

## Wasser-lösliche Polysaccharide aus den Wurzeln von *Polygonum cuspidatum* SIEB. et ZUCC.

TAKAO MURAKAMI und KATSUMI TANAKA

*Pharmazeutisches Institut der Naturwissenschaftlichen Universität (Tokio Rika Daigaku)*<sup>1)</sup>

(Eingegangen am 20. Januar 1973)

Aus den Wurzeln von *Polygonum cuspidatum* SIEB. et ZUCC. (= *Reynoutria japonica* Hour.) wurde ein Polysaccharid mit einem Mol-Gewicht von ca. 6000 isoliert, über dessen Struktur diskutiert wurde.

Die Carragenin-Ödem-hemmende Wirksamkeit des Wasser-Extrakts der Wurzeln von *Polygonum cuspidatum* SIEB. et ZUCC. (= *Reynoutria japonica* Hour.) (jap. Name: Itadori) konnte auf ein in den Wurzeln enthaltenes Polysaccharid zurückgeführt werden.<sup>2)</sup> Das veranlasste uns, dieses Polysaccharid zu untersuchen.

Die Wurzeln wurden mit Wasser extrahiert, der Extrakt, wie im experimentellen Teil beschrieben, aufgearbeitet und das Rohpolysaccharid als hygroskopisches und aschfarbiges Pulver gewonnen. Das Rohpolysaccharid, das keinen Stickstoff enthielt, wurde an DEAE-Cellulose (OH-Form)<sup>3)</sup> mit NaOH steigender Konzentration chromatographiert. Wie in Abb. 1 angegeben, wurden vier Komponenten (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> und P<sub>4</sub>) getrennt und P<sub>1</sub> wurde zur weiteren Reinigung an DEAE-Cellulose (Borat Form)<sup>3)</sup> chromatographiert. Bei der Elution mit Wasser wurde das Polysaccharid F<sub>1</sub> (I) als weisses Pulver,  $[\alpha]_D^{20} + 136.0^\circ$  ( $c = 0.32$ , in Borat-Puffer) erhalten, das sich im Elektropherogramm<sup>4)</sup> und auch im Sedimentationslauf der analytischen Spinco-Ultracentrifuge als einheitlich erwies. Durch die analytische Ultracentrifugen-Methode wurde für dieses Polysaccharid das Mol-Gewicht von etwa 6000 ermittelt, demnach konnten insgesamt etwa 38 Monosaccharid-Einheiten erwartet werden.

Das Polysaccharid F<sub>1</sub> lieferte bei der Säurehydrolyse D-Glucose, D-Galaktose, D-Mannose, L-Rhamnose und L-Arabinose im Verhältnisse von 28:4:4:1:1.

Die partielle Hydrolyse mit 0.01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ergab neben Monosaccharide Cellobiose, die papierchromatographisch identifiziert werden konnte und die enzymatische Hydrolyse mit Emulsin als Spaltprodukt D-Glucose.

Die partielle Hydrolyse mit Oxalsäure ergab als Spaltprodukt L-Arabinose. Demnach liegt L-Arabinose in der furanosiden Form<sup>5)</sup> vor und bildet eine Endgruppe in einer verzweigten Zuckerkette.

Die Permethylierung des Polysaccharids F<sub>1</sub>, nach Srivastava und Mitarbeitern<sup>6)</sup> durchgeführt, ergab bei nachfolgender Hydrolyse die Methylzucker, hauptsächlich aber 2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucose, 2,3,6-Tri-O-methyl-D-galaktose und 2,3,6-Tri-O-methyl-D-mannose und sehr wenig 2,3-Di-O-methyl-D-glucose und 2,3-Di-O-methyl-D-mannose. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Zuckerkette zur Hauptsache aus D-Glucoseresten in 1,4-glykosidischer Bindung aufgebaut ist.

Die säurekatalysierte Methanolyse lieferte Methyl-per-O-methyl-L-arabinofuranosid, Methyl-per-O-methyl-L-rhamnopyranosid und Methyl-per-O-methyl-D-glucopyranosid sowie

1) Standort: *Funakawara-machi, Shinjuku-ku, Tokyo.*

2) Eigene Ergebnisse, die noch nicht veröffentlicht sind.

3) H. Neukom, H. Deuel, W.J. Heri und W. Kündig, *Helv. Chim. Acta*, **43**, 64 (1960)

4) R.L. Whistler und M.L. Wolfrom, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, V, s. 49, Academic Press Inc., New York, 1965.

5) W.N. Haworth und E.L. Hirst, *J. Chem. Soc.*, **1930**, 2615.

6) H.C. Srivastava, S.N. Harsche und P.P. Singh, *Tetrahedron Letters*, **1963**, 1869.

Methyl-per-O-methyl-D-galaktopyranosid. Dieser Befund zeigte, dass L-Arabinose und L-Rhamnose, sowie ein Teil der D-Glucose und D-Galaktose endständig in der Zuckerkette angeordnet sind. Ferner wies das Auftreten der 2,3-Di-O-methyl-D-glucose und der 2,3-Di-O-methyl-D-mannose bei der Hydrolyse darauf hin, dass die Zuckerkette an Glucosen und Mannosen wenigstens dreifach verzweigt ist.

Die Anordnung der Zuckerkette im Polysaccharid  $F_1$  ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

### Beschreibung der Versuche

Zur Papierchromatographie diente das Papier Toyo-Roshi Nr. 50. Chromatographiert wurde nach der absteigenden Methode in folgenden Lösungsmittelsystemen: System A: *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:2); System B: *n*-Butanol-Äthanol-Wasser-konz. Ammoniak (40:10:49:1); System C: 2-Butanon-Wasser-konz. Ammoniak (90:8:2). Als Anfärbereagentien Anilinhydrogenphthalat für Zucker und Methylzucker.

Zur Gaschromatographie benutzte man das Gerät GC-1C von Shimazu mit Flammen-Ionisations-Detektor (Trägergas: Stickstoff). Zur Trennung von TMS-Zuckerderivate diente als Trennkolonne eine 1.5 m-Kolonne, beladen mit 8% SE-30 auf Gas-Chrom P 60/80, Säulentemperatur 145°. Zur Trennung von Methylzucker diente eine 1.5 m-Kolonne, beladen mit 3% (Kolonne a)-oder 5% (Kolonne b)-Neopentylglykol-succinatpolyester auf Chromsorb W 80/100, Kolonnentemperatur 120–145°.

**Extraktion der Wurzeln**—12 kg Wurzeln von *P. cuspidatum* SIEB. et ZUCC. wurden mit 120 Liter Wasser drei Stunden am Sieden extrahiert, die Extrakte eingedampft, gefriergetrocknet. 660 g braunes Pulver wurden erhalten, die mit siedendem Methanol ausgezogen wurden (3 Liter  $\times$  3). Der Rückstand wurde in 2 Liter Wasser aufgenommen und mit 600 ml 20 proz.  $CCl_3COOH$ -Lösung versetzt, 48 Stunden bei 5° stehengelassen und der Niederschlag abzentrifugiert, anschliessend zehn Tage lang gegen laufendem Wasser durch Cellophan dialysiert. Der Inhalt der Dialyseschläuche wurde sodann konzentriert und mit 5 proz. Kupferacetat-Lösung, bis sich keine braunfarbene Ausfällung mehr abscheidet, versetzt und abzentrifugiert. Ein weiterer Kupfer-Komplex wurde aus der eingeeengten überstehenden Lösung durch Zugabe von Methanol ausgefallen. Die Entkupferung wurde in Äthanol mit 5 proz. alkoholischer konzentrierter Salzsäure durchgeführt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Äthanol und Äther gewaschen. 6.24 g hygroskopisches aschgraues Pulver wurden gewonnen.

**Fraktionierung des Rohpolysaccharids**—1) Chromatographie an DEAE-Cellulose (OH-Form)<sup>3)</sup>: DEAE-Cellulose: Verwendet wurde ein Produkt der Brown Company, Berlin; Austausch-Kapazität: 0.76 m äq/g. Die vorbehandelte DEAE-Cellulose wurde in 0.5N NaOH suspendiert, abfiltriert und mit Wasser gewaschen. 4.81 g Polysaccharid wurden in möglichst wenigem Wasser gelöst, auf die Säule (4  $\times$  50 cm) aufgebracht und nacheinander mit  $H_2O$ , 0.01N NaOH und 0.05N NaOH eluiert. Die Eluate wurden in Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen, jede Fraktion wurde mit Anthronreagenz auf Polysaccharid-gehalt untersucht. Wie in Abb. 1 angegeben, wurden vier Komponenten ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$ ) aufgetrennt. Je 30 mg von  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$  wurden mit 12 ml 1N  $H_2SO_4$  6 Stdn. am Sieden hydrolysiert und das Hydrolysat wurde mit  $Ba(OH)_2$ -Lösung und Amberlite IR-4B neutralisiert und im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wurde mit 5 proz. methanolischer Salzsäure bei 100° 6 Stdn. methanolysiert, anschliessend mit Amberlite IR-4B entsäuert, die Lösung eingedampft und getrocknet. Die entstandenen Methylglykoside wurden nach Yamakawa, *et al.*<sup>7)</sup> in die Trimethylsilyläther übergeführt und gaschromatographisch quantitativ bestimmt.

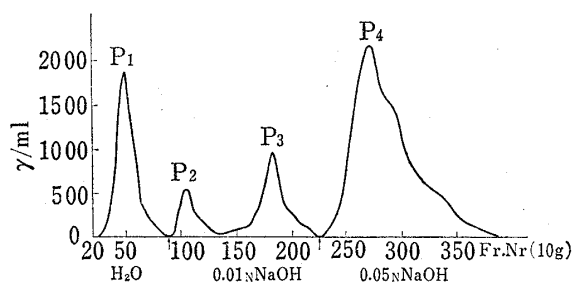


Abb. 1. Fraktionierung des Rohpolysaccharids an einer DEAE-Cellulose-Kolonne (OH-Form)

2) Weitere Chromatographie an DEAE-Cellulose (Borat-Form)<sup>3)</sup>: Das Polysaccharid  $P_1$  370 mg und  $P_4$  1.23 g wurden nochmals an DEAE-Cellulose (Borat-Form) mit Wasser chromatographiert und die Mol-Verhältnisse der Komponentenzucker wurden, wie oben beschrieben, bestimmt.

**Elektrophorese des Polysaccharids  $F_1$** <sup>4)</sup>—Elektrophorese wurde in 0.1M Borat-Puffer (pH 9.8) auf Glasfaser-Papier durchgeführt. Laufzeit 1 Stde., 1000 V, Entwicklung mit *p*-Anisidin-konz.  $H_2SO_4$ .  $F_1$  wanderte bei der Elektrophorese als ein einheitliches Band.

7) T. Yamakawa, N. Ueta und I. Ishizaka, *Japan J. Exp. Med.*, 34, 23 (1964).

TABELLE I. Auftrennung des Rohpolysaccharids an einer DEAE-Cellulose (OH-Form)-Kolonne

Fraktionen	Elutionsmittel	Menge (g)	$[\alpha]_D^{20}$ in H <sub>2</sub> O
P <sub>1</sub>	H <sub>2</sub> O	0.513	+66.7°
P <sub>2</sub>	0.01N NaOH	0.133	+54.8°
P <sub>3</sub>	0.01N NaOH	0.363	+23.3°
P <sub>4</sub>	0.05N NaOH	2.108	+25.9°

TABELLE II. Mol-Verhältnisse der Zuckerkomponenten von P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, und P<sub>4</sub>

Fraktion	Glu	Gal	Man	Rham	Ara	Xyl
P <sub>1</sub>	30	4	3	2	1	Spuren
P <sub>2</sub>	7	4	3	1	1	Spuren
P <sub>3</sub>	7	6	3	1	1	Spuren
P <sub>4</sub>	4	24	3	7	8	1

TABELLE III. Auftrennung von P<sub>1</sub> und P<sub>4</sub> an einer DEAE-Cellulose (Borat-Form)-Kolonne

Aufgetragen (g)	Fraktionen	Elutionsmittel	Menge (g)	$[\alpha]_D^{20}$ in Borat-Puffer (pH 9.2)
P <sub>1</sub> (0.370)	F <sub>1</sub>	H <sub>2</sub> O	0.270	+136.0°
P <sub>4</sub> (1.235)	F <sub>41</sub>	H <sub>2</sub> O	0.036	—
	F <sub>42</sub>	0.05M Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	0.074	—
	F <sub>43</sub>	0.10M Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	0.246	-162.0°
	F <sub>44</sub>	0.20M Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	0.730	—

TABELLE IV. Mol-Verhältnisse der Zuckerkomponenten von F<sub>1</sub>, F<sub>42</sub>, F<sub>43</sub>, und F<sub>44</sub>

Fraktion	Glu	Gal	Man	Rham	Ara	Xyl
F <sub>1</sub>	28	4	4	1	1	—
F <sub>42</sub>	14	10	11	7	1	2
F <sub>43</sub>	8	17	10	10	4	1
F <sub>44</sub>	9	15	14	9	3	1

**Enzymatische Spaltung des Polysaccharids F<sub>1</sub>**—10 mg F<sub>1</sub> wurden in 3 ml Acetat-Puffer-Lösung gelöst und mit 5 mg Emulsin 72 Stdn. bei 30° stengelassen. Nach der Entfernung des Enzyms wurde die Lösung papierchromatographisch (System A) auf Zucker untersucht. Dabei liess sich neben zwei noch nicht identifizierten Oligosacchariden (*Rf*: 0.03, 0.09) D-Glucose (*Rf*: 0.17) nachweisen.

**Partielle Hydrolyse des Polysaccharids F<sub>1</sub>**—a) 15 mg F<sub>1</sub> wurden mit 6 ml 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 Stde. bei 100° hydrolysiert. Papierchromatographisch wurde Cellulose nachgewiesen (Lösungsmittel-System: Butanol-Essigsäure-Wasser/4: 1: 5).

b) 15 mg F<sub>1</sub> wurden mit 12 ml 0.02N Oxalsäure 2 Stdn. bei 100° hydrolysiert. Papierchromatographisch (Lösungsmittel-System A) wurde nur L-Arabinose (*Rf*: 0.38) nachgewiesen.

**Methylierung<sup>6)</sup> und nachfolgende Hydrolyse**—100 mg F<sub>1</sub> wurden in 7 ml DMSO mit 1.7 g BaO und 7 ml CH<sub>3</sub>I 73 Stdn. bei 30° methyliert. Nach üblicher Aufarbeitung wurden die Produkte nach Purdie weiter methyliert. Es resultierten 40 mg eines schwach bräunlichen Sirups, dessen IR-Spektrum keine OH-Bande mehr zeigte. Das Permethylopolysaccharid F<sub>1</sub> wurde im geschlossenen Rohr mit 5 proz. methanolischer Salzsäure bei 100° 8 Stdn. lang erhitzt, anschliessend mit Amberlite IR-4B (OH-Form) neutralisiert und im Vakuum eingedampft. Das so erhaltene Methylglykosidgemisch wurde gaschromatographisch untersucht.

Das Methylglykosidgemisch wurde mit 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 Stdn. auf 100° erhitzt und mit Amberlite IR-4B (OH-Form) neutralisiert. Die papierchromatographische Untersuchung im System C ergab 2,3-Di-O-methyl-D-mannose (RG: 0.31), 2,3-Di-O-methyl-D-glucose (RG: 0.41), 2,3,6-Tri-O-methyl-D-mannose (RG: 0.73),

TABELLE V. Gaschromatographische Analyse der Methylglykoside

Methylglykoside	Retentionszeit (bezogen auf Methyl-2,3,4,6-tetra- O-methyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)
Methyl-2,3,5-tri-O-Me-arabinofuranosid	0.57, 0.79 <sup>a)</sup>
Methyl-2,3,4-tri-O-Me-rhamnopyranosid	0.60 <sup>a)</sup>
Methyl-2,3,4,6-tetra-O-Me-glucopyranosid	1.00 <sup>a)</sup>
Methyl-2,3,6-tri-O-Me-glucopyranosid	2.98, 4.34 <sup>a)</sup>
Methyl-2,3,-di-O-Me-glucopyranosid	8.33, 13.80 <sup>b)</sup>
Methyl-2,3,4,6-tetra-O-Me-galactopyranosid	1.78 <sup>c)</sup>

a) Kolonne (a), Kolonne-Temperatur, 120°

b) Kolonne (a), Kolonne-Temperatur, 145°

c) Kolonne (b), Kolonne-Temperatur, 145°

2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucose (RG: 0.80), 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-galaktose (RG: 0.90), und 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose (RG: 1.00). Im Lösungsmittel-System B waren 2,3-Di-O-methyl-D-mannose (RG: 0.84), 2,3-Di-O-methyl-D-glucose (RG: 0.87), 2,3,6-Tri-O-methyl-D-galaktose (RG: 0.92) und 2,3,4 6-Tetra-O-methyl-D-glucose (RG: 1.00) zu erkennen.

**Anerkennung** Herrn N. Ogawa, Technische Hochschule Tokio, danken wir für die Durchführung der Mol-Gew.-Bestimmung mit der analytischen Spinco-Ultrazentrifuge.