



УДК 593.93-444.088.5 : 547.995.1.02

ГАНГЛИОЗИДЫ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ
APHELASTERIAS JAPONICA. ОБНАРУЖЕНИЕ СВЯЗИ
МЕЖДУ N-ГЛИКОЛИЛНЕЙРАМИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ
ЧЕРЕЗ ГИДРОКСИЛ ГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ

Смирнова Г. П., Бочетков Н. Е., Садовская В. Л.*

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва;
*Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной молекулярной биологии
и генетики ВАСХНИЛ, Москва

Из печени морской звезды *Aphelasterias japonica* выделены моно- и дисиалоганглиозиды, структура которых установлена с помощью полного и частичного кислотного гидролиза, метилирования, периодатного окисления, метанолиза, окисления хромовым ангидридом и обработки нейраминидазой. Структурной основой ганглиозидов является лактозилцерамид, к которому $\alpha 2 \rightarrow 3$ -связью в моносиалоганглиозиде присоединена 8-О-метил-N-гликолилнейраминавая кислота, а в дисиалоганглиозиде — дисиалипильный фрагмент, содержащий главным образом 8-О-метил-N-гликолилнейраминавую кислоту и в меньшем количестве N-гликолилнейраминавую кислоту. Показано, что в дисиалоганглиозиде сиаловые кислоты связаны между собой через гидроксил гликолевой кислоты. Липидная часть ганглиозидов включает фитосфингозины с прямой цепью и разветвленные и высшие жирные кислоты, среди которых преобладают α -оксикислоты. Определен состав фитосфингозинов и высших жирных кислот.

При исследовании ганглиозидов иглокожих было обнаружено, что олигосахаридные цепи этих соединений, выделенных из различных видов морских ежей, построены по одному плану [1—8], в то время как ганглиозиды другого класса иглокожих — морских звезд, по-видимому, не имеют общего типа структуры углеводных цепей, характерного для всего класса. Наиболее сильные различия в структуре наблюдаются для ганглиозидов морских звезд, относящихся к разным отрядам [9—15], по есть существенные отличия и для ганглиозидов морских звезд внутри одного отряда. Так, ганглиозиды из *Evaslerias retifera* и *Asterias amurensis* (отряд Педицелляриевых звезд) содержат глюкозу, галактозу и N-ацетилгалактозамин и имеют одинаковую структуру асиалопронзводного, но отличаются составом сиаловых кислот и положением их в углеводной цепи: ганглиозид из *E. retifera* содержит два остатка N-ацетилнейраминавой кислоты, связанных между собой 2→9-связью, и дисиалипильный фрагмент присоединен к N-ацетилгалактозамину в положение 3 [10, 16], а в состав ганглиозида из *A. amurensis* входят два остатка 8-О-метил-N-гликолилнейраминавой кислоты, которые присоединены к одному и тому же остатку N-ацетилгалактозамина в положения 3 и 6 [10, 17]. Ганглиозид из морской звезды *Distolasterias nipon*, относящейся к тому же отряду, не содержит гексозамина и имеет структуру трисиапиллактозилцерамид, в котором остатки N-ацетилнейраминавой кислоты связаны между собой 2→8-связями, а трисиалипильный фрагмент присоединен к остатку галактозы в положение 3 [9]. Чтобы выяснить, насколько широки вариации структур ганглиозидов морских звезд внутри одного отряда, мы продолжили исследование Педицелляриевых звезд. В настоящей работе установлены структуры двух ганглиозидов, выделенных из печени морской звезды *Aphelasterias japonica*.

Сырой препарат полярных гликолипидов получали из общего липидного экстракта печени *A. japonica* после диализа, последующего упаривания водного слоя, образовавшегося внутри диализного мешка, и лиофилизации. Этот препарат, по данным ТСХ, содержал два сиалогликолипида, а также некоторое количество нейтральных гликолипидов, фосфолипидов и пигментов. Сиалогликолипиды были выделены из этой смеси с помощью

ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой при элюции растворами ацетата аммония в метаноле. Менее полярный ганглиозид, содержащийся в смеси в большем количестве, элюировался 0,025 М раствором соли, а более полярный — 0,25 М раствором. Оба ганглиозида были затем дополнительно очищены с помощью препаративной ТСХ на силикагеле и вели себя как индивидуальные соединения при ТСХ в пейтральной и основной системах растворителей.

Структуры олигосахаридных цепей ганглиозидов установлены на основании результатов полного и частичного кислотного гидролиза, метилирования, обработки нейраминидазой и окисления хромовым ангидридом. После полного кислотного гидролиза ганглиозидов обнаружены глюкоза и галактоза в соотношении 1:1. При частичном кислотном гидролизе ганглиозидов расщепляются главным образом кетозидные связи сиаловых кислот и образуются нейтральные гликолипиды, которые были выделены из гидролизатов с помощью диализа. В обоих случаях недиализуемые продукты, по данным ТСХ, содержали главный компонент с подвижностью лактозилцерамида и минорный с подвижностью церебозида. Эти соединения были разделены с помощью препаративной ТСХ на силикагеле. Показано, что оба ганглиозида дают главный гликолипид, содержащий глюкозу и галактозу в соотношении 1:1, и минорный, содержащий глюкозу. При окислении ацетилированных производных дигексозилцерамидов, полученных из ганглиозидов *A. japonica*, хромовым ангидридом оба моносахарида разрушились, что свидетельствует о β -конфигурации их гликозидных связей.

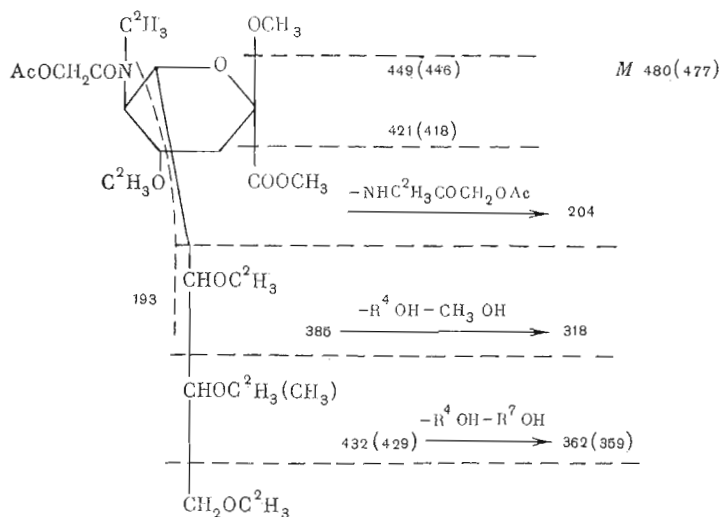
Сиаловые кислоты, отщепившиеся при частичном кислотном гидролизе ганглиозидов, были выделены из внешней диализной воды с помощью ионообменной хроматографии на дауэксе 2×8 (ацетатная форма) и количественно определены с резорциновым реактивом. Менее полярный ганглиозид содержит один остаток сиаловой кислоты, а более полярный — два остатка. Анализ сиаловых кислот с помощью ТСХ показал, что в моносиалоганглиозиде присутствует одно соединение, обладающее несколько большей подвижностью, чем *N*-ацетилнейраминная кислота (R_{NeuAc} 1,1), и совпадающее по подвижности с 8-*O*-метил-*N*-гликолилнейраминной кислотой, выделенной нами ранее из ганглиозида морской звезды *A. amurensis* [10, 17], а в дисиалоганглиозиде присутствуют два соединения: главное, с подвижностью 8-*O*-метил-*N*-гликолилнейраминной кислоты, и минорное, с подвижностью *N*-гликолилнейраминной кислоты.

Структуры сиаловых кислот ганглиозидов и места замещения моносахаридов определены с помощью тридейтерометилирования. В масс-спектре полностью тридейтерометилированного производного моносиалоганглиозида имеются интенсивные пики ионов с m/z 424 и 389. Первый соответствует концевой *N*-гликолилнейраминной кислоте, содержащей одну *O*-метильную группу вместо тридейтерометильной, а второй образуется из нее при отщеплении заместителя из положения 4 и водорода из положения 3 с образованием двойной связи между С-3 и С-4. Пиков, отвечающих другим типам сиаловых кислот, в спектре нет. После метанолиза тридейтерометилированного моносиалоганглиозида производные метилгликозидов пейтральных сахаров анализировали с помощью ГЖХ, а сиаловых кислот — с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии. Анализ показал, что остаток галактозы замещен в положение 3, а остаток глюкозы — в положение 4. ГЖХ производных сиаловой кислоты показала присутствие одного соединения, масс-спектрометрическая фрагментация которого идентична фрагментации метилового эфира метилкетозида 4,7,9-три-*O*-тридейтерометил-8-*O*-метил-*N*-тридейтерометил-*N*-гликолилнейраминной кислоты, полученного нами ранее при исследовании ганглиозида из *A. amurensis* [10, 17]. В спектре имеются пики ионов с m/z 421 (M^+ — OCH_3) и 393 (M^+ — COOCH_3), указывающие на присутствие в тридейтерометилированном производном *N*-гликолилнейраминной кислоты одной *O*-метильной группы вместо тридейтерометильной, положение которой у С-8 следует из пиков ионов с m/z 404 (M^+ — $\text{CH}_2\text{OC}^2\text{H}_3$) и 360 (M^+ — $\text{CH}_2\text{OC}^2\text{H}_3$), а также образующихся из них фрагментов с

m/z 334 (404 — R⁴OH — R⁷OH) * и 293 (360 — R⁴OH — CH₃OH). Следовательно, в состав моносиалоганглиозида входит 8-О-метил-N-гликолиллейрампиновая кислота, расположенная на конце олигосахаридной цепи.

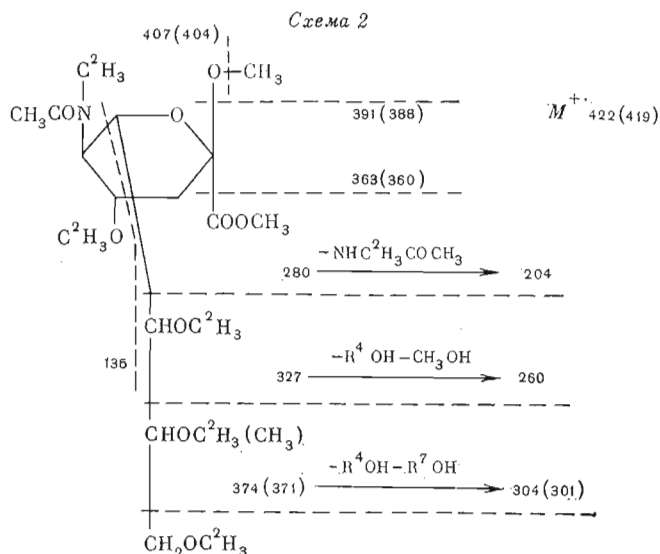
Анализ тридегтерометилированных производных метилгликозидов, полученных при метанолизе тридегтерометилированного дисиалоганглиозида, показал, что, как и в моносиалоганглиозиде, остаток глюкозы замещен в положение 4, а остаток галактозы — в положение 3. Производные сиаловых кислот анализировали с помощью хроматомасс-спектрометрии после ацетилирования. На хроматограмме видны два пика примерно равной интенсивности. Первый совпал по времени удерживания и масс-спектру с метиловым эфиром метилкетозида 4,7,9-три-О-тридегтерометил-8-О-метил-N-тридегтерометил-N-гликолиллейраминной кислоты, полученным из моносиалоганглиозида, а второй имел время удерживания 1,26 по отношению к первому. В его масс-спектре имелись пики ионов с m/z 449 и 446 ($M^{+} - OCH_3$), а также 421 и 418 ($M^{+} - COOCH_3$), которые указывали на присутствие двух моно-О-ацетилированных производных N-гликолиллейраминной кислоты, одно из которых содержит четыре О-тридегтерометильные группы, а другое — одну О-метильную и три О-тридегтерометильные группы. Судя по интенсивности пиков в спектре, количества этих производных примерно одинаковые. Положение О-метильной группы у С-8 следовало из пиков ионов с m/z 432 и 429 ($M^{+} - CH_2OC^2H_3$) и 385 ($M^{+} - CHOC^2H_3(C^2H_3)CH_2OC^2H_3$) (схема 1). Присутствие в спектре пика иона с m/z 193 (С-4 — С-5-фрагмент) показывает, что О-ацетильная группа находится либо у С-4, либо у гидроксила гликолевой кислоты. Выбор между этими двумя положениями в пользу последнего можно сделать при анализе того же спектра, где имеются интенсивные пики ионов с m/z 362 и 359, соответствующие фрагментам, которые образуются при разрыве связи С-8 — С-9 и последующем отщеплении заместителей из положений 4 и 7, и пика иона с m/z 318, образующегося при разрыве связи С-7 — С-8 и отщеплении заместителя из положения 4 и метанола (аналогично фрагментации других производных сиаловых кислот [18]). Кроме того, в спектре имеется пик иона с m/z 204, который образуется при отщеплении боковой цепи сиаловой кислоты (С-7 — С-9) и заместителя при С-5. Этот фрагмент отсутствует в том случае, если О-ацетильная группа находится в положении 4 [18].

Схема 1



Таким образом, из спектра следует, что у С-4 находится О-тридегтерометильная группа, а О-ацетильная группа расположена у гидроксила гликолевой кислоты, т. е. в дисиалоганглиозиде неконцевая N-гликолиллей-

* R⁴ и R⁷ здесь и далее — заместители при С-4 и С-7 сахарного остатка.



раминная кислота замещена концевой по гидроксильной группе гликолевой кислоты. Поскольку такая связь между сialовыми кислотами не была обнаружена ранее в сialогликоконъюгатах, нам казалось целесообразным доказать ее присутствие независимым способом. Для этой цели мы провели N-переацилирование сialовых кислот, включающее жесткий метаноллиз тридегтерометилированного производного дисialоганглиозида и последующее N,O-ацелирование. Хотя реакция N-деацилирования протекает не полностью и более половины N-гликолильных групп сохраняется даже после обработки 3 н. HCl в метаноле в течение 50 ч, анализ образовавшихся производных сialовых кислот с помощью хромато-масс-спектрометрии позволил сделать вывод о положении связи между сialовыми кислотами в дисialоганглиозиде. На хроматограмме видны три основных пика, два из которых совпали с производными N-гликолилнейраминной кислоты, полученными из тридегтерометилированного дисialоганглиозида в условиях метанолиза, идущего без снятия N-ацильной группы, и являются результатом неполного протекания жесткого метанолиза. Третий пик совпал по времени удерживания с метиловым эфиром метилкетозида тридегтерометилированной N-ацетилнейраминной кислоты и образовался в результате N-переацилирования. Масс-спектрометрический анализ показал присутствие в этом пике двух производных N-ацетилнейраминной кислоты, в одном из которых все гидроксильные группы тридегтерометилированы (пики ионов с m/z 422 (M^+), 407 ($M^+ - \text{CH}_3$), 363 ($M^+ - \text{COOCH}_3$), 304 ($M^+ - \text{CH}_2\text{OC}^2\text{H}_3 - 2\text{C}^2\text{H}_5\text{OH}$), а в другом — в положении 8 находится O-метильная группа вместо тридегтерометильной (пики аналогичных ионов с m/z 419, 404, 360, 301) (схема 2): Первое производное может образоваться только из остатка сialовой кислоты, не имеющего O-метильного заместителя при C-8, а такой остаток в дисialоганглиозиде занимает неконцевое положение. Из масс-спектра следует, что у C-4 этого производного находится O-тридегтерометильная группа, т. е. в ганглиозиде неконцевой остаток сialовой кислоты не имеет заместителя в положении 4 и, следовательно, может быть гликозилирован только по гидроксилу гликолевой кислоты. Этот вывод подтверждается также тем, что в продуктах N-переацилирования отсутствует производное 4-O-ацетил-N-ацетилнейраминной кислоты, которое должно образоваться в случае 2→4-связи между сialовыми кислотами.

Таким образом, масс-спектрометрический анализ производных N-гликолилнейраминной кислоты, полученных после метанолиза тридегтерометилированного дисialоганглиозида, и производных N-ацетилнейраминной кислоты, полученных в результате N-переацилирования тридегтерометилированных сialовых кислот дисialоганглиозида, показал, что в дисialоганглиозиде из печени *A. japonica* два остатка N-гликолилнейра-

Состав высших жирных кислот ганглиозидов печени *A. japonica*

Кислота	Моносиалоганглиозид		Дисиалоганглиозид	
	Незамещенные кислоты *	α -Окси-кислоты **	Незамещенные кислоты *	α -Окси-кислоты **
C ₁₂	0,7	—	—	0,6
C ₁₃	0,9	—	—	1,2
C ₁₄	1,6	1,2	1,3	14,5
C ₁₅	1,3	8,6	4,0	2,7
C ₁₆	19,5	45,1	23,5	30,0
C _{17:1}	1,3	1,3	—	—
C ₁₇	5,0	2,6	4,5	—
C ₁₈	62,6	3,8	12,6	3,6
C ₁₉	2,7	—	2,7	—
C ₂₀	2,4	2,2	4,9	—
C ₂₁	—	2,2	3,9	—
C ₂₂	2,0	12,1	13,5	18,0
C ₂₃	—	9,0	5,7	12,8
C ₂₄	—	9,1	4,7	16,6
C ₂₅	—	1,3	7,2	—
C ₂₆	—	1,3	2,2	—

* % от суммы незамещенных кислот.

** % от суммы α -оксикислот.

Таблица 2

Состав сфингозиновых оснований ганглиозидов печени *A. japonica*

Спирты	Соответствующие фитосфингозины	Содержание (% от суммы) в	
		моносиалоганглиозиде	диссиалоганглиозиде
<i>n</i> -C ₁₂	<i>n</i> -C ₁₅	3,0	—
<i>изо</i> -C ₁₃	<i>изо</i> -C ₁₆	2,6	—
<i>n</i> -C ₁₃	<i>n</i> -C ₁₆	9,7	12,1
<i>изо</i> -C ₁₄	<i>изо</i> -C ₁₇	19,1	30,0
<i>n</i> -C ₁₄	<i>n</i> -C ₁₇	7,3	6,6
<i>изо</i> -C ₁₅	<i>изо</i> -C ₁₈	20,6	24,1
<i>n</i> -C ₁₅	<i>n</i> -C ₁₈	8,8	11,2
<i>изо</i> -C ₁₆	<i>изо</i> -C ₁₉	10,6	9,7
<i>n</i> -C ₁₆	<i>n</i> -C ₁₉	4,8	6,3
<i>изо</i> -C ₁₇	<i>изо</i> -C ₂₀	10,9	—
<i>n</i> -C ₁₇	<i>n</i> -C ₂₀	2,6	—

миновой кислоты связаны между собой через гидроксильную группу глицеролевой кислоты.

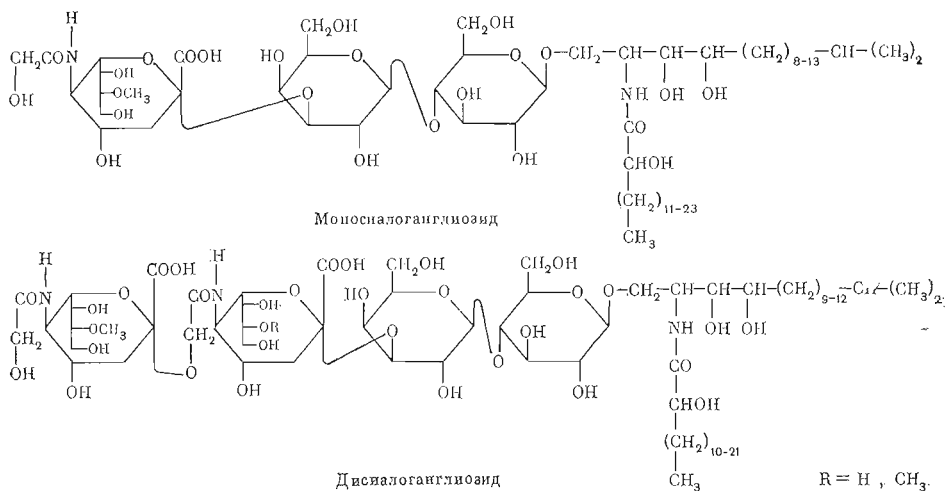
α -Конфигурация кетозидных связей сиаловых кислот в ганглиозидах *A. japonica* определена с помощью нейраминидазы из *Vibrio cholerae*. Фермент отщепляет сиаловые кислоты от моно- и диссиалоганглиозида, однако скорость отщепления значительно меньше, чем в случае ганглиозидов, содержащих незамещенные сиаловые кислоты. По-видимому, присутствие *O*-метильной группы у *C*-8 *N*-гликолилнейраминовой кислоты оказывает такое же влияние на скорость ферментолиза, как и *O*-ацетильная группа. Известно, что сиаловые кислоты, *O*-ацетилированные в положении 7, 8 или 9, отщепляются нейраминидазами медленнее, чем незамещенные кислоты [19].

Структура липидной части ганглиозидов установлена с помощью метанолиза и периодатного окисления. В продуктах метанолиза ганглиозидов обнаружены метиловые эфиры высших жирных кислот и сфингозиновые основания. По данным ТСХ, как в моно-, так и в диссиалоганглиозиде высшие жирные кислоты являются смесью незамещенных и α -оксикислот, в которых последние составляют ~90%, а сфингозиновые

основания идентичны фитосфингозину. Оба типа кислот были выделены препаративной ТСХ и анализированы с помощью ГЖХ, α -оксикислоты предварительно метилировали или ацетилировали. Как видно из табл. 1, состав кислот моно- и дисиалоганглиозидов близок, хотя не одинаков. В моносиалоганглиозиде среди незамещенных кислот главными являются стеариновая (62,6% от смеси незамещенных кислот) и пальмитиновая (19,5%) кислоты, а среди оксикислот — α -оксипальмитиновая (45% от суммы α -оксикислот); кроме того, в заметных количествах присутствуют C_{15} -, C_{22} -, C_{23} - и C_{21} - α -оксикислоты. В дисиалоганглиозиде среди незамещенных кислот преобладают пальмитиновая, стеариновая и бегеновая кислоты, а среди оксикислот — α -оксипальмитиновая (30%), в заметных количествах присутствуют C_{14} -, C_{22} -, C_{23} - и C_{21} - α -оксикислоты. Таким образом, состав высших жирных кислот ганглиозидов *A. japonica* близок к составу кислот ганглиозидов морских звезд *E. retifera* и *A. amurensis*, где также высоко содержание α -оксикислот с преобладанием α -оксипальмитиновой кислоты, а среди незамещенных кислот главными компонентами являются пальмитиновая и стеариновая кислоты [10].

Состав сфингозиновых оснований ганглиозидов (табл. 2) определен в результате анализа высших жирных спиртов, полученных после периодатного окисления ганглиозидов и последующего восстановления образовавшихся высших жирных альдегидов KVH_4 , с помощью ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии. Обнаружены спирты с прямой цепью и разветвленные, последние составляют более 60% каждой смеси спиртов. Положение разветвления на конце цепи следует из масс-спектрометрического анализа ацетатов спиртов [16]. Главными сфингозиновыми основаниями обоих ганглиозидов являются *изо*-фитосфингозины C_{17} и C_{18} . По составу сфингозиновых оснований ганглиозиды *A. japonica* близки ганглиозидам морских звезд *P. pectinifera* [13, 14, 20], *E. retifera* [10, 16] и *A. amurensis* [10, 17], где также высоко содержание фитосфингозинов изостроения.

Таким образом, на основании изложенных данных для ганглиозидов печени морской звезды *A. japonica* предложены следующие структуры:



При сравнении структур олигосахаридных цепей ганглиозидов *A. japonica* и других видов морских звезд отряда Педицелляриевых видны черты сходства и различия между ними. По составу сахаров (за исключением сиаловых кислот) ганглиозиды *A. japonica* подобны ганглиозиду *D. nipon*, также содержащему только глюкозу и галактозу [9], но отличаются от ганглиозидов *E. retifera* [10, 16] и *A. amurensis* [10, 17], которые кроме этих моносахаридов содержат N-ацетилгалактозамин. 8-О-Метил-N-гликозилнейраминавая кислота, которая является главным типом сиаловых кислот ганглиозидов *A. japonica*, входит также в состав ганглиозидов *A. amurensis*, в то время как в ганглиозиды *D. nipon* и *E. retifera* присутствует N-ацетилнейраминавая кислота. В дисиалоганглиозиде *A. japonica*

впервые обнаружен новый тип связи между остатками N-гликолилнейраминных кислот — через гидроксильную группу гликолевой кислоты. Дальнейшее исследование ганглиозидов морских звезд отряда Педицелляриевых позволит выяснить, существуют ли общие типы структур сиалогликолипидов для более мелких таксономических групп, например подсемейств или родов, и встречаются ли другие типы структур ганглиозидов в этом отряде.

Экспериментальная часть

Морские звезды *A. japonica* собраны в заливе Посыет Японского моря в сентябре-октябре. В работе использовали N-ацетилнейраминную кислоту (Koch-Light, Англия), N-гликолилнейраминную кислоту (Sigma, США), нейраминидазу из *V. cholerae* (500 ед. акт./мл, Calbiochem, США). Хлороформ перед использованием перегоняли, остальные растворители использовали без предварительной очистки.

Аналитическую ТСХ проводили на готовых пластинках с силикагелем G60 (Merck, ФРГ), препаративную — на силикагеле G-60H (Merck, ФРГ). Сиаловые кислоты анализировали на силикагеле, импрегнированном 0,2 M NaH_2PO_4 . Использовали системы растворителей: для ганглиозидов — хлороформ — метанол — вода (60 : 40 : 10) и хлороформ — метанол — 2 M NH_4OH (60 : 35 : 8), для нейтральных гликолипидов — хлороформ — метанол — вода (64 : 24 : 4), для сиаловых кислот — пропанол — вода (7 : 3) и пропанол — вода — 2 M NH_4OH (30 : 10 : 5), для сфингозиновых оснований — хлороформ — метанол — 2 M NH_4OH (40 : 10 : 1), для алифатических спиртов — хлороформ — метанол (49 : 1,5), для метиловых эфиров высших жирных кислот — дихлорэтан. Обнаруживали гликолипиды орциновым [21] и резорциновым [22] реактивами, сиаловые кислоты — резорциновым реактивом, сфингозиновые основания — 2% раствором нингидрина в ацетоне, алифатические спирты и метиловые эфиры высших жирных кислот — конц. H_2SO_4 .

Общий липидный экстракт из печени морских звезд и сырой препарат полярных гликолипидов получали как описано ранее [1].

Колоночную хроматографию липидов на DEAE-целлюлозе (CH_3COO^-) проводили как описано ранее [1]. Моносиалоганглиозид элюировали 0,025 M раствором ацетата аммония в метаноле, дисиалоганглиозид — 0,25 M раствором соли. Фракции (по 50 мл) анализировали с помощью ТСХ. Сходные по составу фракции объединяли, упаривали, остаток растворяли в воде, диализовали против дистиллированной воды, лиофилизировали и очищали ганглиозиды с помощью препаративной ТСХ. Из 3,15 г сырого препарата получено 149 мг моносиалоганглиозида и 42 мг дисиалоганглиозида.

ГЖХ выполняли на приборе Pye Unicam 104, 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 тридегтерометилированные метилгликозиды нейтральных сахаров — на колонке с 3% NGA на диатомите С при 160°С, тридегтерометилированные производные метиловых эфиров метилкетозидов сиаловых кислот — на колонке с 3% OV-I на диатомите С при 235°С и 3% OV-17 на том же носителе, алифатические спирты и их ацетаты, а также метиловые эфиры высших жирных кислот — на колонке с OV-I при 160–220°С (3°/мин) и 180–280°С соответственно.

Хроматомасс-спектрометрический анализ проводили на приборе M-80 A Hitachi, снабженном колонкой с 2% OV-1, при ионизирующем напряжении 70 эВ, с компьютерной системой обработки данных M-003.

Масс-спектры тридегтерометилированных ганглиозидов снимали на том же приборе при температуре нагрева образцов 270–300°С.

Аналитические методы: сиаловые кислоты количественно определяли с резорциновым реактивом [23, 24], сфингозиновые основания — по методу Лаутера и Трэмса [25], гексозы в виде ацетатов гекситов — с помощью ГЖХ, используя в качестве внутреннего стандарта инозит.

Полный кислотный гидролиз гликолипидов проводили 2 М HCl при 100°С в течение 4 ч. Гидролизат промывали 1 мл хлороформа, подный слой нейтрализовали смолой IRA-410 (HCO₃⁻), обрабатывали KВН₃ в течение 3 ч, нейтрализовали 2 М СН₃СООН, пропускали через колонку со смолой IR-120 (H⁺), элюировали водой. Элюат упаривали с добавлением метанола в конце упаривания, остаток обрабатывали 16 ч смесью уксусного ангидрида с пиридином (1:1) при 20°С и анализировали ГЖХ.

Частичный кислотный гидролиз ганглиозидов проводили 0,05 М Н₂SO₄ при 80°С в течение 1,5 ч, гидролизат диализовали 20 ч против дистиллированной воды. Недиализуемые продукты льофилизovali и анализировали ТСХ, нейтральные гликолипиды выделяли с помощью ТСХ и определяли моносакхаридный состав после их полного кислотного гидролиза. Внешний водный раствор, полученный при диализе, упаривали до 5 мл, пропускали через колонку с дауэксом 2Х8 (СН₃СОО⁻), колонку промывали 10 мл воды, сиаловые кислоты элюировали 1 М Na-ацетатным буфером, рН 4,6 [23]. Кислый элюат денозилировали смолой IR-120 (H⁺) и анализировали сиаловые кислоты с помощью ТСХ.

Тридейтерометилирование ганглиозидов проводили по методу Хакомори [26], используя С²Н₃I. Полученные производные экстрагировали хлороформом, диализовали против дистиллированной воды, очищали с помощью ТСХ и анализировали методом масс-спектрометрии. Тридейтерометилированные ганглиозиды нагревали с 0,5 М HCl в метаноле при 80°С в течение 14 ч, упаривали, остаток выдерживали 16 ч в эксикаторе над КОН и P₂O₅. Частично тридейтерометилированные метилгликозиды анализировали с помощью ГЖХ, а после ацетилирования уксусным ангидридом в пиридине (1:1) при 100°С в течение 2 ч — с помощью хроматомасс-спектрометрии.

Жесткий метанолиз тридейтерометилированных ганглиозидов проводили 3 М HCl в метаноле при 80°С в течение 50 ч. Частично тридейтерометилированные метилгликозиды обрабатывали 2 ч уксусным ангидридом в пиридине (1:1) при 100°С и анализировали ГЖХ-масс-спектрометрией.

Периодатное окисление ганглиозидов проводили 0,02 М NaIO₄ при 20°С в течение 16 ч и смесь обрабатывали KВН₃ как описано ранее [1]. Алифатические спирты экстрагировали гексаном и анализировали ГЖХ, а после ацетилирования уксусным ангидридом в пиридине при 20°С в течение 16 ч — с помощью хроматомасс-спектрометрии.

Окисление хромовым ангидридом. Ацетилированные производные асиалоганглиозидов обрабатывали CrO₃ в смеси уксусная кислота — уксусный ангидрид (9:1) при 40°С в течение 40 мин по методу [27]. Моносакхариды анализировали с помощью ГЖХ.

Метанолиз ганглиозидов проводили 1 М HCl в СН₃ОН при 80°С в течение 18 ч. Метилловые эфиры высших жирных кислот и сфингозиновые основания выделяли как описано ранее [1] и анализировали ТСХ. Метилловые эфиры пезамещенных и оксикислот разделяли препаративной ТСХ, метилловые эфиры оксикислот метилировали по методу Хакомори или ацетилировали. Оба типа кислот анализировали с помощью ГЖХ.

Ферментативный гидролиз ганглиозидов нейраминидазой из *V. cholerae* осуществляли в 0,05 М ацетатном буфере, рН 5,5, при 37°С, как описано ранее [28], реакционную смесь анализировали ТСХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kochetkov N. K., Zhakova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. Biochim. et. biophys. acta, 1973, v. 326, № 1, p. 74–83.
2. Hoshi M., Nagai Y. Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 388, № 1, p. 152–162.
3. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Chekareva N. V. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 424, № 2, p. 274–283.
4. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 7, с. 937–942.
5. Кочетков Н. К., Смирнова Г. П., Глухoded И. С. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1093–1099.
6. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1667–1673.

7. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 1, с. 123-130.
8. Dabrowski J., Shashkov A. S., Smirnova G. P., Chekareva N. V. In: Abst. XII Int. Carbohydr. Symp./Eds. Vliegenthart J. F. G., Kamerling J. P., Veldink G. A. Vank Publishers, 1984, p. 446.
9. Жукова И. Г., Богдановская Т. А., Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. Докл. АН СССР, 1973, т. 208, № 4, с. 981-984.
10. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 712, № 3, p. 650-658.
11. Sugita M. J. Biochem. (Tokyo), 1979, v. 86, № 2, p. 289-300.
12. Sugita M. J. Biochem. (Tokyo), 1979, v. 86, № 3, p. 765-772.
13. Smirnova G. P., Kochetkov N. K. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 618, № 3, p. 426-435.
14. Kochetkov N. K., Smirnova G. P. Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 759, № 1, p. 192-198.
15. Смирнова Г. П., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1650-1655.
16. Смирнова Г. П., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 102-108.
17. Смирнова Г. П., Глухoded И. С., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 7, с. 971-979.
18. Kamerling J. P., Vliegenthart J. F. G. In: Sialic acids, chemistry, metabolism and function/Ed. Schauer R. Wien, New York: Springer-Verlag, 1982, p. 95-125.
19. Schauer R., Faillard H. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1968, v. 349, № 8, p. 961-968.
20. Кочетков Н. К., Смирнова Г. П. Биорган. химия, 1977, т. 3, № 8, с. 1048-1054.
21. 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.
22. Svennerholm L. Biochim. et biophys. acta, 1957, v. 24, № 3, p. 604-611.
23. Svennerholm L. Acta chem. scand., 1958, v. 12, № 3, p. 547-554.
24. Miettinen T., Takki-Luukkainen I. T. Acta chem. scand., 1959, v. 13, № 4, p. 856-858.
25. Lauter C. J., Trams E. G. J. Lipid Res., 1962, v. 3, № 1, p. 136-138.
26. Hakomori S. J. Biochem. (Tokyo), 1964, v. 55, № 2, p. 205-208.
27. Laine R. A., Renkonen O. J. Lipid Res., 1975, v. 16, № 2, p. 102-106.
28. Ishizuka I., Kloppenburg M., Wiegandt H. Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 210, № 2, p. 229-303.

Поступила в редакцию
19.II.1986

GANGLIOSIDES OF THE STARFISH *APHELASTERIAS JAPONICA*. DETECTION OF LINKAGE BETWEEN N-GLYCOLYLNEURAMINIC ACIDS VIA A GLYCOLIC ACID HYDROXYL

SMIRNOVA G. P., KOCHETKOV N. K., SADOVSKAYA V. L.*

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; *All-Union Institute of Applied Molecular Biology
and Genetics, V. I. Lenin Academy of Agricultural Sciences, Moscow*

Mono- and disialogangliosides have been isolated from hepatopancreas of the starfish *Aphelasterias japonica*. Their structures have been elucidated by total and partial acid hydrolyses, trideuteriomethylation analysis, periodate oxidation, methanolysis, chromium trioxide oxidation and neuraminidase treatment. Lactosylceramide was identified as the structural base of both gangliosides. 8-O-Methyl-N-glycolylneuraminic acid residue in the monosialoganglioside and the disialosyl fragment in the disialoganglioside were found to be connected with the galactose residue of lactosylceramide by α -2 \rightarrow 3 linkage. The disialosyl fragment contained N-glycolylneuraminic acid and its 8-O-methyl derivative (the main component) which were bound through the hydroxy group of the glycolic acid residue. The long-chain bases of the gangliosides were found to be mixtures of phytosphingosines with both branched and linear chains. The fatty acids were shown to be the mixtures of normal and α -hydroxy acids, the latter being predominant. The composition of the lipid moieties of the gangliosides was determined by GLC and GLC-MS.