



УДК 547.458.02:577.114.5.088

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛЮКОФРУКТАНА ИЗ ЛУКОВИЦ ГАДЮЧЬЕГО ЛУКА (МЫШИНОГО ГИАЦИНТА), *Muscari szovitsianum* BAKER (LILIACEAE)

© 1996 г. В. В. Барбакадзе, И. Л. Таргамадзе, А. И. Усов\*<sup>#</sup>

Институт фармакохимии им. И.Г. Кутателадзе АН Грузии, Тбилиси;

\* Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,  
117913, Москва, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 02.02.96 г.

Показано, что главным водорастворимым полисахаридом луковиц *Muscari szovitsianum* Baker является нейтральный глюкофруктан, который содержит фруктозу и глюкозу в соотношении 26 : 1. По данным метилирования, молекулы полисахарида разветвлены и построены из остатков β-D-фруктофуранозы со связями 2 → 1 и 2 → 6 между ними в соотношении 6 : 1, точками разветвления служат 1,6-дизамещенные остатки β-D-фруктофуранозы; одно разветвление приходится в среднем на каждые 4–5 моносахаридных остатков. Только 20% остатков α-D-глюкопиранозы занимают терминальные положения и соединены с остатками β-D-фруктофуранозы связями 1 → 2. Остальные 80% остатков глюкозы дополнительно замещены в положении 6 остатками β-D-фруктофуранозы или цепочками из таких остатков. Строение глюкофруктана подтверждено спектром <sup>13</sup>C-ЯМР.

Ключевые слова: глюкофруктан; *Muscari szovitsianum*.

Гадючий лук *Muscari szovitsianum* широко распространен на Кавказе, где он развивается в массовом количестве как сорняк в посевах и на залежах. Экстракты из этого растения употребляются в народной медицине как рвотное и мочегонное средство [1]. Сведения о строении или биологической активности полисахаридов, содержащихся в *M. szovitsianum*, в литературе отсутствуют.

Продолжая поиск источников глюкофруктанов (см. [2, 3]) с потенциальной иммуномодулирующей, противоопухолевой или противовоспалительной активностью, мы исследовали в данной работе строение глюкофруктана из луковиц *M. szovitsianum*.

В одной из наших предыдущих работ [4] уже описано выделение водорастворимых полисахаридов из этого растения. При фракционном осаждении возрастающими количествами ацетона из водного экстракта луковиц были получены полисахаридные препараты I–III, моносахаридный состав которых приведен в табл. 1. Как следует из этих данных, фракции I и II представляют собой смеси нейтрального глюкофруктана и кислого арабиногалактана, содержащего галактуроновую кислоту (последний моносахарид был идентифицирован методом ГЖХ в виде ацетата полиола после двукратного восстановления – см. методику в работе [4]), причем содержание глюко-

фруктана во фракции II значительно выше, чем в I, в то время как фракция III является практически чистым глюкофруктаном. Это вещество и было использовано для подробного исследования.

С помощью амилолиза [5] было показано, что примесь крахмала в препарате отсутствует. Вещество содержало глюкозу и фруктозу в соотношении I : 26 (сахара определяли как описано в работе [3]). Глюкофруктан гидролизовался в очень мягких условиях (0.05 М трифторуксусная кислота, 45 мин при 100°C), что характерно для молекул полисахаридов, построенных из фруктофуранозных остатков. Полисахарид имел отрицательное удельное вращение,  $[\alpha]_D^{26} -30^\circ$  (с 1.0; вода), указывающее, как и в других глюкофруктанах, на D-конфигурацию остатков фруктозы и β-конфигурацию гликозидных центров [6]. По данным гель-хроматографии на колонках с молселектами G-50 и G-75, полисахарид неоднороден по молекулярной массе и представляет собой достаточно широкий набор полимергомологов, что наблюдается обычно и для других глюкофруктанов растительного происхождения [6]. В ИК-спектре полисахарида присутствовали полосы поглощения при 820, 860 и 940 см<sup>-1</sup>, характерные для глюкофруктанов типа инулина и левана [7–9].

Для выяснения природы межмоносахаридных связей в молекулах глюкофруктана был применен метод метилирования. Техника метилирования и

<sup>#</sup> Автор для переписки.

Таблица 1. Моносахаридный состав полисахаридных препаратов из луковиц *M. szovitsianum*

Фракция	Выход, %	Содержание, %							
		Общие сахара	Fru	Glc	Rha	Ara	Xyl	Gal	Уроновые кислоты
I	7.6	63.5	35.0	0.8	1.5	3.5	1.7	6.3	14.0
II	0.5	83.3	64.6	0.3	0.5	1.6	1.1	2.2	10.0
III	20.0	95.0	91.5	3.5					

Таблица 2. Анализ продуктов метилирования глюкофруктана методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов

Соединение	Тип замещения	Относительное время удерживания	Относительное содержание
2,5-Ди-О-ацетил-1,3,4,6-тетра-О-метилманнит	Fru2 →	0.75	5.8
2,5-Ди-О-ацетил-1,3,4,6-тетра-О-метилсорбит	Fru2 →	0.76	4.4
1,5-Ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилсорбит	Glc1 →	0.82	0.25
2,5,6-Три-О-ацетил-1,3,4-три-О-метилманнит	→6Fru2 →	0.94	2.4
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 →	0.948	7.2
1,2,5-Три-О-ацетил-3,4,6-три-О-метилсорбит	→1Fru2 →	0.95	7.0
1,5,6-Три-О-ацетил-2,3,4-три-О-метилсорбит	→6Glc1 →	1.0	1.0
1,2,5,6-Тетра-О-ацетил-3,4-ди-О-метилманнит	→6 Fru2 →	1.14	5.2
1,2,5,6-Тетра-О-ацетил-3,4-ди-О-метилсорбит			
	→1		

анализ образующихся после гидролиза метилированного образца моносахаридных производных с помощью ГЖХ и хромато-масс-спектрометрии подробно описаны в наших предыдущих работах [2, 10]. Полнота метилирования полисахарида достигалась в результате двукратной обработки метилиодидом и щелочью в диметилсульфоксиде [11].

Как видно из табл. 2, молекулы полисахарида содержат два типа связей ( $2 \rightarrow 1$  и  $2 \rightarrow 6$ ) 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 : 26, соотношение связей  $2 \rightarrow 1$  и  $2 \rightarrow 6$  равно 6 : 1, одно разветвление приходится в среднем на 2.3 остатка линейной

цепи. Другими словами, принимая в расчет и концевые моносахариды, можно заключить, что из каждых 4–5 моносахаридных остатков один служит точкой разветвления. Если считать, что подобно большинству известных глюкофруктанов исследуемый полисахарид биогенетически является продуктом фруктозилрования молекулы сахарозы (т.е., что каждая его молекула содержит только один остаток глюкозы), то, судя по соотношению глюкозы и фруктозы, средняя степень полимеризации образца составляет 27, а средняя степень разветвленности – 6 точек ветвления на молекулу.

Интересной отличительной особенностью глюкофруктана из *M. szovitsianum* является тот факт, что только 20% из общего количества остатков D-глюкопиранозы представляют собой концевые невозстанавливающие группировки, по всей вероятности, в составе обычных для глюкофруктанов фрагментов сахарозы. Остальные 80% глюкозных остатков находятся в цепях и замещены в

положении 6. По-видимому, к ним присоединены остатки фруктофуранозы или цепочки, построенные из таких остатков. В этом случае в молекулах полисахарида должен содержаться фрагмент неокестозы [ $\beta$ -D-Fruf-(2  $\rightarrow$  6)- $\alpha$ -D-Glcp-(1  $\leftrightarrow$  2)- $\beta$ -D-Fruf] и приведенный выше расчет средней степени полимеризации и разветвленности остается в силе. Второй 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. Сделать выбор между этими двумя вариантами структуры на основании результатов метилирования не представляется возможным.

Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР глюкофруктана аналогичен спектрам других разветвленных полисахаридов этого типа с 2  $\rightarrow$  1- и 2  $\rightarrow$  6-связями между остатками  $\beta$ -D-фруктофуранозы [2]. Положения главных сигналов, соответствующих углеродным атомам остатков фруктозы, подтверждают вывод о фуранозной форме этих остатков и о  $\beta$ -конфигурации гликозидных центров (ср. [12, 13]). Результаты полного анализа спектра, выполненного как описано в работе [2], совпадают с данными метилирования полисахарида. В частности, сигналы атомов углерода глюкозных остатков доказывают их пиранозную форму,  $\alpha$ -конфигурацию и присоединение их к С-2-атому  $\beta$ -D-фруктофуранозных остатков с образованием фрагментов сахарозы. К сожалению, особенности ЯМР-спектра неокестозы [14] не позволяют подтвердить или опровергнуть наличие фрагмента ее структуры в составе глюкофруктана по данным спектроскопии  $^{13}\text{C}$ -ЯМР.

Для того чтобы проверить, замещены ли остатки глюкозы в положении 6 остатками фруктофуранозы или другими остатками глюкозы, мы провели частичный гидролиз полисахарида в условиях расщепления фуранозидных связей, после чего попытались обнаружить в продуктах гидролиза соответствующие глюкозные дисахариды — генциобиозу или изомальтозу. По данным гель-хроматографии и ВЭЖХ, гидролизат содержал фруктозу, немного глюкозы и весьма незначительные количества сахарозы и других олигомерных веществ. Фракция дисахаридов была выделена препаративной гель-хроматографией и дополнительно исследована методом ГЖХ после восстановления боргидридом натрия и перевода в триметилсилильные производные. Сравнение с известными веществами, полученными из изомальтозы и генциобиозы, показало, что названные дисахариды в гидролизате глюкофруктана отсутствуют. Это наблюдение доказывает, что замещенные остатки глюкозы несут в положении 6 остатки фруктофуранозы.

Таким образом, глюкофруктан, выделенный из луковиц *M. szovitsianum*, относится к типу разветвленных глюкофруктанов, молекулы которых одновременно содержат элементы как инулиновой, так и левановой структуры [6, 15]. Примечательной особенностью этого полисахарида является наличие в нем редко встречающегося структурного элемента: только 20% остатков  $\alpha$ -D-глюкопиранозы занимают терминальное положение в составе обычного для глюкофруктанов сахарозного фрагмента, тогда как 80% замещены в положение 6 остатками фруктофуранозы или цепями; построенными из таких остатков. Глюкофруктаны с замещенными в положении 6 остатками D-глюкопиранозы были обнаружены ранее в *Cordyline terminalis* [16], *C. australis* [12], *Polygonatum odoratum* [17] и *Ornithogalum ponticum* [3]; замещенный остаток глюкозы имеется также в глюкофруктане из *Allium sativum* [18], но в этом случае заместитель расположен в положении 3.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Луковицы *M. szovitsianum* собирали в апреле в окрестностях Тбилиси. Предварительную обработку растительного материала, экстракцию горячей водой и фракционное осаждение полисахаридов ацетоном проводили как описано ранее [4].

ГЖХ выполняли на хроматографе Hewlett-Packard 5890A с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой HP Ultra-1 и интегратором HP 3393A. Условия: 150°C (1 мин)  $\rightarrow$  290°C, 5°/мин для ацетатов частично метилированных полиолов, 175°C (1 мин)  $\rightarrow$  290°C, 10°/мин для ацетатов полиолов и 250°C (1 мин)  $\rightarrow$  290°C, 10°/мин для  $\text{Me}_3\text{Si}$ -производных восстановленных дисахаридов. Хроматомасс-спектрометрию ацетатов частично метилированных полиолов проводили на приборе Varian MAT 311A с капиллярной колонкой SE-30 (25 м) при программировании температуры от 170 до 290°C со скоростью 12°/мин; энергия ионизирующего пучка электронов 70 эВ.

Для гель-хроматографии использовали мол-селекты G-50 и G-75 (Reanal, Венгрия) и смолу TSK HW-40 (Toyo Soda, Япония).

Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР получали на спектрометре Bruker AM-300 с рабочей частотой по углероду 75.43 МГц для 6%-ного раствора полисахарида в  $^2\text{H}_2\text{O}$  при 30°C (внутренний стандарт — метанол, 50.15 м. д. от  $\text{Me}_4\text{Si}$ ).

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

Количественное определение общего содержания сахаров выполняли по реакции с фенолом и конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [19] и калибровочному графику для фруктозы, уроновых кислот — по реакции с

м-гидроксидифенилом и конц.  $H_2SO_4$  [20] и калибровочному графику для галактуроновой кислоты, фруктозы – по реакции с резорцином и конц.  $HCl$  [21], глюкозы – с глюкозооксидазой [22].

Гидролиз полисахарида, качественный и количественный анализ моносахаридного состава проводили по известным методикам [2, 10, 23].

**Метилирование глюкофруктана.** К раствору 20 мг полисахарида в 1 мл DMSO прибавляли 0.3 мл  $MeI$  и 50 мг порошкообразного  $NaOH$ . После перемешивания на магнитной мешалке в течение 1 ч при комнатной температуре реакционную смесь разбавляли 3 мл воды, прибавляли 3 мл хлороформа, перемешивали, диализовали, упаривали досуха и остаток подвергали повторному метилированию в описанных выше условиях, получали метилированный полисахарид (полоса поглощения  $OH$ -групп при  $3400-3600\text{ см}^{-1}$  в ИК-спектре образца отсутствовала). 5 мг метилированного полисахарида в 0.5 мл 1 М трифторуксусной кислоты нагревали 2 ч при  $100^\circ C$ , упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл 1 М  $NH_4OH$ , обрабатывали избытком  $NaBH_4$  или  $NaB^2H_4$ , ацетилировали и анализировали полученные смеси ацетатов частично метилированных полиолов с помощью ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии, как описано ранее [2].

**Мягкий гидролиз глюкофруктана.** Раствор 130 мг полисахарида в 10 мл 0.05 М трифторуксусной кислоты нагревали 45 мин при  $100^\circ C$ , охлаждали и упаривали в вакууме, прибавляя этанол, для полного удаления кислоты. Остаток растворяли в 1 мл воды и 0.5 мл этого раствора наносили на колонку ( $2.5 \times 80\text{ см}$ ) с TSK HW-40, которую промывали водой ( $V_0$  140 мл, объемы элюции для мальтозы 285 мл, для глюкозы 320 мл). Вещества в элюате обнаруживали с помощью рефрактометрического детектора. Собирали фракции с подвижностью, соответствующей трисахаридам (255–267 мл, фракция 1), дисахаридам (266–288 мл, фракция 2) и моносахаридам (289–340 мл, фракция 3), которые исследовали с помощью ВЭЖХ на двух соединенных последовательно колонках ( $0.3 \times 15\text{ см}$ ), содержащих Sерагон SGX- $NH_2$ , 5 мкм. Использовали элюцию 75% водным ацетонитрилом ( $d$  0.843) со скоростью 0.8 мл/мин и рефрактометрический детектор. Сравнение с заведомыми образцами показало, что фракция 3 содержит фруктозу (главный компонент) и глюкозу, фракция 2 – сахарозу с примесью фруктозы и глюкозы, а фракция 1 – два неидентифицированные соединения, но изомальтоза или генциобиоза ни в одном случае не были обнаружены. Фракцию 2 или заведомые изомальтозу и генциобиозу обрабатывали боргидридом натрия, как при получении полиолов из моносахаридов,

к продуктам восстановления приливали по 0.4 мл силилирующего реагента Tri-Sil 'Z' (Pierce, США), нагревали в течение нескольких минут при  $60^\circ C$  и полученные растворы использовали для ГЖХ. Подтверждено отсутствие изомальтозы и генциобиозы в дисахаридной фракции 2.

Авторы благодарят сотрудников ИОХ РАН (Москва) Т.М. Мельникову за помощь при выполнении ВЭЖХ и А.С. Шашкова за получение и помощь в интерпретации спектра  $^{13}C$ -ЯМР глюкофруктана.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гроссгейм А.А. Флора Кавказа. Баку: АзФАН, 1940. С. 175–180.
2. Барбакадзе В.В., Кемертелидзе Э.П., Деканосидзе Г.Е., Беручаишвили Т.Г., Усов А.И. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 671–679.
3. Барбакадзе В.В., Кемертелидзе Э.П., Деканосидзе Г.Е., Усов А.И. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 912–916.
4. Барбакадзе В.В., Гахокидзе Р.А., Шенгелия З.С., Усов А.И. // Химия природных соединений. 1989. С. 330–335.
5. Peat S., Turvey J.R., Evans J.M. // J. Chem. Soc. 1959. P. 3341–3344.
6. Meier H., Reid J.S.G. // Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Plant Carbohydrates. V. 13A / Eds F.A. Loewus, W. Tanner. B.: Springer-Verlag, 1982. P. 435–451.
7. Vestraeten L.M.J. // Anal. Chem. 1964. V. 36. P. 162–166.
8. Suzuki M. // Can. J. Bot. 1968. V. 46. P. 1201–1206.
9. Kuhbauch W. // Z. Pflanzenphysiol. 1974. B. 7. S. 121–129.
10. Барбакадзе В.В., Кемертелидзе Э.П., Деканосидзе Г.Е., Усов А.И. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 223–227.
11. Ciucanu I., Kerek F. // Carbohydr. Res. 1984. V. 131. P. 209–217.
12. Brash D.J., Frankhauser B.L., McDonald A.G. // Carbohydr. Res. 1988. V. 180. P. 315–324.
13. Angyal S.J., Bethell G.S. // Austral. J. Chem. 1976. V. 29. P. 1249–1265.
14. De Bruin A., Van Loo J. // Carbohydr. Res. 1991. V. 211. P. 131–136.
15. Pontis H.G., DelCampillo E. // Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants / Eds P.M. Dey, R.A. Dixon. L.: Acad. Press, 1985. P. 205–227.
16. Boggs L.A., Smith F. // J. Amer. Chem. Soc. 1956. V. 78. P. 1880–1885.
17. Tomoda M., Satoh N., Sugiyama A. // Chem. Pharm. Bull. 1973. V. 21. P. 1806–1810.
18. Das N.N., Das A. // Carbohydr. Res. 1978. V. 64. P. 155–167.

19. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // *Anal. Chem.* 1956. V. 28. P. 350–356.
20. Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. // *Anal. Biochem.* 1973. V. 54. P. 484–489.
21. Yaphe W., Arsenault G.P. // *Anal. Biochem.* 1965. V. 13. P. 143–148.
22. Щербухин В.Д., Миронова А.И., Кодырева А.Н., Грюнер В.С. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1970. Т. 6. С. 467–470.
23. Слонекер Дж. // *Методы исследования углеводов / Пер. с англ. под ред. А.Я. Хорлина. М.: Мир, 1967. С. 26–37.*

## Glucofructan from Bulbs of Grape Hyacinth *Muscari szovitsianum* Baker (Liliaceae)

V. V. Barbakadze\*, I. L. Targamadze\*, and A. I. Usov\*\*<sup>1</sup>

\* *Kutateladze Institute of Pharmaceutical Chemistry, Academy of Sciences of Georgia, Tbilisi, Georgia*

\*\* *Zelinskii Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
Leninskii pr. 47, Moscow, GSP-1, 117913 Russia*

**Abstract**—A neutral glucofructan composed of fructose and glucose (26 : 1) residues was shown to be the major water-soluble polysaccharide in bulbs of *Muscari szovitsianum* Baker. It was shown by methylation technique to be branched and contain  $\beta$ -D-fructofuranose residues linked by 2  $\rightarrow$  1 and 2  $\rightarrow$  6 bonds in the ratio 6 : 1. 1,6-Disubstituted  $\beta$ -D-fructofuranose residues are branch points, which occur at intervals of 4–5 monosaccharide residues. Only 20% of  $\alpha$ -D-glucopyranose residues are terminal and linked with  $\beta$ -D-fructofuranose residues by 1  $\rightarrow$  2 bonds, whereas the remaining 80% of the glucose residues are additionally substituted in position 6 by either single  $\beta$ -D-fructofuranose residues or chains consisting of them. The glucofructan structure was confirmed by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy.

*Key words:* glucofructan, *Muscari szovitsianum*.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.