



УДК 547.95.02:593.96.3:577.115

ЦЕРЕБРОЗИДЫ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ ГОЛОТУРИИ
CUCUMARIA JAPONICA

Ватраков С. Г., Муратов В. В., Сакандглидзе О. Г.

Центральный ордена Ленина институт усовершенствования врачей, Москва

Сулима А. В., Розынов Б. В.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР,
Москва

В кожно-мышечном мешке дальневосточной голотурии *Cucumaria japonica* обнаружено необычно высокое содержание цереброзидов (22 мг/г сухого веса). Сумма цереброзидных фракций состоит из β -D-глюкопиранозилцерамидов трех видов. Две из них, (I) и (II), содержат в качестве жирных оснований 16-метил- Δ^4 -¹¹-гептадекасфингаденин (доминирующее основание), 14-метил- Δ^4 -гексадекасфингенин, 16-метил- Δ^4 -гептадекасфингенин и 16-метил- Δ^4 -сфингенин, которые во фракции (I) связаны с негидроксированными жирными кислотами ($C_{22:0}$, $C_{23:0}$, $C_{24:0}$, $C_{24:1}$), а во фракции (II) — с жирными 2-D-оксикислотами ($C_{22:0}$, $C_{23:1}$, $C_{23:1}$, $C_{24:1}$). Последние также входят в состав цереброзидной фракции (III), где практически единственным жирным основанием является 4-окси-14-метилгексадекасфинганин. По результатам масс-спектрометрического анализа пер-О-ацетильных производных цереброзидов и бензолборнатов соответствующих церамидов сделан вывод о молекулярно-видовом составе цереброзидных фракций.

Исследования гликосфинголипидов морских беспозвоночных, проведенные в различных лабораториях, показали, что некоторые виды этих животных синтезируют структурные разновидности указанного класса липидов, не встречающиеся у наземных организмов. Так, в морских иглокожих обнаружены ганглиозиды необычного строения (см., например, [1—4]), в составе цереброзидов морских звезд [5] и дальневосточного трепанга [6] найдены насыщенные фитосфингозины * C_{16} — C_{19} с разветвленной углеводородной цепью, а в цереброзидах актинии *Metridium senile* — сфингозиновые основания, имеющие метильное разветвление при двойной связи в середине цепи [7]. Весьма интересным представляется высокое содержание цереброзидов в тканях морских звезд [8], сравнимое лишь с уровнем аналогичных гликолипидов в нервных тканях млекопитающих. Не исключено, что это обстоятельство связано со специфическими функциями цереброзидов у различных животных. Существенную помощь при выяснении физиологической роли гликосфинголипидов, в частности цереброзидов морских беспозвоночных, может оказать изучение структуры и распространения этих липидов у представителей различных видов. В настоящей работе описаны выделение и структурный анализ цереброзидов, содержащихся в кожно-мышечном мешке дальневосточной голотурии *Cucumaria japonica*.

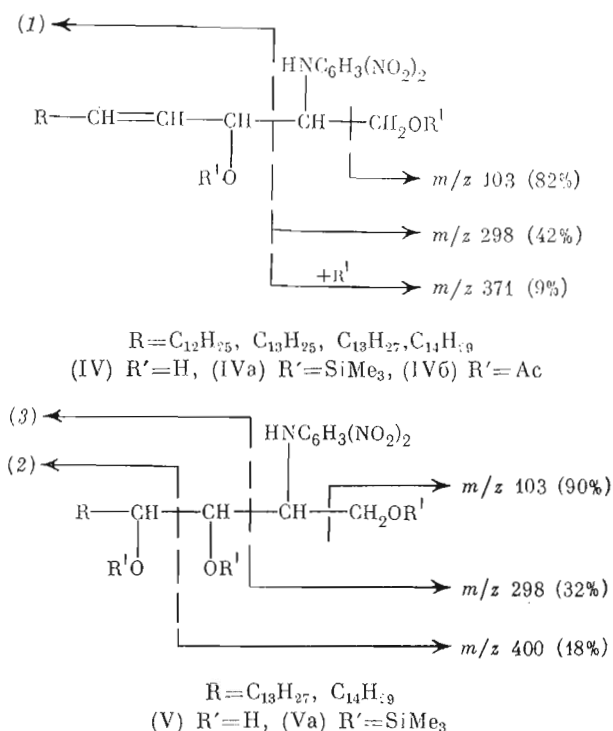
Суммарные липиды кожно-мышечного мешка *C. japonica* экстрагировали смесью хлороформ — метанол; анализ экстракта при помощи ТСХ на силикагеле показал, что в нем присутствуют в меньшей мере три различных вида цереброзидов. На хроматограммах эти вещества давали положительные реакции на гликолипиды с антроновым реагентом [10] и с периодатом — реактивом Шиффа [11], а также положительную реакцию на группировку NH (или NH_2) с Cl_2 — бензидином [12]. Две цереброзидные фракции, наиболее подвижные при ТСХ, мигрировали близко к цереброзидам мозга быка.

* В настоящем сообщении названия «сфингозины» и «сфингозиновые основания» указывают только на принадлежность обсуждаемых веществ к соответствующему классу липидов; для описания конкретной структуры жирных оснований используется общепринятая номенклатура [9].

Для выделения цереброзидных фракций суммарные липиды подвергали щелочному метанолизу в мягких условиях, нейтральные липофильные вещества метанолизата освобождали от кислотных хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе, после чего гликолипиды разделяли и очищали до хроматографически гомогенного состояния путем хроматографии на колонках с силикагелем. Полученные индивидуальные цереброзиды не отличались по подвижности при ТСХ от цереброзидов, содержащихся в первоначальном липидном экстракте, откуда следует, что в процессе выделения структура этих липидов не претерпела изменений. Общее содержание цереброзидов в суммарных липидах кожно-мышечного мешка *S. japonica* составляет 23%; на 1 г сухого веса последнего приходится 22 мг цереброзидов. Количественное соотношение цереброзида (I), наиболее подвижного при ТСХ, цереброзида (II), менее подвижного, и наиболее полярного цереброзида (III) определено как 1 : 3,7 : 0,02.

ИК-спектры гликолипидов (I) — (III) различаются незначительно и содержат полосы валентных колебаний связей: O—H спиртовых гидроксильных групп и N—H амидной группы (3360 см^{-1} , широкая полоса), C—H при двойной связи (3015 см^{-1}), C—O в карбинольных группировках (1085 см^{-1}); амидные полосы I и II (1643 и 1538 см^{-1}). При кислотном метанолизе в жестких условиях все три цереброзида (I) — (III) дали единственный углеводный продукт деградации — глюкозу, однако состав липофильных продуктов метанолиза был различным. Метанолиз цереброзида (I) привел к образованию метиловых эфиров незамещенных жирных кислот и сфингозиновых оснований (последним сопутствовали обычные продукты их трансформации). Те же основания обнаружены в метанолизате цереброзида (II), нейтральная же липофильная часть метанолизата состояла из метиловых эфиров жирных 2-оксикислот. Аналогичный состав имела нейтральная липофильная фракция метанолизата цереброзида (III), тогда как жирные основания в этом случае были представлены фитосфингозинами. По данным ГЖХ-масс-спектрометрии, среди незамещенных жирных кислот цереброзида (I) доминировали соединения $C_{22:0}$, $C_{23:0}$, $C_{24:0}$.

Схема I*



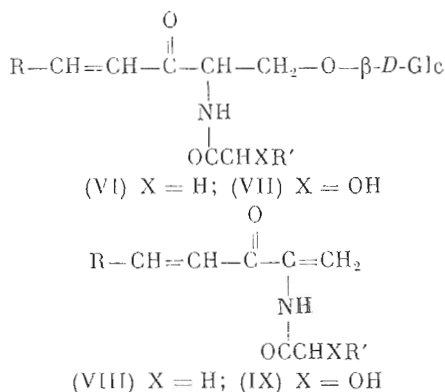
* Изображены основные направления распада молекулярных ионов триметилсилиловых производных (IVa) и (Va); максимальную интенсивность в масс-спектрах этих веществ имеют ионы с m/z 297 и 285 соответственно.

и $C_{24:1}$, в качестве минорных компонентов присутствовали кислоты $C_{21:0}$ и $C_{25:0}$. Среди жирных 2-оксикислот, входящих в структуры цереброзидов (II) и (III), преобладали гомологи $C_{22:0}$, $C_{22:1}$, $C_{23:1}$ и $C_{24:1}$ (минорный компонент — кислота $C_{23:1}$). Все кислоты имеют нормальную углеводородную цепь.

При ТСХ на аргентированном силикагеле метиловые эфиры как незамещенных жирных кислот, так и 2-оксикислот мигрировали в виде двух зон, принадлежащих к насыщенным (более подвижные зоны) и моноеновым (менее подвижные) соединениям. Моноеновые метиловые эфиры обоих типов не отличались по подвижности от соответствующих метиловых эфиров, полученных из цереброзидов мозга быка и имеющих *цис*-конфигурацию двойной связи [13]. Поэтому можно полагать, что моноеновые жирноацильные остатки, входящие в структуры цереброзидов, (I—III), также имеют *цис*-конфигурацию. Конфигурацию асимметрического атома $C_{(2)}$ в 2-оксикислотах определяли при помощи ТСХ соответствующих фенилэтиламидов [14]; все эти кислоты оказались *D*-энантиомерами.

Сфинголипные основания цереброзидных фракций (I) и (II) превращали в *N*-2,4-динитрофенильные производные (IV) (см. схему 1), аналогичные производные (V) были получены из жирных оснований гликолипида (III). Те и другие анализировали методом масс-спектрометрии в виде триметилсилиловых эфиров (IVa) и (Va) (ср. [7]). Масс-спектры эфиров (IVa), полученных из цереброзидов (I) и (II), оказались практически идентичными; в обоих спектрах наибольшие массовые числа имеют ионы $[M - Me]^+$ (m/z 580, 592, 594, 608), которые отвечают производным жирных диоксисоединений $C_{17:1}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ и $C_{19:1}$. Сделанное отнесение находится в соответствии с наличием в спектрах четырех ионов типа (1) с m/z 297 (относительная интенсивность 100%), 309 (72%), 311 (21%) и 325 (8%) (см. схему 1), в которых, судя по перечисленным массовым числам, $R = C_{12}H_{25}$, $C_{13}H_{25}$, $C_{13}H_{27}$ и $C_{14}H_{29}$. В масс-спектре триметилсилиловых эфиров (Va) наблюдается только один пик иона $[M - Me]^+$ — при m/z 670, который соответствует производному триоксисоединения $C_{17:0}$ (Va, $R = C_{13}H_{27}$). Относительная интенсивность осколочных ионов (2), (3) и [(3) — Me_3SiOH] с m/z 285, 387 и 297, образующихся при распаде этого молекулярного иона, составляет 100, 27 и 82%, тогда как интенсивность гомологичных ионов типа (2) и [(3) — Me_3SiOH] с m/z 299 и 311, отвечающих триоксисоединению $C_{18:0}$, не превышает 5%. Таким образом, молекулы компонентов цереброзидной фракции (III) содержат практически одно и то же жирное триоксисоединение $C_{17:0}$.

При окислении цереброзидов (I) и (II) 2,3-дихлор-5,6-дидианбензохиноном с количественным выходом образовывались 3-кетocereброзиды (VI) и (VII), откуда следует, что двойная связь в моноеновых жирных основаниях и одна из двойных связей в диеновом находится при $C_{(4)}$ аллифатической цепи [15]. Строение 3-кетопроизводных подтверждается легким элиминированием молекулы глюкозы при их обработке разбавленным раствором карбоната натрия в метаноле [16]. Продукты деглюкозилрования (VIII) и (IX) обнаруживали в УФ-спектре характерный максимум поглощения при 230 нм [16].



N-2,4-Динитрофенилпроизводные (IV), полученные из цереброзидов (I) и (II), были разделены в виде ди-О-ацетатов (IVб) на фракции моноеновых и диеновых соединений при помощи хроматографии на аргентированном силикагеле. Те и другие фракции подвергали периодат-перманганатному окислению. При окислении моноеновых фракций образовались смеси жирных кислот, которые, по данным ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии, состояли из кислот *антеизо*-C_{13:0}, *изо*-C_{14:0} и *антеизо*-C_{15:0} в одинаковом мольном соотношении 81:16:3. Нормальные жирные кислоты (C_{13:0} и C_{14:0}) обнаружены лишь в виде следов. Среди продуктов деградации диеновых фракций присутствовала только одна жирная кислота — изогептановая. Кроме того, была найдена единственная дикарбоновая кислота — пимелиновая. Отсюда следует, что вторая двойная связь в цепи диенового диоксисоединения находится в положении 11. Таким образом, в состав молекул цереброзидов (I) и (II) входят следующие жирные основания: 16-метил-Δ^{4,11}-гептадекасфинганин, 14-метил-Δ⁴-гексадекасфинганин, 16-метил-Δ⁴-гептадекасфинганин и 16-метил-Δ⁴-сфинганин. Их относительное содержание, найденное по количественному соотношению жирных кислот, образующихся при окислении суммы производных (IVб), составляет соответственно 52, 39, 8 и 1 мол.%. Сфингозиновые основания с нормальной углеводородной цепью присутствуют в виде следов. Смесь жирных кислот, полученная в результате периодат-перманганатного окисления динитрофенилпроизводного (V), более чем на 95% состояла из 11-метилтридекановой кислоты; следовательно, в состав компонентов цереброзидной фракции (III) входит 4-окси-14-метилгексадекасфинганин.

С целью окончательного доказательства строения цереброзидов (I) — (III) был осуществлен масс-спектрометрический анализ соответствующих пер-О-ацетильных производных (Ia), (IIa) и (IIIa), а также пер-О-тридейтероацетатов (*d*₁₅-Ia) и (*d*₁₈-IIa). Поведение пер-О-ацетатов цереброзидов под электронным ударом ранее изучалось [17]; интерпретация полученных нами масс-спектров ацетильных производных основывается на данных этой работы и на описанных выше результатах предварительного изучения строения гликолипидов (I) — (III).

В масс-спектрах всех трех ацетатов (Ia), (IIa) и (IIIa) (табл. 1 и 2) в области $m/z > 100$ вторым по интенсивности является пик при m/z 331, принадлежащий иону (4), который образуется при разрыве гликозидной связи из полностью ацетилированного глюкозидного остатка (схема 2). В спектрах присутствуют пики фрагментов с m/z 289, 271, 229, 211, 169, 127 и 109, возникающих при дальнейшем распаде иона (4) [18]. Происхождение иона (4) и перечисленных фрагментов подтверждается соответствующими сдвигами их пиков в масс-спектрах дейтероаналогов (*d*₁₅-Ia) и (*d*₁₈-IIa). О пиранозной форме углеводного остатка свидетельствует отсутствие в спектрах ионов $\text{AcOCH}_2\text{CH}=\text{O}^+\text{Ac}$ (m/z 145 \rightarrow m/z 103, характерных для пер-О-ацетилгексафуранозидов [18]; наблюдаемые же в обсуждаемых спектрах пики при m/z 145 и 103 принадлежат ионам Ac_2O^+ и $\text{Ac}_2\text{O}^+\text{H}$, поскольку в случае пер-О-тридейтероацетатов эти пики смещены соответственно на 9 и 6 единиц массы.

В рассмотренной области углеводных ионов масс-спектров ацетатов (Ia) и (IIa) находятся также пики фрагментов (5), образующихся из остатков сфингозиновых оснований C_{17:1}, C_{18:1}, C_{18:2} и C_{19:1}, содержащихся в молекулах цереброзидов (I) и (II). В области более высоких значений m/z располагается ряд серий пиков гомологичных ионов, в структуру которых входит остаток жирной кислоты и часть остатка жирного основания. К такого рода ионам относятся фрагменты (6—11). Пики ионов типа (9) и (11) в спектрах ацетатов (Ia) и (IIa) соответственно имеют весьма низкую интенсивность и в табл. 1 не приводятся. Массовые числа ионов (6), (7), (8) и (10) в спектре дейтероацетатов (*d*₁₈-IIa) возрастают на 3, а у ионов (9) — на 6 единиц массы по сравнению со спектром ацетильного производного (IIa), однако они не изменяются при переходе от ацетильного производного (Ia) к его дейтероаналогу (*d*₁₅-Ia). Последнее относится и к фрагментам серии (12); эти фрагменты помимо указанных структур-

Основные пики в масс-спектрах пер-О-ацетатов церреброзидов (Ia) и (IIa) и их дейтероаналогов (d_{15} -Ia) и (d_{18} -IIa)

Тип иона	Пер-О-ацетат (Ia)		m/z в спектре дейтеро-аналога (d_{15} -Ia)	Пер-О-ацетат (IIa)		m/z в спектре дейтеро-аналога (d_{18} -IIa)		
	m/z	$I_{\text{отн}}, \%^*$		m/z	$I_{\text{отн}}, \%^*$			
M^+ , $R+R'=C_{35}H_{70}$	$C_{35}H_{68}$	1019	0,3	1034	1077	0,35	1095	
	$C_{35}H_{68}$	1017	0,15	1032	1075	0,7	1093	
	$C_{34}H_{70}$	1007	0,3	1022				
	$C_{34}H_{68}$	1005	0,2	1020	1063	0,5	1081	
	$C_{34}H_{66}$				1061	0,35	1079	
	$C_{33}H_{68}$	993	0,3	1008				
	$C_{33}H_{66}$	991	0,1	1006	1049	0,5	1067	
	$C_{33}H_{64}$				1047	0,2	1065	
	$C_{32}H_{66}$	979	0,1	994	1037	0,2	1053	
	$C_{32}H_{64}$				1035	0,15	1053	
	$M - \text{AcOH}$	$R+R'=C_{35}H_{70}$	959	3,1	971	1017	2,7	1032
		$C_{35}H_{68}$	957	1,3	969	1015	4,4	1030
		$C_{34}H_{70}$	947	3,9	959			
$C_{34}H_{68}$		945	1,8	957	1003	5,9	1018	
$C_{34}H_{66}$					1001	2,2	1016	
$C_{33}H_{68}$		933	1,0	945				
$C_{33}H_{66}$		931	2,9	943	989	3,8	1004	
$C_{33}H_{64}$					987	1,4	1002	
$C_{32}H_{66}$		919	1,2	931	977	2,1	992	
$C_{32}H_{64}$					975	1,6	990	
(13) $R'=C_{22}H_{45}$		$C_{22}H_{43}$	740	1,8	752			
		$C_{22}H_{43}$	738	0,5	750	796	14,9	811
		$C_{21}H_{43}$	726	1,2	738			
	$C_{21}H_{41}$				782	6,2	797	
	$C_{20}H_{41}$	712	0,6	724	770	2,6	785	
	$C_{20}H_{39}$				768	3,3	783	
(9) $R+R'=C_{35}H_{70}$	$C_{35}H_{68}$				730	1,2	736	
	$C_{35}H_{68}$				728	2,2	734	
	$C_{34}H_{68}$				716	3,0	722	
	$C_{34}H_{66}$				714	2,2	720	
	$C_{33}H_{66}$				702	2,8	708	
	$C_{33}H_{64}$				700	1,0	706	
	$C_{32}H_{66}$				690	2,4	696	
	$C_{32}H_{64}$				688	1,3	684	
	(15) $R=C_{14}H_{29}$	$C_{13}H_{27}$				725	0,6	740
$C_{13}H_{25}$					711	1,0	726	
$C_{13}H_{25}$					709	1,0	724	
$C_{12}H_{25}$					697	3,6	712	
(10) $R+R'=C_{35}H_{70}$		$C_{35}H_{68}$	612	1,8	612	670	1,6	673
	$C_{35}H_{68}$	610	1,9	610	668	2,2	671	
	$C_{34}H_{70}$	600	1,9	600				
	$C_{34}H_{68}$	598	2,9	598	656	3,8	659	
	$C_{34}H_{66}$				654	2,2	657	
	$C_{33}H_{68}$	586	1,8	586				
	$C_{33}H_{66}$	584	3,2	584	642	2,8	645	
	$C_{33}H_{64}$				640	1,5	643	
	$C_{32}H_{66}$	572	2,2	572	630	2,2	633	
	$C_{32}H_{66}$				628	1,6	631	
(11) $R+R'=C_{35}H_{70}$	$C_{35}H_{68}$	597	3,3	597				
	$C_{35}H_{68}$	595	1,2	595				
	$C_{34}H_{70}$	585	2,3	585				
	$C_{34}H_{68}$	583	2,4	583				
	$C_{33}H_{68}$	571	2,5	571				
	$C_{33}H_{66}$	569	1,0	569				
	$C_{32}H_{66}$	557	0,6	557				
(12) $R'=C_{22}H_{45}$	$C_{22}H_{43}$	444	1,6	444				
	$C_{22}H_{43}$	442	2,5	442				
	$C_{21}H_{43}$	430	2,1	430				
	$C_{21}H_{41}$	416	3,7	416				
	(8) $R'=C_{22}H_{45}$	$C_{22}H_{43}$	392	2,2	392			
$C_{22}H_{43}$		390	11,2	390	448	2,2	451	
$C_{21}H_{43}$		378	3,1	378				
$C_{21}H_{41}$					434	1,9	437	
$C_{20}H_{41}$		364	7,0	364	422	2,2	425	

Таблица 1 (продолжение)

Тип иона	Пер-О-ацетат (Ia)		m/z в спектре дейтеро-аналога (d_{15} -Ia)	Пер-О-ацетат (IIa)		m/z в спектре дейтеро-аналога (d_{15} -IIa)
	m/z	$I_{\text{отн.}} \%$ *		m/z	$I_{\text{отн.}} \%$ *	
(16)	$C_{20}H_{39}$			420	1,7	423
				433	4,6	448
(14)	$R' = C_{22}H_{45}$	390	11,2	402		402
(6)		376	5,2	376	390	30,4
	$C_{23}H_{43}$	374	3,2	374	432	1,9
	$C_{21}H_{43}$	362	3,6	362		435
	$C_{21}H_{41}$				418	1,1
	$C_{20}H_{41}$	348	5,9	348	406	1,6
	$C_{20}H_{39}$				404	1,0
(7)	$R' = C_{22}H_{45}$	362	3,6	362		421
	$C_{22}H_{43}$	360	4,9	360	418	1,1
	$C_{21}H_{43}$	348	5,9	348		421
	$C_{21}H_{41}$				404	1,0
	$C_{20}H_{41}$	334	5,9	334	392	2,2
	$C_{20}H_{39}$				390	30,4
(17)	$R' = C_{22}H_{43}$				379	11,5
	$C_{21}H_{41}$				365	6,2
	$C_{20}H_{41}$				353	3,0
	$C_{20}H_{39}$				351	3,7
(5)	$R = C_{14}H_{29}$	278	5,6	278	278	4,6
	$C_{13}H_{27}$	264	7,5	264	264	8,1
	$C_{13}H_{25}$	262	10,7	262	262	11,5
	$C_{12}H_{25}$	250	19,8	250	250	15,5
(4)		331	47,6	343	331	63,8
**		289	3,4	299	289	4,9
		271	6,4	280	271	30,4
		229	6,2	236	229	10,1
		211	5,9	217	211	14,1
		169	100,0	172	169	100,0
		127	20,3	128, 129	127	23,0
		109	55,6	109, 110	109	50,0

* В табл. 1, 2 и 4 указывается суммарная интенсивность пика при данном значении m/z , независимо от числа ионов, которому отвечает этот пик.

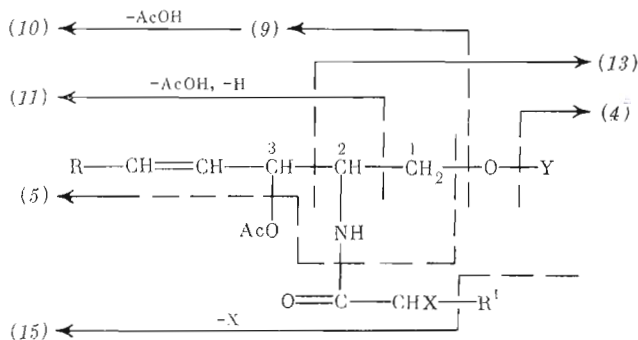
** В табл. 1 и 2 ион с m/z 289 и ионы, указанные ниже, представляют собой продукты распада иона (4) с m/z 331 [18].

Таблица 2

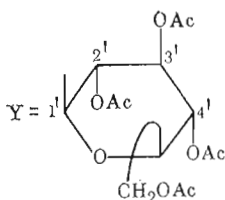
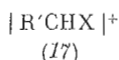
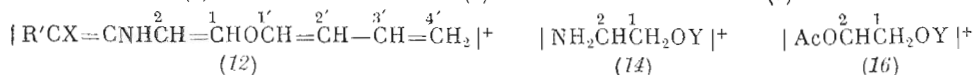
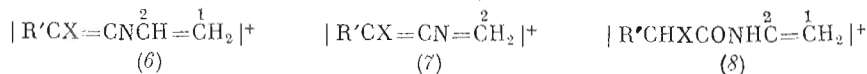
Основные пики в масс-спектре пер-О-ацетата (IIIa)

Тип иона	m/z	$I_{\text{отн.}} \%$	Тип иона	m/z	$I_{\text{отн.}} \%$		
M^+ , $R' = C_{22}H_{43}$	1123	0,8	(24) $R' = C_{22}H_{43}$	776	3,2		
	$C_{21}H_{43}$	1111		0,4	$C_{21}H_{43}$	764	2,0
	$C_{21}H_{41}$	1109		0,6	$C_{21}H_{41}$	762	1,0
	$C_{20}H_{41}$	1097		0,5	$C_{20}H_{41}$	750	3,8
	$C_{20}H_{39}$	1095		0,3	$C_{20}H_{39}$	748	1,5
$M - \text{AcOH}$	$R' = C_{22}H_{43}$	1063	0,9	(25) $R' = C_{22}H_{43}$	762	1,0	
	$C_{21}H_{43}$	1051	0,3		$C_{21}H_{43}$	750	3,8
	$C_{21}H_{41}$	1049	0,7		$C_{21}H_{41}$	748	1,5
	$C_{20}H_{41}$	1037	0,3		$C_{20}H_{41}$	736	1,4
	$C_{20}H_{39}$	1035	0,4		$C_{20}H_{39}$	734	0,8
(23)	817	2,1	(14)	390	6,3		
(13) $R' = C_{22}H_{43}$	796	1,6	(26)	368	23,5		
	$C_{21}H_{43}$	784	0,3	(27)	327	3,2	
	$C_{21}H_{41}$	782	0,7	(28)	255	4,3	
	$C_{20}H_{41}$	770	0,6	(4)	331	97,4	
	$C_{20}H_{39}$	768	0,5		289	3,5	
					271	18,3	
				229	5,2		
				211	8,0		
				169	100,0		
				127	11,7		
				109	34,8		

Схема 2



(Ia) X = H; (IIa) X = OAc

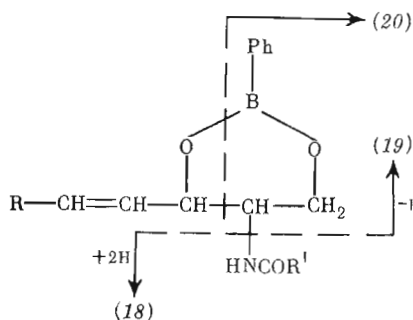


ных элементов молекулы цереброзида содержат углеродные атомы остатка глюкозы; в спектре ацетата (IIa) пики ионов (12) малоинтенсивны. К ионам (13), включающим остатки жирных кислот, тетра-О-ацетилглюкозы и атомы C₍₁₎ и C₍₂₎ жирного основания, приводит разрыв связи C₍₂₎—C₍₃₎ сфингозинового остатка молекулярного иона. В спектрах дейтероацетатов (*d*₁₅-Ia) и (*d*₁₈-IIa) пики этих ионов смещены в область больших массовых чисел соответственно на 12 и 15 единиц, что отвечает предполагаемой структуре ионов. В работе [17] указывается, что в результате рассмотренной реакции распада возникают главным образом ионы типа [(13) — 2H], однако в изученных нами спектрах пики аналогичных ионов оказались в 5—10 раз менее интенсивными по сравнению с пиками соответствующих ионов (13). Возможно, это обстоятельство связано с условиями регистрации масс-спектров. Массовые числа фрагментов (6—13) полностью отвечают строению жирнокислотных остатков, входящих в состав молекул цереброзидов (I) и (II).

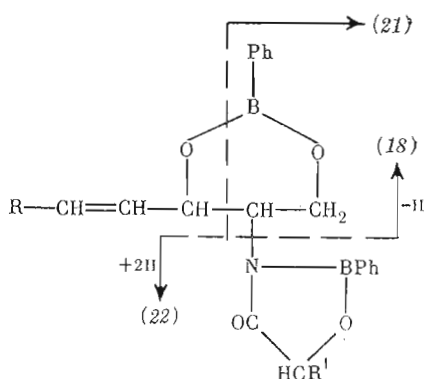
К числу наиболее интенсивных пиков в спектрах ацетатов (Ia) и (IIa) относится пик иона (14); последний может возникать, в частности, вследствие потери фрагментами (13) молекулы жирного кетена. Наличие оксигенной группы в жирнокислотном остатке гексаацетата (IIa) вызывает появление в его масс-спектре ионов (15—17), не наблюдаемых в спектре пентаацетата (Ia).

Пики молекулярных ионов в масс-спектрах производных (Ia) и (IIa) малоинтенсивны. В спектрах дейтероаналогов (*d*₁₅-Ia) и (*d*₁₈-IIa) они смещены соответственно на 15 и 18 единиц массы. Отсюда следует, во-первых, что в состав молекул компонентов цереброзидных фракций (I) и (II) входит только один остаток глюкозы, все спиртовые гидроксильные группы которого свободны, и, во-вторых, что гидроксильные группы при C₍₃₎ сфингозиновых оснований в обоих цереброзидах, равно как и НО-группа ацильного остатка в цереброзидах (II), также незамещены. Наибольшую интенсивность в области высоких значений *m/z* имеют ионы [M—AcOH]⁺;

Схема 3



(X) R = C₁₂H₂₅, C₁₃H₂₇, C₁₄H₂₉
 R' = C₂₁H₄₃, C₂₃H₄₅, C₂₅H₄₇



(XI) R = C₁₂H₂₅, C₁₃H₂₇, C₁₄H₂₉
 R' = C₀H₃₉, C₁₀H₄₁, C₂₁H₄₃, C₂₂H₄₅

их массовые числа в совокупности с данными о составе жирных кислот и оснований цереброзидных фракций (I) и (II) дают возможность судить о молекулярно-видовом составе этих фракций. Строение основных молекулярных видов приведено в табл. 3.

Сведения, представленные в табл. 3, а также строение липофильных фрагментов молекул цереброзидов (I) и (II) подтверждаются результатами масс-спектрометрического анализа бензолборонатов церамидов (X) и (XI), полученных из названных гликолипидов. Церамиды, полученные из фракции (I) и содержащие остаток незамещенной жирной кислоты, при действии трифенилборосола дают производные (X) с одним остатком бензолбороновой кислоты. В аналогичных условиях церамиды, представляющие собой продукты деглюкозилирования цереброзида (II) и несущие оксиацильный остаток, превращаются в бисбензолборонаты (XI) (ср. [19]). Основные пути распада молекулярных ионов бензолборонатов (X) и (XI) не отличались от путей, характерных для молекулярных ионов

Таблица 3

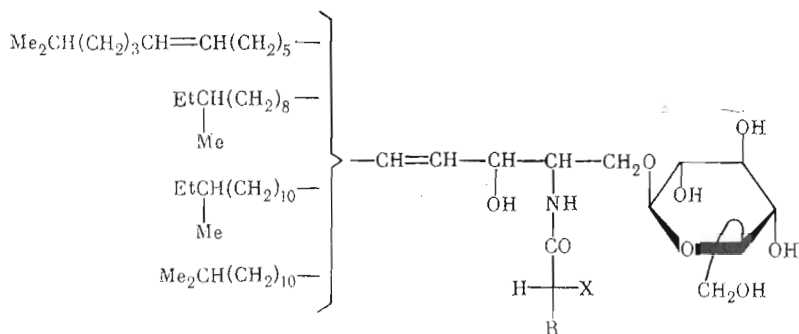
Основные молекулярные виды цереброзидных фракций (I) и (II) по данным масс-спектров пер-О-ацетатов (Ia) и (IIa) и бензолборонатов (X) и (XI)

<i>m/z</i> диагностических ионов		Структура молекулярных видов (жирное основание — жирная кислота)
<i>M</i> — AcOH *	<i>M</i> + **	
Цереброзид (I)		
919	693	17:1 — 22:0
931	705	18:2 — 22:0
933	707	17:1 — 23:0, 18:1 — 22:0
945	719	17:1 — 24:1, 18:2 — 23:0
947	721	17:1 — 24:0, 18:1 — 23:0, 19:1 — 22:0
957	731	18:2 — 24:1
959	733	18:2 — 24:0, 18:1 — 24:1
Цереброзид (II)		
975	793	17:1 — 22:1
977	795	17:1 — 22:0
987	805	18:2 — 22:1
989	807	17:1 — 23:1, 18:2 — 22:0
1001	819	18:2 — 23:1
1003	821	17:1 — 24:1, 18:1 — 23:1, 19:1 — 22:1
1015	833	18:2 — 24:1
1017	835	18:1 — 24:1, 19:1 — 23:1

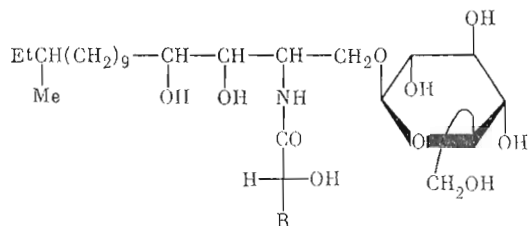
* По масс-спектрам пер-О-ацетатов (Ia) и (IIa).

** По масс-спектрам бензолборонатов церамидов (X) и (XI).

Схема 3а



- (I) X = H; R = *n*-C₂₀H₄₁, *n*-C₂₁H₄₃, *n*-C₂₂H₄₅, *n*-C₂₂H₄₃
 (II) X = OH; R = *n*-C₂₀H₃₉, *n*-C₂₀H₄₁, *n*-C₂₁H₄₃, *n*-C₂₂H₄₅



- (III) R = *n*-C₂₀H₃₉, *n*-C₂₀H₄₁, *n*-C₂₁H₄₃, *n*-C₂₂H₄₅

метанборонатов церамидов [19, 20]. Диагностически важные ионы, наблюдаемые в масс-спектрах производных (X) и (XI), указаны на схеме 3 и в табл. 4. Пики молекулярных ионов в обоих масс-спектрах довольно интенсивны, они позволяют сделать выводы о составе жирных кислот и оснований у основных компонентов церамидных, а следовательно, и цереброзидных фракций (см. табл. 3).

Таблица 4

Основные пики в масс-спектрах бензолборонатов церамидов (X) и (XI)

Бензолборонат (X)			Бензолборонат (XI)		
Тип иона	<i>m/z</i>	<i>I</i> _{отн.} %*	Тип иона	<i>m/z</i>	<i>I</i> _{отн.} %*
<i>M</i> ⁺ **	733	1,4	<i>M</i> ⁺ **	835	6,0
	731	2,0		833	12,7
	721	1,0		821	15,5
	719	3,8		819	6,4
	707	1,6		807	10,1
	705	3,3		805	4,8
	693	2,4		795	4,4
				793	3,2
(18)	497	1,7	(21)	597	29,6
	495	3,5		583	13,2
	483	1,6		571	27,1
(19)	469	4,2	(19)	569	9,4
	382	2,2		382	15,5
	368	5,3		368	31,5
	366	8,2		366	25,8
(20)	354	15,8	(22)	354	82,5
	368	5,3		466	29,4
	366	8,2		454	27,7
	354	15,8		442	51,0
	340	13,0		440	19,5

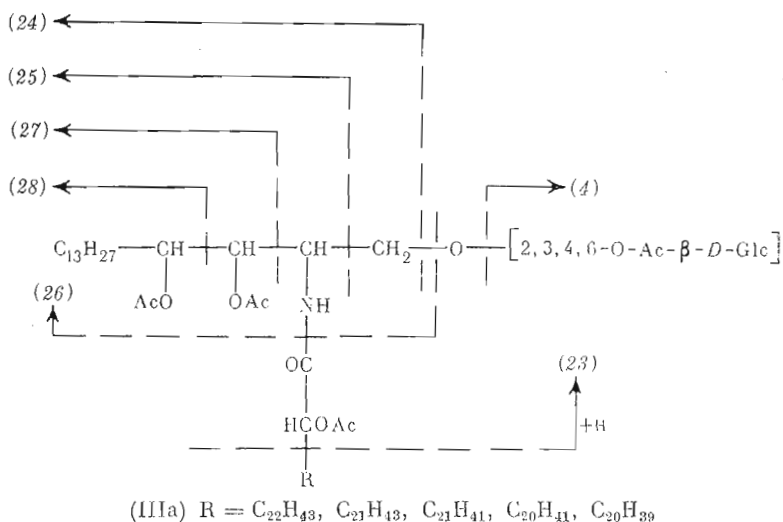
* Интенсивность 100% соответствует пику иона $\text{PhBOCH}_2\text{CH}=\text{N}+\text{H}$ с *m/z* 146.

** Структуру молекулярных ионов см. в табл. 3.

Как уже говорилось, гликолипиды (I) и (II) представляют собой глюкопиранозиды церамидов. Аномерную структуру остатка глюкозы определяли путем окисления пер-О-ацетильных производных (Ia) и (IIa) хромовым ангидридом в уксусной кислоте [21]. В обоих случаях окисление остатка тетра-О-ацетилглюкозы происходило более чем на 90%, что однозначно свидетельствует о β -конфигурации остатка глюкопиранозы в цереброзидах (I) и (II). Сопоставление этого факта с результатами измерения удельного оптического вращения гликолипидов (см. «Экспериментальную часть») позволяет отнести глюкозный остаток к *D*-ряду. Таким образом, цереброзидам (I) и (II) следует приписать изображенные на схеме 3а структуры.

Все сказанное выше о конфигурации углеводного остатка в цереброзидах (I) и (II), оказалось справедливым и для цереброзида (III). Интерпретация масс-спектра пер-О-ацетата (IIIa) этой фракции облегчается тем, что в состав ее молекул входит практически только одно жирное основание — 4-окси-14-метилгексадекасафинганин (см. выше). В масс-спектре (табл. 2) присутствуют пять пиков молекулярных ионов и столько же пиков ионов $[M - \text{AcOH}]^+$, соответствующих пяти молекулярным видам гликолипидной фракции, различающимся природой жирнокислотных остатков. Большинство осколочных ионов, содержащих ацильный остаток и аналогичных тем ионам, которые наблюдаются при фрагментации молекулярного иона пер-О-ацетильного производного (IIa), имеют чрезвычайно низкую интенсивность; исключение составляют фрагменты (13) и (14). Пути образования главных фрагментов распада молекулярного иона ацетата (IIIa) представлены на схеме 4. Исходя из полученных результатов структурного анализа третьему выделенному нами цереброзиду приписана изображенная выше структура (III).

Схема 4



В суммарных липидах кожно-мышечного мешка *S. japonica* цереброзиды — один из основных липидных классов, необычно высокий уровень их в тканях сравним лишь с содержанием подобных гликолипидов в головном мозге млекопитающих. Присутствие цереброзидов в липидном экстракте *S. japonica* было установлено ранее при помощи ТСХ [22], но их строение не изучалось. Данные настоящей работы позволяют сформулировать характерные особенности цереброзидной фракции *S. japonica*: углеводная часть молекул гликолипидов — остаток β -*D*-глюкопиранозы; практически все жирные основания имеют разветвленную углеводородную цепь *изо*- и *антеизо*-строения, среди них доминируют 16-метил- $\Delta^{4,11}$ -гексадекасафингандиенин (более 50% от суммы жирных оснований), 14-метил- Δ^4 -гексадекасафингенин (около 40%) и 16-метил- Δ^4 -гексадекасафингенин, в качестве

минорных компонентов содержатся 16-метил- Δ^4 -сфингенин и 4-окси-14-метилгексадекасфинганин; среди негидроксилированных жирных кислот преобладают соединения $C_{24}:0$, $C_{24}:1$, $C_{23}:0$ и $C_{22}:0$, а среди жирных 2-*D*-оксикислот — $C_{24}:1$, $C_{23}:1$, $C_{22}:1$ и $C_{22}:0$, все кислоты имеют нормальное строение; в молекулы основных гликолипидов суммарной цереброзидной фракции входят диоксиоснования и жирные 2-*D*-оксикислоты.

Изученные гликолипиды отличаются от цереброзидов дальневосточного трепанга *Stichopus japonicus* [6] — представителя того же класса Nolothurioidea, к которому относится *S. japonica*. Главное различие состоит в том, что для сфингозиновых оснований цереброзидов трепанга характерны нормальные углеводородные цепи с одной двойной связью, состоящие из 17 и 18 C-атомов. Жирные основания с разветвленной цепью найдены только в фитосфингозиновой фракции, которая, как и в случае *S. japonica*, составляет лишь незначительную долю суммарных жирных оснований. Следует отметить существенные различия между цереброзидами названных видов и аналогичными гликолипидами другого класса морских иглокожих — морских звезд (Asteroidea). Хотя цереброзиды тех и других животных сходны по структуре гликозидного фрагмента молекул, в гликолипидах морских звезд среди жирных оснований преобладают фитосфингозины (иногда они являются единственным типом оснований), а значительная часть жирных кислот имеет углеродную цепь из 16–18 C-атомов [5, 8, 23].

Экспериментальная часть

Голотурии *S. japonica* собирали в октябре 1979 г. в заливе Петра Великого Японского моря. Внутренние органы животных удаляли, кожно-мышечную часть измельчали и лиофильно высушивали.

Для хроматографии на колонках применяли силикагель Л (Lachema, ЧССР) с размером частиц 100–160 мкм, который предварительно промывали 10 объемами смеси $CHCl_3$ –MeOH (2:1), затем 5 объемами MeOH, сушили 24 ч при 20–50°С и 8 ч при 105–110°С. ТСХ проводили на пластинках (9×6 см) с силикагелем КСК, приготовленных по методике [24]. Вещества на хроматограммах обнаруживали специфическими реагентами, указанными выше, и общими реагентами — парами иода, фосфорномолибденовой кислотой и 50% серной кислотой с обугливанием.

Метаполизу индивидуальных цереброзидов (10–15 мг) осуществляли кипячением их с 2 н. водно-метанольной HCl [25]; образовавшиеся метиловые эфиры жирных кислот, сфингозиновые основания (и продукты их трансформации) и метилглюкозиды разделяли [25].

ГЖХ проводили на хроматографе Perkin-Elmer 910 с использованием стандартов. Для анализа метиловых эфиров кислот применяли колошку (2000×2 мм) с 10% Silar 10 с на хроматоне N-AW (75–90 меш) в изотермическом режиме: 120°С для эфиров дикарбоновых кислот, 210°С для эфиров жирных кислот C_{10} – C_{18} , 250°С для эфиров высших жирных кислот. Метилглюкозиды хроматографировали в виде триметилсилиловых производных на колонке (2000×2 мм) с 3% SE-30 на хроматоне W-HP (80–100 меш) при температурном режиме: 120→280°С (6°С/мин). Во всех случаях расход гелия 30 мл/мин. Метиловые эфиры жирных кислот анализировали также методом ГЖХ-масс-спектрометрии на хроматомасс-спектрометре LKB 9000 (Швеция); колошка размером 1800×3 мм с 5% SE-30 на хроматоне N-AW (75–90 меш) при температурном режиме: 180→300°С (5°С/мин), расход гелия 20 мл/мин.

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Specord UV-VIS (Zeiss, ГДР), ИК-спектры — на спектрографе Perkin-Elmer 180 в пленках веществ; оптическое вращение измеряли на спектрополяриметре той же фирмы (модель 141) в смеси $CHCl_3$ –MeOH (2:1). Масс-спектры производных липидов получали на вышеназванном масс-спектрометре при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и ускоряющем напряжении 3,5 кВ.

Растворители отгоняли на роторном испарителе при 30°С/15–20 мм рт.ст., затем высушивали при 30–35°С/0,02 мм рт.ст.

Извлечение суммы липидов из кожно-мышечного мешка C. jarovica. Липофилизированную биомассу (50 г) перемешивали 2 ч при 20–25° С с 500 мл смеси CHCl_3 –MeOH (2 : 1), после чего фильтровали, осадок промывали на фильтре 70 мл той же смеси растворителей. Осадок экстрагировали еще дважды в вышеописанных условиях. Объединенный фильтрат упаривали, остаток растворяли в 100 мл указанной смеси растворителей, раствор промывали по Фолчу, упаривали, получали 3,2 г суммы липидов.

Выделение фракций цереброзидов (I)–(III). К раствору 3,2 г суммы липидов в 30 мл смеси CHCl_3 –MeOH (1 : 1) добавляли при перемешивании при 5–10° С 15 мл 0,5 М раствора КОН в MeOH. Смесь встряхивали 40 мин при 20–25° С, разбавляли 15 мл CHCl_3 , оставляли на 1 ч, подкисляли ледяной АсОН до pH 4 и упаривали. Остаток растворяли в 75 мл смеси CHCl_3 –MeOH (2 : 1), раствор промывали 15 мл воды и упаривали. Остаток растворяли в 30 мл смеси CHCl_3 –MeOH (10 : 1), наносили на колонку (25×3,5 см), заполненную DEAE-целлюлозой (АсО–форма) в той же смеси растворителей. Колонку промывали 800 мл этой же смеси, элюат упаривали. Остаток растворяли в 30 мл CHCl_3 , раствор наносили на колонку (35×3 см), заполненную силикагелем в CHCl_3 . Колонку промывали 1,5 л CHCl_3 , после чего вымывание продолжали смесями CHCl_3 –MeOH, 50 : 1, 30 : 1, 20 : 1 (по 500 мл), 10 : 1 (800 мл), 9 : 1 (600 мл). Элюат собирали фракциями объемом 20 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в системе CHCl_3 – MeOH – вода (80 : 15 : 1; система А). Ряд фракций, элюированных первыми порциями смеси CHCl_3 – MeOH (10 : 1), содержал хроматографически гомогенный цереброзид (I), выход 66 мг. В последующих фракциях, элюированных той же системой растворителей, присутствовала смесь цереброзидов (I) и (II) (212 мг), а затем гомогенный цереброзид (II), который находился также и в начальных фракциях, полученных при вымывании смесью CHCl_3 – MeOH (9 : 1); получали 283 мг индивидуального цереброзида (II). Далее элюировали 11,5 мг смеси цереброзидов (II) и (III).

Вышеуказанную смесь цереброзидов (I) и (II) растворяли в 3 мл CHCl_3 и наносили на колонку (20×2 см), заполненную силикагелем в CHCl_3 ; элюировали 200 мл смеси CHCl_3 – MeOH (20 : 1), затем смесями тех же растворителей в соотношениях 10 : 1 и 9 : 1 (по 300 мл). Элюат (фракции 10 мл) анализировали описанным способом. Получали 50,5 мг индивидуального цереброзида (I) и 148 мг цереброзида (II). Общий выход цереброзида (I) 116,5 мг; R_f 0,5 (в системе А), 0,65 (CHCl_3 – MeOH – вода, 80 : 20 : 2; система В), 0,45 (CHCl_3 – MeOH – конц. NH_4OH , 85 : 15 : 1,5; система В); $[\alpha]_D^{21} -12,5^\circ$ (с 0,5). Общий выход цереброзида (II) 431 мг; R_f 0,45 (система А), 0,55 (В), 0,35 (В); $[\alpha]_D^{21} -8,5^\circ$ (с 0,6).

Смесь цереброзидов (II) и (III) хроматографировали на колонке (15×4,5 см), заполненной силикагелем в CHCl_3 . Элюировали 300 мл смеси CHCl_3 – MeOH (10 : 1), элюат (фракции 5 мл) анализировали при помощи ТСХ в системе Б. Из фракций, содержащих хроматографически гомогенный цереброзид (III), получили 2,5 мг этого липида; R_f 0,5 (в системе В), 0,3 (В).

Ацетильные производные (Ia), (IIa) и (IIIa). Раствор 1–5 мг цереброзида (I), (II) или (III) в 0,2 мл безводного пиридина обрабатывали 0,2 мл Ac_2O (24 ч при 20–25° С), смесь упаривали. Остаток растворяли в 0,5 мл бензола, наносили на колонку (10×1 см), заполненную силикагелем в бензоле. Колонку промывали 25 мл бензола, 25 мл смеси бензол – этилацетат (4 : 1), после чего 25 мл смеси тех же растворителей в соотношении 2 : 1. вымывали пер-О-ацетат (Ia), (IIa) или (IIIa); R_f 0,45; 0,5; 0,5 соответственно в системе бензол – этилацетат (3 : 2). Аналогично получали пер-О-тридекаоацетаты (d_{15} -Ia) и (d_{18} -IIa).

Окисление цереброзидов (I) и (II). Цереброзид (I) окисляли 3% раствором 2,3-дихлор-5,6-дицианбензохинона-1,4 в безводном диоксане при 38–40° С, как это описано в сообщении [15]. Продукт реакции растворяли в 1 мл CHCl_3 и раствор наносили на колонку (15×1,8 см), заполненную силикагелем в CHCl_3 . Колонку промывали 50 мл CHCl_3 , затем смесями

$\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$, 20 : 1 (50 мл) и 10 : 1 (100 мл). Последней смесью растворителей вымывали 3-кетопроизводное (VI); R_f 0,65 (в системе А); УФ-спектр (в EtOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 230 нм (ϵ 11 800).

Аналогично цереброзид (II) превращали в 3-кетопроизводное (VII); R_f 0,55 (в системе А); 0,65 (Б); УФ-спектр (в EtOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 230 нм (ϵ 12 200).

Деглюкозилирование 3-кетопроизводных (VI) и (VII). 3-Кетопроизводное (VI) деглюкозилировали смесью $\text{CHCl}_3 - 0,01$ н. раствор Na_2CO_3 в MeOH (2 : 1), как описано [16]. Продукт реакции растворяли в бензоле и наносили на колонку (15×1,4 см), заполненную силикагелем в бензоле. Колонку промывали 50 мл бензола, 50 мл смеси бензол — CHCl_3 (3 : 1), после чего 100 мл CHCl_3 вымывали кетодиен (VIII); R_f 0,7 ($\text{CHCl}_3 - \text{бензол}$, 1 : 3). Масс-спектр: M^+ , m/z 587, 599, 604, 643, 625, 627; $[\text{R}'\text{CH}_2\text{CONH}_3]^+$, m/z 340, 354, 366, 368; $[\text{R}'\text{CH}_2\text{CONH}_2]^+$, m/z 339, 353, 365, 367; $[M - \text{R}'\text{CH}=\text{C}=\text{O}]^+$, m/z 265, 277, 279, 293.

Аналогично из 3-кетопроизводного (VII) получали кетодиен (IX); R_f 0,2 ($\text{CHCl}_3 - \text{бензол}$, 1 : 3), 0,45 (CHCl_3). Масс-спектр: $[M+1]^+$, m/z 602, 604, 614, 616, 628, 630, 640, 642; $[\text{R}'\text{CH}(\text{OH})\text{CONH}_2]^+$, m/z 353, 355, 367, 381; $\text{R}'\text{CH}=\text{O}+\text{H}$, m/z 309, 311, 323, 337; $[M - \text{R}'\text{CH}(\text{OH})\text{CO}]^+$, m/z 264, 276, 278, 292; $\text{RCH}=\text{CHCO}^+$, m/z 223, 235, 237, 249.

N-2,4-Динитрофенилпроизводные жирных оснований (IV) и (V). Фракцию сфингозиновых оснований метанолизата цереброзида (I) или (II) растворяли в 1 мл MeOH, к раствору добавляли 15 мл 2,4-динитрофторбензола и 4 мл 7,5% раствора NaHCO_3 . Смесью перемешивали 1 ч при 60°С, по охлаждению экстрагировали CHCl_3 (2×5 мл), объединенный экстракт промывали 3 мл воды и упаривали. Остаток растворяли в 0,5 мл CHCl_3 , наносили на колонку (20×1,4 см), заполненную силикагелем в CHCl_3 . Колонку промывали 70 мл CHCl_3 , 50 мл смеси $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$ (20 : 1), вещества вымывали смесью тех же растворителей в соотношении 10 : 1. Элюат (фракции 5 мл) анализировали при помощи ТСХ в системе $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$ (50 : 1), получали хроматографически гомогенное производное (IV) (R_f 0,35).

Аналогично из фракции жирных оснований метанолизата цереброзида (III) получали динитрофенильное производное (V); R_f 0,3 ($\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$, 20 : 1).

Разделение N-2,4-динитрофенильных производных моноеновых и диеновых жирных оснований. Динитрофенилпроизводные (IV) ацетилировали по вышеописанной методике, получали 1,3-ди-О-ацетил-2-N-(2,4-динитрофенил)сфингозины (IVб); R_f 0,8 (бензол — изопропанол, 25 : 1), 0,4 (гексан — эфир, 1 : 2; система Г). Продукт ацетилирования (IVб) (28 мг) растворяли в 0,5 мл гексана и раствор наносили на колонку (17×1,8 см), заполненную в гексане силикагелем, импрегнированным азотнокислым серебром (0,35 г AgNO_3 на 1 г силикагеля). Колонку промывали 50 мл гексана, после чего вымывали смесями гексан — эфир, 2 : 1 и 3 : 2 (по 100 мл), собирая фракции объемом 8 мл, их анализировали при помощи ТСХ на силикагеле, импрегнированном 15% AgNO_3 , в системе Г. Первой смесью растворителей и начальными порциями второй смеси элюировали 12,0 мг производных моноеновых жирных оснований, R_f 0,6; масс-спектр: $[M+\text{H}]^+$, m/z 536, 550, 564; $[M+\text{H} - \text{AcO}]^+$, m/z 477, 491, 505; $[M - \text{AcO}]^+$, m/z 476, 490, 504; $[M - \text{AcO} - \text{AcOH}]^+$, m/z 416, 430, 444; $(\text{O}_2\text{N})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{N}^+\text{H}=\text{CHCH}_2\text{OAc}$, m/z 268; $[(\text{O}_2\text{N})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{NCH}=\text{CH}_2]^+$, m/z 209. Затем элюировали 3,5 мг смеси моноеновых и диеновых производных, после чего вымывали 12,5 мг производных диеновых оснований, R_f 0,45; масс-спектр: $[M+\text{H}]^+$, m/z 548; $[M - \text{AcO}]^+$, m/z 488; $[M - \text{AcOH}]^+$, m/z 487; $[M - \text{AcO} - \text{AcOH}]^+$, m/z 418; $(\text{O}_2\text{N})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{N}^+\text{H}=\text{CHCH}_2\text{OAc}$, m/z 268; $[(\text{O}_2\text{N})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{NCH}=\text{CH}_2]^+$, m/z 209.

Окисление моноеновых и диеновых производных (IVб) и динитрофенилпроизводного триоксисоединения (V) смесью периодата и перманганата осуществляли по методике [26].

Бензолборонаты церамидов (X) и (XI). Цереброзиды (I) и (II) (10–15 мг) расщепляли до соответствующих церамидов по методике [7]. Каж-

дую из церамидных фракций растворяли в 2 мл безводного диоксиана, к растворам добавляли по 1 мл 0,5% раствора трифенилбороксила в диоксиане. Смеси оставляли на 30 мин при 20° С и упаривали. Каждый из остатков растворяли в 5 мл диоксиана, растворы упаривали. Остатки высушивали и без очистки анализировали методом масс-спектрометрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Prokazova N. V., Mikhailov A. T., Kocharov S. L., Malchenko L. A., Zvezdina N. D., Buznikov G., Bergelson L. D. Eur. J. Biochem., 1981, v. 115, № 3, p. 671-677.
2. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Chekareva N. V. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 424, № 2, p. 274-283.
3. Hoshi M., Nagai Y. Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 388, № 1, p. 152-162.
4. Жукова Н. Г., Богдановская Т. А., Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. Докл. АН СССР, 1973, т. 208, № 5, с. 981-984.
5. Вавер В. А., Шапошникова Г. Н., Симонова Т. И. Биооргани. химия, 1976, т. 2, № 5, с. 594-599.
6. Hayashi A., Matsuura F. Adv. Mass Spectrom. Vol. 7B. Proc. 7th Int. Mass Spectrom. Conf., Florence, 1976. 1978, p. 1567-1571.
7. Karlsson K.-A., Leffler H., Samuelsson B. E. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 574, № 1, p. 79-93.
8. Björkman L. R., Karlsson K.-A., Nilsson K. Comp. Biochem. and Physiol., 1972, v. 43B, № 2, p. 409-411.
9. IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature. The nomenclature of lipids. Recommendations, 1976.- Eur. J. Biochem., 1977, v. 79, № 1, p. 11-21.
10. Eichberg J., Whittaker W. P., Dawson R. M. C. Biochem. J., 1964, v. 92, № 1, p. 91-96.
11. Shaw N. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 164, № 2, p. 435-436.
12. Хайс Н. М., Мацек К. Хроматография на бумаге. М.: Изд-во иностр. лит., 1962, с. 460, 721.
13. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г., Батраков С. Г., Барсуков Л. И., Проказова Н. В. Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981, с. 198-205.
14. Karlsson K.-A., Pascher I. Chem. and Phys. Lipids, 1974, v. 12, № 2, p. 65-74.
15. Iwamori M., Moser H. W., McCluer R. H., Kishimoto Y. Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 380, № 2, p. 308-349.
16. Iwamori M., Nagai Y. Chem. and Phys. Lipids, 1977, v. 20, № 3, p. 193-203.
17. Andersson B. A., Karlsson K.-A., Pascher I., Samuelsson B. E., Steen G. O. Chem. and Phys. Lipids, 1972, v. 9, № 2, p. 89-111.
18. Bieman K., De Jongh D. C., Schnoecs H. K. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 12, p. 1763-1771.
19. Gaskell S. J., Brooks C. J. W. J. Chromatogr., 1976, v. 122, p. 415-423.
20. Gaskell S. J., Edmonds C. G., Brooks C. J. W. J. Chromatogr., 1976, v. 126, p. 591-599.
21. Laine R. A., Renkonen O. J. Lipid Res., 1975, v. 16, № 2, p. 102-106.
22. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Svetashev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P. Comp. Biochem. and Physiol., 1970, v. 34, № 1, p. 163-177.
23. Komori T., Sakato K., Matsu J., Sanechika Y., Nohara T., Ito Y., Kawasaki T., Schulden H.-R. Proc. 11th Int. Symp. Chem. Nat. Prod., Golden Sands, Bulgaria, 1978, vol. 2, p. 120-123.
24. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. J. Chromatogr., 1972, v. 67, № 2, p. 376-378.
25. Кеурс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975, с. 91-92.
26. Spence M. W. Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 218, № 2, p. 357-359.

Поступила в редакцию
23.VIII.1982

CEREBROSIDES OF THE FAR-EASTERN SEA CUCUMBER *CUCUMARIA JAPONICA*

BATRAKOV S. G., MURATOV V. B., SAKANDELIDZE O. G.,
SULIMA A. V., ROSYNOV B. V.

Central Institute of Advanced Medical Training, Moscow;
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

Muscle skin of the Far-Eastern sea cucumber, *Cucumaria japonica*, is shown to have unusually high cerebroside content (22 mg/g dry weight). In total the cerebroside fractions consist of β -D-glucopyranosylceramides of three types. Two of them (I and II) contain 16-methyl- $\Delta^4,11$ -heptadecasphingodienine, 14-methyl- Δ^4 -hexadecasphingenine, 16-methyl- Δ^4 -heptadecasphingenine and 16-methyl- Δ^4 -sphingenine as long-chain base moieties. In fraction I these are bound to non-hydroxylated fatty acids, C₂₂:₀, C₂₃:₀, C₂₃:₀, C₂₃:₁, whereas in the fraction II the abovementioned bases are acylated by 2-D-hydroxy fatty acids, C₂₂:₀, C₂₂:₁, C₂₃:₁, C₂₄:₁. Fraction III contains these same 2-D-hydroxy acids associated only with 4-hydroxy-14-methylhexadecasphingenine. By means of mass spectrometry of *per*-O-acetylated cerebrosides and benzene boronates of the corresponding ceramides, major molecular species have been determined in the isolated natural cerebrosides.