



УДК 547.458.02 : 577.114.5.088

© 1992 г. В. В. Варбакадзе, Э. П. Кемертелидзе,
Г. Е. Деканосидзе, Т. Г. Беручаишвили, А. И. Усов *ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛЮКОФРУКТАНОВ ИЗ КОРНЕЙ ДВУХ ВИДОВ
ОКОПНИКА, *SYMPHYTUM ASPERUM* LERESCH. И
S. CAUCASICUM WEB.Институт фармакохимии им. И. Г. Кутателадзе АН Грузии, Тбилиси;
* Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

Показано, что нейтральные глюкофруктаны являются главными водорастворимыми полисахаридами корней *Symphytum asperum* и *S. caucasicum*. По данным метилирования и спектров ^{13}C -ЯМР, оба полисахарида построены из остатков β -D-фруктофуранозы со связями 2→1 и 2→6 между ними; 1,6-дизамещенные остатки β -D-фруктофуранозы служат точками разветвления полимерных молекул. Единственный в каждой молекуле остаток α -D-глюкопиранозы занимает терминальное положение и соединен 1→2-связью с остатком β -D-фруктофуранозы. Различия между двумя полисахаридами сводятся к величинам средней степени полимеризации (соответственно 22 и 39 моносахаридных остатков), соотношения связей 2→1 и 2→6 (3,4:1 и 3,8:1) и разветвленности (4–5 и 7 точек ветвления на молекулу).

Глюкофруктаны высших растений представляют интерес как биологические стимуляторы, проявляющие иммуномодулирующую, противоопухолевую и противовоспалительную активности [1]. Богатым источником глюкофруктанов могут служить представители семейства Boraginaceae [2], в частности такие виды окопника, как *Symphytum officinale* [3, 4], *S. grandiflorum* [5] и *S. palaestinum* [6]. Что же касается широко распространенных на Кавказе окопника шершавого (*S. asperum*) и окопника кавказского (*S. caucasicum*), то сведения о наличии в них глюкофруктанов в литературе отсутствуют. Мы показали, что главными компонентами водорастворимых полисахаридов корней, стеблей и листьев обоих растений являются нейтральный глюкофруктан и кислый арабиногалактан (табл. 1), причем глюкофруктан преобладает в корнях, а арабиногалактан — в листьях; по содержанию этих полисахаридов стебли занимают промежуточное положение. Данная работа посвящена установлению химического строения глюкофруктанов, выделенных из корней *S. asperum* и *S. caucasicum*.

Выделение суммарных препаратов водорастворимых полисахаридов было проведено по методике, описанной в нашем предыдущем сообщении [7]. С помощью амилолиза было установлено, что содержание крахмала в препаратах из обоих растений составляет всего 0,3–0,8%. Оба препарата разделяли препаративной хроматографией на DEAE-целлюлозе в карбонатной форме [8], вымывая нейтральные полисахариды водой, а кислые — возрастающей концентрацией карбоната аммония. Результаты фракционирования полисахаридов из *S. asperum* представлены в табл. 2, из которой видно, что глюкофруктан содержится в водном элюате. Компонент главной кислой фракции IV относится к пектиновым веществам, поскольку содержит галактуроновую кислоту (идентификация методом, описанным в работе [7]). Фракции V и VI, содержащие меньше урсонных кислот, чем фракция IV, по-видимому, удерживаются на колонке не только за счет заряда, но и за счет адсорбции на поверхности целлюлозных волокон.

Таблица 1

Моносахаридный состав водорастворимых полисахаридных препаратов,
полученных из различных частей растений *

Растение	Орган	Выход полисахаридов, %	Моносахариды, %						
			Fru	Уроновые кислоты	Rha	Ara	Xyl	Gal	Glc
<i>S. asperum</i>	Корни	10,2	66	16,7		0,62		0,76	0,61
	Стебли	6,5	37,4	17	0,2	0,6	0,03	1,8	0,5
	Листья	10	1,5	26,5	1,1	3,6	0,6	3,4	0,5
<i>S. caucasicum</i>	Корни	16	62,5	14,3	0,6	1,4	0,2	1,4	1,3
	Стебли	6,8	16	28,7	1,8	3,8	0,3	3,8	0,8
	Листья	7,1	1,7	26,5	2,5	3,7	0,6	2,9	0,5

* Выход к воздушно-сухому материалу после обработки органическими растворителями.

Таблица 2

Фракционирование полисахаридов *S. asperum* на колонке с DEAE-целлюлозой
и состав фракций по ВХ

Элюент	Фракции	Масса, мг	Выход, %	Состав						
				Rha	Ara	Xyl	Gal	Glc	Fru	Уроновые кислоты
H ₂ O	I	140	70					+	+++++	
(NH ₄) ₂ CO ₃	II	3	1,5		+	+++++	+			Следы +
0	III	6	3	+	+++	+	+++			
↓	IV	14	7	+++	++++	+	++++			++++
0,5 M	V	7	3,5	+	+++	++	+++			++
1 M	VI	10	5		++	+++	++			+

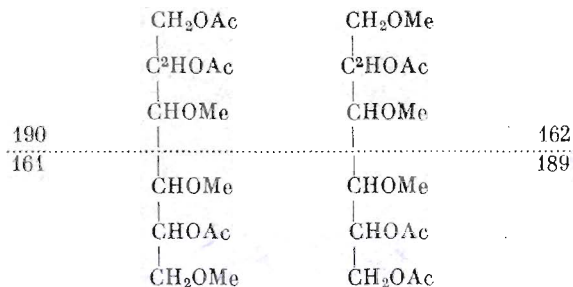
Водные элюаты освобождали от небольшой примеси крахмала амилолизом и получали глюкофруктаны, характеристика которых приведена в табл. 3. Полисахариды из обоих растений имеют в ИК-спектрах полосы поглощения при 820 и 940 см⁻¹, характерные для глюкофруктанов типа инулина и левана [9-11]; гидролизуются в очень мягких условиях (1% щавелевая кислота, 1 ч при 100°С [12]), что свойственно фруктофуранозным остаткам; имеют отрицательное удельное вращение, указывающее, как и в других глюкофруктанах растений, на D-конфигурацию остатков фруктозы и β-конфигурацию гликозидных центров. Различия между полисахаридами касаются соотношения глюкозы и фруктозы. Следует отметить, что при оценке этого соотношения D-глюкозу определяли с глюкозооксидазой [13] и методом ГЖХ в виде ацетатов сорбита [14] или глюкононитрила [15, 16], а фруктозу — колориметрическим методом с резорцином и HCl [17] и ГЖХ в виде ацетата оксима [15, 16]; разные методы анализа дали хорошо совпадающие результаты. По данным гель-хроматографии на колонках с молселектами G-50 и G-75 [18], полисахариды неоднородны по молекулярной массе и представляют собой достаточно широкий набор полимергомологов, что характерно и для других глюкофруктанов растительного происхождения.

Для выяснения природы межмономерных связей в молекулах глюкофруктанов был применен метод метилирования. Превращение гидроксильных групп в метоксильные проводили действием метилиодида и щелочи в диметилсульфоксиде [19]. По литературным данным [20],

Характеристика глюкофруктанов

Источник	$[\alpha]_D$ град. (с 1, вода)	Общие сахара, %	Fru, %	Glc, %	Соотношение Fru : Glc
<i>S. asperum</i>	-30	85	80	3,8	21 : 1
<i>S. caucasicum</i>	-35	94	91	2,4	38 : 1

этот прием в отличие от более распространенного метода Хакомори [21] дает существенно меньше побочных продуктов неуглеводной природы. Полнота замещения достигалась в результате двукратной обработки. Метилловые эфиры моносахаридов, полученные после гидролиза метилированных полисахаридов, восстанавливали NaBH_4 или NaB^2H_4 [22], ацелилировали и полученные смеси ацетатов частично метилированных полиолов анализировали методом ГЖХ [23]. Идентификацию веществ проводили сравнением с заведомыми образцами и с помощью хромато-масс-спектрометрии [22, 24]. Следует иметь в виду, что при восстановлении производных фруктозы образуются эпимерные по С-2 производные маннита и сорбита. Введение дейтериевой метки было необходимо для того, чтобы различить ацетаты 3,4,6- и 1,3,4-три-О-метилпроизводных маннита и сорбита, образующиеся при восстановлении соответствующих 1- или 6-О-замещенных фруктофуранозных остатков [24]. В дейтерированных соединениях это удастся сделать с помощью масс-спектрометрии по пикам ионов с m/z 190 и 161 или же 162 и 189:



Результаты метилирования двух глюкофруктанов (табл. 4) свидетельствуют о том, что молекулы обоих полисахаридов содержат 2→1- и 2→6-связи между остатками фруктофуранозы; соотношение между этими типами связей не удастся определить с помощью ГЖХ, но по результатам масс-спектрометрии соответствующих дейтерированных производных (ср. [25]) оно составляет ~3,5:1. Наличие 1,6-дизамещенных и соответствующее им количество терминальных остатков фруктозы указывает на разветвленность молекул полисахаридов; в глюкофруктане из *S. asperum* содержится 4–5, а в глюкофруктане из *S. caucasicum* 7 точек разветвления на молекулу. Единственный остаток глюкозы в молекулах каждого полисахарида занимает концевое положение.

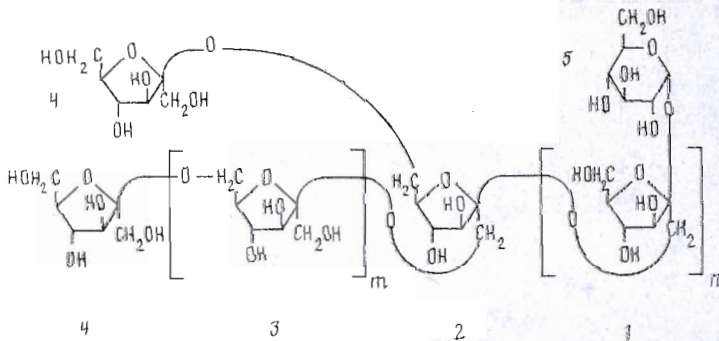
В спектрах ¹³C-ЯМР глюкофруктанов (рис. 1, 2 и табл. 5) главные сигналы соответствуют углеродным атомам остатков фруктозы. Их положение подтверждает вывод о фуранозной форме этих остатков и β-конфигурации гликозидных центров [26, 27]. Полное отнесение сигналов было проведено в соответствии с данными работ [20, 28–33]. Так, в аномальной области спектра полисахарида из *S. asperum* имеются сигналы с химическими сдвигами 104,43 и 105,0 м. д., принадлежащие соответ-

Анализ продуктов метилирования глюкофруктанов методом ГЖХ

Вещество	Тип замещения	Относительное время удерживания	Относительное содержание	
			<i>S. asperum</i>	<i>S. caucasicum</i>
2,4-Ди-О-ацетил-1,3,4,6-тетра-О-метилманнит	} Fru2→	0,91	2,8	3,6
2,4-Ди-О-ацетил-1,3,4,6-тетра-О-метилсорбит		0,92	3,4	4,7
1,5-Ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилсорбит	Glc1→	1,00	1,0	1,0
2,5,6-Три-О-ацетил-1,3,4-три-О-метилгексит	→6Fru2→	1,16	} 6,4	10,7
1,2,5-Три-О-ацетил-3,4,6-три-О-метилманнит	1,16			
1,2,5-Три-О-ацетил-3,4,6-три-О-метилсорбит	} →1Fru2→	1,17	5,8	9,8
1,2,5,6-Тетра-О-ацетил-3,4-ди-О-метилманнит	} →6 Fru2→ →1	1,40	4,0	6,5
1,2,5,6-Тетра-О-ацетил-3,4-ди-О-метилсорбит				

Таблица 5

Отнесение сигналов (м.д.) в спектрах ¹³C-ЯМР глюкофруктанов из *S. asperum* и *S. caucasicum*



Расщепление	Остаток сахара	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<i>S. asperum</i>	β-D-фруктозил						
	1	62,29	104,43	78,35	75,82	82,35	63,38
	2	62,2 ^а	104,5 ^а	78,35	76,25	81,47	63,88
	3	61,62	105,0	78,35	76,5	81,47	64,32
	4	61,62	104,82	78,35	75,25	82,47	63,38
	α-D-глюкозил						
	5	93,69	72,5	73,96	70,66	73,75	61,62
<i>S. caucasicum</i>	β-D-фруктозил						
	1	62,17	104,49	78,12	75,61	82,33	63,39
	2	61,85	104,6 ^а	77,91	76,07	81,53	63,86
	3	61,33	105,07	77,91	76,27	81,53	64,35
	4	61,33	104,93	77,91	75,0 ^а	82,33	63,39
	α-D-глюкозил						
	5	93,73	72,44	73,91	70,53	73,71	61,33

а — плечо.

ственно 1-О- и 6-О-замещенным остаткам β -D-фруктофуранозы, т. е. инулиновому и левановому типам глюкофруктанов [28, 29, 31–33]. Между этими сигналами находятся еще два сигнала с химическими сдвигами 104,5 (плечо) и 104,82 м. д., которые можно отнести соответственно к 1,6-ди-О-замещенному и терминальному остаткам β -D-фруктофуранозы. В области резонанса С-5 имеются два сигнала с химическими сдвигами 82,35 и 84,47 м. д., относящиеся соответственно к 1-О- и 6-О-замещенным остаткам β -D-фруктофуранозы [29, 28–33]. Количественное соотношение β -2 \rightarrow 1- и β -2 \rightarrow 6-связей в полимерных молекулах, рассчитанное из интегральных интенсивностей соответствующих сигналов С-5, составляет 3,4:1 для глюкофруктана из *S. asperum* и 3,8:1 для глюкофруктана из *S. caucasicum*. Положения сигналов С-3 и С-4 фруктофуранозных остатков подтверждают отсутствие замещения при этих углеродных атомах [20, 28, 29, 33]. Химические сдвиги сигналов С-1 и С-6 остатков фруктозы соответствуют величинам, найденным в спектрах известных инулинов и леванов [28–31, 33]. Малоинтенсивные сигналы терминального остатка α -D-глюкопиранозы легко обнаруживаются в спектрах глюкофруктанов; их положение доказывает, что остаток глюкозы расположен на «восстанавливающем» конце полисахаридных молекул и присоединен к С-2 остатка фруктофуранозы, образуя характерный для полисахаридов этого типа сахарозный фрагмент [28, 29]. Количественные соотношения глюкозы и фруктозы, рассчитанные из интегральных интенсивностей отдельных сигналов в спектрах ^{13}C -ЯМР, совпадают с данными химических определений. Эти результаты подтверждают правомерность использования соотношения глюкозы и фруктозы для определения средней степени полимеризации полисахаридов.

Таким образом, два глюкофруктана, выделенные из корней *S. asperum* и *S. caucasicum*, относятся к смешанному типу разветвленных фруктанов, молекулы которых содержат элементы как инулинового, так и леванового типа [34]. Полисахариды несколько различаются между собой лишь величинами средней степени полимеризации (22 и 39), соотношения связей 2 \rightarrow 1 и 2 \rightarrow 6 (3,4 и 3,8) и разветвленности (4–5 и 7 точек ветвления на молекулу).

Экспериментальная часть

ВХ проводили нисходящим способом на бумаге Filtrak FN-11 в системе растворителей *n*-бутанол – пиридин – вода, $\text{v} : 4 : 3$. Зоны восстанавливающих сахаров на бумаге обнаруживали кислым фталатом анилина.

ГЖХ проводили на хроматографе Hewlett-Packard 5890 А с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой Ultra-1 и интегратором HP 3393 А. Условия: а) 175–290° С, 10°/мин для ацетатов полиолов; б) 150–290° С, 5°/мин для ацетатов частично метилированных полиолов. Хроматомасс-спектрометрию ацетатов частично метилированных полиолов проводили на приборе Varian MAT 311 А с капиллярной колонкой SE-30 25 м, хроматография при 170–290° С, 12°/мин, энергия ионизирующего пучка электронов 70 эВ.

Спектры ^{13}C -ЯМР получали на спектрометре Bruker AM-300 с рабочей частотой по углероду 75,43 МГц для растворов полисахаридов в $^2\text{H}_2\text{O}$ (240 мг в 4 мл) при 30° С, внутренний стандарт – метанол, 50,15 м. д. от Me_4Si .

ИК-спектры получали на приборе UR-10, спектрофотометрические определения проводили на приборе СФ-26, оптическое вращение измеряли на поляриметре Jasco DIP-360.

Количественное определение общих сахаров выполняли по реакции

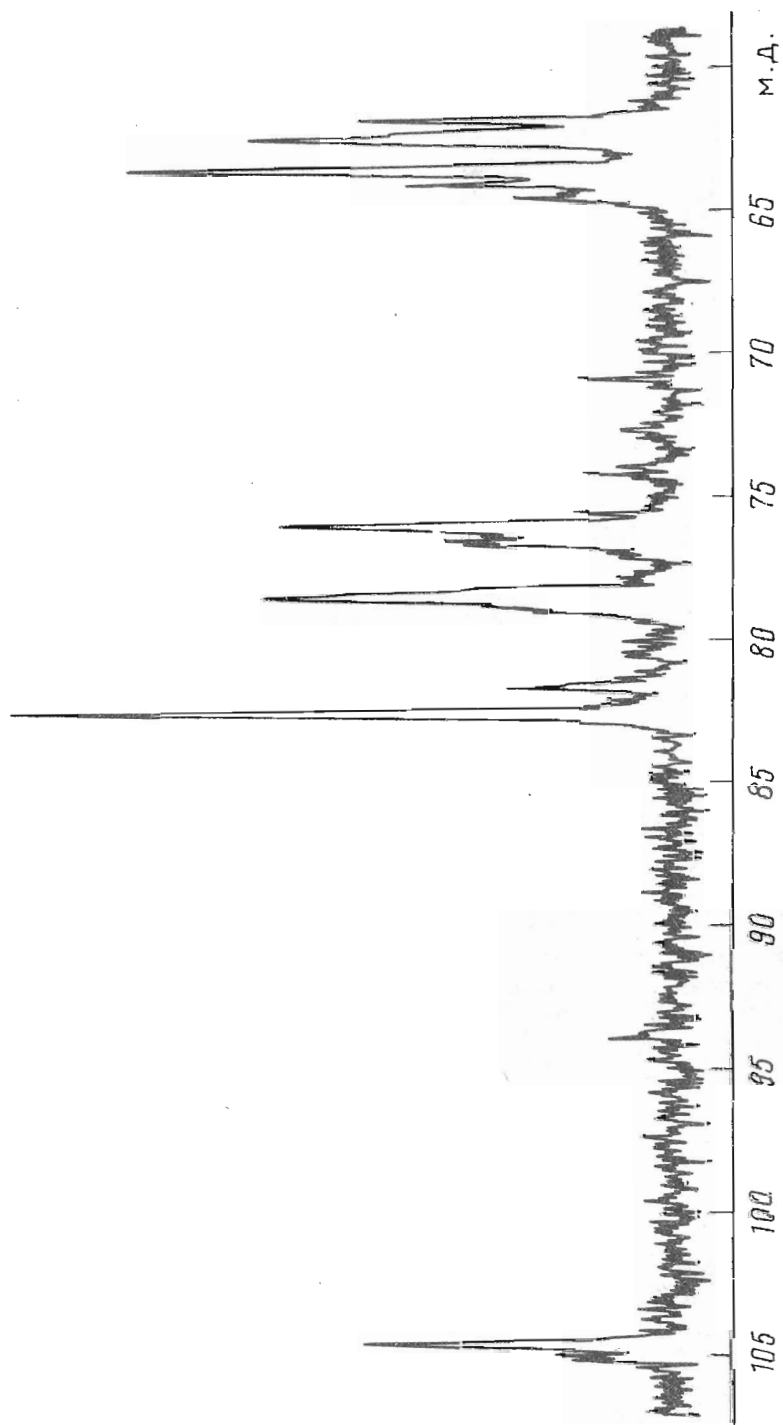


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР глюкофуранана из *S. cerevisiae*

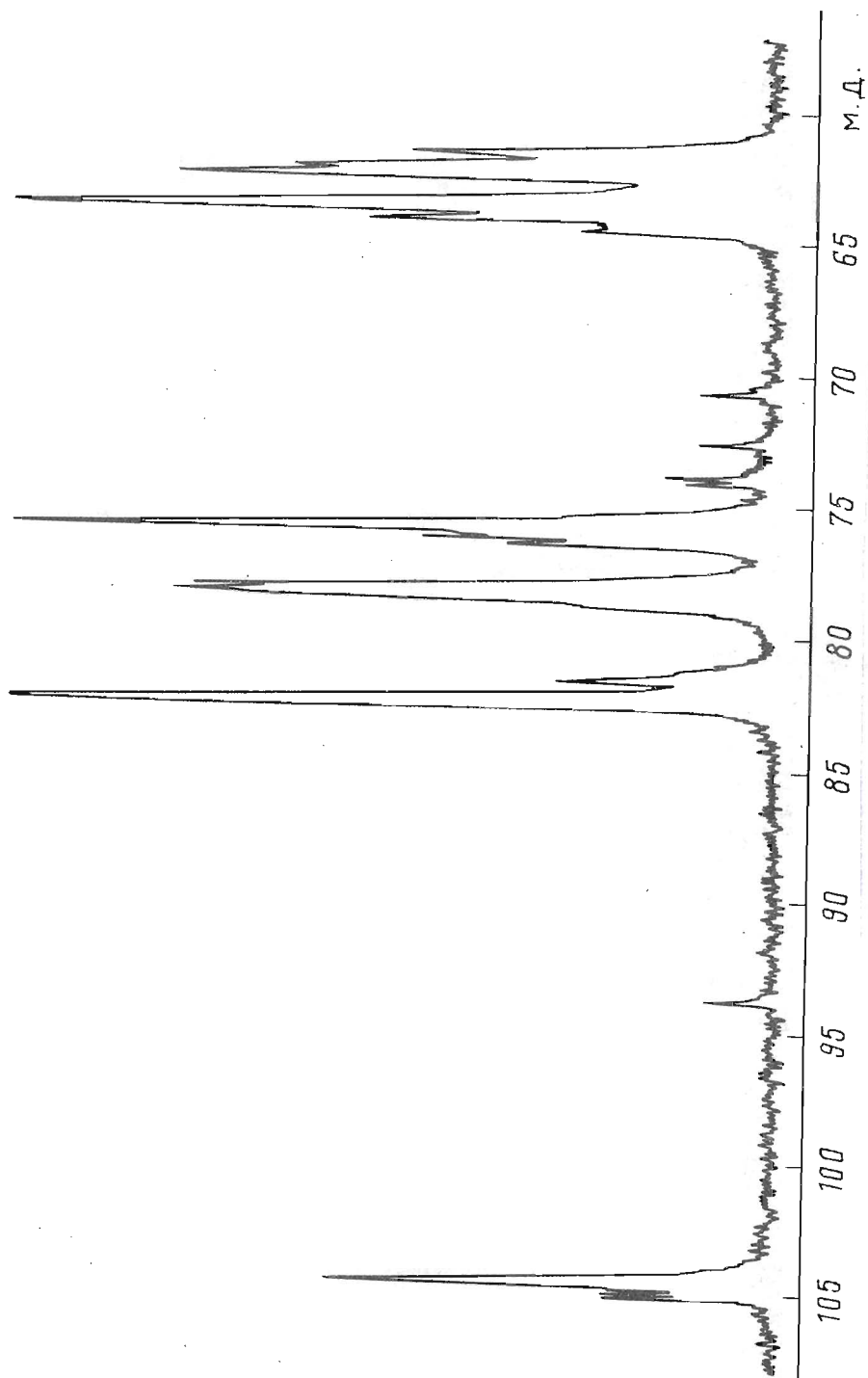


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР гликофруктана из *S. sepesscium*

с фенолом и конц. H_2SO_4 и калибровочному графику для фруктозы [35], уроновых кислот — по реакции с *m*-гидроксидифениловым реагентом и калибровочному графику для галактуроновой кислоты [36], фруктозы — по реакции с резорцином и HCl [17], глюкозы — с глюкозооксидазой [13]. Амилолиз и фракционирование полисахаридных препаратов на колонке с DEAE-целлюлозой, а также идентификацию уроновой кислоты проводили как описано ранее [7].

Для качественного и количественного определения моносахаридного состава 5 мг полисахаридного препарата в 0,5 мл 2 н. H_2SO_4 нагревали 5 ч при $100^\circ C$, нейтрализовали $BaCO_3$, фильтрат деионизировали катионитом КУ-2 (H^+ -форма), исследовали БХ, а затем переводили в ацетаты полиолов и анализировали ГЖХ по известному методу [14] с инозитом в качестве внутреннего стандарта. При определении глюкозы этим методом вводили поправку на сорбит, образовавшийся при восстановлении фруктозы, количество которой оценивали по содержанию маннита (манноза в гидролизатах отсутствовала).

Метилирование глюкофруктанов. 20 мг глюкофруктана растворяли в 1 мл DMSO, добавляли 0,2–0,3 мл MeI и 50 мг порошка $NaOH$, перемешивали на магнитной мешалке 1 ч при комнатной температуре. Затем разбавляли 2–4 мл воды, добавляли 2–4 мл хлороформа, встряхивали, диализовали и упаривали досуха. О полноте метилирования свидетельствовало отсутствие полосы поглощения гидроксильной группы в ИК-спектрах при $3400–3600\text{ см}^{-1}$. 5 мг метилированного полисахарида гидролизовали 0,5 мл 1 М трифторуксусной кислоты 2 ч при $100^\circ C$. Гидролизат упаривали досуха, растворяли в 1 мл 1 М NH_4OH , восстанавливали $NaBH_4$ или NaB^2H_4 , ацетиловали и полученные смеси ацетатов частично метилированных полиолов анализировали ГЖХ и хроматомасс-спектрометрически.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franz G. // *Planta Med.* 1989. V. 55. № 6. P. 493–497.
2. Meier H., Reid J. S. C. // *Encyclopedia of Plant Physiology / New Series. Plant Carbohydrates I. Intracellular Carbohydrates*/Eds Loewus F. A., Tanner W. Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 1982. V. 13 A. P. 418–471.
3. Bourdu R. // *C. r. Acad. sci.* 1958. V. 246. № 6. P. 973–976.
4. Haab D., Stadler G., Franz G., Abou-Mandour A., Czygan F. C. // *Planta Med.* 1986. V. 50. № 6. P. 511.
5. Pinkas M., Bezanger-Beauquesne L., Trotin F. // *C. r. Acad. sci.* 1965. V. 261. № 3. P. 834–837.
6. Siton D., Chaouat M. // *Planta Med.* 1989. V. 55. № 7. P. 603.
7. Варбакадзе В. В., Гахоцидзе Р. А., Шенгелия З. С., Усов А. И. // *Химия природ. соед.* 1989. № 3. С. 330–335.
8. Siddiqui I. R., Wood P. J. // *Carbohydr. Res.* 1971. V. 16. № 2. P. 452–454.
9. Vestraeten L. M. J. // *Anal. Chem.* 1964. V. 36. № 6. P. 162–166.
10. Suzuki M. // *Can. J. Bot.* 1968. V. 46. № 10. P. 1201–1206.
11. Kühbauch W. // *Z. Pflanzenphysiol.* 1974. Bd. 7. S. 121–129.
12. Das N. N., Das A. // *Carbohydr. Res.* 1978. V. 64. P. 155–167.
13. Щербухин В. Д., Миронова А. И., Кодырева А. Н., Грюнер В. С. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1970. Т. 6. № 4. С. 467–470.
14. Слокекер Дж. // *Методы исследования углеводов* / Пер. с англ. под ред. А. Я. Хорлина. М.: Мир, 1975. С. 22–25.
15. Seymour F. R., Chen E. C. M., Stouffer J. E. // *Carbohydr. Res.* 1980. V. 83. № 2. P. 201–242.
16. Seymour F. R., Unruch S. L., Nehlich D. A. // *Carbohydr. Res.* 1989. V. 191. № 2. P. 175–189.
17. Yaphe W., Arsenault G. P. // *Anal. Biochem.* 1965. V. 13. № 1. P. 143–148.
18. Дегерман Г. *Гель-хроматография.* М.: Мир, 1970.
19. Ciucanu I., Kerek F. // *Carbohydr. Res.* 1984. V. 131. № 2. P. 209–217.
20. Brasch D. J., Frankhauser B. L., McDonald A. G. // *Carbohydr. Res.* 1988. V. 180. № 2. P. 315–324.
21. Nakomori S. // *J. Biochem.* 1964. V. 55. № 2. P. 205–208.
22. Björndal H., Hellerqvist C. G., Lindberg B., Svensson S. // *Angew. Chem. Engl. Int. Ed.* 1970. V. 9. № 5. P. 610–619.

23. Джонс Г. Дж. // Методы исследования углеводов / Пер. с англ. под ред. А. Я. Хор-
лина. М.: Мир, 1975. С. 26-27.
24. Lindberg B., Lönngren J., Thomson J. L. // Acta chem. scand. 1973 V. 27. № 5.
P. 1819-1821.
25. Carpita N. C., Kanabus J., Housley T. L. // J. Plant Physiol. 1989. V. 134. P. 162-168.
26. Argyal S. J., Bethell G. S. // Austral J. Chem. 1976. V. 29. № 6. P. 1249-1265.
27. Шашков А. С., Чижов О. С. // Биооргани. химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437-496.
28. Seymour F. R., Knapp R. D., Zweig J. E., Bishop S. H. // Carbohydr. Res. 1979. V. 72.
P. 57-69.
29. Jarrell H. C., Conway T. F., Moyna P., Smith J. C. P. // Carbohydr. Res. 1979. V. 76.
P. 45-57.
30. Seymour F. R., Knapp R. D., Jeanes A. // Carbohydr. Res. 1979. V. 72. P. 222-228.
31. Tomašić J., Jennings H. J., Claudemans C. P. J. // Carbohydr. Res. 1978. V. 62.
P. 127-133.
32. French A. D. // J. Plant Physiol. 1989. V. 134. P. 125-136.
33. Hammer H., Morgenlie S. // Acta chem. scand. 1990. V. 44. P. 158-160.
34. Pontis H. G., DelCampillo E. // Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green
Plants / Eds Dey P. M., Dixon R. A. London: Acad. Press, 1985. P. 205-227.
35. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. // Anal. Chem. 1956.
V. 28. № 3. P. 350-356.
36. Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. // Anal. Biochem. 1973. V. 54. № 2. P. 484-489.

Поступила в редакцию
4.XI.1991

V. V. BARBAKADZE, E. P. KEMERTELIDZE, H. E. DEKANOSIDZE,
T. G. BERUCHASHVILI, A. I. USOV *

INVESTIGATION OF GLUCOFRUCTANS FROM ROOTS OF TWO SPECIES
OF COMFREY *SYMPHYTUM ASPERUM* LEPECH. AND
S. CAUCASICUM BIEB

I. G. Kutateladze Institute of Pharmacochemistry, Academy of Sciences of Georgia,
Tbilisi;

* N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Moscow

Neutral glucofructans were shown to be the principal watersoluble polysaccharides of *Symphytum asperum* and *S. caucasicum* roots. According to the methylation analysis and ¹³C-NMR spectral data, both polysaccharides consist of 2→1 and 2→6-linked β-D-fructofuranose residues; 1,6-disubstituted residues of β-D-fructofuranose serve as branching points of the polymeric molecules. A single residue of α-D-glucopyranose in each molecule occupies the terminal position and is linked to the β-D-fructofuranose residue through an 1→2 linkage. Differences between the two polysaccharides are the average degree of polymerization (22 and 39 monosaccharide residues), the proportion of 2→1 and 2→6 linkages (3.4:1 and 3.8:1) and the degree of branching (4-5 and 7 branching points per molecule, respectively).