



УДК 547.458.02:577.114.5.088

© 1993 В. В. Барбакадзе, Э. П. Кемертелидзе,
Г. Е. Деканосидзе, А. И. Усов*

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛЮКОФРУКТАНА ИЗ ЛУКОВИЦ
ПТИЦЕМЛЕЧНИКА, *Ornithogalum ponticum* Zahar. (Liliaceae)

Институт фармакохимии им. И. Г. Кутателадзе АН Грузии, Тбилиси;
* Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

Показано, что главным водорастворимым полисахаридом луковиц *Ornithogalum ponticum* Zahar. является нейтральный глюкофруктан, тогда как в луковицах родственного вида *O. caudatum* Jacq. преобладает крахмал. Глюкофруктан из *O. ponticum* содержит фруктозу и глюкозу в соотношении 30 : 1. По данным метилирования, молекулы полисахарида разветвлены и построены из остатков β -D-фруктофуранозы со связями 2 \rightarrow 1 и 2 \rightarrow 6 между ними в соотношении 4,4 : 1; точками разветвления служат 1,6-дизамещенные остатки β -D-фруктофуранозы; одно разветвление приходится в среднем на каждые 4—5 моносахаридных остатка. В полисахариде имеются два вида остатков α -D-глюкопиранозы. Около половины из них занимают терминальные положения и соединены 1 \rightarrow 2-связями с остатками β -D-фруктофуранозы. Прочие остатки глюкозы дополнительно замещены в положении 6 остатками β -D-фруктофуранозы или цепочками из таких остатков. Строение глюкофруктана подтверждено спектром ^{13}C -ЯМР.

Глюкофруктаны высших растений привлекают внимание исследователей как вещества с потенциальной иммуномодулирующей, противоопухолевой и противовоспалительной активностью [1]. В нашей предыдущей работе [2] были описаны два таких полисахарида, выделенные из корней двух видов окопника. Продолжая поиск источников глюкофруктанов, мы исследовали полисахариды двух представителей рода *Ornithogalum* (семейство Liliaceae): *O. ponticum* Zahar. и *O. caudatum* Jacq. Характеристика состава водорастворимых полисахаридов луковиц этих растений приведена в табл. 1. Как видно из полученных данных, главным компонентом препарата из *O. ponticum* является фруктан, а препарата из *O. caudatum* глюкан, который легко подвергается амилолизу и, следовательно, представляет собой крахмал. Тем самым показано, что разные виды рода *Ornithogalum* могут существенно различаться по составу резервных полисахаридов. Данная работа посвящена выделению и установлению строения глюкофруктана из луковиц *O. ponticum*.

Птицемлечник понтийский *O. ponticum* широко распространен по всему Кавказу в качестве сорняка посевов зерновых культур. Луковицы этого растения съедобны в поджаренном и маринованном виде, а молодые соцветия употребляют в пищу как спаржу [3]. В народной медицине луковицы птицемлечника используются против нарывов [4]. Сведения о строении или биологической активности полисахаридов, содержащихся в этом растении, в литературе отсутствуют.

Моносахаридный состав водорастворимых полисахаридных препаратов, %

Растение	Выход	Общие сахара	Fru	Glc
<i>O. ponticum</i>	19	88	66,6	16
<i>O. caudatum</i>	12,5	67,5	12	50

Суммарный препарат водорастворимых полисахаридов, выделенный из луковиц *O. ponticum* экстракцией горячей водой, разделяли на нейтральный и кислый компоненты хроматографией на DEAE-целлюлозе в карбонатной форме [5]. В составе кислой фракции кроме уруновых кислот были найдены арабиноза и галактоза, но выход этой фракции был незначителен. Фракцию нейтральных полисахаридов дважды подвергали амилолизу [6] для удаления примеси крахмала. Полученный препарат глюкофруктана содержал глюкозу и фруктозу в соотношении 1 : 30 (*D*-глюкозу определяли в гидролизате полисахарида глюкозооксидазным методом с феррицианидом калия в качестве окисляемого субстрата [7]; содержание фруктозы в полисахариде определяли по цветной реакции с резорцином и HCl [8]; общее содержание сахаров в препарате составило 88%). В ИК-спектре полисахарида наблюдались полосы поглощения при 820, 870 и 940 см⁻¹, характерные для глюкофруктанов типа инулина и левана [9—11]. Вещество гидролизовалось в очень мягких условиях (1% щавелевая кислота, 1 ч при 100° С [12], или 0,05 М трифторуксусная кислота, 45 мин при 100° С), что характерно для молекул, построенных из фруктофуранозных остатков. Полисахарид имел отрицательное удельное вращение, $[\alpha]_D^{26} = -30^\circ$ (с 1, вода), указывающее, как и в других глюкофруктанах, на *D*-конфигурацию остатков фруктозы и β -конфигурацию гликозидных центров [13]. Гель-хроматография на колонках с молс-лектами G-50 и G-75 показала, что полисахарид неоднороден по молекулярной массе и представляет собой достаточно широкий набор полимергомологов, что характерно и для других глюкофруктанов растительного происхождения [13].

Для выяснения природы межмономерных связей в молекулах глюкофруктана был применен метод метилирования. Техника метилирования и анализ продуктов с помощью ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии подробно описаны в нашей предыдущей работе [2]. Полученные результаты приведены в табл. 2. Как видно из этих данных, молекулы полисахарида содержат два типа связей, 2 → 1 и 2 → 6, между остатками фруктофуранозы в линейных участках цепей, и довольно сильно разветвлены, причем точками ветвления служат 1,6-дизамещенные остатки фруктофуранозы. Количественный расчет (допускающий некоторую погрешность, связанную с неполным разделением ряда пиков на хроматограммах) дает следующие результаты: соотношение производных глюкозы и фруктозы в продуктах метилирования, как и в исходном глюкофруктане, составляет 1 : 30, соотношение связей 2 → 1 и 2 → 6 равно 4,4 : 1, одно разветвление приходится в среднем на 2,5 остатка линейной цепи. Другими словами, принимая в расчет и концевые моносахариды, это означает, что из каждых 4—5 моносахаридных остатков один служит точкой разветвления. Если считать, что, как и большинство известных глюкофруктанов, исследуемый полисахарид биогенетически является продуктом фруктозилирования молекулы сахарозы (т. е. каждая его молекула содержит только один остаток глюкозы), то, исходя из соотношения глюкоза : фруктоза, средняя степень полимеризации образца составляет 31, а средняя степень разветвленности — 7 точек разветвления на молекулу.

Однако весьма интересной отличительной особенностью глюкофруктана из *O. ponticum* является наличие в нем двух типов остатков *D*-глюкопиранозы: только около половины из них представляют собой концевые невосстанавливающие группировки, по всей вероятности, в составе обычных для глюкофруктанов

Анализ продуктов метилирования глюкофруктана методом ГЖХ

Вещество	Тип замещения	Относительное время удерживания	Относительное содержание
2,5-Ди-О-ацетил-1,3,4,6-тетра-О-метилманнит	} Fru2→	0,92	9,3
2,5-Ди-О-ацетил-1,3,4,6-тетра-О-метилсорбит		0,93	7,4
1,5-Ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилсорбит	Glc1→	1,0	1,0
2,5,6-Три-О-ацетил-1,3,4-три-О-метилманнит	} →6Fru2→	1,145	6,5
2,5,6-Три-О-ацетил-1,3,4-три-О-метилсорбит			
1,2,5-Три-О-ацетил-3,4,6-три-О-метилманнит	} →1Fru2→	1,15	13,4
1,2,5-Три-О-ацетил-3,4,6-три-О-метилсорбит		1,16	15,1
1,5,6-Три-О-ацетил-2,3,4-три-О-метилсорбит	→6Glc1→	1,22	1,12
1,2,5,6-Тетра-О-ацетил-3,4-ди-О-метилманнит	} → 6Fru2 → 1 ↑	1,38	12,5
1,2,5,6-Тетра-О-ацетил-3,4-ди-О-метилсорбит			

фрагментов сахарозы. Остальные глюкозные остатки находятся в цепях и замещены в положении 6. Наиболее вероятно, что к ним присоединены остатки фруктофуранозы или цепочки, построенные из таких остатков. В этом случае в молекулах полисахарида должен содержаться фрагмент неокестозы, и приведенный выше расчет средней степени полимеризации и разветвленности остается в силе. Второй, на наш взгляд, менее вероятной возможностью является присоединение в эти положения других остатков глюкозы; тогда становится несправедливым предположение о наличии только одного глюкозного остатка в каждой молекуле глюкофруктана, и реальная степень полимеризации полисахарида должна быть выше расчетной. Естественно, что сделать выбор между этими двумя возможностями на основании результатов метилирования не представляется возможным.

В спектре ^{13}C -ЯМР глюкофруктана главные сигналы соответствуют углеродным атомам остатков фруктозы. Их положение подтверждает вывод о фуранозной форме этих остатков и о β -конфигурации гликозидных центров (ср. [14, 15]). В целом спектр весьма напоминает спектры других разветвленных глюкофруктанов с 2→1- и 2→6-связями между остатками β -D-фруктофуранозы [2]. Полный анализ спектра, выполненный как описано в работе [2], подтвердил результаты метилирования полисахарида. В частности, сигналы атомов углерода глюкозных остатков доказывают их пиранозную форму, α -конфигурацию и присоединение к C-2 β -D-фруктофуранозных остатков с образованием фрагментов сахарозы. К сожалению, особенности ЯМР-спектра неокестозы [16] не позволяют подтвердить или опровергнуть наличие фрагмента неокестозы в составе глюкофруктана по данным спектроскопии ^{13}C -ЯМР.

Таким образом, глюкофруктан, выделенный из луковиц *O. ponticum*, относится к достаточно широко распространенному типу разветвленных глюкофруктанов, молекулы которых одновременно содержат элементы как инулиновой, так и левановой структуры [13, 17]. Однако этот полисахарид содержит редко встречающуюся структурную особенность: в его молекулах имеются два типа остатков

α -D-глюкопиранозы, либо терминальный в составе обычного для глюкофруктанов сахарозного фрагмента, либо замещенный в положении 6, по всей вероятности, остатками фруктофуранозы или цепями, построенными из таких остатков. Глюкофруктаны с частично замещенными в положении 6 остатками D-глюкопиранозы были обнаружены ранее в *Cordyline australis* [14], *C. terminalis* [18] и *Polygonatum odoratum* [19]; замещенный остаток глюкозы имеется также в глюкофруктане из *Allium sativum* [12], но в этом случае заместитель расположен в положении 3.

Экспериментальная часть

Луковицы *O. ponticum* собирали с открытого, а *O. caudatum* с закрытого грунта на Крцаниской экспериментальной базе Центрального ботанического сада АН Грузии в мае 1987 г. Предварительную обработку растительного материала и выделение суммарных препаратов водорастворимых полисахаридов проводили как описано ранее [20]. Общие методы анализа состава, условия хроматографического разделения моносахаридов и их производных, масс-спектрометрии и спектроскопии ^{13}C -ЯМР см. в работе [2].

Выделение глюкофруктана из *O. ponticum*. 200 мг суммарного препарата полисахаридов наносили на колонку с DEAE-целлюлозой. Условия хроматографирования описаны в работе [20]. В водном элюате обнаружили зону нейтральных полисахаридов. Выход 160 мг (состав: фруктоза — 68%, глюкоза — 18%). В солевом элюате (элюция 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) после диализа обнаружили кислый полисахарид, выход 10 мг (состав на основании данных БХ: арабиноза, галактоза, уроновые кислоты), 150 мг нейтральных полисахаридов дважды подвергали амилолизу в условиях, описанных ранее [20]. Получали глюкофруктан. Выход 90 мг (состав: фруктоза — 83%, глюкоза — 2,7%).

Метилирование глюкофруктана. К раствору 20 мг глюкофруктана в 1 мл DMSO прибавляли 0,3 мл метилиодида, 50 мг порошкообразного едкого натра и перемешивали на магнитной мешалке 1 ч при комнатной температуре. Далее к реакционной смеси прибавляли по 3 мл воды и хлороформа, тщательно перемешивали, диализовали и упаривали досуха, получали метилированный полисахарид (полоса поглощения HO-группы при $3400\text{--}3600\text{ см}^{-1}$ в ИК-спектре отсутствовала). 5 мг метилированного полисахарида нагревали с 0,5 мл 1 М трифторуксусной кислоты 2 ч при 100°C , упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл 1 М NH_4OH , обрабатывали NaBH_4 или NaB^2H_4 , затем ацетиловали и анализировали полученные смеси ацетатов частично метилированных полиолов с помощью ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии как описано ранее [2].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franz G.//Planta Med. 1989. V. 55. № 6. P. 493—497.
2. Барбакадзе В. В., Кемертелидзе Э. П., Деканосидзе Г. Е., Беруцашвили Т. Г., Усов А. И.//Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. № 5. С. 671—679.
3. Гроссгейм А. А.//Растительные ресурсы Кавказа. Баку: АН АзССР. 1946. С. 28—29, 38.
4. Гроссгейм А. А.//Флора Кавказа. Баку: АзФАН, 1940. С. 160.
5. Siddiqui I. R., Wood P. J.//Carbohydr. Res. 1971. V. 16. № 2. P. 452—454.
6. Peat S., Turvey J. R., Evans J. M.//J. Chem. Soc. 1959. № 11. P. 3341—3344.
7. Щербухин В. Д., Миронца А. И., Кодырева А. В., Грюнер В. С.//Прикл. биохимия и микробиол. 1970. Т. 6. № 4. С. 467—470.
8. Yaphe W., Arsenaull G. P.//Anal. Biochem. 1965. V. 13. № 1. P. 143—148.
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. V. 7. S. 121—129.
12. Das N. N., Das A.//Carbohydr. Res. 1978. V. 64. P. 155—167.
13. Meier H., Reid J. S. C.//Encyclopedia of Plant Physiology/New Series. Plant Carbohydrates 1.

- Intracellular Carbohydrates. V. 13A/Eds Loewus F. A., Tanner W. Berlin; Heidelberg; New York; Springer-Verlag, 1982. P. 435—451.
14. Brasch D. J., Frankhauser B. L., McDonald A. G.//Carbohydr. Res. 1988. V. 180. № 2. P. 315—324.
15. Angyal S. J., Bethell G. S.//Austral. J. Chem. 1976. V. 29. № 6. P. 1249—1265.
16. De Bruyn A., Van Loo J.//Carbohydr. Res. 1991. V. 211. № 1. P. 131—136.
17. 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.
18. Boggs L. A., Smith F.//J. Amer. Chem. Soc. 1956. V. 78. № 9. P. 1880—1885.
19. Tomoda M., Satoh N., Sugiyama A.//Chem. Pharm. Bull. 1973. V. 21. № 8. P. 1806—1810.
20. Барбакадзе В. В., Гахокидзе Р. А., Шенгелия З. С., Усов А. И.//Химия природ. соединений. 1989. № 3. С. 330—335.

Поступила в редакцию
26.IV.1993

V. V. Barbakadze, E. P. Kemertelidze, H. E. Dekanosidze,
A. I. Usov*

ISOLATION AND INVESTIGATION OF A GLUCOFRUCTAN
FROM *Ornithogalum ponticum* Zahar. (Liliaceae)

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

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

A neutral glucofructan was shown to be the main water-soluble polysaccharide in the bulbs of *Ornithogalum ponticum*, whereas starch predominates in the bulbs of related species *O. caudatum*. The glucofructan isolated from *O. ponticum* contains *D*-fructose and *D*-glucose at a ratio of 30 : 1. According to ¹³C-NMR spectrum and methylation analysis data, the polysaccharide molecules are branched and built of 2 → 1- and 2 → 6-linked β-*D*-fructofuranose residues at a ratio of 4.4 : 1 and of 1,6-disubstituted β-*D*-fructofuranose residues serving as branching points; one branching point falls, at an average, on every 4.5 monosaccharide residues. The polysaccharide has two types of α-*D*-glucopyranose residues. About one half of them occupy the terminal position and are linked 1 → 2 to β-*D*-fructofuranose residues. Other glucose residues are additionally substituted at position 6, supposedly, by β-*D*-fructofuranose residues or by chains built of these residues.