

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО  
СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

**Национальный Университет Узбекистана  
им. М.Улугбека**

*Химический факультет  
Кафедра химии природных соединений*

***Рахматова Нилуфар***  
***ДИПЛОМНАЯ РАБОТА***

***ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
УГЛЕВОДОВ РАСТЕНИЯ *LAGOSCHILUS INEBRIANS****

***Научный руководитель:  
д.х.н. проф. Зайнутдинов У.Н.***

***Научный консультант:  
д.х.н. Рахманбердыева Р.К.  
к.х.н., с.н.с. Жауынбаева К.С.***

**ТАШКЕНТ-2014 г.**

УЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ  
ВА УРТА ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

М.Улугбек номидаги Узбекистон  
Миллий Университети

*Кимё факультети*  
*Табиий бирикмалар кимёси кафедраси*

*Рахматова Нилуфар*

*ДИПЛОМ ИШИ*

*LAGOSCHILUS INEBRIANS УСИМЛИГИ КАНД*

*МОДДАЛАРИНИНГДАСТЛАБКИ ТАДКИКОТИ*

*Илмий рахбар:*

*Д.х.н. проф. Зайнутдинов У.Н.*

*Илмий маслахатчи:*

*к.ф.д. Рахманбердыева Р.К.*

*к.ф.н., к.и.х. Жауынбаева К.С.*

**ТАШКЕНТ-2014 г.**

# ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
I. ВВЕДЕНИЕ.....	5
II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
II.1. Распространение полисахаридов в природе.....	9
II.2. Общие методы выделения полисахаридов.....	10
II.3. Физико-химические свойства полисахаридов....	13
II.4. Физико-химические методы исследования полисахаридов.....	14
III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	21
IV. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	30
ВЫВОДЫ.....	35
ЛИТЕРАТУРА.....	36

## СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ:

ВРПС - водорастворимый полисахарид

ПВ - пектиновые вещества

ГМЦ - гемицелллоза

*Rha* - рамноза

*Ara* - арабиноза

*Xyl* - ксилоза

*Man* - манноза

*Glc* - глюкоза

*Gal* - галактоза

*GalUA* - галактуроновая кислота

Кс - свободные карбоксильные группы

Кэ - этерифицированные карбоксильные группы

$\lambda$  – степень этерификации

ММ - молекулярная масса

ИК - спектроскопия –инфракрасная спектроскопия

БХ - бумажная хроматография

ГЖХ - газожидкостная хроматография

## Введение

Огромное практическое значение углеводов с давних времен привлекало к ним внимание исследователей. У самых истоков цивилизации лежит первое практическое знакомство человека с углеводами. Обработка древесины, изготовление бумаги, хлопчатобумажных и льняных тканей, хлебопечение, брожение—все эти процессы, известные еще с глубокой древности, непосредственно связаны с переработкой углеводсодержащего сырья.

Тростниковый сахар был, по-видимому, первым органическим веществом, полученным человеком в химически чистом виде.

В настоящее время полисахариды, и тесно примыкающие к ним углеводсодержащие биополимеры, несомненно, привлекают гораздо больший интерес исследователей. Это объясняется их меньшей изученностью и с другой стороны, более сложными и важными функциями, которые они несут в организме.

Полисахариды могут быть ценным сырьем для фармацевтической, пищевой, текстильной и других отраслей промышленности, и новыми источниками лекарственных средств, обладающих антибиотической, противовирусной, противоопухолевой активностью. Кроме того, они способствуют выведению из организма токсичных веществ, холестерина, тяжелых металлов, радионуклидов и препятствуют образованию свободных радикалов, восстанавливают поврежденные клетки, а также являются антирадиационным средством, активизируют иммунную систему.

**Актуальность исследования** Растительные полисахариды имеют особую значимость среди природных биополимеров. Они наряду с липидами, белками, нуклеиновыми кислотами ответственны

за жизненно важные процессы в организме растения. Изучение растительных полисахаридов представляет большой интерес, поскольку среди них имеются биополимеры с практически ценными свойствами.

Полисахариды из различных источников (бактериальные, растительные и др.) используются в качестве криоконсервантов, кровезаменителей, гипохолестеринемических, противоопухолевых, ростостимулирующих, иммуностимулирующих, антикоагулирующих и других средств. Они также входят в состав питательных сред при культивировании микроорганизмов и при выращивании культуры тканей. Потребность к этим веществам в народном хозяйстве велика. Источником для получения этих полисахаридов могут служить отходы лекарственных растений, которые накапливаются в производстве в больших количествах. К этому числу можно отнести растение *Lagochilus inebrians*, относящееся к сем. Губоцветных - *Lamiaceae*. Это растение распространено в Узбекистане, Таджикистане, на Алтае и является богатым источником терпеноидов, сапонинов, витаминов и других веществ, которые с давних времен нашли широкое применение в народной медицине в качестве терапевтических средств при лечении самых разнообразных заболеваний. В химическом отношении более подробно изучены низкомолекулярные соединения, а углеводы изучены не достаточно. В связи с этим, с химической точки зрения и практической стороны изучение полисахаридов *L. inebrians* является весьма актуальным.

Целью данного исследования, является комплексное изучение полисахаридов цветков *Lagochilus inebrians*, установление их моносахаридного состава и определение физико-химических свойств.

Исходя из цели были поставлены следующие задачи:

- комплексное выделение углеводов: (водорастворимые полисахариды, пектиновые вещества, гемицеллюлозы);

- изучение физико-химических свойств выделенных полисахаридов;

**Объект и предмет исследования.** Объект исследования- надземная часть *Lagochilus inebrians*, произрастающий в Узбекистане.

Предметом исследования являются водорастворимые полисахариды, пектиновые вещества, гемицеллюлозы; содержание, физико-химические свойства углеводов и установление их моносахаридного состава.

**Методы исследования.** В работе использованы: химические методы: экстракция различных типов полисахаридов, осаждение углеводов, полный кислотный гидролиз, качественный и количественный анализ моносахаридного состава полисахаридов, Аналитические методы: титрометрический метод.

Физико-химические методы: ИК,- ультрацентрифугирование.

**Научная новизна работы:** Впервые из надземной части *Lagochilus inebrians* выделены различные типы полисахаридов и дана химическая характеристика водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ, гемицеллюлоз. Установлен их моносахаридный состав, изучены их физико-химические свойства.

**Апробация работы.** Материалы дипломной работы доложены на IV Республ. конф. Термез 1-3 мая 2014, Респуб. конф. «Роль

полимерных материалов в инновационном развитии промышленности» 23 мая 2014, ИХФП АН РУз, Ташкент.

**Опубликованность результатов.** По результатам дипломной работы опубликованы 2 тезиса докладов

**Структура и объем диссертации.** Дипломная работа изложена на 32 страницах компьютерного текста, состоит из введения, трех глав, выводов и библиографии, включающей ... ссылки. В первой главе приводится краткий обзор литературы по основным химическим и биологическим свойствам полисахаридов высших растений. Глава II включает обсуждение результатов собственных исследований. В третьей главе описывается экспериментальная часть работы. В дипломной работе приведены 4 рисунка, 1 таблица и схема.

## II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### *II.1. Распространение полисахаридов в природе*

Полисахариды составляют основную массу органического вещества на Земле. Большая часть сухого веса высших наземных растений и водорослей приходится на полисахариды; несколько меньше, хотя и очень значительное количество полисахаридов выполняет скелетные функции, обеспечивая жесткость клеток или их агрегатов. К таким полисахаридам относятся целлюлоза и хитин—два наиболее распространенных в природе органических вещества.

Целлюлоза является основным структурным материалом растений, хотя синтезировать ее способны также некоторые бактерии и беспозвоночные. Хитин служит главным компонентом скелета членистоногих, а также входит в состав клеточных стенок грибов. В построении растительных клеточных стенок принимает участие и ряд других полисахаридов: маннаны грибов, гемицеллюлозы и пектиновые вещества высших растений. Морские водоросли значительно отличаются от наземных растений полисахаридным составом клеточных стенок, что несомненно, связано со специфическими условиями их обитания. Характерными компонентами морских водорослей являются полисахариды, этерифицированные серной кислотой: агар, каррагинан, фукан, галактаны и ряд более сложных сульфатов гетерополисахаридов. В организме позвоночных опорные функции выполняют хондроитинсульфаты и родственные мукополисахариды соединительной ткани. Клеточные стенки бактерии построены из сложных гликопротеинов. Другой важнейшей функцией полисахаридов является использование их живыми клетками в

качестве энергетических запасов, при необходимости легко превращаемых в моносахариды, служащие непосредственным источником энергии. К запасным питательным веществам относятся крахмалоподобные полисахариды-амилоза, амилопектин, составляющие крахмал высших растений, и гликоген животных и ряда низших растений. Несколько менее распространены фруктаны, синтезируемые высшими растениями и бактериями. Запасными веществами морских водорослей являются кроме крахмалоподобных полисахаридов ламинарин и возможно маннан [1].

## **II.2. Общие методы выделения полисахаридов**

Нередко разные лаборатории, работающие по установлению строения полисахаридов, выделенных из одного и того же источника, и даже пользующиеся одними и теми же методами установления строения, получают разные результаты. Это объясняется несовершенством примененных методов выделения полисахарида, не позволивших удалить примеси или вызвавших его деструкцию. Хотя методы выделения полисахаридов чрезвычайно разнообразны и невозможно описать стандартную процедуру, существует ряд общих требований и подходов к проблеме выделения, которые будут изложено ниже.

Выбранный способ выделения должен удовлетворять двум основным требованиям. Во-первых, процесс должен быть максимально эффективным, сопровождаться незначительными потерями на всех стадиях, особенно, когда содержание выделяемого полисахарида в источнике не велико.

Во-вторых, в процессе выделения полисахарид должен подвергаться, возможно меньшим изменениям, причем необходимо предусматривать как деструкцию под действием применяемых химических реагентов, так и возможное воздействие ферментов, присутствующих в источнике [2,3].

При выделении полисахаридов приходится решать задачи разной степени сложности: а) отделение биополимеров неуглеводной природы;

в) наиболее сложная-разделение смесей полисахаридов. Нужно оговориться, что эти задачи редко являются последовательными этапами выделения. Чаще применяемый метод выделения позволяет решить сразу две, а иногда и все задачи одновременно.

Способ выделения полисахарида, естественно, определяется его свойствами и теснейшим образом связанной с ними биологической функцией. Резкое отличие свойств скелетных полисахаридов, таких, как целлюлоза, от других биополимеров позволяет сравнительно легко получать их в чистом состоянии; в случае резервных полисахаридов, камедей и слизей выделение облегчается тем, что можно, как правило, найти источники с очень высоким содержанием полисахарида. Напротив, лабильность и невысокое содержание в источниках некоторых гликопротеинов сильно осложняет процесс выделения.

Выделенный полисахарид обычно загрязнен неуглеводными, низкомолекулярными примесями белков, удаление которых достигается диализом, центрифугированием и по методу Севага [2].

Для очистки полисахаридов применяется метод ультрафильтрации т. е. фильтрование. Фильтрование растворов через полупроницаемые мембраны с известной величиной пор, также позволяет удалить

низкомолекулярные примеси, одновременно сконцентрировать растворы полисахаридов и даже в ряде случаев получить фракции полисахаридов, различающиеся по молекулярному весу.

Первым этапом при выделении полисахаридов является обработка растительного сырья кипящим метанолом, этанолом или смесью метанола с хлороформом. Это приводит к дезактивации ферментов, деградирующих полисахариды, а также к удалению липидов, частично протеинов, моно- и олигосахаридов, красящих веществ и неорганических примесей. После инактивации растения, выделение полисахаридов обычно осуществляется экстракцией измельченного сырья водой [4], щелочью [5] с последующим осаждением метиловым или этиловым спиртами, а также ацетоном [6].

Большинство полисахаридов представляют собой порошки белого цвета с кремовым оттенком. Растворяются в воде, при низкой концентрации образуют опалесцирующие растворы, а при высокой концентрации образуют вязкие растворы с высокими показателями относительной вязкости.

Некоторые полисахариды растворимы в горячей воде значительно лучше, чем холодной, и их отделяют после охлаждения экстрактов. Наиболее обычным приемом выделения полисахаридов из водных растворов является осаждение смешивающимся с водой органическим растворителем, причем в подавляющем большинстве случаев применяется этиловый спирт. Известно, что в 80%-ном спирте значительно растворимы низкомолекулярные вещества, экстрагируемые из биологических объектов вместе с полисахаридами, в том числе и многие полисахариды. Полисахариды при такой концентрации спирта, как правило, выпадают в осадок. Таким

простым приемом, как осаждение спиртом, часто можно избавиться от низкомолекулярных примесей. Гораздо реже в качестве осадителей применяют метанол, ацетон, уксусную кислоту и некоторые другие растворители. Простое осаждение не приводит к разделению смесей полисахаридов. Чтобы отделить полисахариды друг от друга, проводят фракционированное осаждение, т. е. получают серию фракций осаждаемых веществ, соответствующих разным концентрациям осадителя в растворе, и исследуют их состав и свойства.

### ***1.3. Физико-химические свойства полисахаридов***

Сухие порошкообразные полисахариды способны удерживать воду в количествах, многократно превышающих их собственную массу, образуя при этом однородный гель.

На растворимость полисахаридов сильное влияние оказывают неорганические соли, рН среды и т.д. Соли присутствующие в растворе, часто вызывают разрушение водородных связей и повышение растворимости полисахаридов; высокие концентрации солей, напротив, уменьшают гидратацию полисахаридных молекул и приводят к выпадению полисахаридов из растворов.

Агрегатное состояние, растворимость моносахаридов и их производных определяются, в первую очередь, наличием в их молекулах большого числа сильнополярных гидроксильных групп, способных к образованию водородных связей. Поэтому подавляющее большинство моносахаридов представляет собой нелетучие вещества, легко растворимые в воде, диметилформамиде или диметилсульфоксиде, умеренно растворимые в низших спиртах, пиридине и уксусной кислоте и практически нерастворимые в таких

обычных органических растворителях, как спирт метанол, ацетон, эфир, бензол, хлороформ, диоксан, тетрагидрофуран, этилацетат и т.д. Однако производные моносахаридов, в которых гидроксильные группы замещены, достаточно летучи, и их можно очищать перегонкой и возгонкой в вакууме. Для анализа этих производных может быть применена газо- жидкостная хроматография [7]. Условия гидролиза (концентрация кислоты, температура, длительность гидролиза) зависят от особенностей строения полисахаридов.

#### ***1.4. Физико-химические методы исследования полисахаридов***

Определение строения полисахаридов является сложной задачей. Современные методы установления строения полисахаридов применимы лишь к однородным веществам: так как работа с неочищенными соединениями может привести к результатам далеким от истины.

При решении вопросов о первичной структуре полисахаридов ставятся следующие задачи:

1. Определение качественного и количественного моносахаридного состава.
2. Определение молекулярного веса.
3. Установление типа связи между отдельными моносахаридами.
4. Определение конфигурации гликозидных связей.
6. Выявление места присоединения боковых цепей к основной.

Эти задачи решаются с использованием классических методов химии углеводов: гидролиз, частичный гидролиз, метилирование, окисление периодатом, хромовым ангидридом и т.д.

Первоначальной стадией при исследовании строения полисахарида является полное его расщепление на моносахариды, разделение и идентификация, установление количественного соотношения между ними.

Полное расщепление гликозидных связей полисахаридов достигается кислотным гидролизом. Очень часто для этой цели используют серную кислоту, иногда применяют муравьиную кислоту с последующим разрушением побочно образующихся формиатов моносахаридов.

Сложность подбора условий для выделения полисахарида обусловлена главным образом тем, что строение его в момент выделения обычно не бывает известно. Нужно всегда учитывать, что полисахарид может содержать группировки, лабильные к кислотам, например, гликозидные связи фураноз или 3,6- ангидрогексоз, а также группировки, лабильные к щелочам, например сложные эфиры, гликозиды  $\beta$ -окси- $\alpha$ -аминокислот, восстанавливающие концевые моносахариды с заместителем в положении 3 и др. В щелочной среде происходит заметная деструкция вследствие окисления кислородом воздуха. Поэтому применение жестких химических воздействий ведет часто к снижению среднего молекулярного веса, падению вязкости и т.д.

Процесс кислотного гидролиза обычно контролируют падением вязкости растворов, увеличением восстанавливающей способности, изменением удельного вращения или хроматографией на бумаге [8, 9] нейтрализованного гидролизата.

Можно без преувеличения сказать, что современная химия, и в первую очередь химия природных соединений, обязана своими достижениями прежде всего применению хроматографических

методов разделения. Однако хроматография полимеров представляет собой специфическую область, развитие которой связано с определенными трудностями. С одной стороны, даже молекулы однородного полимера, различающиеся молекулярным весом, могут обладать разной хроматографической подвижностью. С другой стороны, различие в растворимости или способности сорбироваться на примененном носителе между разными полимерами может быть недостаточным для хроматографического разделения, которое затрудняется еще большей склонностью разделяемых веществ к межмолекулярной ассоциации и образованию коллоидных растворов.

Поэтому до настоящего времени не нашли широкого распространения в области полисахаридов такие виды хроматографии, как распределительная и адсорбционная. Более успешным оказалось применение ионообменной хроматографии для разделения кислых и даже нейтральных полисахаридов. Ионообменниками служат обычно аниониты, полученные модификацией целлюлозы, например ДЭАЭ- целлюлоза. В последние годы все большее распространение получает хроматографическое разделение веществ по их молекулярному весу, причем первое место среди таких вариантов хроматографии принадлежит гель-хроматографии на сефадексах [10]. Такие методы очень широко используются и в исследовании полисахаридов [11,12].

### *ИК-спектроскопия полисахаридов*

Для установления структуры полисахаридов применяют такие физико-химические методы, как ИК, Масс-спектрометрия, ПМР,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектроскопии. Дополняя химические методы, они облегчают работу по определению строения и идентификации полисахаридов.

ИК-спектроскопия применяется для функционального анализа полисахаридов, например, для определения полноты метилирования и других производных по гидроксильным группам, так и для обнаружения сложноэфирных, амидных, сульфатных групп. По данным ИК-спектра можно установить конфигурацию гликозидных связей [13,14].

## **Биологическая активность арабиногалактанов и глюкоарабиногалактанов и их применение**

Работы последнего десятилетия показывают, что полисахариды данного типа обладают высокой и разнообразной активностью, которая непосредственно связана с их структурными особенностями. Все изученные арабиногалактаны и глюкоарабиногалактаны существенно потенцируют ретикуло-эндотелиальную систему (РЭС), и, следовательно, являются РЭС-активирующими иммуномодуляторами [15].

На основании данных сделан вывод, что активация РЭС обусловлена всей сложной структурой арабиногалактана и боковыми цепями, состоящими из остатков L-арабинозы.

Длительные исследования токсичности на крысах и мышах не обнаружили доказательства токсичности. Потребление человеком обычно не вызывает побочных эффектов. Однако маленький процент людей (3%) испытали вздутие и метеоризм вследствие ферментации арабиногалактана кишечной флорой [16].

В отделе химии древесины Иркутского ИОХ СО РАН предложена схема комплексной переработки биомассы лиственницы. В цехе экстракции и ректификации из древесины лиственницы (ДЛ) выделяется ценное водорастворимое вещество – арабиногалактан.

В настоящее время появляются новые направления практического использования арабиногалактана. Благодаря низкой вязкости и высокой клейкости концентрированных растворов он успешно используется в целлюлозно-бумажной промышленности для проклейки и формирования бумаги, картона, улучшения их свойств [17, 18].

Пропитка водными растворами полисахарида наполнителя бумаги – каолина – позволяет увеличить его содержание в бумажной массе до 30% без ухудшения физико-механических свойств бумаги.

Арабиногалактан и глюкоарабиногалактан может использоваться как стабилизатор эмульсий, красок, в качестве поверхностно-активных веществ в строительстве и металлургии, в фармацевтической промышленности как нетоксическое вяжущее вещество.

Арабиногалактан лиственницы является высококачественным порошком со слегка сладким вкусом и нежным сосновоподобным запахом. Он является безопасным и эффективным иммуностимулирующим фитохимическим препаратом.

На основе арабиногалактана возможно создание гепатопротекторного лекарственного средства. Его можно использовать для повышения всасываемости других лекарственных средств, характеризующихся низкой биодоступностью.

Глюкоарабиногалактан проявляет значительную иммуностимулирующую активность.

Московской фирмой «Мирра» производится профилактико-гигиенический гель-спрей для полости рта. В состав этого геля, наряду с другими препаратами, входит арабиногалактан из лиственницы – как иммуномодулятор. Это средство рекомендовано к применению при заболеваниях пародонта (гингвита, пародонтита) как в период обострения, так и в период ремиссии.

Таким образом, организация промышленного производства водорастворимого полисахарида арабиногалактана не только позволит получить ценный многотоннажный продукт, но и значительно

уменьшит себестоимость целлолигнина, поступающего на дальнейшую переработку.

Таким образом, изучение структурных особенностей арабиногалактанов и глюкоарабиногалактанов может расширить границы их практического применения.

### **Заключение**

Исследования в области химии углеводов проводятся в течение последних десятилетий. Особенно большой прогресс достигнут в последнее время, что в значительной мере обусловлено бурным развитием физико-химических методов, особенно  $^{13}\text{C}$ -ЯМР и масс-спектрометрии. Накопленные сведения позволяют говорить о чрезвычайном разнообразии структуры полисахаридов. К настоящему времени известны полисахариды, содержащие практически все возможные типы связей, установление структуры которых основано на изучении главной цепи. Очевидно, что знания об этих интересных полисахаридах еще не достаточно полны, можно ожидать, что дальнейшая работа по выделению и исследованию арабиногалактанов не только расширит наши представления о структурной химии арабиногалактанов, но и послужит основой для более глубокого внимания к биологической роли этих биополимеров в живых системах.

## ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Растения рода *Lagochilus* относятся к сем. Lamiaceae (Губоцветные) и распространены, в основном, в Самаркандской, Джизакской и Навоийской областях Узбекистана и в некоторых других республиках Средней Азии, Закавказья и на Алтае [19,20]. Растения этого рода издавна известны своим лечебным действием и входят в число наиболее известных лекарственных растений. Самым распространенным видом является *Lagochilus inebrians* – лагохилус опьяняющий, который произрастает в условиях жаркого климата. Он растет на предгорных равнинах, низкогорьях, на галечниках и выносах рек, иногда по берегам каналов и арыков как сорняк. Рис 1.

Действующим началом *Lagochilus inebrians* является дитерпеноид, четырехатомный спирт–лагохилин и его ацетильные производные, которые очень плохо растворяются в воде [21]. На его основе создан ряд гемостатических препаратов как для внутривенного и перорального применения. Кроме этого, созданы лекарственные формы в виде гемостатического геля, салфетки, коллагеновой пленки [22].

В траве растения содержатся дубильные вещества, сахара, эфирное масло, лагохилин (четырёхатомный спирт), аскорбиновая кислота и каротин. Наибольшей активностью обладают отвар и настой растения [23]. Например, водные экстракты лагохилуса обладают седативной, гипотензивной и гипосенсибилизирующей активностью, а также стимулируют сократительную способность гладкой мускулатуры матки, сократительную и моторную функцию желудка и кишечника. Интерес к растениям этого рода остается высоким, так, как не все виды изучены в химическом отношении.

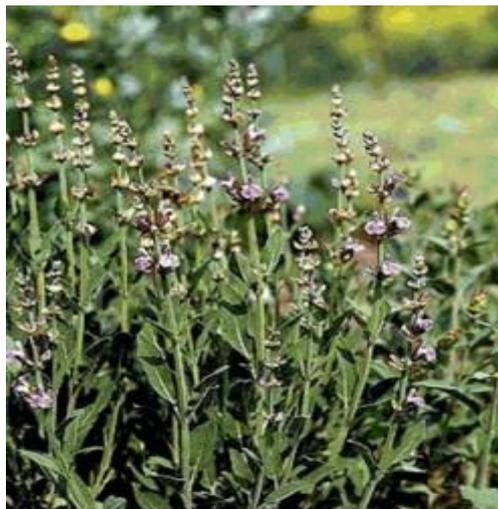


Рис 1. Зайцегуб опьяняющий (лагохилус опьяняющий ).

В литературе имеются сведения о наличии в них эфирных масел, микроэлементов, флаваноидов, кумаринов и т.д, но надо подчеркнуть, что эти растения мало изучены на содержание углеводов [24]. В связи с этим исследование полисахаридов *Lagochilus inebrians* представляет большой интерес, как в научном, так и в практическом отношении.

Целью данного исследования, является комплексное изучение полисахаридов цветков *Lagochilus inebrians*, установление их моносахаридного состава и определение физико-химических свойств. Обсуждение результатов работы охватывает решение следующих поставленных задач:

- выделение водорастворимых полисахаридов холодной и горячей экстракцией;
- экстракция пектиновых веществ и изучение их физико-химических свойств;
- выделение гемицеллюлоз щелочной экстракцией»

- анализ моносахаридного состава выделенных полисахаридов методами кислотного гидролиза;

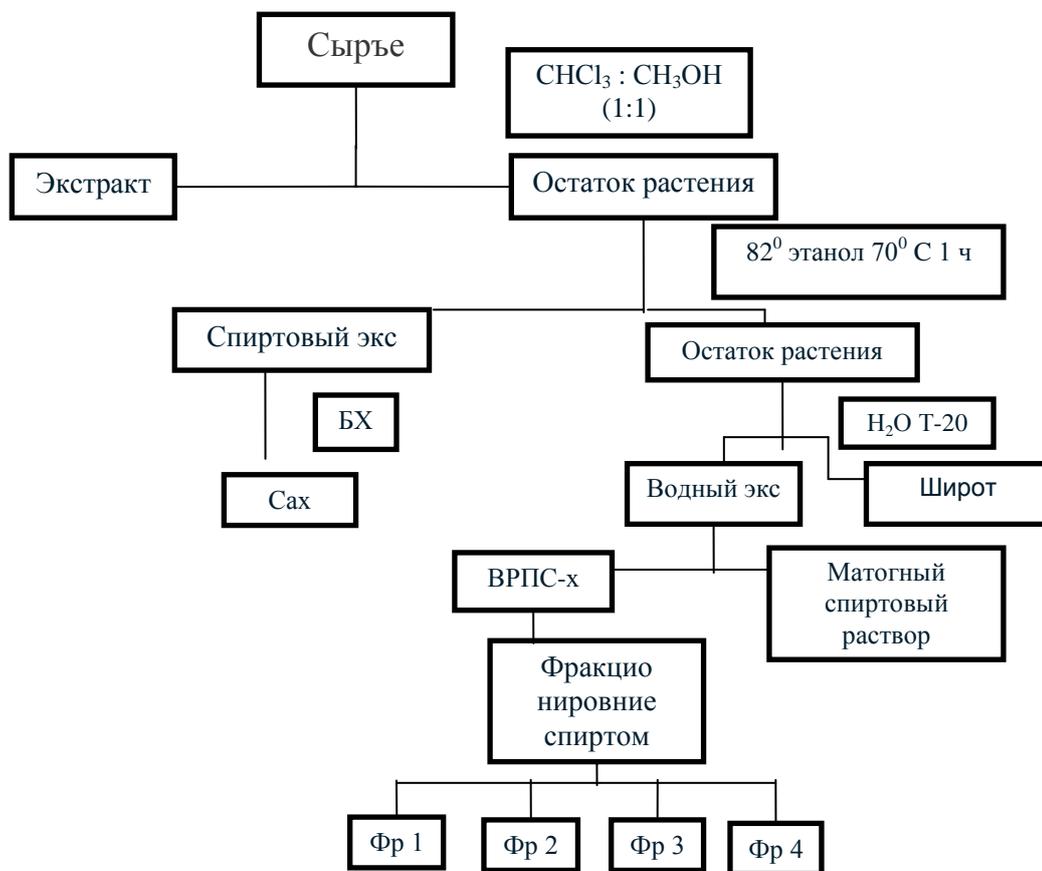
-физико-химическая характеристика выделенных полисахаридов.

Мы изучали углеводный состав цветков *L. inebrians* [25]. Сбор сырья проводили в фазу массового цветения в мае 2013 году в окрестностях Самаркандской области.

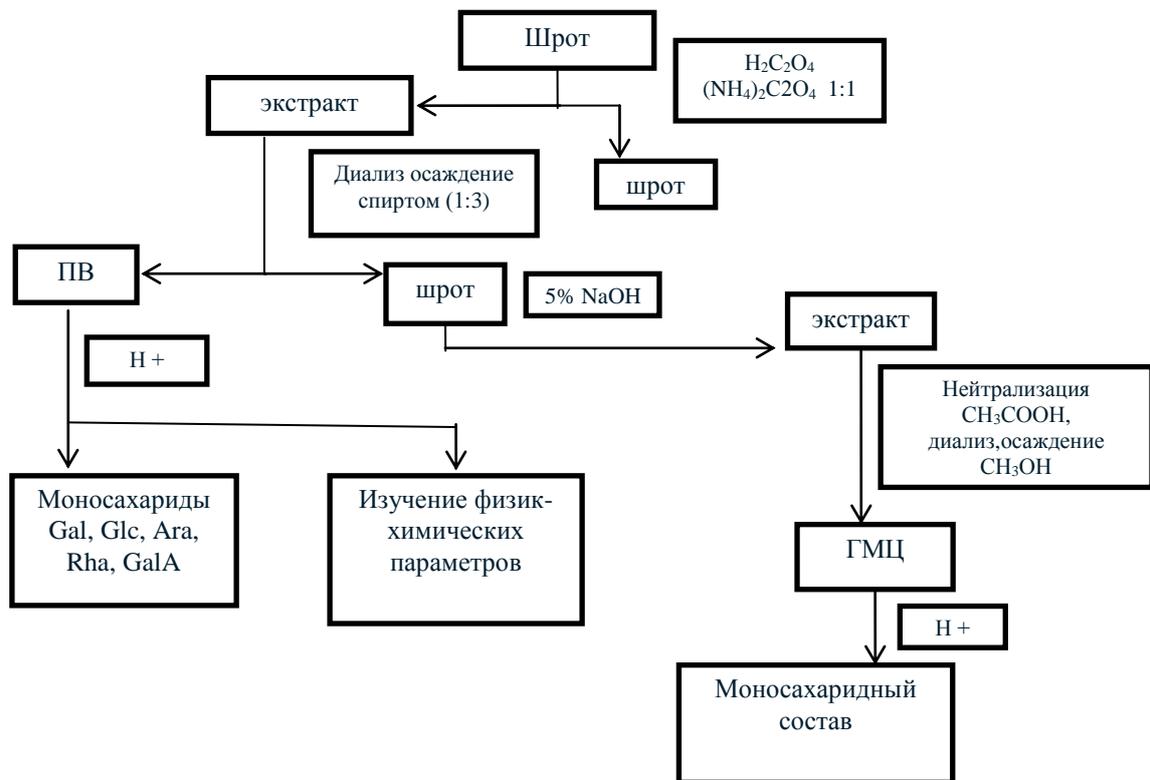
Для выделения углеводов измельченное воздушно-сухое сырье обрабатывали сначала смесью хлороформ-метанол для удаления красящих и низкомолекулярных соединений, затем экстрагировали 82%-ным спиртом, где в спиртовом экстракте методом бумажной хроматографии (БХ) была идентифицирована сахароза. Далее углеводы выделяли последовательно по схеме 1.

#### **Схема выделения полисахаридов**

**Схема1**



Продолжение схема1



Исчерпывающую экстракцию водорастворимых полисахаридов проводили двумя способами: сначала сырье экстрагировали водой при комнатной температуре, получили ВРПС-х с выходом 3.6 %, экстракцией горячей водой при температуре 80°C - ВРПС-г -2.8%. Экстракцией шрота смесью 0,5%-ных растворов щавелевой кислоты и оксалата аммония при 70°C выделили пектиновые вещества (ПВ). ГМЦ экстрагировали 5%-ным раствором щелочи [26]. Данные по содержанию углеводов и их моносахаридному составу приведены в табл. 1. Как видно из табл.1 полисахариды в цветках растений распределены не одинаково.

Образцы ВРПС представляют собой аморфные порошки кремового цвета, хорошо растворяются в воде, образуя невязкие растворы  $\eta_{\text{отн}}=1,82$ ;  $\eta_{\text{отн}}=2,0$ (с 1% H<sub>2</sub>O) для ВРПС-х и ВРПС-г соответственно. Не содержат крахмала, о чем свидетельствует отрицательная реакция с йодом. Моносахаридный состав полисахаридов определяли после кислотного гидролиза методом бумажной и газожидкостной хроматографии и он представлен галактозой, арабинозой, ксилозой, глюкозой и уроновыми кислотами. ВРПС отличаются лишь количественным соотношением моносахаридов. Доминирующим моносахаридом в ВРПС-х является галактоза и арабиноза, ВРПС-г - галактоза. Следует отметить, что по моносахаридному составу ВРПС-х и ВРПС-г относятся к кислым полисахаридам. Об этом свидетельствует присутствие уроновой кислоты, которая была идентифицирована БХ.

Изучение моносахаридного состава БХ, ГЖХ (в виде ацетатов альдононитрилов) показало, что доминирующими во всех фракциях являются арабиноза и галактоза.

Таблица 1.

## Содержание и моносахаридный состав полисахаридов

*Lagochilus inebrians*

Тип полисахаридов	Выход %	Соотношение моносахаридов, ГЖХ						
		<i>Rha</i>	<i>Xyl</i>	<i>Ara</i>	<i>Glc</i>	<i>Man</i>	<i>Gal</i>	<i>GalUA</i>
ВРПС-х	3,58	-	-	3,0	1,0	-	4,2	+
ВРПС-г	2,82	-	-	1,3	1,0	-	3,9	+
ПВ	7,0	Сл.	1,0	1,8	2,0	-	2,5	+
ГМЦ	3,9	-	1,0	2,0	2,8	-	2,3	+

Для получения гомогенного полисахарида ВРПС-х фракционировали спиртом и получили 4 фракции с выходами: 10.0% фракция-1, 20% фракция-II, 5% фракция-III и фракция-IV- 0,75%. соответственно. Из них фракция-II является наибольшей по выходу и по данным ультрацентрифугирования оказалась гомогенной. Молекулярная масса, определенная по константе седиментации, составляет 27000 Da. Моносахаридный состав представлен глюкозой, арабинозой и галактозой. Следовательно, фракция-II является глюкоарабиногалактаном.

Глюкоарабиногалактан (ГАГ) - белый аморфный порошок, растворяется в воде, образует невязкие растворы, которые не дают окрашивания с йодом, образуют осадок с растворами солей тяжелых металлов. ИК-спектры были обнаружены полосы поглощения в областях 3375, 2937, 1419, 1350, 1075, 920, 860, 799, 557, 423 см<sup>-1</sup>.

Природный полисахарид пектин - уникальный биополимер, он является одним из основных строительных материалов клеточных стенок высших растений, обладает широким спектром функциональных свойств. В сочетании с водой и некоторыми другими веществами он проявляет себя в качестве загустителя, студнеобразователя, стабилизатора, эмульгатора, агента, связывающего катионы металлов.

Исходя из этого, после выделения ВРПС из остатка сырья были экстрагированы пектиновые вещества с выходом 7%.

Выделенные пектиновые вещества представляют собой светлокорицевого цвета порошок, растворяясь в воде имеет относительную вязкость 16,25 дл/г. Молекулярная масса пектиновых веществ, определенная вискозиметрическим методом, равна 22000 Da [27]. Моносахаридный состав ПВ представлен галактуроновой кислотой и нейтральными моносахаридами: галактозой, глюкозой, ксилозой, арабинозой и рамнозой находится в следовых количествах.

Титрометрическим методом определены количественные характеристики карбоксильных групп ПВ *L. Inebrians*, К<sub>с</sub>-свободные карбоксильные группы составляют-10%, К<sub>э</sub>-этерифицированные карбоксильные группы-21,6%. Степень этерификации-33%, что позволяет отнести ПВ к группе низкоэтерифицированных пектинов [28].

В ИК-спектрах ПВ в основном присутствовали полосы поглощения в области 870, 1020, 1110, 1450, 1650, 1750, 2940, 3400 см<sup>-1</sup>. Наличие в ИК-спектрах полосы поглощения при 870 см<sup>-1</sup> позволяет предположить, что в ПВ остатки галактуроновой кислоты в пиранозной форме связаны между собой гликозидными связями в α - конфигурации. Присутствие в ИК- спектре ПВ полос поглощения в

области 1700-1800  $\text{см}^{-1}$  характерно для поглощения сложноэфирных и карбоксильных групп.

Частичным кислотным гидролизом ПВ (1н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 4ч,  $100^\circ\text{C}$ ) получили галактуронан, состоящий только из остатков D-галактуроновой кислоты. В ИК-спектре галактуронана обнаружены полосы поглощения в области 840, 870, 910, 1120, 1250, 1350, 1450, 1750, 2940, 3420  $\text{см}^{-1}$ , которые характерны для пектинов. Данные ИК-спектроскопии (860 и 920  $\text{см}^{-1}$ ) и высокое положительное удельное вращение ПВ, позволяют предположить, что между остатками галактуроновой кислоты в пиранозной форме существует  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидная связь [29].

Таким образом, надземная часть *L. inebrians* является потенциальным источником пектиновых полисахаридов.

ГМЦ представляют собой порошки коричневого и темно-коричневого цвета. Водные растворы гемицеллюлоз не дают цветной реакции на крахмал, они легко растворяются в щелочных растворах. При кислотном гидролизе ГМЦ БХ наряду с нейтральными сахарами, обнаружили галактуроновую кислоту. В ИК-спектрах ГМЦ обнаружены полосы поглощения при 3470, 3359, 2935, 1420, 1350, 1228, 1152, 1079, 920, 860, 530, 420  $\text{см}^{-1}$ . В гидролизатах ГМЦ БХ и ГЖХ (в виде ацетатов альдононитрилов) идентифицировали галактозу, глюкозу, ксилозу, арабинозу и уроновую кислоту. Из табл. 1 видно, что преобладающими нейтральными моносахаридами в ГМЦ являются галактоза и глюкоза.

Следовательно, гемицеллюлоза является гетерополисахаридом.

## ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Общие методы исследования

Растворы упаривали на роторном испарителе при +40–45°C.

Бумажную хроматографию (БХ) проводили на бумаге FN-13, 17,18 (ГДР) в следующей системе растворителей (по объему) нисходящим методом:

1. Бутанол-1–пиридин–вода (6:4:3)

Для индикации пятен применяли следующие реагенты:

1. Кислый фталат анилина 110° (гексозы-коричневого окрашивания)
2. 5% раствор мочевины. 110° (кетосахара синее окрашивания)

Газо-жидкостную хроматографию (ГЖХ-анализ) проводили на приборе Chrom-5 в следующих условиях:

а) колонка из нержавеющей стали (200×0,01 мм); 5%-ный Silicone XE-60 на хроматоне NAW-0,200–0,255 мм, 210°, газ-носитель азот, 30 мл/мин, для ацетатов альдононитрилов;

**Вязкость** определяли по времени истечения 1%, 0,5%, 0,25% растворов образцов в воде в вискозиметре Оствальда, диаметр капилляра 0,82 мм., при температуре 19°±3°C.

**Седиментационный анализ** проводился на ультрацентрифуге MOM-3170. Седиментационные кривые получены при C=10 мг/мл в воде, 50000 об/мин, температура 20°C, скорость съемки 5 мин.

**ИК-спектры** образцов снимали на ИК-Фурье-спектрометре фирмы Perkin-Elmer, модель 2000, в таблетках с KBr (5 мг вещества на 200 мг KBr).

**Титрометрические данные** вычисляли следующим образом:

**Определение свободных карбоксильных групп ( $K_c$ )** 0,25 г промытого и высушенного пектина растворяли в 100 мл дистиллированной воды, нагретой до 40°C,. Растворяли 2 ч и титровали 0,1 н раствором едкого натра с фенолфталеином до слабо-розовой окраски. Содержание свободных карбоксильных групп COOH ( $K_c$ ) вычисляли по формуле:

$$K_c = \frac{a}{p} \cdot 0,45\%$$

где  $a$  – количество 0,1 н NaOH, израсходованное на титрование, мл;

$p$  –навеска взятого промытого пектина, г.

**Этерифицированные карбоксильные группы ( $K_e$ )** определяли следующим образом. К пробе, нейтрализованной при определении свободных карбоксильных групп, при помощи пипетки прибавляли точно 50 мл 0,1 н едкого натра, закрывали колбу и оставляли на 2 ч при комнатной температуре для омыления метоксилированных COOH групп. Затем вносили точно 50 мл 0,1 н раствора HCl и избыток ее оттитровали 0,1 н раствором NaOH. Количество 0,1 н NaOH, затраченное на второе титрование, соответствовало количеству этерифицированных COOH в исследуемой пробе:

$$K_e = \frac{B}{p} \cdot 0,45\%$$

где  $B$  – количество 0,1 н NaOH, необходимое для второго титрования, мл;

$p$  –навеска промытого пектина, г.

Общее количество карбоксильных групп COOH ( $K_o$ ) равно сумме свободных и этерифицированных групп:

$$K_o = K_c + K_e, \%$$

Степень этерификации пектина- ( $\lambda$ ) показывает количество этерифицированных карбоксильных групп в процентах от всех карбоксильных групп:

$$\lambda = \frac{K_e}{K_o} \cdot 100\% \quad [47]$$

$$\text{Титр}_1 = 6 \text{ мл}$$

$$\text{Титр}_2 = 12 \text{ мл}$$

$$P = 0,25 \text{ г}$$

$$1. K_e = \frac{6}{0,25} \cdot 0,45\% = 10,8\%$$

$$2. K_e = \frac{12}{0,25} \cdot 0,45\% = 21,6\%$$

$$K_o = K_c + K_e, \% = 10,8 + 21,6 = 32,4$$

$$\lambda = \frac{K_e}{K_o} \cdot 100\%$$

$$\lambda = \frac{10,8}{32,4} \cdot 100\% = 33\% \text{ степень этерификации}$$

**Инактивация растения.** 100 г воздушно-сухого сырья инактивировали смесью хлороформа и метанола (1:1) на кипящей водяной бане по 1 ч трижды. Сырье отделили фильтрованием. Остаток сырья экстрагировали кипящим 82° спиртом (1:5) дважды по 1 ч.

Экстракты объединяли. Упаривали и БХ обнаружили сахарозу. (систем1. проявитель 2).

**Выделение ВРПС.** Сырье после инактивации экстрагировали сначала холодной водой (1:5), дважды. Затем, шрот растения экстрагировали горячей водой (1:10, 1:5) дважды по 2 часа. Экстракт сгущали на роторном испарителе и осаждали спиртом в соотношении 1:3. Высушенные полисахариды получили с выходом 3,58 г и 2,82 г соответственно (ВРПС-х 3,58% и ВРПС-г 2,82 %).

**Выделение ПВ.** Остаток сырья после выделения ВРПС экстрагировали растворами щавелевой кислоты и оксалата аммония методом описанным выше, выделены ПВ с выходами 7,2 г (7,2%).

**Выделение гемицеллюлоз.** Остатки сырья после выделения ВРПС, ПВ экстрагировали 5% раствором едкого натра (1:10, 1:5) при комнатной температуре в течение 2 часов. После обработки получили ГМЦ с выходом 3,9 г (4,3%).

**Полный кислотный гидролиз ВРПС, ПВ и ГМЦ** По 0,1 г образцов полисахаридов из цветков растения гидролизовали 4 мл 1 н.  $H_2SO_4$ . Все гидролизаты нейтрализовали  $CaCO_3$ , деионизировали катионитом КУ-2 ( $H^+$ ), упаривали и изучали БХ (система 1, проявитель 1). Моносахаридный состав и соотношение моносахаридов приведены в табл. 1 (см. стр. 26).

**Фракционное осаждение спиртом.** 2 г ВРПС растворяли в 50 мл воды и при сильном перемешивании добавляли 50 мл спирта. Выпавший осадок (I) отделяли центрифугированием, промывали ацетоном и сушили в вакууме над  $P_2O_5$ . Выход 0,4 г 10%(фракция-I). К надосадочной жидкости добавляли еще 50 мл спирта, осадок отделяли и сушили. Выход 0,8 г-20%. фракция-II)

К надосадочной жидкости добавляли еще 50 мл спирта, осадок отделяли и сушили. Выход—0,2г - 5%. фракция-III) Водно-спиртовой маточный раствор упаривали, осаждали спиртом. Осадок отделяли и сушили. Выход 0,015г- 0,75% фракция-IV).

**Кислотный гидролиз.** К фракция-II 0,1 г полисахарида добавили 4 мл 1 н  $H_2SO_4$  и гидролизовали 4 часа при  $100^\circ$ . После обработки гидролизата БХ (система 1, проявитель 1) и ГЖХ (условие 1) обнаружили галактозу, арабинозу и глюкозу.

**Получение гомогалактуронана** 0,1г ПВ растворяли 15 мл 0,5 н.  $H_2SO_4$  нагревали при  $100^\circ$  в течение 4ч. Выпавший осадок центрифугировали, промывали 50% водным метанолом. Высушивали, выход 0,05 г. После полного кислотного гидролиза (2Н.  $H_2SO_4$ ,  $100^\circ$ , 48ч.) обнаружили только галактуроновую кислоту.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые был выделен и охарактеризован углеводный состав цветков растения *Lagochilus inebrians*.

2. Изучено количественное содержание полисахаридов, их моносахаридный состав и физико-химические свойства.

3. Показано, что водорастворимый полисахарид относится к типу глюкоарабиногалактанам.

4. Изучены пектиновые вещества цветков *Lagochilus inebrians*. Результаты исследований показали, что пектин является низкоэтерифицированным полисахаридом.

5. Частичным кислотным гидролизом ПВ получен галактуронан.

6. Данные ИК- спектроскопии показали, что основу ПВ составляет  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 связанный галактуронан, а нейтральные сахара находятся в боковых ответвлениях.

## Литература

1. Химия углеводов. Н.К. Кочетков, А.Ф.Бочков, Б.А. Дмитриев и др. – М.: Химия, 1967.–494– 498 с.
2. Степаненко Б.Н. Химия и биохимия углеводов (Полисахариды): Учеб. пособие для вузов. – М.: Высш. школа, 1978. – 50–161с.
3. 1.Прогресс химии углеводов. Под. ред. И.В.Торгов. М.Наука, 1985.- 6 с.
4. Mukherjee A.R., Choudhuri D., Bagchi P. Constitution of the galactomannan from the Kernel of Green Palmura Palm Nut (*Borassus flabellifer linn*) // *Can.J. Chem.*–1961.–Vol.39, № 7.– P. 1408-1418.
5. Rao V., Subba, Rao M.V.L. Galactomannan from the tegmen of the seeds of *Sesbania grandiflora Pevs* // *Indian J. Chem.*–1965.–Vol.3, №8.– P.361-363.
6. Jones J.K., Stoodley R.J. Fractionation using copper complex // *Methods in Carbohydr. Chem.* New York.–London: Acad. Press.– 1965.– Vol.5.–P.36-38.
7. Оводов Ю.С. Газожидкостная хроматография углеводов.– Владивосток, 1970. –70 с.
8. Хайс И.М., Мацек К. Хроматография на бумаге. – М.: Мир, 1962. 254–300 с.
9. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. – М.: Мир, 1965.- 454–461с.
10. Детерман Г. Гель хроматография. – М.: Мир, 1970.– с.253
11. Полисахариды сапониноносных растений. XIV.Структурное исследование глюкоарабиногалактана корней *Acanthophyllum pungens* // Арифходжаев А.О., Курбанова А.Д., Рахимов Д.А., Шашков А.С. *Химия природ.соедин.* –2003. – № 2.– С.111.

12. Косаганов Ю.Н., Трифонов Э.Н. Гидродинамические методы. Под.ред. Лазуркина Ю.С.- М.: Наука, 1967.-238–274 с.
13. Жбанков Р.Т. Инфракрасные спектры и структуры углеводов. – Минск: Наука и техника, 1972.-7–75 с.
14. 46. Филиппов М.П. Инфракрасные спектры пектиновых веществ. –Кишинев: Штиинца, 1978.-С.76.
15. Оводов Ю.С. Полисахариды цветковых растений: Структура и физиологическая активность// Биоорган. Химия. –Т.24.- С.483-501.
16. Peter D. Adamo. Larch arabinogalactan is a novel immune modulator //J. Naturopath. Med.-1996.-N 4.-P32-39.
17. Алексеева Т.В., Антоновский С.Д., Беленькая Н.Г., Чочиева М.М., Терлукова А.Ф. Влияние арабиногалактана на свойства бумаги// Химия древесины.- 1978. №5.-С.104.
18. Михайлов В.Г., Михайлова Н.Т, Кудрявцева М.В. Химия и использование экстрактивных веществ дерева // Тез докл.- Горький, 1990
19. Атлас Ареалов и ресурсов, лекарственных растений СССР. М., 1980
20. Б.Н. Головкин, Л.А. Китаева, Э.П. Немченко «Декоративные растения СССР», Москва, Мысль» 1986, с.238.
21. Зайнутдинов У.Н., Исламов Р., Далимов Д.Н., Абдурахманов Т.Р., Матчанов А.Д., Выпова Н.Л. Гемостатическая активность дитерпеноидов группы лагохилина и ее связь со структурой // Химия природных соединений. 2002. №2. С. 135–136.
22. Тураева Д.Т., Выпова Н.Л., Далимова С.Н., Далимов Д.Н., Матчанов А.Д., Ниязимбетова Д. Влияние препарата Лаговин на процесс свертывания крови в опытах *in vitro* // Доклады АН РУз. 2008. №1. С. 43–46.

23. Зайнутдинов У.Н., Далимов Д.Н., Матчанов А.Д., Исламов А.Х., Тлегенов Р.Т., Бозорова Н.Х., Собирова Ф.А. Сравнительное изучение дикорастущей и культурной форм *lagochilus inebrians* // Химия растительного сырья. 2011. №2. С. 189–190.

24. М.Х. Маликова, Д.А. Рахимов Растительные полисахариды. VIII. Полисахариды *lagochilus zeravschanicus* // Химия природных соединений, 1997, №4, с.569

25. Жауынбаева К.С., Рахматова Н., Рахманбердыева Р.К. Полисахариды *lagochilus inebrians* IV Республ. конф. Термез 1-3 мая 2014,

26. Арифходжаев А.О., Курбанова А.Д., Рахимов Д.А. Исследование полисахаридов *Asantophyllum Knorringianum* //Химия природ.соедин.-1999.-С169-170.

27. Коваленко С.Л., Куриленко О.Д. Вязкость пектиновых веществ // Укр. химический журнал. 1965. –Т. 31, №2.- С.175-179.

28. Жауынбаева К.С., Рахматова Н., Рахманбердыева Р.К. Пектиновые полисахариды *Lagochilus inebrians* Респуб. конф. «Роль полимерных материалов в инновационном развитии промышленности» 23 мая 2014, ИХФП АН РУз, Ташкент.

29. Аймухамедова Г.Б., Алиева Д.Э., Шелухина Н.П. Свойства и применение пектиновых сорбентов. – Фрунзе: Илим, 1984.-С.61.

