



УДК 547.95.02 + 543.422.25

СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СИАЛОГЛИКОЛИПИДОВ
МОРСКОГО ЕЖА *TRIPNEUSTES VENTRICOSA*
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ^1H - И ^{13}C -ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИШашков А. С., Смирнова Г. П., Чекарева Н. В.,
Дабровски Я. *

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

* Институт медицинских исследований им. Макса Планка, Гейдельберг, ФРГ

Из гонад морского ежа *Tripneustes ventricosa* с помощью ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе и препаративной тонкослойной хроматографии на силикагеле выделены три моносиалоганглиозида и один дисиалоганглиозид. Структуры моносиалоганглиозидов установлены с помощью ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии как N-ацетилнейраминозил-(α 2-6)-глюкопиранозил-(β 1-1)-церамид, N-гликолилнейраминозил-(α 2-6)-глюкопиранозил-(β 1-1)-церамид и 8-О-сульфат-N-гликолилнейраминозил-(α 2-6)-глюкопиранозил-(β 1-1)-церамид и для несulfатированных ганглиозидов подтверждены химическими методами. Структура дисиалоганглиозида как N-ацетилнейраминозил-(α 2-8)-N-ацетилнейраминозил-(α 2-6)-глюкопиранозил-(β 1-1)-церамида определена с помощью полного и частичного кислотного гидролиза, метилирования, периодатного окисления, ферментативного расщепления нейраминидазой и окисления хромовым ангидридом. Показано, что в состав липидной части ганглиозидов входит C_{18} -фитосфингозин и высшие жирные незамещенные и α -оксикислоты, последние составляют $\sim 10\%$ смеси кислот. Состав кислот определен с помощью ГЖХ.

Ранее было показано, что ганглиозиды различных видов морских ежей имеют общий тип структуры олигосахаридной цепи, не обнаруженный в гликоконъюгатах позвоночных, и содержат глюкозу и сиаловую кислоту (или ее сульфатированное производное), соединенную с глюкозой α 2-6-связью [1]. Поскольку до сих пор все исследование ганглиозидов морских ежей проводили на видах, обитающих в Японском море, представляло интерес выяснить, сохраняется ли такой тип структуры в ганглиозидах морских ежей, обитающих в других морях. В настоящей работе приведены результаты исследования четырех ганглиозидов, выделенных из гонад морского ежа *T. ventricosa*, выловленного в Карибском море. Структура ганглиозидов (III), (IV) и (VI) (рис. 1) (первые два являются главными компонентами смеси ганглиозидов) определена с помощью ЯМР-спектроскопии и для ганглиозидов (III) и (IV) подтверждена химическими методами, а структура минорного ганглиозида (V) определена химическими методами и ферментативным гидролизом нейраминидазой.

Выделение и первичная характеристика ганглиозидов. Ганглиозиды *T. ventricosa* были выделены из общего липидного экстракта гонад с помощью диализа и ионообменной хроматографии полярных липидов на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой с использованием в качестве элюента растворов ацетата аммония в метаноле. Картина элюции приведена на рис. 1. Соединения (III) и (IV) элюировались 0,025 М раствором $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ в метаноле как моносиалоганглиозиды, соединение (V)—0,1 М раствором соли в зоне дисиалоганглиозидов, а соединение (VI) обладало наиболее кислым характером и элюировалось 0,25 М раствором соли. Ганглиозиды (III)—(V) были очищены далее с помощью препаративной ТСХ на силикагеле. Все четыре ганглиозида вели себя как индивидуальные соединения при ТСХ в нейтральной и основной системах растворителей и содержали сиаловую кислоту и нейтральные сахара (специфическое окрашивание резорциновым [2] и орциновым [3] реактивами) и не содержали фосфатной группы и свободной аминогруппы (отрицательная реакция с молибденовым

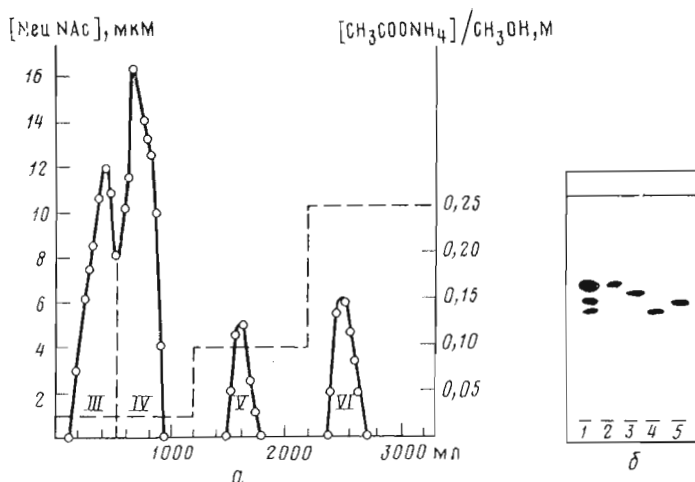


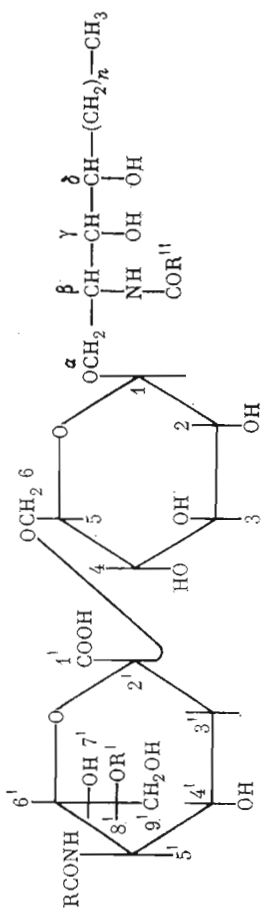
Рис. 1. Хроматографический анализ ганглиозидов гонад морского ежа *T. ventricosa*. *a* — элюция с DEAE-целлюлозы (CH_3COO^- -форма); *б* — ТСХ в системе хлороформ—метанол—вода (6 : 4 : 1): 1 — сырой препарат полярных гликолипидов, 2 — ганглиозиды (III), 3 — (IV), 4 — (V), 5 — (VI). NeuNAc — N-ацетилнейраминная кислота

реактивом [4] и нингидрином). В ИК-спектрах этих соединений присутствовали все полосы поглощения, характерные для ганглиозидов, а в спектре ганглиозида (VI), кроме того, присутствовали полосы поглощения при 810 и 1235 см^{-1} , соответствующие сульфатной группе [5]. На основании этого можно было предположить, что ганглиозид (VI) является сульфатированным ганглиозидом.

Общая характеристика спектров ^1H -ЯМР. В качестве модельных соединений для интерпретации спектров использовали 4-О-Х-N-гликолилнейраминозил-($\alpha 2$ -6)-глюкопиранозил-($\beta 1$ -1)-церамид (ганглиозид I) из морского ежа *Echinocardium cordatum* [6] и 8-О-сульфат-N-гликолилнейраминозил-($\alpha 2$ -6)-глюкопиранозил-($\beta 1$ -1)-церамид (ганглиозид II) из морского ежа *Echinarachnius parma* [7].

Для всех спектров характерны сигналы групп CH_3 липидной части молекулы (0,85 м. д., триплет), уширенный пик от совокупности протонов метиленовых групп при 1,23 м. д., ряд сигналов протонов метиленовых групп, сдвинутых в более низкое поле (2,0—2,5 м. д.) за счет соседства двойной связи или карбонильной группы, сигналы протонов, связанных с sp^2 -гибридизованным углеродом (5,3 м. д.), и уширенные сигналы групп OH и NH в области 4,5 м. д. и более низком поле. Все сигналы протонов групп CH_2OH , CHOH и CHNHCO расположены в интервале 3,0—4,3 м. д. В этой же области спектра находится сигнал воды, точное положение которого зависит от условий съемки спектра (главным образом температуры). Используя температурную зависимость химического сдвига сигнала воды, удастся определить общее количество протонов в области спектра 3,0—4,3 м. д. путем сопоставления интегральных интенсивностей линий, заведомо относящихся к резонансу одного протона (например, H1 глюкопиранозного остатка, см. ниже) с интенсивностью остальных сигналов, не совпадающих по химическому сдвигу с сигналом воды.

Для соединений (I), (II), (IV) и (VI) в области спектра 3,0—4,3 м. д. находятся сигналы от 21 протона, а для соединения (III) — от 19 протонов. В спектре соединения (III) имеется характерный синглет при 1,886 м. д. интенсивностью три протонные единицы, который следует отнести к протонам CH_3CONH -группы N-ацетилнейраминной кислоты. Во всех остальных спектрах этот сигнал отсутствует, однако в области 3,85—3,87 м. д. в них имеется синглетный сигнал, отвечающий по интегральной интенсивности двум протонам. В соответствии с данными химического анализа [6, 7] соединения (I) и (II) содержат в своем составе N-гликолилнейраминную кислоту. Появление в спектрах соединений (I)



- (I), (IV): R=CH₂OH * R'=H;
 (III): R=CH₃ * R'=H;
 (II), (VI): R=CH₂OH *, R'=SO₃H
 COR'' – остатки высших жирных кислот, предельных
 и непредельных^{2*}

Химические сдвиги протонов, м. д. от TMS

Соедине- ние	Темпера- тура, °С	H1 ^{3*}	H2	H3, H4	H5, H6 _A	H6 _B	H3' _B	H3' _A	H4'	H5'	H6'	H7'	H8'	H9' _A	H9' _B	H _{αA}	H _{αB}	H _β	H _γ	H _δ
(I)	35	4,12 4,09	2,97	3,14	3,74	3,20	1,30	2,68	3,65	3,33	3,37	3,21	3,60		3,37	3,89	3,55	3,96	3,43	3,40
(IV)	35	4,12 4,09	2,95	3,14	3,74	3,20	1,30	2,68	3,64	3,35	3,35	3,19	3,63	3,55	3,43	3,89	3,58	3,93	3,39	3,35
(III)	35 70 ^{4*}	4,08 4,10	2,94 2,98	3,11 3,14	3,70 3,75	3,17 3,14	1,27 1,29	2,66 2,69	3,52 3,57	3,32 3,35 3,41	3,32 3,67	3,17 3,22	3,57 3,63	3,50 3,57	3,32 3,36	3,88 3,91	3,57 3,57	3,91 3,99	3,47 3,46	3,32 3,35
(II)	35	4,13 4,10	2,94	3,14	3,67	3,15	1,40	2,45	3,57	3,67	3,67	3,63	4,32	3,91	3,57	3,85	3,59	3,92		3,40
(VI)	80 35	4,17 4,13 4,15 4,11	3,01	3,20	3,85	3,20	1,46	2,45	3,74	3,64 3,74	3,74	3,67	4,39	3,91	3,62	3,86	3,58	3,92	3,40	3,43
	35		2,97	3,15	3,70	3,21	1,44	2,48	3,58	3,65	3,62	3,62	4,30	3,90	3,55	3,85	3,56	3,98		3,43

* Сигнал CH₂OH 3,87 м. д. в спектрах соединений (I) и (IV) и 3,85 м. д. в спектрах соединений (II) и (VI); сигнал CH₃ в спектре соединения (III) 1,88 м. д. (все при 35° С).

^{2*} Сигналы –CH=CH– в остатках непредельных жирных кислот 5,31–5,32 м. д.; CH₂–CH= – 2,07–2,08 м. д. для несурфатированных ганглиозидов и 1,97–1,98 м. д. – для сульфатированных (все при 35° С).

^{3*} Для всех соединений, кроме соединения (III), в спектрах наблюдается два сигнала от протона H1 с суммарной интегральной интенсивностью, отвечающей одному протону.

^{4*} КССВ (получены из анализа спектров соединения (III) при высоких температурах): J_{H1–H2} = 7,9; J_{H3'_A–H3'_B} = 11,2; J_{H3'_A–H4'} = 4,7; J_{H3'_B–H4'} = 11,2; J_{H4'–H5'} = 8,9; J_{H5'–H6'} = 10,2; J_{H6'–H7'} = 1,7; J_{H7'–H8'} = 8,5; J_{H8'–H9'_A} = 2,8; J_{H8'–H9'_B} = 5,8; J_{H9'_A–H9'_B} = 10,5; J_{H_{αA}–H_{αB}} = 4,8; J_{H_{αB}–H_β} = 4,8; J_{H_β–H_γ} = 4,5; J_{H_γ–H_δ} = 6,5 (все значения в Гц).

и (II) упомянутого двухпротонного синглета вызвано протонами НОСН₂СОНН-групп. Следовательно, ганглиозиды (IV) и (VI) также содержат в своем составе N-гликолилнейраминовою кислоту.

При сопоставлении спектров соединений (I), (III) и (IV) со спектрами соединений (II) и (VI) обнаруживается характерное различие в области 4,0—4,3 м. д. (табл. 1). Для соединений (I), (III) и (IV) в этой области имеется лишь дублетный сигнал с константой спин-спинового взаимодействия (KССВ), равной 7,9 Гц (или дублетные сигналы, см. ниже), с интегральной интенсивностью, отвечающей одному протону. Сигнал с таким расщеплением и химическим сдвигом может принадлежать только протону при аномерном атоме углерода глюкозного остатка. Для соединений (II) и (VI) в указанной области спектра появляется еще один мультиплетный сигнал с интегральной интенсивностью, отвечающей одному протону.

Таким образом, все рассматриваемые соединения по признакам внешнего сходства или различия их спектров ПМР могут быть разделены на две основные группы: сульфатированные ганглиозиды ((II) и (VI), характерный признак в спектре ПМР — мультиплет при 4,3 м. д.) и несульфатированные ганглиозиды ((I), (III) и (IV)). Внутри последней группы возможно разделение на соединения, содержащие N-гликолилнейраминовою кислоту ((I) и (IV), характерный признак — синглет интенсивностью две протонные единицы при 3,85—3,87 м. д.) или N-ацетилнейраминовою кислоту ((III), характерный признак — синглет интенсивностью три протонные единицы при 1,875 м. д.). Все сульфатированные ганглиозиды содержат N-гликолилнейраминовою кислоту. Исходя из данных по структуре ганглиозида (II), полученных при химическом исследовании [7], можно предположить, что появление сигнала с химическим сдвигом 4,3 м. д. связано с наличием сульфатной группы, обуславливающей низкочастотное смещение сигнала одного из протонов. Для ганглиозида (VI) это предположение подтверждается наличием в ИК-спектре полосы поглощения сульфатной группы.

Дальнейшее детальное отнесение сигналов в спектрах ПМР выполнено с помощью селективного двойного гомоядерного резонанса или измерения эффектов Оверхаузера в варианте разностной спектроскопии. На рис. 2 представлен ПМР ганглиозида (III) и приведены спектры разностной спектроскопии гомоядерного двойного резонанса или ЯЭО в качестве иллюстрации использования этих методик для отнесения сигналов.

В спектрах всех соединений имеется ряд сигналов, отнесение которых не вызывает сомнений. Так, в приведенном на рис. 2 спектре ганглиозида (III) дублетный (J 7,9 Гц) сигнал при 4,10 м. д., очевидно, может быть отнесен только за счет резонанса Н1 β -D-глюкопиранозного остатка. В спектрах других соединений в этой области находятся два дублета с одинаковой константой 7,9 Гц и суммарной интегральной интенсивностью, отвечающей одному протону (табл. 1). По-видимому, небольшое различие в химических сдвигах Н1 глюкопиранозного остатка объясняется различием в длине цепи фитосфингозина.

Вторым характерным для всех соединений сигналом является триплет с химическим сдвигом 2,94—2,98 м. д. и J 7,9 Гц. С помощью селективного гомоядерного двойного резонанса (обычные и разностные спектры), а также при анализе спектра двумерной спектроскопии SECSY (в случае ганглиозида (III)) однозначно показано, что этот сигнал принадлежит протону Н2 β -D-глюкопиранозного остатка. На него не распространяется влияние различия в длине цепи фитосфингозина, и во всех спектрах положение и расщепление этого сигнала одно и то же. Необычное для β -D-глюкопиранозы расщепление сигнала (триплет вместо дублета дублетов), как выяснилось (см. табл. 1), связано с вырожденностью спектра из-за совпадения химических сдвигов сигналов протонов Н3 и Н4 в этом остатке.

Третий сигнал, отнесение которого становится очевидным после анализа спектров двумерной спектроскопии и разностных спектров двойного резонанса и ЯЭО, находится при 2,66 м. д. (при 35° С). При насыщении этого дублета дублетов в разностных спектрах ганглиозида (III) появляются

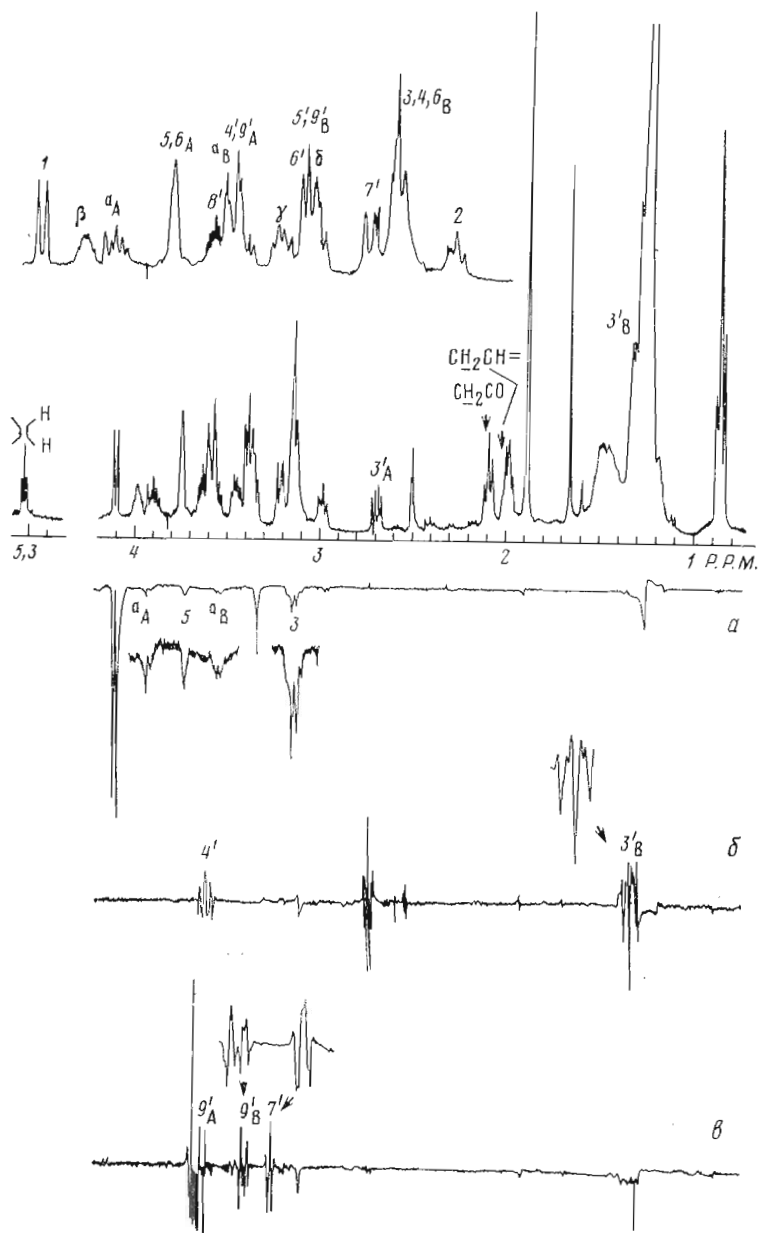


Рис. 2. ^1H -ЯМР-спектр соединения (III) в $\text{DMSO}-d_6$ при 70°C ; в верхней части рисунка — область спектра 2,9—4,2 м. д. в увеличенном масштабе. *a* — разностный спектр ЯЭО, полученный при облучении аномерного протона остатка глюкозы; *b*, *в* — разностные спектры селективного гомоядерного двойного резонанса, полученные при насыщении протона H_{3A}' и $\text{H}_{8'}$ остатка нейраминовой кислоты соответственно. Обозначения сигналов — в соответствии с нумерацией и индексацией протонов в формуле, приведенной в табл. 1

ся триплетный сигнал в высоком поле (1,27 м. д.), скрытый в обычном спектре совокупностью сигналов метиленовых групп, и мультиплет в низком поле (3,52 м. д., дублет дублетов дублетов). Характер расщепления всех упомянутых сигналов, величины КССВ (табл. 1) и само положение сигналов в спектре позволяют сделать заключение, что сигнал при 2,66 м. д. в спектре соединения (III) относится к экваториальному протону (H_{3A}' в табл. 1 и на рисунках) остатка нейраминовой кислоты. В спектрах ганглиозидов (I) и (IV) также имеются сигналы с единичной интегральной интенсивностью в этой области; разностные спектры, полученные при насыщении рассматриваемого сигнала, совершенно идентичны

описанным для ганглиозида (III). В спектрах сульфатированных ганглиозидов сигнал протона $H3_A'$ оказывается скрытым под мультиплетом от не полностью дейтерированного растворителя (CHD_2SOCD_3). Однако в разностных спектрах при насыщении сигнала растворителя и находящегося под ним сигнала $H3_A'$ ясно видны отклики от сигналов протонов $H3_B'$ и $H4'$. При повышении температуры до $80^\circ C$ удается увидеть часть сигнала протона $H3_A'$.

В спектрах сульфатированных ганглиозидов имеется еще один характерный сигнал с интегральной интенсивностью одна протонная единица при 4,30—4,32 м. д., относящийся к протону $\overset{|}{\underset{|}{H}}COSO_3H$ -группы. Варьирование температуры позволяет выделить несколько сигналов единичной интенсивности из группы перекрывающихся мультиплетов за счет различной температурной зависимости химических сдвигов протонов. Так, в спектре соединения (III), снятом при $50^\circ C$, наблюдается как отдельный сигнал дублет дублетов с химическим сдвигом 3,47 м. д., в спектре, снятом при $70^\circ C$ — мультиплеты при 3,63 и 3,99 м. д. и дублеты дублетов при 3,91 и 3,22 м. д. (табл. 1). Селективное насыщение упомянутых сигналов позволяет получить хорошо разрешенные и интерпретируемые разностные спектры. Анализ мультиплетности сигналов в спектрах ПМР, снятых при высоких температурах, позволяет достаточно точно измерить КССВ и облегчает отнесение сигналов.

Результаты анализа спектров ПМР ганглиозидов приведены в табл. 1. Сопоставление спектров ПМР ганглиозидов с известной структурой (I и II) и вновь выделенных (III, IV и VI) позволяет найти общие детали и особенности структуры каждого из них*.

Ганглиозиды (I), (III) и (IV). Спектры ПМР углеводной части молекулы ганглиозидов практически идентичны, различие в природе остатка сказывается лишь на химическом сдвиге сигнала протона $H4'$ (0,12 м. д.). Во всех спектрах, кроме ганглиозида (III), наблюдаются два сигнала от протона $H1$, что, по-видимому, является следствием неоднородности остатков фитосфингозина по длине углеводородной цепи (различия в значениях n , см. формулу к табл. 1). Различие в структуре R'' (предельные и непредельные кислоты) не сказывается на химическом сдвиге протона $H1$. Так, в спектре ганглиозида (III) имеется один сигнал протона $H1$, хотя соотношение предельных и непредельных высших жирных кислот близко к 1 : 1 (сигналы 5,32 и 2,07 м. д., см. примечание 3 к табл. 1).

Величина КССВ ($J_{1,2}$ 7,9 Гц) однозначно свидетельствует о β -конфигурации гликозидного центра гексозного остатка. К сожалению, вырожденность спектра гексозного остатка, обусловленная совпадением сигналов протонов $H3$ и $H4$, а также протонов $H5$ и $H6A$, не позволяет определить другие КССВ и получить независимое спектральное подтверждение его идентичности β -D-гликопиранозе. Из ПМР-спектров не следует со всей очевидностью и тип замещения в этом остатке, так как из-за отсутствия протона у аномерного атома углерода остатка нейраминовой кислоты невозможно использовать обычный прием определения типа связи — наблюдение эффектов Оверхаузера на протонах гликозилированного остатка при насыщении резонанса протона при аномерном углероде гликозилирующего остатка. Анализ ПМР-спектров, однако, показывает, что гексоза во всех трех ганглиозидах представлена одним и тем же сахаром с одним и тем же типом замещения. Строгое доказательство β -D-гликопиранозной структуры гексозы и типа ее замещения следует из анализа спектров ^{13}C -ЯМР (см. ниже).

Общее число сигналов протонов от второго углеводного остатка и величины КССВ полностью отвечают N-ацетил-(ганглиозид (III)) или N-

* В спектре ганглиозида (I) не удалось обнаружить сигналов, соответствующих щелочлабильному заместителю X, который, как было показано ранее, расположен у остатка N-гликолилнейраминовой кислоты в положении 4 или, возможно, у гидроксид гликолевой кислоты [6]. Отсутствие сигналов может быть связано с отщеплением заместителя при выдерживании ганглиозида в DMSO (частичное расщепление некоторых ганглиозидов в DMSO мы недавно наблюдали).

гликолилнейраминовой кислоте (ганглиозиды (I) и (IV)). Химический сдвиг аксиального протона H3' существенно зависит от конфигурации гликозидного центра; величина его, найденная для ганглиозидов (I), (III) и (IV) (1,3 м. д.), отвечает только α -конфигурации [8].

Ганглиозиды (II) и (VI). Спектры ПМР углеводной части ганглиозидов (II) и (VI) практически идентичны, совпадают также положения сигналов протонов H_α—H_δ сфингозинового основания.

В спектрах соединений (II) и (VI), с одной стороны, и (I) и (IV) — с другой, имеются существенные различия в положении сигналов N-гликолилнейраминовой кислоты, обусловленные наличием в первых сульфатной группы. Положение сульфатной группы в этом остатке следует из рассмотрения спектров ПМР. Поскольку при насыщении сигнала при 4,3 м. д. в разностном спектре отчетливо видны отклики от трех протонов, сульфатная группа может находиться только при C4' или C8'. Однако среди этих трех протонов нет H3_A' и H3_B', так что первое предположение должно быть исключено. Таким образом, O-сульфатная группа находится при C8'.

Идентичность спектров гексозы в соединениях (II) и (VI), а также (I) и (IV) свидетельствует об одном и том же типе замещения ее во всех ганглиозидах. Высокопольный сдвиг сигнала протона H3_B' в соединениях (II) и (III) подтверждает α -конфигурацию остатка нейраминовой кислоты.

Спектры ¹³C-ЯМР ганглиозидов (II) и (III). Спектры ¹³C-ЯМР ганглиозидов (II) (представитель сульфатированных ганглиозидов) и (III) (представитель несульфатированных ганглиозидов) (рис. 3) расшифрованы при сопоставлении со спектрами ряда модельных соединений (табл. 2). При сравнении спектров β -метил-D-глюкопиранозида и глюкопиранозил-(β 1-4)-церамида, полученного в результате частичного кислотного гидролиза ганглиозида (I) [6] (гликолипид (VII)), в последнем удается выделить сигналы углеродов фитосфингозина, связанных с атомами азота или кислорода (C_α—C_ν). Аналогичным образом, сопоставляя спектры соединений (III) и (VII), можно найти в первом сигналы атомов углерода остатка N-ацетилнейраминовой кислоты. Отнесение последних выполнено при сравнении спектра этого остатка со спектрами α - и β -метил-N-ацетилнейраминовой кислоты. Спектр ганглиозида (II) расшифрован при сравнении со спектром ганглиозида (III).

Из спектров ¹³C-ЯМР однозначно следует: 1) гексоза представлена β -D-глюкопиранозой; 2) последняя замещена остатком сиаловой кислоты по C6 (высокопольное смещение сигнала C5 за счет β -эффекта гликозилирования и низкопольное смещение сигнала C6 за счет α -эффекта); 3) гликозидный центр сиаловой кислоты имеет α -конфигурацию, так как химический сдвиг C6 этого остатка (73,3 м. д.) близок по величине химическому сдвигу C6 α -метил-N-ацетилнейраминовой кислоты (74,0 м. д.), но не ее β -аномера (71,2 м. д.); 4) в ганглиозиде (II) сульфатная группа находится при C8', о чем свидетельствует высокопольное смещение сигнала C9' за счет β -эффекта сульфатирования.

Таким образом, на основании данных ЯМР-спектроскопии ганглиозид (III) должен иметь структуру N-ацетилнейраминозил-(α 2-6)-глюкопиранозил-(β 1-4)-церамида, ганглиозид (IV) — N-гликолилнейраминозил-(α 2-6)-глюкопиранозил-(β 1-4)-церамида и ганглиозид (VI) — 8-O-сульфата N-гликолилнейраминозил-(α 2-6)-глюкопиранозил(β 1-4)-церамида.

Установление строения ганглиозидов (III)—(V) химическими методами. Для подтверждения данных, полученных с помощью ЯМР-спектроскопии для ганглиозидов (III) и (IV), а также для установления структуры ганглиозида (V) использовали химические методы и обработку нейраминидазой. После полного кислотного гидролиза ганглиозидов в качестве единственного нейтрального моносахарида обнаружена глюкоза. Количественные измерения глюкозы с помощью ГЖХ в виде полного ацетата сорбита показали, что в молекуле каждого ганглиозида содержится по одному остатку глюкозы. При мягком кислотном гидролизе ганглиозидов полностью отщеплялась сиаловая кислота и образовывались моноглюкозилцерамиды. Сиаловые кислоты выделяли из гидролизатов с помощью

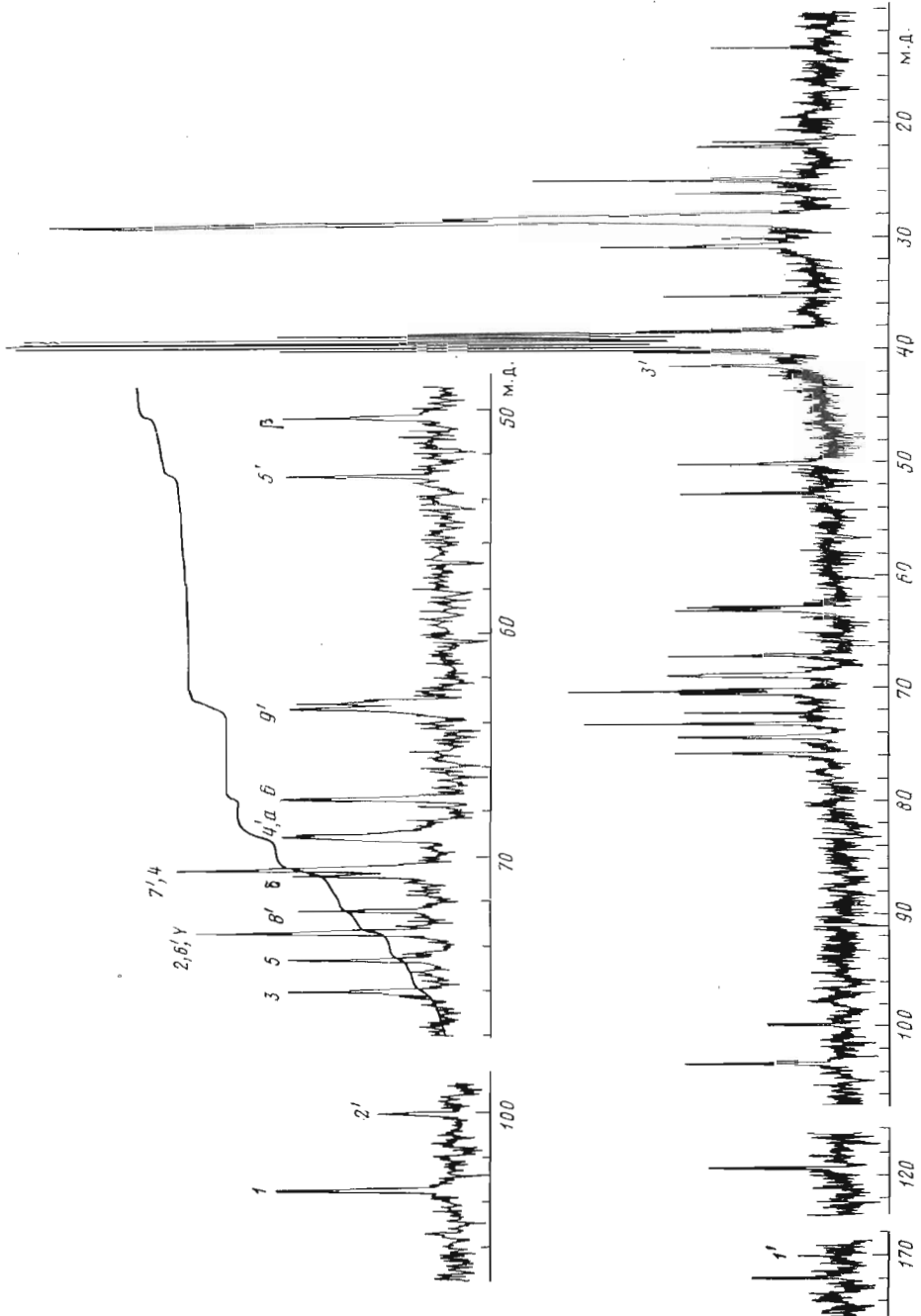


Рис. 3. Спектр ^{13}C -ЯМР соединения (III) в $\text{DMSO-}d_6$. Обозначения сигналов см. табл. 1.

Химические сдвиги атомов углерода ^{13}C ганглиозидов (II) и (III), глюкозилцерамида (VII)* и модельных соединений

Соединение	Остаток	Химические сдвиги ^{13}C , м. д. от ТМС										
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	CH_2OH **	
(III)	N-ацетилнейраминовой кислоты	170,0	100,0	41,65	69,0	52,9	73,3	70,5	72,35	63,3		
	β -D-глюкопиранозы	103,4	73,3	75,9	70,4	74,5	67,3					
	фитосфингозина	68,9 (α)	50,2 (β)	73,3 (γ)	70,8 (δ)							
(II)	N-гликолилнейраминовой кислоты	171,5	99,4	41,0	68,9	52,4	73,3	70,5	79,1	61,4	61,2	
	β -D-глюкопиранозы	103,5	73,3	75,9	70,5	74,8	66,6					
	фитосфингозина	68,9 (α)	50,0 (β)	73,8 (γ)	70,8 (δ)							
(VII)	β -D-глюкопиранозы	103,65	73,5	76,4	70,1	76,8	61,1					
	фитосфингозина	69,3 (α)	50,3 (β)	73,8 (γ)	70,7 (δ)							
	Метил- β -D-глюкопиранозид	103,9	73,4	76,7	70,2	76,8	61,1					
Метил- α -D-N-ацетилнейраминовая кислота	172,3	100,3	40,0	68,5	52,9	74,0	69,5	72,0	64,3**			
Метил- β -D-N-ацетилнейраминовая кислота	175,1	100,6	40,6	67,8	53,1	71,2	69,4	71,8	64,7**			

* Продукт частичной деградации (I). ** Гликолильного остатка. ** По данным [23], для растворов в воде.

ионообменной хроматографии на колонке с дауэксом 2×8 (CH_3COO^-) и анализировали ТСХ на силикагеле, импрегнированном $0,2 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$. По данным анализа, ганглиозиды (III) и (V) содержат N-ацетилнейраминную кислоту, а ганглиозид (IV) — N-гликолилнейраминную кислоту. Количественное определение сиаловой кислоты с резорциновым реактивом [9, 10] показало, что ганглиозиды (III) и (IV) содержат по одному остатку сиаловой кислоты, а ганглиозид (V) — два остатка.

Места связи моносахаридов определяли с помощью метилирования. В масс-спектре полностью метилированного ганглиозиды (III) имеются пики ионов с m/z 376 и 344 (376—32), соответствующие концевой N-ацетилнейраминной кислоте, а также пик иона с m/z 653, отвечающий фрагменту, содержащему дисахаридную цепочку N-ацетилнейраминозил-глюкозу и C1-C2-участок сфингозинового основания. Эти данные показывают, что на конце олигосахаридной цепи ганглиозиды действительно находится остаток N-ацетилнейраминной кислоты и что остаток глюкозы связан с первичным гидроксильной сфингозинового основания. В масс-спектре метилированного производного ганглиозиды (IV) пики ионов аналогичных фрагментов сдвинуты на 30 единиц в сторону больших масс, что связано с присутствием в ганглиозиде концевого остатка N-гликолилнейраминной кислоты. В масс-спектре метилированного дисиалоганглиозиды (V) имеется пик иона с m/z 376, соответствующий концевому остатку N-ацетилнейраминной кислоты, и пик иона с m/z 737, отвечающий фрагменту из двух остатков N-ацетилнейраминной кислоты. Следовательно, олигосахаридная цепь ганглиозиды (V) линейна и имеет на конце дисахарид N-ацетилнейраминной кислоты. После метанолиза метилированных ганглиозидов частично метилированные метилглюкозиды анализировали с помощью ГЖХ и обнаружили, что во всех случаях остаток глюкозы замещен по положению 6. Метилированные метилглюкозиды, образующиеся при метанолизе метилированного дисиалоганглиозиды (V), ацетилировали и полученные производные анализировали с помощью хроматомасс-спектрометрии. Было обнаружено два производных N-ацетилнейраминной кислоты, относительные времена удерживания которых при ГЖХ на колонке с фазой OV-1 были 1 и 1,11. Масс-спектр производного с меньшим временем удерживания идентичен масс-спектру полностью метилированного метилкетозиды N-ацетилнейраминной кислоты [11], а масс-спектр производного с большим временем содержал все пики, характерные для метилового эфира метилкетозиды 4,7,9-три-О-метил-8-О-ацетил-N-метил-N-ацетилнейраминной кислоты [11]. Следовательно, остатки N-ацетилнейраминных кислот в ганглиозиде (V) соединены между собой 2-8-связью.

Этот вывод был подтвержден данными периодатного окисления. Сиаловые кислоты, полученные после обработки ганглиозиды (V) по Смитту, имеют в спектре поглощения хромофоров, образующихся при их взаимодействии с резорцином, два максимума — при 585 и 630 нм, характерные для C₉- и C₇-сиаловых кислот соответственно [12]. При окислении каждая молекула ганглиозиды выделяет одну молекулу формальдегида. Следовательно, концевой остаток сиаловой кислоты окисляется с разрывом C7-

Таблица 3

Состав незамещенных высших жирных кислот ганглиозидов (III) и (IV) из гонад морского ежа *T. ventricosa*

Кислота	Содержание, % от суммы кислот		Кислота	Содержание, % от суммы кислот	
	(III)	(IV)		(III)	(IV)
C _{14:0}	—	5,0	C _{22:0}	22,0	0,8
C _{15:0}	—	2,7	C _{23:1}	—	1,6
C _{16:0}	48,0	80,0	C _{23:0}	—	0,7
C _{18:0}	30,0	5,4	C _{24:1}	—	0,5
C _{20:0}	—	1,0	C _{24:0}	—	0,3
C _{22:1}	—	2,0			

С8- и С8-С9-связей, а остаток, расположенный внутри цепи, замещен в положение 8 и не затрагивается периодатом.

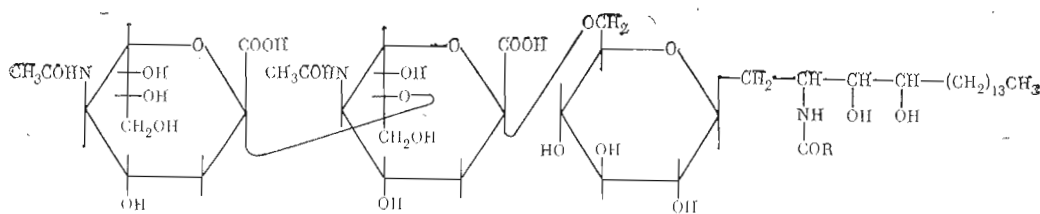
Для определения аномерной конфигурации гликозидной связи моногликозилцерамиды, полученные в результате частичного кислотного гидролиза ганглиозидов (III)—(V), ацетилировали и окисляли хромовым ангидридом. Во всех случаях наблюдалось практически полное разрушение глюкозы, следовательно, она соединена с церамидом β-гликозидной связью [13].

Конфигурацию кетозидных связей сиаловых кислот определяли с помощью обработки ганглиозидов нейраминидазой из *Vibrio cholerae*. Во всех случаях сиаловые кислоты отщеплялись количественно, следовательно, они соединены α-кетозидными связями.

Строение липидной части ганглиозидов (III)—(V) определяли методами кислотного метанолиза и периодатного окисления. В продуктах метанолиза всех ганглиозидов обнаружены метиловые эфиры высших жирных незамещенных и α-оксикислот и фитосфингозин. Оксикислоты составляют во всех случаях не более 10% от суммы кислот. Метиловые эфиры незамещенных кислот ганглиозидов (III) и (IV) были выделены препаративной ТСХ на силикагеле, и их состав установлен с помощью ГЖХ (табл. 3). Как видно из таблицы, в состав ганглиозида (III) входят только пальмитиновая, стеариновая и бегеновая кислоты, а главным компонентом кислот в ганглиозиде (IV) является пальмитиновая кислота (80% смеси). В связи с недостатком материала состав высших жирных кислот минорного дисиалоганглиозида (V) не определяли.

Для установления строения фитосфингозинов ганглиозиды (III)—(V) окисляли периодатом, продукты окисления восстанавливали КВН₄ и распределяли между водой и гексаном. Из водного слоя после метанолиза был выделен 2-амино-1,3-пропандиол, который анализировали в виде 2,4-динитрофенильного производного с помощью масс-спектрометрии. В органическом слое методом ГЖХ был обнаружен С_{15:0} — высший жирный спирт. Образование этих продуктов показывает, что в сфингозиновом основании этих ганглиозидов гидроксильные группы находятся у С1, С3 и С4, а аминогруппа — у С2, как и в фитосфингозине, и С_{18:0}-фитосфингозин является единственным сфингозиновым основанием ганглиозидов (III)—(V).

Таким образом, с помощью химических методов были подтверждены структуры моносиалоганглиозидов (III) и (IV) из *T. ventricosa*, установленные с помощью ЯМР-спектроскопии, и определена структура дисиалоганглиозида (V).



R-остаток высшей жирной кислоты

(V)

Из изложенного материала видно, что ганглиозиды морского ежа *T. ventricosa*, обитающего в Карибском море, имеют такой же тип структуры олигосахаридных цепей, как и ганглиозиды морских ежей Японского моря. По-видимому, этот тип структуры является общим для ганглиозидов всего класса Echinoidea, так как только он обнаружен в морских ежах разных таксономических групп (подклассов и отрядов) и разных мест обитания. По составу липидной части ганглиозиды из *T. ventricosa* похожи на ганглиозиды других видов морских ежей, где в большинстве случаев сфингозиновым основанием является фитосфингозин с преобладанием С₁₈-компонента, а высшие жирные кислоты представляют собой смеси незамещенных и α-оксикислот, в которых последние составляют 10—25%.

Экспериментальная часть

Морские ежи *T. ventricosa* собраны в Карибском море в феврале-марте. Липидный экстракт гонад и неочищенный препарат сиалогликолипидов получали по описанной ранее методике [14]. В работе использовали *N*-ацетилнейраминую кислоту (Koch-Light, Англия), *N*-гликолилнейраминую кислоту (Sigma, ФРГ), нейраминидазу из *Vibrio cholerae* (500 ед. акт./мл, Calbiochem, США). Органические растворители перед использованием перегоняли.

ТСХ проводили на силикагеле КСК (150 меш), содержащем 5% гипса, с использованием систем растворителей, описанных ранее [14].

ГЖХ выполняли на приборе Pye Unicam 104 (Англия), скорость азота 60 мл/мин. Нейтральные моносахариды анализировали в виде ацетатов соответствующих гекситов на колонке с 3% ECNSS-M на газхроме Q при 180° С, частично метилированные метилглюкозиды — на колонке с 3% NGA на диатомите С при 160° С, ацетаты частично метилированных метилкетозидов сиаловых кислот — на колонке с 3% SE-30 на диатомите С при 200—250° (3°/мин), алифатические спирты и метиловые эфиры незамещенных высших жирных кислот — на той же колонке при 160—220 и 180—280° (3°/мин) соответственно.

Масс-спектры метилированных ганглиозидов снимали на приборе Varian MAT CN-6 (США) при ионизирующем напряжении 70 эВ и температуре нагрева образцов 280° С.

Спектры ¹H-ЯМР снимали на приборе Bruker HX-360 в DMSO-*d*₆ при концентрации веществ 1,2—2,0% как в [15].

Спектры ¹³C-ЯМР снимали на приборе Bruker WM-250 с рабочей частотой по углероду 62,9 МГц при 35° С; длина импульса 8 мкс (30°), объем памяти 16 К, частота повторения импульсов 0,6 с, концентрации веществ 1,2—2,0% в DMSO-*d*₆.

Колоночную хроматографию ганглиозидов на DEAE-целлюлозе проводили как ранее [16]. Два главных ганглиозида ((III) и (IV)) элюировались 0,025 М CH₃COONH₄ в CH₃OH, а минорные ганглиозиды (V) и (VI) — 0,1 и 0,25 М CH₃COONH₄ соответственно, собирали фракции по 50 мл. По 2 мл каждой фракции упаривали и определяли содержание сиаловой кислоты с резорциновым реактивом [9, 10]. Фракции, содержавшие одинаковые ганглиозиды, объединяли, диализовали против дистиллированной воды, упаривали и лиофилизовали. Ганглиозиды (III)—(V) дополнительно очищали с помощью препаративной ТСХ. Из сырого препарата сиалогликолипидов *T. ventricosa*, содержащего 200 мкМ NeuNAc, получено 56 мкМ ганглиозида (III), 99 мкМ — (IV), 15 мкМ — (V) и 25 мкМ — (VI).

Сфингозиновое основание количественно определяли по методу Лаутера и Тремса [17], калибровочную кривую строили по френозину.

Сиаловые кислоты количественно определяли с резорциновым реактивом [9, 10]: нейтральные моносахариды — с помощью ГЖХ в виде ацетатов гекситов, в качестве внутреннего стандарта использовали инозит.

Полный кислотный гидролиз гликолипидов проводили 1 М HCl при 100° С в течение 4 ч. Гидролизат экстрагировали хлороформом, водный слой нейтрализовали смолкой IRA-410 (HCO₃⁻) и анализировали нейтральные моносахариды с помощью ГЖХ.

Частичный кислотный гидролиз ганглиозидов проводили 0,05 М H₂SO₄ при 80° С в течение 1,5 ч. Гидролизат диализовали 24 ч против дистиллированной воды при 20° С. Недиализуемый продукт лиофилизовали и анализировали ТСХ, глюкозилцерамиды выделяли с помощью препаративной ТСХ. Внешний водный раствор упаривали до 5—10 мл и сиаловые кислоты выделяли на колонке с дауксом 2 × 8 (CH₃COO⁻) элюцией 1 М Na-ацетатным буфером, pH 4,6 [9]. Элюат деионизировали смолкой IR-120 (H⁺), упаривали и лиофилизовали, сиаловые кислоты анализировали ТСХ на силикагеле, импрегнированном 0,2 М NaH₂PO₄.

Кислотный метанолиз сиалогликолипидов проводили 1 М HCl в CH₃OH при 80° С в течение 18 ч. Из кислого раствора извлекали геаном метиловые эфиры высших жирных кислот, которые анализировали с помощью ТСХ

и ГЖХ. Метанольный слой подщелачивали 4 н. КОН в 90% водном метаноле, сфингозиновые основания экстрагировали эфиром и анализировали ТСХ.

Метилирование ганглиозидов проводили по методу Хакомори [18]. Метилированные производные экстрагировали CHCl_3 , диализовали против дистиллированной воды, очищали препаративной ТСХ и анализировали с помощью масс-спектрометрии. Метилированные ганглиозиды подвергали метанолизу 0,5 М HCl в метаноле при 80° С в течение 14 ч. Частично метилированные метилгликозиды анализировали с помощью ГЖХ и после ацетилирования уксусным ангидридом в пиридине (1 : 1) при 100° С в течение 2 ч — с помощью хроматомасс-спектрометрии.

Периодатное окисление ганглиозидов проводили 0,02 М NaIO_4 при 18° С в течение 12 ч в темноте и обрабатывали KВH_4 согласно [14]. Алифатические спирты экстрагировали гексаном, очищали препаративной ТСХ и анализировали ГЖХ. Водный слой после экстракции диализовали, недиализуемый продукт лиофилизировали и подвергали кислотному метанолизу. Из метанолизата экстрагировали метиловые эфиры высших жирных кислот гексаном, метанольный слой упаривали. Остаток обрабатывали 2,4-динитрофторбензолом [19]. 2,4-Динитрофенильное производное; 2-аминопропандиола-1,3 очищали препаративной ТСХ и анализировали с помощью масс-спектрометрии. Внешний водный раствор после диализа упаривали до 5—10 мл, сиаловые кислоты выделяли, как описано выше, и анализировали с помощью ТСХ, а также характеризовали спектром поглощения хромофора с резорцином.

Окисление хромовым ангидридом нейтральных глюкозилцерамидов, полученных после частичного кислотного гидролиза ганглиозидов, проводили в смеси уксусная кислота — уксусный ангидрид (9 : 1) по методу [13]. Предварительно гликолипиды ацетилировали смесью уксусный ангидрид — пиридин (1 : 1) при 20° С в течение 14 ч, в качестве внутреннего стандарта использовали инозит.

Ферментативный гидролиз ганглиозидов проводили обработкой нейраминидазой из *V. cholerae* в ацетатном буфере pH 5,5 при 37° С [20]. Сиаловую кислоту, устойчивую к действию фермента, количественно определяли с резорциновым реактивом после обработки реакционной смеси KВH_4 [21].

Формальдегид, выделяющийся при периодатном окислении ганглиозидов (V), количественно определяли по методу [22], калибровочную кривую строили по манниту.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнова Г. П. В кн.: Прогресс химии углеводов. М.: Наука, 1985, с. 126—148.
2. Svennerholm L. *Biochim. et biophys. acta*, 1957, v. 24, № 3, p. 604—611.
3. 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.
4. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. *Lipid Res.*, 1968, v. 9, № 3, p. 396.
5. Haines T. H. In: *Progress in the chemistry of fats and other lipids*/Ed. Holman R. H. Oxford: Pergamon, 1971, v. 2, part. 3, p. 299—345.
6. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 1, с. 123—130.
7. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 11, с. 1667—1673.
8. Brown E. B., Brey W. S., Welter W., Jr. *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 399, № 1, p. 124—130.
9. Svennerholm L. *Acta chem. scand.*, 1958, v. 12, № 3, p. 547—554.
10. Miettinen T., Takki-Luukkainen J. T. *Acta chem. scand.*, 1959, v. 13, № 4, p. 856—858.
11. Halbeek H., Haaverkamp J., Kamerling J. F. G. *Carbohydr. Res.*, 1978, v. 60, № 1, p. 51—62.
12. Kuhn R., Gauche A. *Chem. Ber.*, 1965, B. 98, № 2, S. 395—413.
13. Laine R. A., Renkonen O. *J. Lipid Res.*, 1975, v. 16, № 1, p. 102—106.
14. Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. *Biochim. et biophys. acta*, 1973, v. 326, № 1, p. 74—83.
15. Dabrowski J., Hanfland P., Egge H. *Biochemistry*, 1980, v. 19, № 24, p. 5652—5658.
16. Winterbourn C. C. J. *Neurochem.*, 1971, v. 18, № 6, p. 1153—1155.

17. *Lauter C. J., Trams E. G. J. Lipid Res.*, 1962, v. 3, № 11, p. 126—123.
18. *Hakomori S. J. Biochem. (Tokyo)*, 1964, v. 55, № 2, p. 205—208.
19. *Grassmann W., Hörmann H., Endres H. Chem. Ber.*, 1953, B. 86, № 12, S. 1477—1482.
20. *Ishizuka I., Kloppenburg M., Wiegandt H. Biochim. et biophys. acta*, 1970, v. 210, № 2, p. 299—305.
21. *Schneit M. L., Rafelson M. E. Biochim. et biophys. acta*, 1966, v. 130, № 1, p. 1—11.
22. *Vaskovsky V. E., Isay S. V. Anal. Biochem.*, 1969, v. 30, № 1, p. 25—31.
23. *Bhattacharjee A. K., Jennings H. J., Kenny C. P., Martin A., Smith I. C. P. J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, № 5, p. 1926—1932.

Поступила в редакцию
19.IX.1985

После доработки
6.XI.1985

STRUCTURAL STUDY OF SIALOGLYCOLIPIDS FROM THE SEA URCHIN *TRIPNEUSTES VENTRICOSA* GONADS USING ¹H- AND ¹³C-NMR SPECTROSCOPY

SHASHKOV A. S., SMIRNOVA G. P., CHEKAREVA N. V., DABROWSKI J.*

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of
Sciences of the USSR, Moscow; *Max Planck Institute for Medical
Research, Heidelberg*

Three monosialogangliosides and one disialoganglioside have been isolated from the gonads of the sea urchin *Tripneustes ventricosa* by DEAE-cellulose column chromatography and preparative TLC on silica gel. The structures of the monosialogangliosides have been established by ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy as N-acetylneuraminosyl-(α2-6)-glucopyranosyl-(β1-1)-ceramide, N-glycolylneuraminosyl-(α2-6)-glucopyranosyl-(β1-1)-ceramide and 8-O-sulfate-N-glycolylneuraminosyl-(α2-6)-glucopyranosyl-(β1-1)-ceramide. The structures of the nonsulfated gangliosides have been confirmed by chemical methods. The disialoganglioside structure has been identified as N-acetylneuraminosyl-(α2-8)-N-acetylneuraminosyl-(α2-6)-glucopyranosyl-(β1-1)-ceramide by total and partial acid hydrolyses, methanolysis, periodate oxidation, methylation analysis, chromium trioxide oxidation and neuraminidase treatment. The ceramide moieties of all gangliosides have been found to contain C₁₈-phytosphingosine and the mixtures of normal and α-hydroxy fatty acids. The fatty acid compositions have been determined by GLC.