцы ПС с установленным составом, могут быть использованы для детального изучения иммуномодулирующих свойств и дальнейшей разработки на их основе новых безопасных препаратов для лечения заболеваний, требующих коррекции регуляции функциональной активности иммунных клеток.

Список литературы

1. Сычев И.А., Калинин О.В., Лаксаева Е.А. Биологическая активность растительных полисахаридов // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2009. Т. 17. №4. С. 143–148. DOI: 10.17816/PAVLOVJ20094143-148.
2. Гулина Е.И., Кривошеков С.В., Исаков Д.А., Белоусов М.В. Выделение, химическая и пространственная характеристика кислых полисахаридов некоторых растений флоры Сибири, обладающих иммуностропной активностью // Химия растительного сырья. 2023. №2. С. 97–105. DOI: 10.14258/jcprm.20230212366.
3. Sindhu R.K., Goyal A., Das J., Neha, Choden S., Kumar P. Immunomodulatory potential of polysaccharides derived from plants and microbes: Anarrativerewiew// Carbohydr. Polym. Technol. Appl. 2021. Vol. 2. Art. 100044. DOI: 10.1016/J.CARPTA.2021.100044.
4. Орипова М.Ж., Кузиева З.Н., Корабоева Б.Б., Ощепкова Ю.И., Салихов Ш.И. Выделение и физико-химическая характеристика полисахаридов семян репы *Brassica rapa* // Химия растительного сырья. 2023. №2. С. 79–86. DOI: 10.14258/jcprm.20230211629.
5. Гулина Е.И., Зыкова А.В., Лигачева А.А., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Селиванова Н.С., Шерстобоев Е.Ю., Горобец Е.А., Кривошеков С.В., Белоусов М.В. Химическая характеристика полисахаридного комплекса *Saussurea Salicifolia* L. и его NO-стимулирующие свойства // Химия растительного сырья. 2023. №4. С. 99–109. DOI: 10.14258/jcprm.20230413545.
6. Оленников Д.Н., Кащенко Н.И. Полисахариды. Современное состояние изученности: экспериментально-научнометрическое исследование // Химия растительного сырья. 2014. №1 С. 5-26. <https://doi.org/jcprm.1401005>.
7. Курбанова А.Д., Арифходжаев А.О., Рахимов Д.А. Водорастворимые полисахариды представителей семейства Caryophyllaceae // Химия природных соединений. 2002. № 6. С. 484-487.
8. Арифходжаев А.О., Курбанова Ф.Д., Рахимов Д.А. Структурное исследование глюкоарабиногалактана из *A. Pungens* // Химия природных соединений. 2003. № 2. С. 111-116.
9. Арифходжаев А.О., Курбанова А.Д., Рахимов Д.А. Химическое исследование полисахаридов *Acanthophyllum* // Тез. докл. межд. симп. ИХФП АН РУз., 20-22 – октябрь, 1999г. С. 95-96.
10. Ажибаева, З. С. Полисахариды *Acanthophyllum subglabrum* и структура глюкоарабиногалактана // Известия ВУЗов (Кыргызстан). 2011. № 3. С. 135-138.
11. Ажибаева, З. С. Углеводы и свойства олиго- и полисахаридов из *Acanthophyllum Subglabrum* // Известия ВУЗов (Кыргызстан). 2012. № 1. С. 68-70.
12. Ажибаева, З. С., Турдумамбетов К., Камалов Ж.К. Водорастворимые полисахариды *Acanthophyllum subglabrum* и их частичный кислотный гидролиз. Материалы научных трудов

международной научно- практической конференции «Интеграция теории, образования и науки с прикладной медициной» г. Ош 22-23- июня 2023 г. С. 28-32

12. Ажибаева, З. С., Турдумамбетов К., Эрнарарова Э.Э. Углеводный состав лопуха гладкосемянного (*Arctium leiospermum*) в зависимости от экологических мест произрастания. Вестник ОшГУ №3 2023 г. С.74-79 https://doi.org/10.52754/16948610_2023_3_9