



УДК 594.945:577.121:547.458.7

ПОЛЯРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ АСЦИДИИ *Botryllus schlosseri*© 2002 г. А. И. Усов^{*,#}, К. И. Сланчев^{**}, Г. П. Смирнова^{*}, А. П. Иванова^{**},
К. Л. Стефанов^{**}, С. С. Попов^{**}, С. Н. Андреев^{***}^{*}Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинский просп., 47;^{**}Институт органической химии с центром фитохимии, Болгарская академия наук, София, Болгария;^{***}Музей естествознания, Болгарская академия наук, София, Болгария

Поступила в редакцию 13.03.2001 г. Принята к печати 15.03.2001 г.

В бутанольном экстракте биомассы асцидии *Botryllus schlosseri* с помощью ГЖХ-МС триметилсилильных производных идентифицированы 18 соединений, три из которых (5-оксопролин, 5-гидроксигидантоин и кинуреновая кислота) ранее в морских беспозвоночных не обнаруживались. Показано также, что биомасса, помимо целлюлозы, содержит сложные водорастворимые сульфатированные полисахариды, которые экстрагировали, фракционировали и характеризовали по моносхаридному составу и содержанию сульфатных групп. В полученных фракциях найдены фукоза, ксилоза, галактоза, манноза, глюкоза, глюкозамин, галактозамин и уроновые кислоты. В отличие от нескольких видов асцидий, изученных ранее, в составе *B. schlosseri* индивидуальный галактансульфат, по-видимому, отсутствует.

Ключевые слова: асцидии, *Botryllus schlosseri*, *n*-бутанольный экстракт; полисахариды, ГЖХ-МС.

ВВЕДЕНИЕ

Асцидии семейства Botryllidae [тип Chordata, подтип Urochordata (Tunicata), класс Ascidiacea] образуют колонии, состоящие из группы индивидуальных организмов. Единственным представителем этого семейства в Черном море является *Botryllus schlosseri*. В зависимости от возраста отдельные колонии этого вида могут достигать в диаметре 10 и в высоту 3 см. Колонии окрашены в яркие цвета, от лимонно-желтого до темно-коричневого, что объясняется наличием большого количества пигментов. Этот вид является практически космополитом и заселяет морское дно на глубинах от 1 до 65 м. Изучение его химического состава до сих пор ограничивалось анализом липофильных экстрактов, причем описаны только некоторые фосфолипиды и их жирные кислоты [1]. Недавно в составе неполярных компонентов биомассы черноморского образца *B. schlosseri* мы идентифицировали 19 стероидов, 12 фосфолипидов и 7 летучих соединений [2].

Полярные вещества асцидий, остающиеся в водно-этанольном слое при экстракции липофильных соединений по модифицированному методу Блая и Дайера [3], часто содержат компоненты (главным образом алкалоиды и пептиды), наделенные ценной биологической активностью [4]. Однако химические исследования полярных соединений *B. schlosseri* отсутствуют. Наше предва-

рительное изучение *n*-бутанольного экстракта водно-этанольного слоя показало, что он обладает умеренной противовирусной активностью [5], что может представлять интерес для медицины. Этот экстракт имеет, по-видимому, очень сложный состав. Одной из возможностей его детального анализа является исследование компонентов экстракта в виде триметилсилильных производных с помощью ГЖХ-МС. Этот метод весьма чувствителен и позволяет идентифицировать очень небольшие количества известных соединений. Биомасса *B. schlosseri* после экстракции в модифицированных условиях Блая и Дайера представляет собой труднорастворимый материал, содержащий преимущественно биополимеры. Этот материал мы также проанализировали с целью охарактеризовать его полисахаридный состав.

Уже давно известно, что оболочки асцидий содержат полисахарид, аналогичный целлюлозе и называемый туницином [6]. Позже в асцидиях были найдены некоторые необычные сульфатированные полисахариды, например, хитинсульфат в *Halocynthia roretzi* [7] или α -L-галактансульфаты в том же организме и в *Styela plicata* [8]. Сульфатированные полисахариды асцидий недавно подробно изучены бразильской группой исследователей. Присутствие высокомолекулярных α -L-галактанов, построенных главным образом из 4-связанных остатков 3-сульфата галактозы, было подтверждено для нескольких видов асцидий [9–13], включая *Botryllus* sp. [14]. В то же время среди этих сульфатированных галактанов были найде-

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 137-67-91; эл. почта: usov@ioc.ac.ru).

ны значительные структурные вариации, зависящие от вида асцидии. Так, α -L-галактан из *Herdmania tonus* – линейный полисахарид, построенный из моносультатированных моносахаридных остатков, тогда как сульфатированные галактаны из *S. plicata* и *Ascidia nigra* представляют собой высокоразветвленные полимеры, содержащие несультатированные остатки L-галактопиранозы и D-глюкопиранозы на невосстанавливающих концах цепей [15]. Соответствующий сульфатированный полисахарид из *Botryllus* sp. подробно не изучался.

В данной статье мы сообщаем результаты, полученные при анализе методом ГЖХ-МС некоторых полярных компонентов *B. schlosseri*, растворимых в *n*-бутаноле, а также предварительные данные о полисахаридном составе этой асцидии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование бутанольного экстракта методом ГЖХ-МС

Методика силилирования превращает полярные вещества в неполярные летучие производные, пригодные для разделения методом ГЖХ. Идентификация соединений была проведена сравнением их масс-спектров с соответствующими спектрами заведомых соединений. Некоторые из ТМС-производных (например, производные моносахаридов или жирных кислот) обладают очень близкими масс-спектрами. В этих случаях для подтверждения предлагаемой структуры использовались дополнительно времена удерживания при ГЖХ. Полученные результаты суммированы в табл. 1.

Идентифицированные полярные соединения принадлежат к нескольким структурным группам. Первая из них включает аминокислоты и их производные. Хотя в асцидиях были ранее найдены многочисленные пептиды и депсипептиды [4], часто обладающие ценной биологической активностью, о свободных аминокислотах в этих животных практически ничего не известно. Метод исследования, примененный нами, позволяет обнаруживать только свободные аминокислоты, не входящие в состав белков. Однако данные по свободным аминокислотам могут быть неполными, поскольку хроматографические пики ТМС-производных некоторых из них, особенно при низком содержании, могут накладываться на пики других компонентов смеси, что делает идентификацию таких аминокислот невозможной.

Главными аминокислотами оказались валин, серин и треонин, а в небольшом количестве найден аланин. В значительных количествах была обнаружена также одна из редких аминокислот, 5-оксопролин. Недавно мы нашли эту аминокислоту почти во всех черноморских водорослях и беспозвоночных (неопубликованные результа-

Таблица 1. Состав *n*-бутанольного экстракта биомассы *B. schlosseri*

Вещество	Содержание*, %
Аминокислоты	1.7
Валин	0.5
Аланин	<0.1
Серин	0.5
Треонин	0.3
5-Оксопролин	0.2
Другие N-содержащие вещества	2.3
5-Гидроксигидантоин	0.2
Кинуреновая кислота	0.4
Уридин	0.4
Урацил	1.0
Тимин	<0.1
Мочевина	0.5
Полиолы и моносахариды	34.7
Глицерин	20.7
Манноза	5.1
Глюкоза	4.4
мио-Инозит	2.2
Кислоты	1.9
Янтарная кислота	0.7
Глицериновая кислота	0.9
2-Гидроксиглутаровая кислота	<0.1

* Содержание приведено в процентах от общего ионного тока при ГЖХ-МС.

ты). Мы показали также, что это соединение присутствует в относительно небольших количествах в наземных растениях, но его содержание в беспозвоночных гораздо выше. Особый интерес представляет идентификация 5-гидроксигидантоина, поскольку гидантоины ранее не считались природными соединениями, а получались из аминокислот методами химического синтеза. Недавно были открыты ферменты, которые способны гидролизовать гидантоины [16]. Наши результаты можно рассматривать как свидетельство существования ферментов, катализирующих образование гидантоинов.

В бутанольном экстракте *B. schlosseri* мы идентифицировали урацил и тимин, а также нуклеозид уридин. Такие вещества редко обнаруживаются в морских беспозвоночных, вероятно, из-

Таблица 2. Содержание моносахаридов и сульфата в обезжиренной биомассе (ОБ) и полисахаридных фракциях, полученных из *B. schlosseri**

Препарат	Rha	Fuc	Xyl	Man	Glc	Gal	Уроновые кислоты	GlcN	GalN	SO ₃ Na
ОБ	0.12	0.20	0.10	0.20	0.28	0.3	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Фракции										
I	–	2.0	0.2	0.4	0.7	1.7	1.8	3.5	0.7	6.8
I–А	–	сл.	сл.	0.4	1.2	сл.	сл.	сл.	сл.	3.6
I–В	–	7.7	3.5	4.0	2.2	8.2	6.2	6.8	0.7	17.3
II	–	0.6	–	1.0	0.7	0.7	сл.	0.9	0.2	11.5
II–А	–	6.1	–	5.0	2.3	1.5	н.о.	сл.	сл.	1.8
II–В	–	3.0	–	3.4	3.0	1.1	н.о.	1.3	сл.	10.2

* В процентах от сухого веса; сл. – следы; н.о. – определение не проводилось.

за их высокой полярности и присутствия в сложной смеси с другими полярными соединениями.

В этом экстракте присутствуют также другие азотистые соединения. Два из них, кинуреновая кислота и мочевины, обычные метаболиты позвоночных, в беспозвоночных встречаются весьма редко. В морском организме кинуреновая кислота найдена впервые.

Важными составляющими бутанольного экстракта *B. schlosseri* являются свободные гидроксикислоты и дикарбоновые кислоты. Идентифицировано несколько полигидроксисоединений, из которых глицерин, по-видимому, является главным компонентом бутанольного экстракта. Обнаружен также мио-инозит и два моносахарида, манноза и глюкоза, которые присутствуют в свободном виде, а не входят в состав полисахаридов (см. ниже).

Всего в бутанольном экстракте, содержащем около 100 соединений, нам удалось идентифицировать 18 полярных веществ, причем все они найдены в изучаемой асцидии впервые. Некоторые из них могут обладать биологической активностью и, вероятно, выполняют для этих животных защитные функции или действуют как аттрактанты. Другие вещества, например свободные аминокислоты, гидроксикислоты или сахара, могут играть определенную роль в метаболизме. Когда будут исследованы полярные вещества асцидий большего числа видов, накопленные сведения могут оказаться полезными для химической таксономии оболочников. Дальнейшее изучение диеты асцидий позволит получить сведения о происхождении найденных веществ и о способности данного организма биосинтезировать некоторые из них.

Предварительная характеристика полисахаридов

После удаления липидов из биомассы *B. schlosseri* образуется остаток, содержащий преимуще-

ственно полисахариды и белки. Прямое определение [17] показало, что этот материал содержит 5.3% целлюлозы. Кислотный гидролиз в условиях, когда целлюлоза практически не расщепляется, привел к получению довольно сложной смеси нейтральных моносахаридов, присутствующих в сравнимых количествах (табл. 2). Для получения сведений о природе ожидаемых сульфатированных биополимеров была проведена экстракция водорастворимых полисахаридов с их последующим фракционированием. Методика экстракции включала депротеинизацию биомассы обработкой папаином как рекомендовано в работе [18]. Далее из нерастворимого остатка биомассы после дополнительной обработки смесью азотной и уксусной кислот, по аналогии с методикой аналитического определения целлюлозы в биологических объектах [17], был получен препарат неочищенной целлюлозы, содержащий 45.75% целлюлозы, с выходом, соответствующим содержанию целлюлозы в исходном материале. В продуктах кислотного гидролиза этого препарата нейтральные моносахариды отсутствовали, тогда как при более жестком гидролизе в условиях, используемых для расщепления целлюлозы (растворение в конц. H₂SO₄ с последующим нагреванием в 2 M H₂SO₄ при 100°C в течение 6 ч), как и ожидалось, была получена глюкоза в качестве единственного моносахарида.

К водному экстракту после обработки папаином, содержащему водорастворимые полимеры, дважды последовательно прибавляли двукратный объем этанола, в результате чего получали две фракции осадка (I и II). Обе фракции содержали связанный сульфат и имели аналогичный сложный моносахаридный состав. Разная растворимость этих фракций в водно-этанольных смесях объясняется, скорее всего, разницей в молекулярной массе полимеров. Интересно отметить, что обе фракции содержали аminosахара (глюкозамин и галактозамин в разных количествах, но в

одном и том же соотношении). Ионообменная хроматография обеих фракций на колонке с DEAE-целлюлозой, рекомендованная для выделения α -*L*-галактансульфата из асцидий [17], привела к получению низкосульфатированных субфракций I–A и II–A (содержание сульфата 3.6 и 1.8% соответственно), в которых аминоксахара отсутствовали, и высокосульфатированных субфракций I–B и II–B (содержание сульфата 17.3 и 10.2%). Все субфракции имели сложный моносахаридный состав. В субфракциях I–A и II–A углеводы присутствовали лишь в качестве минорных компонентов. Поскольку эти субфракции показывали сильное поглощение при 280 нм, можно предположить, что они содержат большие количества белка. В субфракциях I–B сульфатированные полисахариды составляли около 60%, а в субфракции II–B – всего около 22%. Моносахаридный состав этих субфракций приведен в табл. 2. Следует подчеркнуть, что ни в одной из них галактоза не является главным компонентом.

На основании проведенного анализа можно заключить, что, в отличие от нескольких изученных ранее видов асцидий, упомянутых выше (см. [9–15]), в *B. schlosseri* простой галактансульфат или отсутствует, или содержится в небольшом количестве в смеси с другими сульфатированными полисахаридами в субфракции I–B. Строение сложных сульфатированных биополимеров этой асцидии нуждается в дополнительном исследовании.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сбор *B. schlosseri*. Образец был собран в сентябре в южной части болгарского побережья Черного моря на глубине 7 м. Асцидий немедленно погружали в этанол и доставляли в лабораторию.

Исследование *n*-бутанольного экстракта. Собранные асцидии (150 г) гомогенизировали в 400 мл этанола. Нерастворимую часть гомогената отделяли фильтрованием, промывали хлороформом и высушивали, выход обезжиренной биомассы 3.5 г. Этанольный раствор концентрировали до 100 мл, разбавляли 50 мл воды и экстрагировали 3 × 100 мл хлороформа. Оставшийся водно-этанольный раствор экстрагировали 3 × 100 мл *n*-бутанола. Бутанольный экстракт упаривали досуха, выход сухого остатка 1.4 г. Часть этого остатка (5 мг) растворяли в 50 мкл пиридина и прибавляли 75 мкл бис(триметилсилил)трифторацетамида (BSTFA). Смесь нагревали 30 мин при 90°C и анализировали методом ГЖХ-МС на приборе Hewlett-Packard 6890 + MS 5973 с капиллярной колонкой HP5-MS (23 м × 0.2 мм, 0.5 мкм) в токе гелия (линейная скорость 31 см/с) при программировании температуры от 100 до 315°C со скоростью 5°/мин с последующим выдерживанием при 315°C в течение 10 мин. Для ионизации использовали пучок электронов с энергией 70 эВ при температуре детектора 250°C. Идентификацию соединений проводили

с помощью компьютерной библиотеки масс-спектров (NIST 98 MS Data Library) и прямым сравнением с заведомыми образцами триметилсилилпроизводных моносахаридов, аминокислот, глицерина, уридина и янтарной кислоты.

Анализ углеводов. Общее количество сахаров определяли колориметрически по реакции с фенолом и конц. H₂SO₄ [19], используя раствор галактозы в качестве стандарта. Аналогичные методики, основанные на цветных реакциях 6-дезоксигексоз с гидрохлоридом *L*-цистеина [20] и уроновых кислот с 3,5-диметилфенолом [21], использовали для определения фукозы и уроновых кислот соответственно. Для анализа нейтральных моносахаридов методом ГЖХ навески сухой обезжиренной биомассы или полисахаридных фракций (5–20 мг) нагревали с 2 М CF₃COOH (1 мл, содержит 0.9 мг *мио*-инозита в качестве внутреннего стандарта) при 100°C в течение 8 ч. Аликвоты гидролизата использовали для турбидиметрического определения содержания сульфата в виде BaSO₄ [22] и для колориметрического определения фукозы и уроновых кислот. Нейтральные моносахариды в оставшейся части гидролизата переводили в ацетаты полиолов восстановлением NaBH₄ с последующим ацелированием смесью уксусного ангидрида с пиридином (1 : 1). Полученные ацетаты полиолов анализировали методом ГЖХ на хроматографе Hewlett-Packard 5890A, снабженном пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой HP Ultra-2 и интегратором HP 3393A. Температуру колонки программировали от 175 до 290°C со скоростью 10°/мин. Индивидуальные ацетаты полиолов идентифицировали сравнением с заведомыми образцами по временам удерживания. Соотношение площадей пиков ацетата *мио*-инозита и исследуемых соединений использовали для количественных измерений.

Аминосакхара определяли в отдельных гидролизатах (4 М HCl, 22 ч при 100°C) с помощью аминокислотного анализатора Biotronic 2000. Целлюлозу анализировали по известной полумикрометодике [17].

Выделение полисахаридных фракций. Измельченную обезжиренную биомассу *B. schlosseri* (3 г) суспендировали в 60 мл 0.1 М натрий-ацетатного буфера pH 5.5, содержащего 5 мМ динатриевой соли EDTA и 5 мМ гидрохлорида *L*-цистеина, прибавляли папаин (300 мг), и смесь инкубировали 24 ч при 60°C. Осадок, полученный после центрифугирования смеси (6000g, 15 мин при комнатной температуре), еще дважды обрабатывали папаином в тех же условиях. Объединенные супернатанты после трех обработок смешивали с двумя объемами этанола и выдерживали 24 ч при –5°C. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали этанолом (50 мл), ацетоном (50 мл) и сушили в вакууме над P₂O₅, получали фракцию I, выход 323 мг. К водно-этанольному маточному раствору прибавляли этанол (180 мл) и обрабаты-

вали смесь, как описано выше, получали фракцию II, выход 287 мг.

К нерастворившемуся остатку биомассы приливали 80% АсОН (100 мл) и конц. HNO₃ (10 мл), перемешивали 1 ч при 100°C, охлаждали, центрифугировали, осадок отмывали от кислот водой, промывали этанолом, ацетоном и высушивали, получали фракцию III неочищенной целлюлозы, выход 360 мг.

Колоночная ионообменная хроматография фракций I и II. Раствор фракции I (312 мг) в 0.1 М натрий-ацетатном буфере pH 6.0 (5 мл) наносили на колонку (5 × 1.8 см) с DEAE-целлюлозой DE-52, уравновешенной с тем же буфером. Колонку промывали этим буфером (120 мл), а затем 0.1, 0.2, 0.3 и т.д. до 0.8 М растворами NaCl в этом буфере (по 30 мл каждого). Собирали фракции по 3 мл и в аликвотах по 0.2 мл определяли содержание общих сахаров. В первом элюате, не содержащем NaCl, было обнаружено значительное поглощение при 280 нм. Этот элюат диализовали и лиофилизовали, получали фракцию I-A, выход 27.8 мг. Аналогичная обработка объединенных элюатов растворами 0.1–0.4 М NaCl дала фракцию I-B, выход 34.9 мг.

Раствор фракции II (284 мг) в 0.1 М натрий-ацетатном буфере pH 6.0 (3 мл) хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой как описано выше. Из элюата, не содержащего NaCl, получили фракцию II-A, выход 18.2 мг, а из элюата 0.1–0.3 М растворами NaCl – фракцию II-B, выход 13.0 мг.

Авторы выражают благодарность Болгарскому национальному совету по научным исследованиям за частичную финансовую поддержку этой работы (проект X-710).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Костецкий Э.Я., Науменко Н.В. // Химия природ. соед. 1984. № 1. С. 24–29.

2. Slantchev K., Stefanov K., Seizova K., Popov S., Andreev St. // Z. Naturforschung. 2000. V. 55C. P. 794–798.
3. Christie W.W. Lipid Analysis. Oxford: Pergamon Press, 1973.
4. Faulkner D. // Nat. Prod. Reports. 1995. V. 12. P. 256–258.
5. Serkedjieva J., Konaklieva M., Dimitrova-Konaklieva S., Ivanova V., Stefanov K., Popov S. // Z. Naturforschung. 2000. V. 55. P. 87–93.
6. Hunt S. Polysaccharide-Protein Complexes in Invertebrates. London: Academic Press, 1970.
7. Anno K., Otsuka K., Seno N. // Biochim. Biophys. Acta. 1974. V. 362. P. 215–219.
8. Toda N., Horikawa T., Anno K., Seno N. // Carbohydr. Res. 1978. V. 62. P. 389–392.
9. Albano R.M., Pavao M.S.G., Mourao P.A.S., Mulloy B. // Carbohydr. Res. 1990. V. 208. P. 163–174.
10. Mourao P.A.S., Perlin A.S. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 166. P. 431–436.
11. Pavao M.S.G., Mourao P.A.S., Mulloy B. // Carbohydr. Res. 1990. V. 208. P. 153–161.
12. Pavao M.S.G., Albano R.M., Lawson A.M., Mourao P.A.S. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 9972–9979.
13. Santos J.A., Mulloy B., Mourao P.A.S. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 204. P. 669–677.
14. Pavao M.S.G., Albano R.M., Mourao P.A.S. // Carbohydr. Res. 1989. V. 189. P. 374–379.
15. Ruggiero J., Fossey M.A., Santos J.A., Mourao P.A.S. // Carbohydr. Res. 1998. V. 306. P. 545–550.
16. Rai R., Balaji Rao R., Taneja V. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1996. V. 12. P. 247–250.
17. Updegraff D.M. // Anal. Biochem. 1969. V. 32. P. 420–424.
18. Albano R.M., Mourao P.A.S. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 758–765.
19. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.
20. Dische Z., Shettles L.B. // J. Biol. Chem. 1948. V. 175. P. 595–603.
21. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Marina. 1995. V. 38. P. 43–51.
22. Dodgson K.S., Price R.G. // Biochem. J. 1962. V. 84. P. 106–110.

Polar Constituents of the Tunicate *Botryllus schlosseri*

A. I. Usov[#], K. I. Slanchev^{**}, G. P. Smirnova^{*}, A. P. Ivanova^{**},
K. L. Stefanov^{**}, S. S. Popov^{**}, and St. N. Andreev^{***}

[#]Phone: +7 (095) 137-6791; e-mail: usov@ioc.ac.ru

^{*}Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 47, GSP-1 Moscow, 119991 Russia

^{**}Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, 1113 Bulgaria

^{***}Museum of Natural History, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, 1000 Bulgaria

Eighteen compounds were identified by GC-MS of their trimethylsilyl derivatives in *n*-butanolic extract from the biomass of *Botryllus schlosseri*. Three of them, 5-oxoproline, 5-hydroxyhydantoin, and kinurenic acid, were found in marine invertebrates for the first time. In addition to cellulose, the biomass was also shown to contain complex water-soluble sulfated polysaccharides. These were extracted and fractionated, and sulfate content and monosaccharide composition were determined in the fractions; fucose, xylose, galactose, mannose, glucose, glucosamine, galactosamine, and uronic acids were found. Unlike several other tunicate species, *Botryllus schlosseri* does not seem to contain any simple galactan sulfate. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: *Botryllus schlosseri*, *n*-butanolic extract, GC-MS, polysaccharides, tunicates