



УДК 547.915.5:543.51

ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ ДИСИАЛОЗИЛЛАКТОЗИЛЦЕРАМИДОВ ТИМУСА ТЕЛЕНКА

*Садовская В. Л., Ахмед-Заде А. Ш., Когтев Л. С.,
Розынов Б. В., Дятловицкая Э. В.*

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

Хроматомасс-спектрометрическим анализом продуктов, полученных после метаболизма и дейтероацетилирования полностью метилированных дисиалозиллактозилцерамидов тимуса теленка, установлено, что они содержат три компонента: NeuAc $\alpha 2 \rightarrow 8$ NeuAc $\alpha 2 \rightarrow$ LacCer, NeuAc $\alpha 2 \rightarrow 8$ NeuGc $\alpha 2 \rightarrow$ LacCer и NeuGc $\alpha 2 \rightarrow 8$ NeuGc $\alpha 2 \rightarrow$ LacCer.

Как было показано ранее [1], в тимусе теленка в значительном количестве присутствуют дисиалозиллактозилцерамиды, гетерогенные по составу сиаловых кислот. Структура этих ганглиозидов была установлена с помощью анализа продуктов их метаболизма и ферментативного расщепления. Однако в том случае, когда в молекулу ганглиозида одновременно входят остатки N-ацетил- и N-гликолилнейраминовой кислоты, указанный метод не позволяет однозначно определить последовательность и места связывания сиалильных остатков. В этом случае наиболее подходящим методом является хроматомасс-спектрометрический анализ ацетилированных продуктов метаболизма полностью метилированных ганглиозидов [2–7]. Недавно, однако, появились данные, что при метаболизме метилированных гликоконъюгатов и их последующем ацетилировании происходит переацилирование аминогруппы внутреннего остатка сиаловой кислоты, что может приводить к неправильной интерпретации получаемых результатов [8, 9]. В связи с этим в настоящей работе проведено детальное изучение структуры дисиалозиллактозилцерамидов тимуса и вымени крупного рогатого скота с помощью хроматомасс-спектрометрии производных сиаловых кислот, образующихся при метилировании, метаболизме и ацетилировании дейтероуксусным ангидридом исходных соединений, что позволяет определить не только последовательность и места связывания остатков N-ацетил- и N-гликолилнейраминовой кислоты в дисиалозиллактозилцерамидах, но и степень переацилирования.

В работе были использованы дисиалозиллактозилцерамид вымени (I) и два дисиалозиллактозилцерамида тимуса (II) и (III) крупного рогатого скота, выделенные по методу [10]. При ТСХ ганглиозиды I и III давали только по одному четкому пятну, в то время как ганглиозид II обнаруживался в виде сдвоенного пятна, что указывало на неоднородность препарата. Как видно из табл. 1, все ганглиозиды содержали глюкозу, галактозу и сиаловую кислоту в отношении 1:1:2 и отличались друг от друга типом сиаловых кислот. В дисиалозиллактозилцерамиде I присутствовала только N-ацетилнейраминовая кислота, в ганглиозиде III — только N-гликолилнейраминовая кислота, а в случае ганглиозида II были идентифицированы как N-ацетил-, так и N-гликолилнейраминовые кислоты.

Сокращения даны по рекомендациям номенклатурных комиссий IUPAC — IUB: NeuAc и NeuGc — N-ацетил- и N-гликолилнейраминовая кислота, LacCer — лактозилцерамид, Sia — сиаловая кислота, Neu5Gc(Me)8Ac(d_3)4,5,7,9Me $_4$ — 8-[3 H]ацетил-4,7,9-три-O-метил-N-(O-метилгликолил)-N-метилнейраминовая кислота; сокращенные обозначения других замещенных производных нейраминовых кислот построены аналогично.

Анализ дисиаозилактозилцерамидов тимуса и вымени крупного рогатого скота

Источник	Ганглиозид	Отношение углеводных фрагментов			Тип сиаловой кислоты *	
		Glc	Gal	Sia	А	Б
Вымя Тимус	I	1,0	0,9	1,9	NeuAc	NeuAc
	II	1,0	1,0	2,0	NeuAc, NeuGc	NeuAc, NeuGc
	III	1,0	1,1	2,1	NeuGc	NeuGc

* Отщепление при частичном (А) и полном (Б) дезааилировании нейраминидазой.

Таблица 2

Данные газожидкостной хроматографии производных сиаловых кислот * ганглиозидов

Ганглиозиды	Время удерживания, мин			
	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4
I	15	16	—	—
II	15	16	—	17 мин 40 с
III	—	16	16,5	17 мин 40 с

* Получены после операций метилирования, метанолиза и дейтероаааилирования.

Таблица 3

Данные масс-спектров, использованные для идентификации хроматографических пиков *
(m/z , в скобках — относительная интенсивность)

Тип иона **	Neu5Ac4,5,7,8,9Me ₅ M 407 (пик 1)	Neu5Gc(Me)4,5,7,8,9Me ₅ M 437 (пик 3)	Neu5Gc(Me)4,5,7,9Me ₅ 8Ac(d ₃) M 468 (пик 4)
M — Me	392 (1,7)	—	—
M — OMe	376 (5,0)	406 (1)	437 (1,2)
A (M — CH ₂ OMe)	362 (4,0)	392 (5)	423 (0,7)
B (M — COOMe)	348 (47)	378 (14)	409 (16)
V	318 (57)	348 (17)	348 (1)
A — 2×MeOH	298 (75)	328 (8)	359 (6)
Г	274 (25)	304 (8)	304 (6)
B — 2×MeOH	254 (75)	284 (26)	284 (6)
Г — MeOH	242 (20)	272 (8)	272 (8)
Д	—	—	164 (23)
Е	142 (60)	172 (27)	172 (34)
Ж	129 (100)	159 (50)	159 (50)
З	89 (27)	89 (20)	—
CH ₂ OCH ₃	45 (60)	45 (100)	45 (100)

* См. табл. 2.

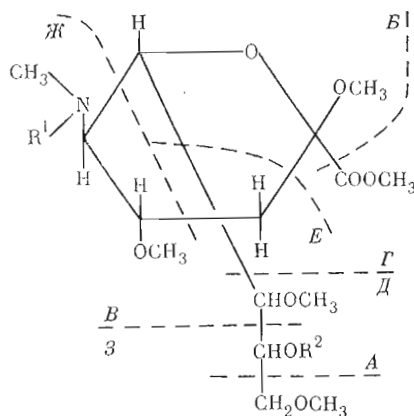
** См. рисунок.

Мягкая обработка ганглиозида II нейраминидазой (22°С, 30 мин) привела к отщеплению в качестве главного компонента N-ааааилнейраминовой кислоты и лишь небольшого количества N-глицолилнейраминовой кислоты. Это свидетельствовало о том, что основной концевой сиаловой кислотой является N-ааааилнейраминовая. Наличие N-глицолилнейраминовой кислоты можно объяснить двумя причинами: либо в препарате ганглиозида II присутствует компонент, содержащий концевой остаток этой кислоты, либо в условиях опыта отщепляется некоторое количество внутреннего остатка N-глицолилнейраминовой кислоты. Этот вопрос был решен хроматомасс-спектрометрическим анализом аааааилированных продуктов метанолиза полностью метилированных ганглиозидов.

Как было установлено ранее [8, 9], при метанолизе метилированных олигосахаридов, содержащих последовательно связанные сиаловые кислоты, происходит частичное дезаааилирование амидной группы внутрен-

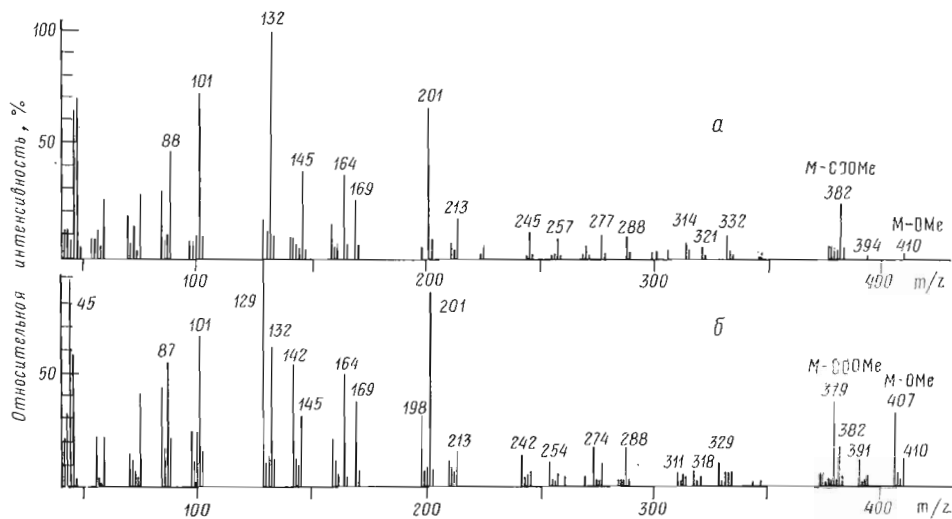
него остатка сиаловой кислоты. Последующее ацетилирование приводит к образованию метилированной 8-ацетил-N-ацетилнейраминовой кислоты даже в случае присутствия в исходном соединении 2-8-связанного остатка N-гликолилнейраминовой кислоты. Степень переацелирования зависела от условий метанолиза [9]. В настоящей работе метанолиз метилированных дисиализидлактозилцерамидов проводили, как описано в работе [9], 0,5 М HCl/CH₃OH при 80°С, но время реакции сократили с 16–20 до 5 ч. Полученные продукты метанолиза далее ацетилировали дейтерокусусным ангидридом, что давало возможность оценить степень переацелирования. По данным газожидкостной хроматографии, в этих условиях происходит практически полное отщепление концевого и внутреннего остатков сиаловой кислоты: отношения пиков 1:2 (ганглиозид I), 1:(2+4) (ганглиозид II) и 3:(2+4) (ганглиозид III) (табл. 2) составляют ~1:1. Приведенные в табл. 3 масс-спектры компонентов, отвечающих пикам 1 и 3 на хроматограммах продуктов метанолиза полностью метилированных ганглиозидов I и III (табл. 2), полностью совпадают с масс-спектрами соответственно N-ацетил- и N-(O-метилгликолил)-4,7,8,9-тетра-O-метил-5-N-метилнейраминовых кислот [2, 3, 6]. Фрагментные ионы, использованные для идентификации производных сиаловых кислот, изображены на схеме в соответствии с общепринятыми в настоящее время представлениями о фрагментации этих соединений под электронным ударом [2, 8].

Схема фрагментации производных сиаловых кислот под электронным ударом [2, 8]



R¹-Ac, или Ac(d₃), или CH₃OCH₂CO;
R²=CH₃ или Ac(d₃)

Как видно из табл. 3, в спектрах производных концевых сиаловых кислот отсутствуют фрагменты, содержащие атом дейтерия. Это свидетельствует о том, что в использованных нами условиях метанолиза переацелирования амидной группы не происходит. В то же время было установлено переацелирование амидной группы внутренних остатков сиаловой кислоты, причем степень переацелирования зависит от структуры ацильного остатка: внутренний остаток метилированной N-ацетилнейраминовой кислоты претерпевает переацелирование на 30%, а N-гликолилнейраминовой — на 70%. В случае ди(N-ацетилнейраминозил)лактозилцерамида степень переацелирования оценивалась по соотношению пиков ²H₃- и ²H₆-содержащих ионов вблизи молекулярной области (например, ионы (M - OMe)⁺ с m/z 407/410 или (M - COOMe)⁺ с m/z 379/382) в масс-спектре Neu5,8Ac₂4,5,7,9Me₄ (рисунок, б), полученном при идентификации хроматографического пика 2 (ганглиозид I, табл. 2); для ди(N-гликолилнейраминозил)лактозилцерамида — по площадям пиков 2 и 4 газожидкостной хроматограммы ацилированных продуктов метанолиза полностью метилированного ганглиозида III.



Масс-спектры производных сialовых кислот, отвечающих пику 2 при разделении ГЖХ (см. табл. 2), для ганглиозида III (а) и I (б)

Как указывалось выше, при расщеплении нейраминидазой ганглиозида II были обнаружены как N-ацетил-, так и N-гликолилнейраминная кислота. Необходимо было определить, в какой последовательности расположены эти кислоты в молекуле ганглиозида. Согласно табл. 2, в ганглиозиде II отсутствует пик концевой остатка N-гликолилнейраминной кислоты. Это означает, что обнаружение N-гликолилнейраминной кислоты при частичном расщеплении ганглиозида II нейраминидазой обусловлено отщеплением некоторого количества внутренней сialовой кислоты. Масс-спектры, полученные при идентификации пиков 4 газожидкостных хроматограмм ацетилированных продуктов метанолиза метилированных ганглиозидов II и III (табл. 2 и 3), полностью совпадали и соответствовали масс-спектру Neu5Gc(Me)8Ac(d_3)4,5,7,9Me. Однако масс-спектры, соответствующие пикам 2 этих же хроматограмм, существенно различались. В случае ганглиозида III пику 2 отвечал масс-спектр, характерный для Neu5,8[Ac(d_3)]₂4,5,7,9Me: фрагментные ионы, в состав которых входят атомы C5 и C8 с заместителями при них, содержат 6 атомов ^2H (например, ион ($M - \text{OMe}$)⁺ с m/z 410 и ион ($M - \text{COOMe}$)⁺ с m/z 382 (рисунок, а)), а пики ионов E и Ж, содержащих C5-атом с N-Ac(d_3)-группой, сдвинуты на 3 ед. (ср. табл. 3 и рисунок, а). С другой стороны, в масс-спектре, отвечающем пику 2 на хроматограмме ганглиозида II, наблюдались дублеты ионов ($M - \text{OMe}$)⁺ с m/z 407/410 и ($M - \text{COOMe}$)⁺ с m/z 379/382, а также ионов Ж с m/z 129/132 и E с m/z 142/145, характерные для смеси $^2\text{H}_3$ - и $^2\text{H}_6$ -содержащих Neu5,8Ac₂→8NeuGc2-группу, присутствовал компонент, содержащий внутренний 2—8-связанный остаток N-ацетилнейраминной кислоты. Поскольку концевая N-гликолилнейраминная кислота (пик 3) отсутствовала (табл. 2), можно сделать вывод, что этот препарат является смесью ди(N-ацетилнейраминозил)лактозилцерамида и N-ацетилнейраминозил-N-гликолилнейраминозиллактозилцерамида. Если принять, что степень переацилирования в обоих ганглиозидах, содержащих внутренний остаток N-гликолилнейраминной кислоты, одинакова, то, исходя из данных ГЖХ и учитывая степень переацилирования внутреннего остатка N-гликолилнейраминной кислоты в ди(N-гликолилнейраминозил)лактозилцерамиде, можно рассчитать содержание компонентов в препарате. Исходя из расчетов ганглиозид II тимуса содержит оба компонента примерно в равных количествах.

Таким образом, в тимусе телянка идентифицированы три дисialозил-

лактозилцерамида: NeuAcα2→8NeuAcα2→LacCer, NeuAcα2→8NeuGcα2→
→LacCer и NeuGcα2→8NeuGcα2→LacCer.

Экспериментальная часть

Дисиазиллактозилцерамиды из тимуса теленка и ди(N-ацетилней-
раминозил)лактозилцерамид из вымени крупного рогатого скота были
выделены по методу [10]. ТСХ ганглиозидов проводили на НРТЛ-пластип-
ках (Merck) в системе CHCl₃-CH₃OH-H₂O, 60:40:9, содержащей 0,02%
CaCl₂·2H₂O.

Полное десиазирование ганглиозидов нейраминоидазой из *Vibrio cho-*
lerae (Serva) осуществляли при 37°С в течение 24 ч, частичное — при
22°С в течение 30 мин [1]. Отщепившиеся спаловые кислоты идентифи-
цировали ТСХ на силикагеле, импрегнированном NaH₂PO₄ [11].

Метилирование ганглиозидов (1–2 мг) проводили по методу Хакомо-
ри [12], выделение продуктов метилирования — по методу [11]. Метили-
рованные ганглиозиды подвергали метанолизу 0,5 М HCl в CH₃OH в те-
чение 5 ч при 80°С, затем реакцию смесь упаривали, трижды экстра-
гировали гексаном (для удаления образовавшихся метиловых эфиров
жирных кислот) и ацетиловали 12 ч смесью пиридин — дейтероуксу-
сый ангидрид (1:1) при 20°С.

ГЖХ ацетилированных продуктов метанолиза полностью метилиро-
ванных ганглиозидов, а также триметилсилиловых эфиров продуктов ме-
танолиза исходных ганглиозидов осуществляли на хроматографе фирмы
Rue-Ulicam (Англия) на колонке (1500×4 мм) с 3% OV-1 на хромосор-
бе W-HP (100–120 меш) при программировании температуры от 150 до
280°С со скоростью 6°С/мин и скоростью газа-носителя (гелий) 60 мл/мин.

Хроматомасс-спектрометрический анализ продуктов расщепления про-
водили на хроматографе-масс-спектрометре LKB-9000A (Швеция) при
понижающем напряжении 70 эВ, температуре ионизационной камеры
250°С и температуре сепаратора 280°С, используя колонку (1500×3 мм)
с 1% OV-101 на газ-хром Q (100–120 меш) при скорости газа-носителя
(гелий) 30 мл/мин и программировании температуры от 190 до 250°С со
скоростью 10°С/мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dyatlovitskaya E. V., Zablotskaya A. E., Azizov Yu. M., Bergelson L. D. Eur. J. Biochem., 1980, v. 110, № 2, p. 475–483.
2. Kamerling J. P., Vliegenthart F. G. In: Sialic acids. Chemistry, metabolism and function / Ed. Schauer R. Wien -- New York: Springer-Verlag, 1982, p. 95–125.
3. Rauvala H., Kärkkäinen J. Carbohydr. Res., 1977, v. 56, p. 1–9.
4. Haverkamp J., Kamerling J. P., Vliegenthart F. G., Veh R. W., Schauer R. FEBS Lett., 1977, v. 73, № 2, p. 215–219.
5. Iwamori M., Nagai Y. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 22, p. 8328–8331.
6. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 712, № 3, p. 650–658.
7. Kochetkov N. K., Smirnova G. P. Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 759, № 2, p. 192–198.
8. Inoue S., Matsumura G. Carbohydr. Res., 1979, v. 74, p. 361–368.
9. Inoue S., Matsumura G., Inoue Y. Analyt. Biochem., 1982, v. 125, № 1, p. 118–124.
10. Дятловицкая Э. В., Ахмед-Заде А. Прикл. биохим. микробиол., 1983, т. 19, № 3, с. 399–402.
11. Dyatlovitskaya E. V., Novikov A. M., Gorkova N. P., Bergelson L. D. Eur. J. Biochem., 1976, v. 63, № 2, p. 357–364.
12. Hakomori S. J. Biochem., 1964, v. 55, № 2, p. 205–208.

Поступила в редакцию
30.III.1984

GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY ANALYSIS OF SIALIC ACIDS FROM DISIALOSYLLACTOSYL CERAMIDES OF CALF THYMUS

SADOVSKAYA V. L., AKHMED-ZADE A. Sh., KOGTEV L. S.,
ROSYNOV B. V., DYATLOVITSKAYA E. V.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

Gas-liquid chromatography/mass spectrometry of the compounds obtained on methanolysis and deuterioacetylation of the permethylated gangliosides has demonstrated that disialosyllactosyl ceramides of calf thymus contain three components — NeuAcα2→8NeuAcα2→LacCer, NeuAcα2→8NeuGcα2→LacCer and NeuGcα2→8NeuGcα2→LacCer.