

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского
Биология. Химия. Том 12 (78). 2026. № 1. С. 285–291.

УДК 547.918:543.422:582.5/.9+577.151

DOI 10.5281/ZENODO.19658687

ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ ARALIACEAE.

IV. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ В УСТАНОВЛЕНИИ ЧАСТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ГЛИКОЗИДОВ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА АРАЛИЕВЫЕ

Гришковец В. И.

*Институт биохимических технологий, экологии и фармации (структурное подразделение)
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Россия
E-mail: vladgri56@yandex.ru*

В статье рассмотрены ферментативные методы в установлении частичной структуры тритерпеновых гликозидов растений семейства Аралиевых. Рассмотрено использование гидролазных ферментов – гесперидиназы, нарингиназы и пектиназы, эмульсина, фермента виноградной улитки и фермента листьев и плодов плюща. Показаны преимущества данных методов (малое количество вещества и времени для анализа) и важность получаемой структурной информации для последующего установления полной структуры с использованием методов спектроскопии ЯМР.

Ключевые слова: *Araliaceae*, тритерпеновые гликозиды, ферментативные методы анализа.

ВВЕДЕНИЕ

В предыдущей статье [1] были рассмотрены химические методы установления частичной структуры тритерпеновых гликозидов. Однако в ряде случаев особенно информативными с точки зрения установления структуры оказываются методы ферментативного гидролиза. Энзиматический гидролиз это очень эффективный и мягкий метод отщепления сахаров от тритерпеновых гликозидов без образования артефактов, особенно в случае лабильных агликонов. Кроме того, дополнительное преимущество ферментативного гидролиза специфическими ферментами состоит в автоматическом доказательстве аномерной конфигурации углеводных остатков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ферментативный гидролиз осуществляли путем растворения субстрата (тритерпенового гликозида) приблизительно в 100-кратном количестве воды, добавления 5–10 кратного весового количества фермента, тщательного перемешивания смеси и выдерживания при 40–50 °С в течение от нескольких часов

до суток с ТСХ контролем. После завершения процесса добавляли 3–5 кратный объем метанола, нагревали до кипения и отделяли денатурированный фермент центрифугированием. Супернатант упаривали досуха или экстрагировали бутанолом и продукты ферментолиза анализировали с помощью ТСХ.

Получение суммарных ферментных препаратов гликозидаз из виноградной улитки, из листьев или семян плюща, эмульсина из семян миндаля и гесперидиназы из колонии *Penicillium* spp., выращенной на плодах плюща крымского, проводили следующим образом: животный или растительный материал тщательно диспергировали с 5–10 кратным весовым количеством воды в течение примерно 5 минут, полученную суспензию центрифугировали при 9000 об/мин, супернатант отделяли от осадка животных или растительных тканей. К супернатанту добавляли 10-кратный объем ацетона и осаждали сумму белков (ферментов). Для дополнительной очистки суммарную осажденную белковую фракцию растворяли в минимальном (5–10 кратном) количестве воды и вновь переосаждали 10-кратным избытком ацетона. Осадок дополнительно обрабатывали 2–3 раза сухим ацетоном для удаления остатков воды и отфильтровывали на стеклянном фильтре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обсудим некоторые ферментные препараты, использовавшиеся при изучении гликозида Аралиевых. Авторы [2] в своем систематическом исследовании сырых препаратов гесперидиназы, нарингиназы, пектиназы, целлюлазы, амилазы и эмульсина показали, что гесперидиназа, нарингиназа и пектиназа наиболее эффективны в гидролитическом расщеплении гинзенозидов. Целлюлаза использовалась при отщеплении глюкозы от кизутасапонина K7A [3]. Сырая гесперидиназа позволила получить с высокими выходами нативные агликоны сапонинов Жень-Шень – гинзенозидов Rb₁ Rb₂ Rc Rg₁. [2, 4]. Этот же фермент использовался и для отщепления концевой рамнозы в углеводной цепи по C-28 в каулозиде D из *Polyscias dichroostachya* [5]. Авторы [5] также показали, что смесь гесперидиназы и β-D-глюкозидазы ведет к одновременному отщеплению рамнозы в трисахариде по C-28 и остатка глюкозы в дисахаридной цепи по C-3 в каулозиде G из *Polyscias dichroostachya*.

В своей работе по установлению структуры тритерпеновых гликозидов растений семейства Аралиевые [6] мы также использовали сырую гесперидиназу, выделенную из колонии *Penicillium* spp., выращенной на плодах плюща крымского после экстракции гликозидов. Полученный препарат показал наличие исключительно α-L-рамнозидазной активности, как и в двух вышеописанных случаях.

Наиболее часто в нашей работе использовалась сумма гликозидаз, полученная из желудочного сока виноградной улитки *Helix pomatia*. Хорошо известно, что этот ферментный препарат содержит экзоглюкозидазу, и способен отщеплять лишь концевые остатки β-D-глюкозы с любым типом связи (Рис. 1).

Это свойство и использовалось в нашей работе для высокоселективного отщепления концевых остатков глюкозы и выделения прогенинов более простого или же обычно известного строения. Однако определенные трудности при

ферментативном гидролизе суммой гликозидаз из *Helix pomatia* могут возникать из-за стерических затруднений в случае разветвленных углеводных цепей. Так, интересное наблюдение было сделано нами для гликозидов из *Tetrapanax papyriferum* [7], где концевые остатки глюкозы и галактозы находятся у соседних C-2 и C-3 атомов остатка арабинозы. В этом случае фермент не отщепляет остаток глюкозы, хотя в случае разветвленного трисахарида с остатками глюкозы у C-4 и рамнозы у C-2 атомов остатка арабинозы [7] ферментативный гидролиз протекает без каких либо затруднений.

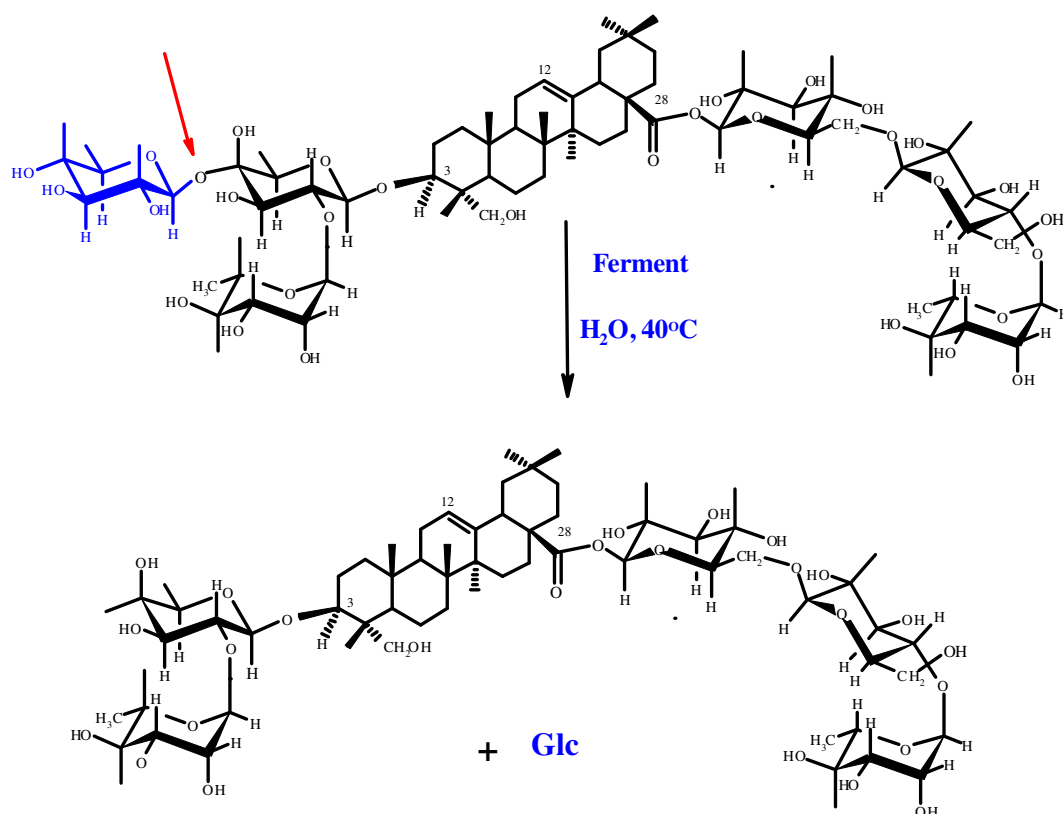


Рис. 1. Схема действия суммы гликозидаз виноградной улитки.

Ферментный препарат из семян розоцветных (эмульсин) содержит высокоспецифическую экзо-β-(1→6)-гликозидазу и не обладает другими активностями. Этот препарат использовался нами и рядом других авторов для доказательства наличия β-(1→6)-гликозидной связи в дисахаридном фрагменте глюкоза→глюкоза по карбоксильной группе агликona в ряде выделенных гликозидов (Рис. 2).

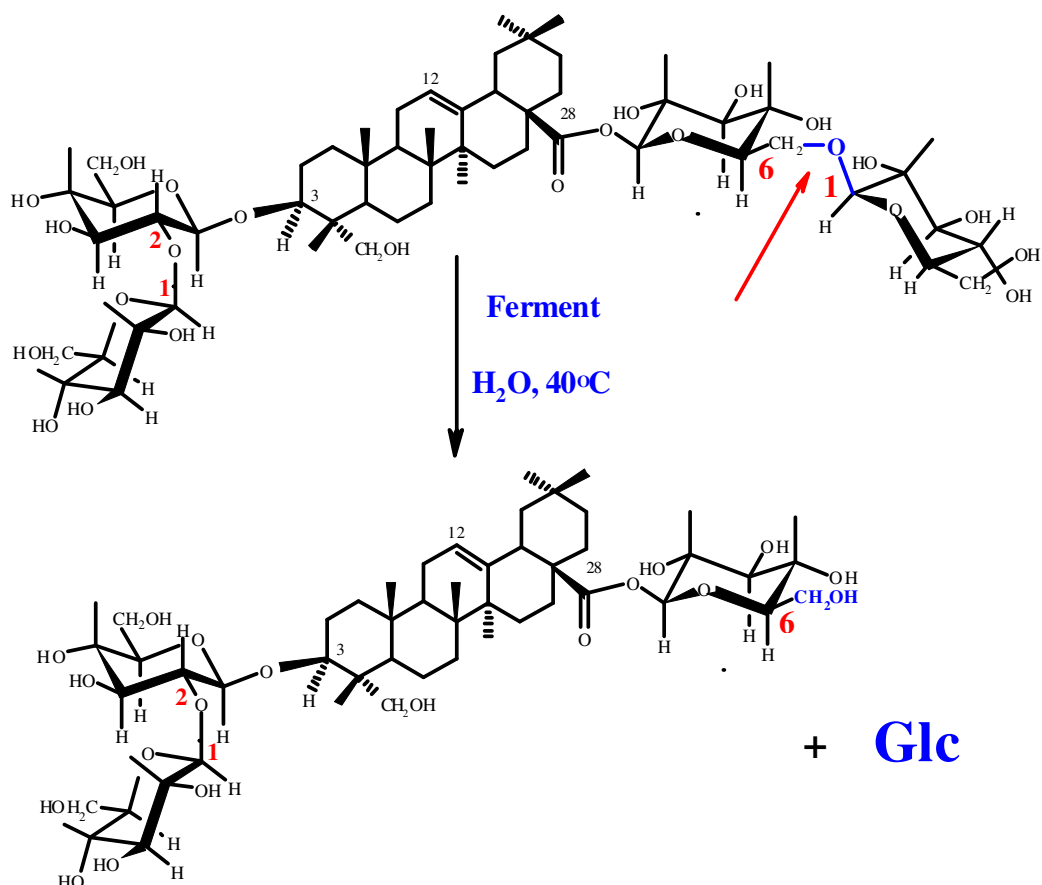


Рис. 2. Схема действия эмульсина из семян Розоцветных.

Особый интерес для структурных исследований представляет выделенный нами ферментный препарат из листьев и семян плюща [8]. Данный фермент расщепляет ацилгликозидную связь и переводит бисдесмозидные гликозиды в мондесмозидные с углеводной цепью по С-3 атому агликона (Рис. 3).

Мы изучили действие полученного ферментного препарата на гликозидах с известной структурой [7] и показали, что фермент одинаково легко отщепляет любой углеводный фрагмент по карбоксильной группе агликона (одна глюкоза, остаток генциобиозы или трисахарида рамноза-глюкоза-глюкоза), причем удаляет его целиком и не расщепляет на отдельные моносахариды. Никакими иными видами гликозидазной активности фермент не обладал, поскольку не наблюдались какие-либо изменения в структуре углеводной цепи по С-3 атому агликонной части гликозидов и получались лишь соответствующие исходным гликозидам прогенины. Более того, было обнаружено, что при наличии одной или двух ацетатных групп в углеводной трисахаридной цепи по С-28 они также сохраняются в отщепляемом трисахариде. Если ацетатная группа находится у остатка арабинозы, связанной с С-3

атомом агликона, то она также сохраняется в полученном прогенине. Таким образом, это дает и ценную информацию и о локализации сложноэфирных групп в той или иной углеводной цепи, которая не может быть столь легко получена какими-либо химическими методами.

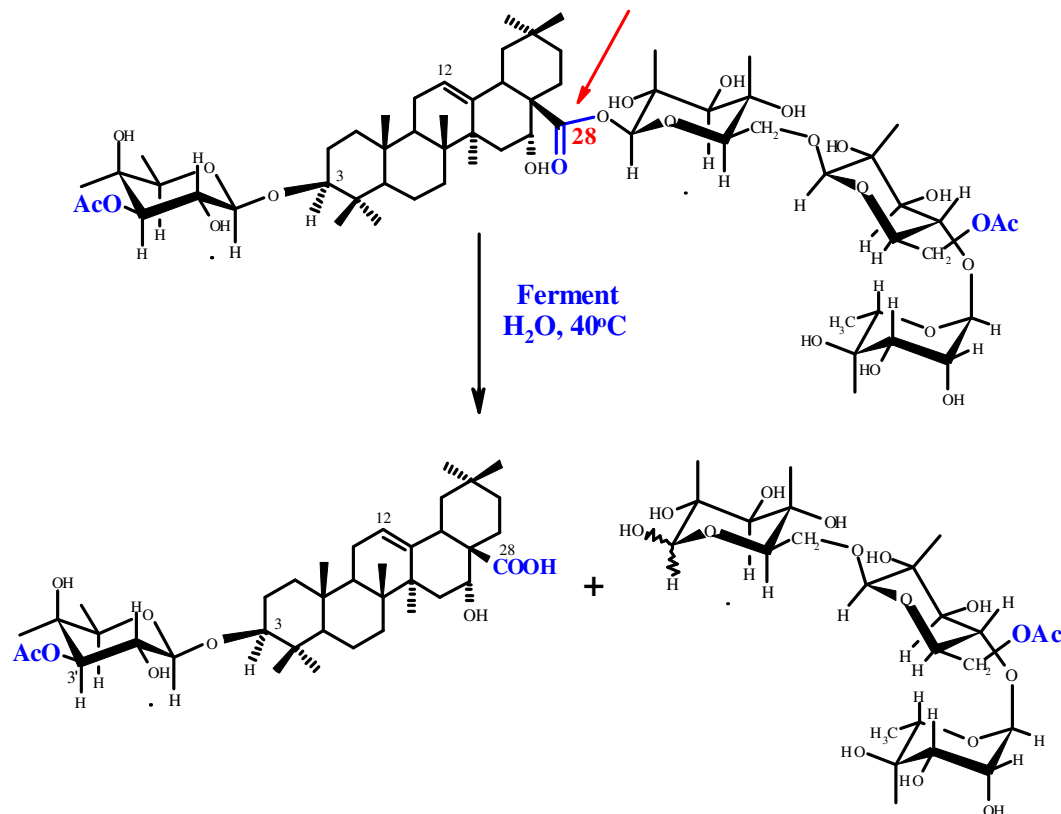


Рис. 3. Схема действия ацилгидролазы плюща.

Использование этого ферментного препарата представляе интерес, прежде всего, в установлении структуры углеводной цепи по C-28 атому агликона, поскольку при щелочном гидролизе отщепляемый фрагмент подвергается множественным превращениям и не может быть проанализирован, а ТСХ-анализ продуктов ферментализа не представляет труда после осаждения фермента горячим спиртом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Описаны ферментативные методы в установлении частичной структуры тритерпеновых гликозидов растений семейства Аралиевых.
2. Рассмотрено использование гидролазных ферментов – гесперидиназы, нарингиназы и пектиназы, эмульсина, фермента виноградной улитки и фермента листьев и плодов плюща.

3. Показаны преимущества данных методов (малое количество вещества и времени для анализа) и важность получаемой структурной информации для последующего установления полной структуры с использованием методов спектроскопии ЯМР.

Список литературы

1. Гришковец В. И. Тритерпеновые гликозиды *Araliaceae*. III. Химические методы в установлении частичной структуры гликозидов растений семейства Аралиевые / В. И. Гришковец // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2025. – Т. 11 (77), № 4. – С. 273–279.
2. Kohda H. Enzymatic hydrolysis of ginseng saponins and their related glycosides / H. Kohda, O. Tanaka // Yakugaku Zasshi. – 1975. – Vol. 95. – P. 246–249.
3. Kizu H. Studies on the constituents of *Hedera rhombea* Bean. III. On the dammarane triterpene glycosides. (2). / H. Kizu, M. Koshijima, T. Tomimori // Chem. Pharm. Bull. – 1985. – Vol. 33. – P. 3176–3181.
4. Tanaka O. Saponins of ginseng and related plants / O. Tanaka, R. Kasai // Prog. Chem. Org. Nat. Prods. – 1984. – Vol. 46. – P. 1–76.
5. Gopalsamy N. Molluscicidal saponins of *Polyscias dichroostachia* / N. Gopalsamy, J. Gueho, H. R. Julien [et al.] // Phytochemistry. – 1990. – Vol. 29. – P. 793–795.
6. Гришковец В. И. Тритерпеновые гликозиды аралиевых: выделение, установление строения, биологическая активность и хемотаксономическое значение : Автореф. дис. ... д-ра хим. наук. / В. И. Гришковец. – Одесса, 2004. – 36 с.
7. Гришковец В. И. Тритерпеновые гликозиды Аралиевых: структуры выделенных тритерпеновых гликозидов / В. И. Гришковец, В. Я. Чирва, В. В. Качала [и др.] // Труды Никитского ботанического сада. – 2007. – Т. 128. – С. 90–102.
8. Гришковец В. И. Выделение и характеристика ферментного препарата из листьев и плодов видов растений рода плющ (*Hedera* L.) / В. И. Гришковец // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2025. – Т. 11 (77), № 4. – С. 267–272.

TRITERPENE GLYCOSIDES OF ARALIACEAE. IV. ENZYMATIC METHODS IN DETERMINING THE PARTIAL STRUCTURE OF ARALIACEAE FAMILY PLANTS GLYCOSIDES

Grishkovets V. I.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russian Federation
E-mail: vladgri56@yandex.ru*

In a number of cases, enzymatic hydrolysis methods are particularly informative in terms of establishing the structure. Enzymatic hydrolysis is a very effective and gentle method for cleaving sugars from triterpene glycosides without the formation of artifacts, especially in the case of labile aglycons. Additionally, an additional advantage of enzymatic hydrolysis with specific enzymes is the automatic proof of the anomeric configuration of the carbohydrate residues.

Enzymatic hydrolysis was carried out by dissolving the substrate (triterpene glycoside) in approximately 100 times the amount of water, adding 5–10 times the weight

of the enzyme, thoroughly mixing the mixture, and incubating at 40–50 °C for several hours to a day with TLC control. After the process was completed, 3–5 times the volume of methanol was added, heated to boiling, and the denatured enzyme was separated by centrifugation. The supernatant was evaporated dry or extracted with butanol, and the enzymolysis products were analyzed using TLC.

The article discusses enzymatic methods in establishing the partial structure of triterpene glycosides of plants of the *Araliaceae* family. The use of hydrolase enzymes – hesperidinase, naringinase and pectinase, emulsifier, enzyme of grape snail and enzyme of ivy leaves and fruits is considered. The advantages of these methods (low amount of substance and time for analysis) and the importance of the obtained structural information for the subsequent establishment of the complete structure using NMR spectroscopy methods are shown.

Keywords: *Araliaceae*, triterpene glycosides, enzymatic methods of analysis.

References

1. Grishkovets V. I. Triterpene glycosides of *Araliaceae*. III. Chemical methods in establishing the partial structure of glycosides from plants of the *Araliaceae* family, *Scientific notes of the Crimean Federal University named after V. I. Vernadsky. Biology. Chemistry*, **11** (4), 273 (2025). (in Russ.).
2. Kohda H., Tanaka O., Enzymatic hydrolysis of ginseng saponins and their related glycosides, *Yakugaku Zasshi*, **95**, 246 (1975)
3. Kizu H., Koshijima M., Tomimori T., Studies on the constituents of *Hedera rhombea* Bean. III. On the dammarane triterpene glycosides. (2), *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3176 (1985).
4. Tanaka O., Kasai R., Saponins of ginseng and related plants, *Prog. Chem. Org. Nat. Prods.*, **46**, 1 (1984).
5. Gopalsamy N., Gueho J., Julien H. R., Owadally A. W., Hostettmann K., Molluscicidal saponins of *Polyscias dichroostachia*, *Phytochemistry*, **29**, 793 (1990).
6. Grishkovets V. I. Triterpene glycosides of *Araliaceae*: isolation, structure determination, biological activity and chemotaxonomic significance, Author's abstract of dissertation for academic degree of doctor of chemical sciences, 36 p. (Odessa, 2004). (in Ukr.).
7. Grishkovets V. I., Chirva V. Ya., Kachala V. V., Shashkov A. S. Triterpene Glycosides of the *Araliaceae*: Structures of the Isolated Triterpene Glycosides, *Proceedings of the Nikitsky Botanical Garden*, **128**, 90 (2007). (in Russ.).
8. Grishkovets V. I. Isolation and characterization of an enzyme preparation from leaves and fruits of plant species of the *Hedera* genus (*Hedera* L.), *Scientific notes of the Crimean Federal University named after V. I. Vernadsky. Biology. Chemistry*, **11** (4), 267 (2025). (in Russ.).