



УДК 577.15.154

ВЫДЕЛЕНИЕ И ЧАСТИЧНАЯ СТРУКТУРА СИАЛОГЛИКОЛИПИДА
ИЗ ПЕЧЕНИ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *PATIRIA PECTINIFERA*

Кочетков Н. К., Смирнова Г. П.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Из печени морской звезды *Patiria pectinifera* выделены и охарактеризованы два сиалогликолипида. Показано, что они являются сфингогликолипидами, углеводная цепь которых содержит глюкозу, галактозу, арабинозу и сиаловую кислоту. В менее полярном сиалогликолипиде (I) соотношение этих моносахаридов равно 1 : 4 : 2 : 1. Сфингозновое основание липида (I) представляет собой смесь C_{16} -, C_{17} - и C_{18} -фитосфингозинов с прямой цепью и *изо*-строения; главный компонент смеси — C_{17} -*изо*-фитосфингозин. Высшие жирные кислоты липида (I) представлены α -оксикислотами, ~95% смеси кислот составляют $C_{22:0}$ -, $C_{23:0}$ - и $C_{24:0}$ - α -оксикислоты. При мягком кислотном гидролизе гликолипида (I) образуется галактопиранозил- β -(1 \rightarrow 4)-глюкопиранозил- β -(1 \rightarrow 1)-керанд.

Ранее было показано, что ткани представителей различных классов иглокожих содержат сиалогликолипиды [1, 2], которые в других типах морских беспозвоночных не обнаружены. Были выделены сиалогликолипиды морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* [3], *Echinocardium cordatum* [4], *Anthocidaris crassispina* [5] и морской звезды *Distolasterias nipon* [6], а также установлены их структуры. Углеводная цепь сиалогликолипидов морских ежей содержит глюкозу и сиаловую кислоту, связанную кетозидной связью с первичным гидроксилом глюкозы. В некоторых случаях олигосахаридная цепь может содержать заместители неуглеводной природы, например остаток серной кислоты [4].

В состав углеводной цепи сиалогликолипида морской звезды *D. nipon* кроме глюкозы и сиаловой кислоты входит еще и галактоза, т. е. этот гликолипид по составу сахаров похож на гематозид, однако отличается от последнего высоким содержанием сиаловых кислот [6]. Чтобы выяснить, типичен ли такой вид структуры для сиалогликолипидов морских звезд, мы предприняли исследование сиалогликолипидов другого вида морской звезды — *Patiria pectinifera*. В настоящей работе приведены данные по выделению и характеристике сиалогликолипидов из печени *P. pectinifera* и исследованию структуры менее полярного сиалогликолипида.

Выделение гликолипидов и их состав. Гликолипиды, содержащие сиаловые кислоты, были выделены из общего липидного экстракта печени *P. pectinifera* с помощью диализа [3]. Полученный препарат составил ~3% от веса исходной влажной ткани и содержал ~2% сиаловых кислот. По данным ТСХ, в состав препарата входили два сиалогликолипида, фосфолипиды, пигменты, а также некоторое количество нейтральных гликолипидов. Для выделения индивидуальных сиалогликолипидов исполь-

Таблица 1

Состав высших жирных кислот сиалогликолипида (I)
из печени *P. pectinifera*
определен при помощи ГЖХ метиловых эфиров
метоксипроизводных кислот

α -Окси-кислоты	Содержание, % от суммы кислот	α -Окси-кислоты	Содержание, % от суммы кислот
C _{20:0}	1,1	C _{23:0}	30,0
C _{21:0}	2,6	C _{24:0}	26,8
C _{22:0}	39,5		

зовали колоночную хроматографию на DEAE-целлюлозе с элюцией кислотных гликолипидов растворами ацетата аммония в метаноле [7]. 0,025 М раствором соли элюировался менее полярный гликолипид (I), а 0,25 М раствором — более полярный гликолипид (II). Оба липида были дополнительно очищены препаративной ТСХ на силикагеле и вели себя как индивидуальные соединения при ТСХ с использованием нейтральной и основной систем растворителей. Они содержали сиаловую кислоту и нейтральные сахара (специфическое окрашивание резорциновым [8] и орциновым [2] реактивами соответственно) и не содержали фосфатной группы (отрицательная реакция с молибденовым реактивом [9]) и свободной аминокислоты (отсутствие окраски с нингидрином). ИК-спектры соединений (I) и (II) подобны спектрам других сиалогликолипидов: имеются интенсивные полосы поглощения амидной группы (1640 и 1550 см⁻¹), первичных и вторичных спиртовых гидроксильных групп (1040 и 1080 см⁻¹), ассоциированных гидроксильных групп (3300—3450 см⁻¹), карбоновых кислот (1225 и 1405 см⁻¹), валентных колебаний C—H-связей алифатической цепи (2860 и 2930 см⁻¹).

По данным метанолиза, а также частичного и полного кислотного гидролиза, в состав гликолипидов (I) и (II) входят высшие жирные кислоты, сфингозиновое основание, глюкоза, галактоза, арабиноза и сиаловая кислота. Таким образом, эти гликолипиды необычны по составу сахаров: содержат арабинозу, которая не была обнаружена в сиалогликолипидах из других источников. Как показал количественный анализ сахаров, в гликолипиде (I) соотношение глюкоза — галактоза — арабиноза — сиаловая кислота равно 1 : 4 : 2 : 1.

Состав жирных кислот. Структура липидной части гликолипида (I) определена на основании анализа продуктов его метанолиза и периодатного окисления. После метанолиза липида (I) были выделены метиловые эфиры высших жирных кислот и сфингозиновое основание. ТСХ метиловых эфиров кислот показала присутствие в липиде только монооксикислот, состав которых был определен с помощью ГЖХ в виде метиловых эфиров метоксипроизводных (табл. 1). Как видно из таблицы, в гликолипиде (I) обнаружены только насыщенные α -оксикислоты, причем более 95 % смеси кислот составляют C_{22:0}, C_{23:0}, C_{24:0}- α -оксикислоты. Таким образом, состав высших жирных кислот сиалогликолипида (I) отличается от состава кислот сиалогликолипида морской звезды *D. piper*, где присутствуют как незамещенные, так и α -оксикислоты и высоко содержание ненасыщенных α -оксикислот [6]. Состав кислот сиалогликолипида (I) близок составу кислот цереброзидов, выделенных из печени *P. pectinifera*, где также присутствуют только α -оксикислоты [10].

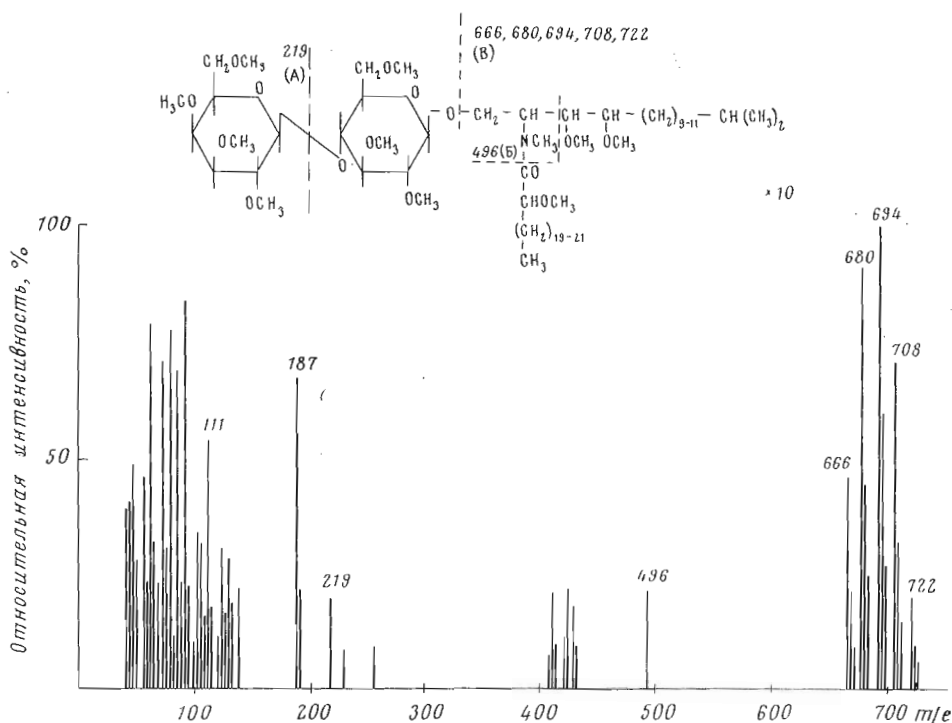
Структура сфингозиновых оснований. Сфингозиновое основание гликолипида (I), по данным ТСХ, идентично фитосфингозину. Расположение функциональных групп установлено на основании результатов периодатного окисления гликолипида. Продукты окисления после распределения между водой и гексаном восстанавливали боргидридом калия. Из водного слоя после метанолиза был выделен 2-амино-1,3-пропандиол, идентифи-

Состав фитосфингозинов сиалогликолипида (I) из печени *P. pectinifera*
 определен с помощью ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии
 простых метиловых эфиров спиртов

Алифатические спирты	Характеристические фрагменты, <i>m/e</i>			Содержание, % от суммы	Фитосфингозины
	<i>M</i> — 32	<i>M</i> — 32 — 15	<i>M</i> — 32 — 43		
<i>изо</i> -C _{13:0}	182	167	139	6,5	<i>изо</i> -C _{16:0}
<i>н</i> -C _{13:0}	182	—	—	13,4	<i>н</i> -C _{16:0}
<i>изо</i> -C _{14:0}	196	181	153	55,5	<i>изо</i> -C _{17:0}
<i>н</i> -C _{14:0}	196	—	—	2,9	<i>н</i> -C _{17:0}
<i>изо</i> -C _{15:0}	210	195	167	14,7	<i>изо</i> -C _{18:0}
<i>н</i> -C _{15:0}	210	—	—	7,0	<i>н</i> -C _{18:0}

цированный масс-спектрометрически в виде 2,4-динитрофенильного производного [6]. В органическом слое были обнаружены высшие жирные спирты. Получение спиртов и 2-амино-1,3-пропандиола после восстановления продуктов периодатной дегградации гликолипида (I) показывает, что гидроксильные группы сфингозинового основания находятся у C₍₁₎, C₍₃₎ и C₍₄₎, а аминогруппа — у C₍₂₎, т. е. занимают такое же положение, как и в фитосфингозине. Состав фитосфингозинов гликолипида (I) был определен в результате анализа спиртов с помощью ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии. Предварительно спирты были очищены препаративной ТСХ на силикагеле. ГЖХ спиртов показала присутствие в смеси шести соединений, из которых три удалось идентифицировать как C₁₃-, C₁₄- и C₁₅-насыщенные спирты нормального строения по их относительным удерживаемым объемам сравнением с заведомыми образцами. Структура остальных соединений была доказана с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии метилированных производных. В масс-спектрах всех компонентов смеси имелись пики, соответствующие характерному для метоксипроизводных спиртов фрагменту [*M* — 32]⁺, позволяющему определить длину алифатической цепи [11]. Кроме того, в масс-спектрах производных неидентифицированных спиртов имелись пики ионов [*M* — 32 — 15]⁺ и [*M*⁺ — 32 — 43]⁺, которые доказывают присутствие изопропильной группы в исследуемых соединениях [11]. Результаты анализа показали, что в смеси содержатся C₁₃-, C₁₄- и C₁₅-спирты *изо*-строения, причем главный компонент смеси спиртов — *изо*-тетрадеканол-1 (табл. 2). Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что более 75% смеси фитосфингозинов сиалогликолипида (I) составляют разветвленные C₁₆-, C₁₇- и C₁₈-фитосфингозины, а главный компонент смеси — C₁₇-*изо*-фитосфингозин. Таким образом, состав сфингозиновых оснований сиалогликолипида (I) существенно отличается от состава сфингозиновых оснований сиалогликолипидов других видов иглокожих, где фитосфингозины с разветвленной цепью не обнаружены, но близок составу фитосфингозинов цереброзидов *P. pectinifera*, где также высоко содержание фитосфингозинов *изо*-строения и главным компонентом является C₁₇-*изо*-фитосфингозин [10].

Структура нейтрального гликолипида, образующегося при частичном гидролизе сиалогликолипида (I). При мягком кислотном гидролизе липида (I) образуется нейтральный гликолипидный фрагмент (III), хроматографическая подвижность которого при ТСХ не отличается от подвижности лактозилкерамида. Анализ моносахаридов, отщепляющихся при полном кислотном гидролизе гликолипида (III), показал, что в его состав входят глюкоза и галактоза в соотношении 1 : 1. После метилирования липида (III) и последующего метанолиза образующиеся метилированные метилгликозиды анализировали с помощью ГЖХ и обнаружили присутствие 2,3,4,6-тетра-О-метил-метилгалактопиранозидов и 2,3,6-три-О-метил-ме-



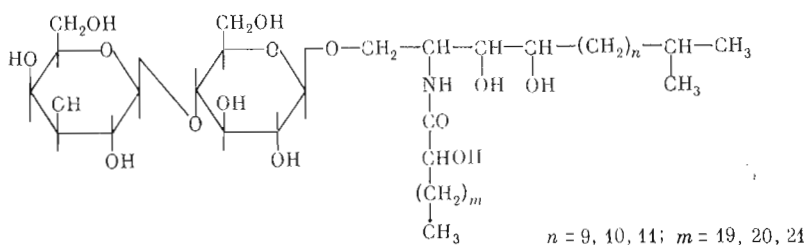
Масс-спектр метилированного лактозилкерамида, полученного при мягком кислотном гидролизе сиалогликолипида (I) из печени *P. pectinifera*

тилглюкопиранозидов. Следовательно, в гликолипиде (III) остаток галактопиранозы является концевым и присоединен к остатку глюкопиранозы в положении 4.

Структура липида (III) как дигексозилкерамида, в состав которого входят монооксикислоты и фитосфингозин, была подтверждена с помощью масс-спектрометрии метилированного производного. Известно, что в масс-спектрах полностью метилированных цереброзидов имеется интенсивный пик с m/e 292, который соответствует фрагменту, образуемому при одновременном разрыве амидной связи керамида и $C_{(2)} - C_{(3)}$ -связи сфингозинового основания [12]. Мы надеялись, что при масс-спектрометрической фрагментации дигексозилкерамида будет образовываться аналогичный фрагмент, содержащий дисахаридную цепь и часть молекулы фитосфингозина. Действительно, в масс-спектре метилированного гликолипида (III) наряду с пиком иона с m/e 219, соответствующего отщеплению концевой гексозы (фрагмент А), имеется достаточно интенсивный пик иона с m/e 496, соответствующий фрагменту Б (рисунок). В масс-спектре тридегтерометильного производного гликолипида (III) этот пик смещается на 24 единицы в сторону больших масс (m/e 520). Образование этого фрагмента показывает, что к первичному гидроксилу фитосфингозина присоединен дигексозильный остаток. Кроме того, в масс-спектре метилированного липида (III) имеются интенсивные пики ионов с m/e 666, 680, 694, 708 и 722, которые в масс-спектре тридегтерометильного производного сдвигаются на 12 единиц в сторону больших масс, т. е. соответствующие этим пикам фрагменты представляют собой керамидную часть молекулы гликолипида (III), включающую фитосфингозин и оксикислоты (фрагмент В). Величины этих ионов соответствуют присутствию в гликолипиде C_{22} -, C_{23} - и C_{24} -монооксикислот и C_{16} -, C_{17} - и C_{18} -фитосфингозинов.

Конфигурация гликозидных связей в гликолипиде (III) определена на основании результатов окисления гликолипида хромовым ангидридом, что, как известно, позволяет отличить α -связанные остатки монопиранозидов, которые не окисляются в этих условиях, от β -связанных остатков, которые при этом разрушаются [13]. После окисления ацетилированного гликолипида (III) хромовым ангидридом и последующего кислотного гидролиза оказалось, что остатки глюкозы и галактозы практически полностью разрушились; следовательно, оба они связаны в гликолипиде β -гликозидными связями.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что нейтральный гликолипид (III), образующийся при мягком кислотном гидролизе сиалогликолипида (I), имеет структуру галактопиранозил- β -(1 \rightarrow 4)-глюкопиранозил- β -(1 \rightarrow 1)-керамида:



Оба моносахаридных остатка, расположенных в начале углеводной цепи сиалогликолипида, не разрушаются при действии на гликолипид (I) периодата. После обработки гликолипида (I) по Смитцу был выделен фрагмент, содержащий высшую жирную кислоту, глюкозу и галактозу в соотношении 1 : 1 : 1. Устойчивость глюкозы, связанной с керамидом и имеющей заместитель у $C_{(4)}$, отмечалась и раньше при периодатном окислении ганглиозидов [14]. Устойчивость галактозы, связанной с глюкозой, свидетельствует о том, что она либо замещена по $C_{(3)}$, либо находится в узле разветвления углеводной цепи гликолипида. Структура участка олигосахаридной цепи, расположенного за остатком лактозы, и место присоединения его к лактозе устанавливается в настоящее время.

Экспериментальная часть

Морские звезды *P. pectinifera* были собраны в бухте Посвет Японского моря в августе-сентябре.

Все растворители очищали по стандартным методикам и перегоняли перед использованием. ТСХ, аналитическую и препаративную, проводили на силикагеле марки КСК (150—200 меш), содержащем 5% гипса. Использовались системы: для сиалогликолипидов — хлороформ — метанол — вода (60 : 40 : 10) и хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH (60 : 35 : 8), обнаружение орциновым [2] и резорциновым [8] реактивами; для нейтральных гликолипидов — хлороформ — метанол — вода (64 : 24 : 4), обнаружение орциновым реактивом; для сфингозиновых оснований — хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH (40 : 10 : 1), обнаружение 2% раствором нингидрина в бутаноле; для алифатических спиртов — хлороформ — метанол (49 : 1), обнаружение раствором бромтимолблау и конц. H_2SO_4 ; метиловые эфиры кислот хроматографировали в дихлорэтаноле и обнаруживали раствором бромтимолблау и конц. H_2SO_4 . БХ сахаров проводили на Ватмане JN11 в системе бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3, обнаружение кислым фталатом анилина и реактивом KIO_4 — щелочной $AgNO_3$ [15].

ГЖХ проводили на приборе Pye Unicam 104 (Англия); скорость газаносителя 60 мл/мин. Нейтральные моносахариды анализировали в виде

ацетатов полиолов [16] и альдононитрилов [17] на колонках с 3% неопентилгликольдипата (НГА) на диатомите С при 215° и 3% ECNSS-M на том же носителе при 180°; частично метилированные метилгликозиды анализировали на колонке с 3% НГА при 155°; алифатические спирты и их метиловые эфиры — на колонках с 3% силикона SE-30 и 3% НГА на диатомите С при 150—200°, скорость подъема температуры 2°/мин; метиловые эфиры метоксипроизводных кислот — на тех же колонках при 160—260°.

Хромато-масс-спектрометрический анализ простых метиловых эфиров спиртов проводили на приборе Varian MAT 111 (ФРГ); колонка с 3% Se-30, ионизирующее напряжение 70 эВ.

Масс-спектры метилированного и тридегтерометилированного гликолипида (III) сняты на приборе Varian MAT CH-6 (США) при ионизирующем напряжении 70 эВ и температуре нагрева образцов 250°.

Сфингозиновое основание количественно определяли по методу [18], калибровочную кривую строили по френозину.

Экстракцию липидов из печени *P. pectinifera* и выделение сиалогликолипидов на DEAE-целлюлозе осуществляли как описано ранее [3, 4]; менее полярный гликолипид (I) элюировали 0,025 н. раствором ацетата аммония в метаноле, а более полярный гликолипид (II) — 0,25 н. раствором. Полученные сиалогликолипиды очищали препаративной ТСХ.

Полный кислотный гидролиз гликолипидов (2—4 мг) проводили 2 н. H_2SO_4 (2 мл) при 100° в течение 4 ч. Моносахариды анализировали БХ и ГЖХ.

Мягкий кислотный гидролиз сиалогликолипида (10 мг) проводили 0,1 н. H_2SO_4 (10 мл) при 80° в течение 2 ч. Реакционную смесь диализовали против дистиллированной воды (500 мл) 24 ч при 20°. Недализируемые соединения лиофилизировали, анализировали ТСХ и нейтральный гликолипид (III) выделяли препаративной ТСХ. Внешний водный раствор упаривали до 10 мл, пропускали через колонку с дауэксом $2 \times 8 (CH_3COO^-)$, сиаловые кислоты элюировали 1 М ацетатным буфером, рН 4,6.

Кислый метанолиз гликолипидов проводили 3 н. HCl в метаноле (2 мл) при 80° в течение 18 ч. Метиловые эфиры высших жирных кислот и фитосфингозины выделяли, как описано ранее [3], и анализировали.

Метилирование гликолипида (III), алифатических спиртов и метиловых эфиров оксикислот осуществляли по Хакомори [19]. Метилированные производные экстрагировали хлороформом, диализовали против дистиллированной воды и очищали с помощью ТСХ. Метилированный гликолипид (III) анализировали с помощью масс-спектрометрии, метиловые эфиры α -метоксикислот — с помощью ГЖХ и простые метиловые эфиры спиртов — с помощью ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии.

Гликолипид (III) окисляли хромовым ангидридом по методу [13]. Предварительно гликолипид (1 мг) ацетилировали смесью пиридин—уксусный ангидрид (1 : 1), в качестве внутреннего стандарта добавляли инозит в количестве, соответствующем содержанию в пробе сфингозинового основания. Моносахариды, образующиеся при гидролизе гликолипида, окисленного CrO_3 , анализировали с помощью ГЖХ в виде ацетатов полиолов.

Периодатное окисление гликолипида (I) (5 мг) проводили 0,02 М $NaIO_4$, как описано ранее [3]. Высшие жирные альдегиды экстрагировали гексаном, восстанавливали KVH_4 и анализировали ГЖХ. Водный слой после окисления обрабатывали KVH_4 , деградированный гликолипид выделяли препаративной ТСХ, гидролизовали 0,1 н. H_2SO_4 (80°, 2 ч) и диализовали против воды. Часть недализируемого продукта подвергали метанолизу 3 н. HCl в метаноле, выделяли 2-амино-1,3-пропандиол, который анализировали с помощью масс-спектрометрии в виде 2,4-динитрофенильного производного [4]. Оставшуюся часть недализируемого продукта гидролизовали 2 н. H_2SO_4 и анализировали моносахариды с помощью ГЖХ, в качестве внутреннего стандарта использовали маннозу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков Н. К., Жукова И. Г., Смирнова Г. П., Васьяковский В. Е. (1967) Докл. АН СССР, **177**, 1472—1474.
2. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. I., Svetashev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P. (1970) *Compar. Biochem. and Physiol.*, **34**, 163—177.
3. Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **326**, 74—83.
4. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Chekareva N. V. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **424**, 274—283.
5. Hoshi M., Nagai Y. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **388**, 152—162.
6. Жукова И. Г., Богдановская Т. А., Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. (1973) Докл. АН СССР, **208**, 981—984.
7. Winterbourn C. C. (1971) *J. Neurochem.*, **18**, 1153—1155.
8. Svennerholm L. (1957) *Biochim. et biophys. acta*, **24**, 604—611.
9. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. I. (1968) *J. Lipid Res.*, **9**, 396.
10. Вавер В. А., Шапошникова Г. И., Симонова Т. Н. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 594—600.
11. Karlsson K.-A., Samuelsson B. E., Steen G. O. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **306**, 307—316.
12. Karlsson K.-A., Pascher I., Pimplott W., Samuelsson B. E. (1974) *Biomed. Mass. Spectrom.*, **1**, 49—56.
13. Laine R. A., Renkonen O. (1975) *J. Lipid Res.*, **16**, 102—106.
14. Johnson G. A., McCluer R. H. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **84**, 587—595.
15. Усов А. И., Рехтер М. А. (1969) *Ж. общ. химии*, **39**, 912—913.
16. Weinstein D. B., Marsh J. B., Glick M. C., Warren L. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 3928—3937.
17. Dmitriev B. A., Backinovsky L. V., Chizhov O. S., Zolotarev B. M., Kochetkov N. K. (1971) *Carbohydr. Res.*, **19**, 432—435.
18. Lauter C. J., Trams E. G. (1962) *J. Lipid Res.*, **3**, 136—138.
19. Nakomori S. I. (1964) *J. Biochem.*, **55**, 205—208.

Поступила в редакцию
18.I.1977

ISOLATION AND PARTIAL STRUCTURE OF A SIALOGLYCOLIPID FROM HEPATOPANCREAS OF THE STARFISH *PATIRIA PECTINIFERA*

КОЧЕТКОВ Н. К., СМИРНОВА Г. П.

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

Two sialoglycosphingolipids were isolated from hepatopancreas of the starfish *Patiria pectinifera*. Their sugar moieties contained glucose, galactose, arabinose and sialic acid. The monosaccharide ratio in the less polar sialolipid (I) was found to be 1 : 4 : 2 : 1. The sphingosine base in (I) comprises a mixture of C₁₆, C₁₇, and C₁₈ straight- and branched-chain phytosphingosines, wherein C₁₇-*iso*-phytosphingosine is the predominant component. The fatty acids in this lipid are saturated α -hydroxy acids, about 95% being a mixture of those with C₂₂, C₂₃, and C₂₄ structures. Galactopyranosyl- β -(1 \rightarrow 4)-glucopyranosyl- β -(1 \rightarrow 1)-ceramide was isolated after mild acid hydrolysis of (I).