



УДК 593.94.088 : 547.95

ГАНГЛИОЗИДЫ ОФИУРЫ *OPHIURA SARSI*

Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К.

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

Из офиуры *Ophiura sarsi* с помощью ионообменной хроматографии на DEAE- и TEAE-целлюлозе и препаративной тонкослойной хроматографии на силикагеле выделены два моносиалоганглиозида. Их структура определена с помощью полного и частичного кислотного гидролиза, метанолиза, метилирования, периодатного окисления, ферментативного расщепления нейтрамидазой, сольволитического десульфатирования, окисления хромовым ангидридом и смесью  $\text{NaIO}_4$ — $\text{KMnO}_4$ . Показано, что минорный ганглиозид (I) имеет строение сиалозил-( $\alpha$ -2-6)-глюкопиранозил-( $\beta$ -1-1)-церамида, а главный ганглиозид (II) дополнительно содержит сульфатную группу в положении 8 остатка сиаловой кислоты. В состав липидной части ганглиозидов входит высшие жирные незамещенные кислоты и сфингозин. Их состав определен с помощью ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии.

Ранее мы показали, что ганглиозиды, которые являются специфическими компонентами клеточных мембран позвоночных, присутствуют в тканях одного типа беспозвоночных — иглокожих [1]. К настоящему времени определена структура ряда ганглиозидов, выделенных из двух классов иглокожих — морских ежей и морских звезд. Оказалось, что ганглиозиды морских ежей отличаются от ганглиозидов позвоночных и имеют общий для этого класса иглокожих тип структуры углеводных цепей: они содержат только остатки глюкозы и сиаловой кислоты, которая присоединена к глюкозе  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  6-связью [2]. Сиаловая кислота (N-ацетил- или N-гликолилнейтраминовая кислота) может содержать сульфатную группу в положении 8. В противоположность им ганглиозиды морских звезд не имеют общего для всего класса типа построения углеводных цепей и отличаются большей сложностью и разнообразием структур [2]. Ганглиозиды других классов иглокожих до сих пор изучены не были. В настоящей работе приведены данные по выделению и установлению структуры ганглиозидов офиуры *Ophiura sarsi*.

Сырой препарат полярных гликолипидов получали из общего липидного экстракта офиур *O. sarsi* после диализа, последующего упаривания водного слоя, образовавшегося внутри диализного мешка, и лиофилизации. Этот препарат, по данным ТСХ, содержал два сиалогликолипида, главный и минорный, а также некоторое количество нейтральных гликолипидов, фосфолипидов и пигментов. Сиалогликолипиды были выделены из этой смеси с помощью ионообменной хроматографии на колонках с DEAE- и TEAE-целлюлозой ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ). Минорный ганглиозид (I) элюировался с DEAE-целлюлозы 0,025 М раствором ацетата аммония в метаноле как моносиалогликолипид, а главный ганглиозид (II) — 0,1 М раствором этой соли и, следовательно, обладал более сильными кислотными свойствами или имел более длинную углеводную цепь. Для получения ганглиозидов в индивидуальном состоянии потребовалось их дополнительная очистка на колонке с TEAE-целлюлозой, а для главного ганглиозид (II), кроме того, и препаративная ТСХ на силикагеле.

Выделенные соединения содержали сиаловые кислоты и нейтральные сахара (специфическое окрашивание резорциновым [3] и ординовым [1] реактивами соответственно) и не содержали фосфатной группы (отрицательная реакция с молибденовым реактивом [4]) и свободной аминогруппы (нет окраски с нингидрином). В ИК-спектрах этих ганглиозидов имелись интенсивные полосы поглощения амидной группы (1640 и 1550  $\text{cm}^{-1}$ ), спир-

товых гидроксильных (1040 и 1080  $\text{см}^{-1}$ ), ассоциированных гидроксильных (3300 и 3450  $\text{см}^{-1}$ ), ионизированной карбоксильной группы (1405  $\text{см}^{-1}$ ) и валентных колебаний С—Н-связей алифатической цепи (2860 и 2930  $\text{см}^{-1}$ ), а в ИК-спектре ганглиозида (II) присутствовали, кроме того, полоса поглощения 1235  $\text{см}^{-1}$ , соответствующая колебаниям S → O-связи ионного сульфата, и полоса 810  $\text{см}^{-1}$ , соответствующая O—S-связи эфира серной кислоты [5]. На основании полученных данных можно было предположить, что ганглиозид (I) является моносиалоганглиозидом, а ганглиозид (II) — сульфатированным ганглиозидом, содержащим одну сульфатную группу.

Структуры олигосахаридных цепей ганглиозидов (I) и (II) установлены на основании результатов полного и частичного кислотного гидролиза, метилирования, периодатного окисления, кислотного метанолиза, ферментативного гидролиза нейраминидазой, сольволитического десульфатирования и окисления хромовым ангидридом.

В продуктах полного кислотного гидролиза ганглиозидов (I) и (II) в качестве единственного нейтрального моносахарида была обнаружена глюкоза. Количественные измерения показали, что молекула каждого ганглиозида содержит по одному остатку глюкозы. При частичном кислотном гидролизе ганглиозидов (I) и (II) отщепляются сиаловые кислоты и образуется нейтральный моноглюкозилцерамид. Сиаловые кислоты количественно определяли реакцией с резорциновым реактивом [6], причем в случае ганглиозида (II) — без предварительного выделения на колонке с дауэксом  $2 \times 8$  ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ). Было показано, что оба ганглиозида содержат по одному остатку сиаловой кислоты на 1 моль. Сиаловая кислота ганглиозида (II) не элюировалась с дауэкса  $2 \times 8$  ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) 4 М ацетатным буфером, pH 4,6, в условиях, применяемых обычно для выделения сиаловых кислот [7], и, следовательно, обладала более сильными кислотными свойствами, чем обычные сиаловые кислоты. Такое же поведение мы отмечали ранее для сульфатированных сиаловых кислот, выделенных из ганглиозидов морских ежей [8—10]. На основании этих данных мы предположили, что в ганглиозиде (II) сульфатная группа связана с остатком сиаловой кислоты. Для подтверждения этого предположения мы использовали сольволитическое десульфатирование ганглиозида (II) нагреванием в диоксане в присутствии хлоргидрата пиридина [11]. Как показал анализ с помощью ТСХ, десульфатирование прошло полностью и образовался новый сиалогликолипид, менее полярный, чем исходный, и совпадающий по полярности с моносиалоганглиозидом (I). В ИК-спектре полученного соединения отсутствовали полосы поглощения 1235 и 810  $\text{см}^{-1}$ , характерные для сульфатной группы. При хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) десульфатированный ганглиозид (II) элюировался 0,025 М раствором ацетата аммония в метаноле, как моносиалоганглиозиды, не содержащие сульфатной группы. Сиаловая кислота, полученная после частичного кислотного гидролиза десульфатированного ганглиозида (II), элюировалась с колонки, заполненной дауэксом  $2 \times 8$  ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ), в обычных условиях. По данным ТСХ, сиаловые кислоты ганглиозида (I) и десульфатированного ганглиозида (II) являются смесью N-ацетил- и N-гликолилнейраминных кислот в соотношении  $\sim 1 : 2$ . Полученные данные подтверждают, что в состав ганглиозида (II) входит сульфатированная сиаловая кислота.

Положение сульфатной группы определяли с помощью периодатного окисления исходного и десульфатированного ганглиозида (II). Сиаловые кислоты, полученные после частичного кислотного гидролиза ганглиозидов, окисленных периодатом и обработанных  $\text{KBH}_4$ , характеризовали спектром поглощения хромофоров с резорциновым реактивом. В случае исходного ганглиозида (II) был получен спектр, характерный для  $\text{C}_9$  сиаловых кислот ( $\lambda_{\text{макс}}$  585 нм), а в случае десульфатированного ганглиозида — характерный для  $\text{C}_7$  сиаловых кислот ( $\lambda_{\text{макс}}$  630 нм) [12]. Следовательно, в исходном ганглиозиде сиаловая кислота устойчива к окислению периодатом, т. е. не имеет свободных винильных гидроксильных групп, что возможно только при замещении ее по гидроксилу при C-8, а в десуль-

фатированном производном гидроксильные группы при С-7 и С-8 свободны. Отсюда вытекает, что сульфатная группа в ганглиозиде (II) находится в положении 8 сиаловой кислоты. Ранее сульфатированные производные сиаловых кислот были обнаружены нами в ганглиозидах морских ежей [8—10], а недавно такие же производные были найдены и в минорных ганглиозидах слизистой желудка быка [13, 14].

Положение связи между моносахаридами определяли с помощью метилирования. Масс-спектры полностью метилированных производных ганглиозида (I) и десульфатированного ганглиозида (II) были практически одинаковы и содержали пики ионов с  $m/z$  406 и 376, соответствующие концевым N-гликолил- и N-ацетилнейраминовым кислотам, пики с  $m/z$  374 и 344, образующиеся из кислот в результате потери метанола, а также пик с  $m/z$  683, соответствующий фрагменту, содержащему олигосахаридную цепь, включающую N-гликолилнейраминовою кислоту, глюкозу и С-1 — С-2-участок сфингозинового основания. Аналогичный фрагмент, содержащий N-ацетилнейраминовою кислоту ( $m/z$  653), имеет малую интенсивность. Присутствие в спектрах этих фрагментов подтверждает, что олигосахаридная цепь ганглиозидов (I) и (II) представляет собой дисахарид сиалозилглюкозу, связанный с первичной гидроксильной группой сфингозинового основания. После метанолиза метилированных ганглиозидов с помощью ГЖХ были обнаружены  $\alpha$ - и  $\beta$ -метил-2,3,4-три-О-метилглюкопиранозиды. Следовательно, в каждом ганглиозиде остаток глюкозы замещен сиаловой кислотой по С-6. Такой тип связи сиаловых кислот характерен для ганглиозидов морских ежей и не встречается в сиалогликоконъюгатах из других животных [2].

Для определения конфигурации глюкозидной связи глюкозилцерамиды, полученные после частичного кислотного гидролиза ганглиозидов (I) и (II), ацетилировали и окисляли хромовым ангидридом. В обоих случаях глюкоза разрушилась практически полностью; следовательно, она связана с церамидом  $\beta$ -гликозидной связью.

Конфигурация кетозидных связей сиаловых кислот в ганглиозидах определена с помощью нейраминидазы из *Vibrio cholerae*. Ганглиозид (II) устойчив к действию фермента, в то время как в ганглиозиде (I) и десульфатированном ганглиозиде (II) сиаловые кислоты отщепляются полностью. Эти данные указывают на то, что в обоих ганглиозидах сиаловые кислоты связаны  $\alpha$ -кетозидными связями, и подтверждают присутствие сульфатной группы у остатка сиаловой кислоты в ганглиозиде (II), которая препятствует действию нейраминидазы.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что ганглиозид (I) представляет собой сиалозил-( $\alpha$ 2-6)-глюкопиранозил-( $\beta$ 1-4)-церамид, а ганглиозид (II) — его 8-О-сульфатированное производное.

Строение липидной части ганглиозидов (I) и (II) определено с помощью кислотного метанолиза. В продуктах метанолиза обоих ганглиозидов с помощью ТСХ обнаружены метиловые эфиры высших жирных незамещенных кислот и сфингозин. Состав метиловых эфиров кислот определен с помощью ГЖХ. Как видно из табл. 1, в обоих ганглиозидах присутствуют только насыщенные кислоты и более половины всех кислот составляют пальмитиновая и стеариновая кислоты. Около 12% от суммы кислот приходится на долю кислот с разветвленной цепью, которые имеют несколько меньшие времена удерживания, чем соответствующие кислоты с прямой цепью, и время выхода их с колонки не меняется после гидрирования.

Состав сфингозинов главного ганглиозида (II) определен с помощью ГЖХ-масс-спектрометрического анализа высших жирных кислот, образующихся при окислении сфингозинов смесью  $\text{NaIO}_4$ - $\text{KMnO}_4$  [15]. Согласно табл. 2, ганглиозид (II) содержит широкий набор сфингозинов (от  $\text{C}_{13}$  до  $\text{C}_{22}$ ), среди которых преобладает  $\text{C}_{20}$ -сфингозин. Около 25% смеси составляют сфингозины с разветвленной цепью. Интересно, что в большинстве исследованных ганглиозидов иглокожих сфингозиновым основанием является триоксиаминоспирт (фитосфингозин) и только в ганглиозидах морского ежа *Anthocidaris crassispina* обнаружены  $\text{C}_{18}$ -сфингозин и немного  $\text{C}_{18}$ -дигидросфингозина [16].

Состав высших жирных кислот ганглиозидов *O. sarsi*

Кислота	Ганглиозид (I)	Ганглиозид (II)	Кислота	Ганглиозид (I)	Ганглиозид (II)
C <sub>14</sub> :0	3,6	4,5	C <sub>19</sub> *:0	—	2,3
C <sub>15</sub> *:0	—	1,6	C <sub>19</sub> :0	—	0,4
C <sub>15</sub> :0	14,7	3,0	C <sub>20</sub> *:0	—	1,6
C <sub>16</sub> *:0	8,8	—	C <sub>20</sub> :0	3,2	2,1
C <sub>16</sub> :0	42,5	42,0	C <sub>21</sub> *:0	—	3,7
C <sub>17</sub> :0	2,5	1,5	C <sub>21</sub> :0	—	1,6
C <sub>18</sub> *:0	3,2	—	C <sub>22</sub> *:0	—	3,5
C <sub>18</sub> :0	15,2	29,2	C <sub>22</sub> :0	6,3	3,0

Примечание. C<sub>n</sub>\*:0 — разветвленные высшие жирные кислоты.

Таблица 2

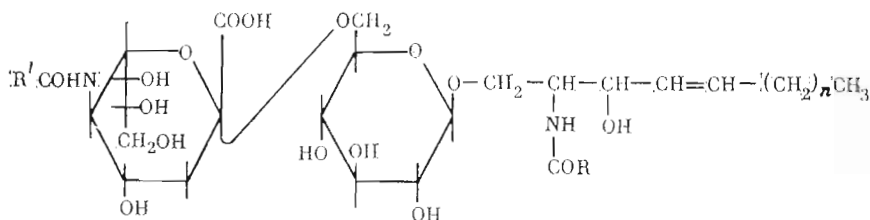
Состав сфингозинов ганглиозида (II)

Сфингозины	Содержание, % от суммы	Сфингозины	Содержание, % от суммы
C <sub>13</sub>	9,8	C <sub>18</sub>	8,6
C <sub>14</sub>	14,4	C <sub>19</sub> *	7,4
C <sub>16</sub>	2,4	C <sub>19</sub>	3,7
C <sub>17</sub> *	0,5	C <sub>20</sub>	24,0
C <sub>17</sub>	3,7	C <sub>22</sub> *	8,3
C <sub>18</sub> *	7,4	C <sub>22</sub>	9,8

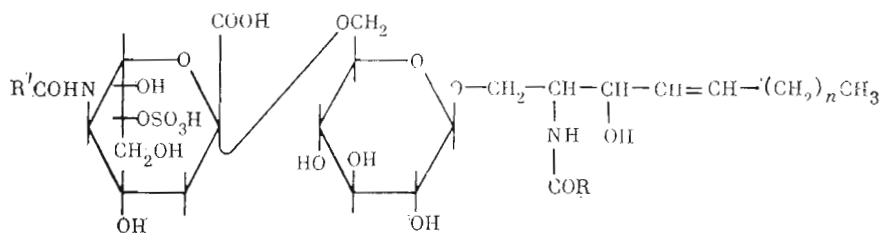
Примечание. C<sub>n</sub>\* — разветвленные сфингозины.

Из-за недостатка материала состав сфингозинов минорного ганглиозида (I) не исследовали.

На основании приведенных выше данных для ганглиозидов офиуры *O. sarsi* предложены следующие структуры:



Ганглиозид I



Ганглиозид II, n = 7-16

R — остаток высшей жирной кислоты  
R' — CH<sub>3</sub> (30%) и CH<sub>2</sub>OH (70%)

Таким образом, ганглиозиды, выделенные из офиуры *O. sarsi*, по строению олигосахаридных цепей похожи на ганглиозиды морских ежей и существенно отличаются от ганглиозидов морских звезд. Этот результат оказался довольно неожиданным, так как в настоящее время в биологии принято считать, что класс офиур (*Ophiuroidea*) наиболее близок к классу морских звезд (*Asteroidea*), и эти два класса объединяют в одну группу *Asterozoa*. Более того, эволюция офиур дает основание предполагать, что они произошли от *Asteroidea*; развитие же морских ежей (*Echinoidea*) шло независимым путем [17, 18]. Исходя из этого, можно было ожидать сходства структур биологически важных компонентов клеточных мембран, в том числе ганглиозидов, у офиур и морских звезд. С другой стороны, результаты исследования личиночных стадий развития иглокожих показывают, что большее родство существует между офиурами и морскими ежами, чем морскими звездами [18], и факт структурного сходства ганглиозидов этих двух классов иглокожих, по-видимому, подтверждает этот вывод. Таким образом, структурные исследования ганглиозидов иглокожих, как и других биологически важных соединений, могут представить интерес с точки зрения эволюции этих животных. Необходимо также выяснить, является ли обнаруженный здесь тип структуры ганглиозидов общим для всего класса офиур, как это наблюдалось в случае морских ежей.

### Экспериментальная часть

Офиуры *O. sarsi* собраны в сублиторальной зоне залива Посыет Японского моря в августе-сентябре. Липидный экстракт целых животных и сырой препарат сиалогликолипидов получали по ранее описанной методике [19].

Использовали N-ацетилнейраминную кислоту (Koch-Light), N-гликолилнейраминную кислоту (Sigma), нейраминидазу *V. cholerae* (500 ед. акт./мл, Calbiochem), DEAE-целлюлозу DE-23 (Whatman), триэтиламиноэтил (TEAE)-целлюлозу (Serva). Хлороформ перегоняли перед использованием.

*Колоночная хроматография сиалогликолипидов на DEAE-целлюлозе* ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ). Колонку (3,0 × 38 см) промывали последовательно 2200 мл смеси  $\text{CHCl}_3$ — $\text{CH}_3\text{OH}$  (2 : 1), 1000 мл смеси  $\text{CHCl}_3$ — $\text{CH}_3\text{OH}$  (1 : 1), 2200 мл  $\text{CH}_3\text{OH}$  и далее растворами  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  в  $\text{CH}_3\text{OH}$  (ступенчатый градиент: 1350 мл — 0,025 М, 1100 мл — 0,1 М и 1500 мл — 0,25 М); объем фракций 50 мл. По 2 мл каждой фракции упаривали и определяли содержание сиаловой кислоты с резорциновым реактивом [3]. Фракции, элюированные солью одной концентрации и содержащие ганглиозиды, объединяли, диализовали против дистиллированной воды, упаривали и лиофилизовали. Полученные препараты дополнительно очищали на колонке с TEAE-целлюлозой.

*Колоночная хроматография сиалогликолипидов на TEAE-целлюлозе* ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ). Колонку (2,0 × 16 см) промывали последовательно 250 мл смеси  $\text{CHCl}_3$ — $\text{CH}_3\text{OH}$  (2 : 1), 500 мл  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 200 мл 0,025 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  в  $\text{CH}_3\text{OH}$  и 400 мл 0,1 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  в  $\text{CH}_3\text{OH}$ ; объем фракций 20 мл. По 1 мл каждой фракции упаривали и определяли содержание сиаловой кислоты с резорциновым реактивом [3]. Фракции, элюированные солью одной концентрации и содержащие ганглиозиды, объединяли, диализовали против дистиллированной воды, упаривали и лиофилизовали. Из 5,2 г сырого препарата сиалогликолипидов *O. sarsi* получили ганглиозид (I) в количестве 8 мкмоль по сиаловой кислоте и ганглиозид (II) (после дополнительной очистки с помощью ТСХ) — 98 мкмоль по сиаловой кислоте.

ИК-спектры снимали в таблетках с KBr.

ТСХ проводили на силикагеле 60 Н (Merck, ФРГ). Использовали системы растворителей: для ганглиозидов —  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{CH}_3\text{OH}$  —  $\text{H}_2\text{O}$  (6 : 4 : 1) и  $\text{CHCl}_3$ — $\text{CH}_3\text{OH}$ —2 М  $\text{NH}_4\text{OH}$  (60 : 35 : 8), обнаружение — орциновым [1] и резорциновым [3] реактивами; для нейтральных гликолипидов —  $\text{CHCl}_3$  —  $\text{CH}_3\text{OH}$  —  $\text{H}_2\text{O}$  (16 : 6 : 1), обнаружение — орциновым реактивом; для сиаловых кислот —  $n\text{-C}_3\text{H}_7\text{OH}$ — $\text{H}_2\text{O}$ —2 М  $\text{NH}_4\text{OH}$  (30 : 10 : 5) на

пластинках, импрегнированных 0,2 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  [20], обнаружение — резорциновым реактивом; для сфингозиновых оснований —  $\text{CHCl}_3$ — $\text{CH}_3\text{OH}$  — 2 М  $\text{NH}_4\text{OH}$  (40 : 10 : 1), обнаружение — 0,2% раствором нингидрина в ацетоне; для метиловых эфиров высших жирных кислот — 1,2-дихлорэтан, обнаружение — раствором бромтимолблау и конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

ГЖХ выполняли на приборе фирмы Pye Unicam, серия 104 (Англия), скорость азота 60 мл/мин. Нейтральные моносахариды анализировали в виде ацетатов соответствующих гекситов на колонке с фазой ECNSS-M на диатомите С при 180° С, частично метилированные метилгликозиды — на колонке с 3% NGA на диатомите С при 155° С, метиловые эфиры незамещенных высших жирных кислот — на колонке с 3% OV-1 на диатомите С при 160—260° С (3°/мин).

ГЖХ-масс-спектрометрический анализ метиловых эфиров высших жирных кислот проводили на приборе Varian MAT III (ФРГ), колонка с 3% OV-1, ионизирующее напряжение 70 эВ.

Масс-спектрометрию метилированных ганглиозидов выполняли на приборе Varian MAT CH-6 (США), ионизирующее напряжение 70 эВ, температура нагрева образцов 280° С.

*Аналитические методы:* сфингозиновое основание количественно определяли по методу [21]; сиаловые кислоты — с резорциновым реактивом [3, 6]; гексозы — в виде ацетатов гекситов с помощью ГЖХ, в качестве внутреннего стандарта использовали инозит.

*Полный кислотный гидролиз* гликолипидов проводили 2 М  $\text{HCl}$  при 100° С в течение 4 ч. Реакционную смесь нейтрализовали смолой IRA-410 ( $\text{HCO}_3^-$ ), обрабатывали 1 ч  $\text{KBH}_4$ , нейтрализовали 2 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , деионизировали смолой IR-120 ( $\text{H}^+$ ) и анализировали методом ГЖХ.

*Частичный кислотный гидролиз* ганглиозидов проводили в 0,05 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  при 80° С в течение 1,5 ч. Реакционную смесь диализовали 24 ч против дистиллированной воды при 20° С. Недализуемый продукт лиофилизировали и анализировали ТСХ. Внешний водный слой упарили до 5 мл, пропустили через колонку с дауэксом  $2 \times 8$  ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ), сиаловые кислоты элюировали 1 М  $\text{Na}$ -ацетатным буфером, рН 4,6 [6], элюат деионизировали смолой IR-120 ( $\text{H}^+$ ). Сиаловые кислоты определяли количественно по методу [3].

*Метилирование* ганглиозидов проводили по Хакомори [22]. Полученные производные экстрагировали  $\text{CHCl}_3$ , диализовали против воды, очищали препаративной ТСХ и анализировали с помощью масс-спектрометрии. Далее метилированные ганглиозиды подвергали метанолизу 0,5 М  $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{OH}$  при 80° С в течение 16 ч. Частично метилированные метилгликозиды анализировали ГЖХ.

*Полный кислотный метанолиз* гликолипидов проводили 3 М  $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{OH}$  при 80° С в течение 18 ч. Метиловые эфиры высших жирных кислот и сфингозиновые основания выделяли как описано ранее [19]. Метиловые эфиры незамещенных кислот очищали препаративной ТСХ и анализировали методом ГЖХ. Сфингозиновое основание ганглиозида (II) растворяли в 0,5 мл *трет*-бутанола, добавляли 1 мл 5 мМ  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 0,5 мл 0,1 М  $\text{NaIO}_4$  и 0,5 мл 0,01 М  $\text{KMnO}_4$ . Реакционную смесь встряхивали 2 ч при 20° С, затем добавляли твердый  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , подкисляли и извлекали высшие жирные кислоты 10 мл эфира [15]. Полученный продукт подвергали полному кислотному метанолизу 0,5 М  $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{OH}$  при 80° С в течение 16 ч. Метиловые эфиры жирных кислот извлекали гексаном и анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

*Периодатное окисление* ганглиозидов проводили 16 ч 0,02 М  $\text{NaIO}_4$  при 20° С. К реакционной смеси добавляли сначала 10% водный этиленгликоль и через 10 мин  $\text{KBH}_4$  до рН 8,0. Через 1 ч избыток  $\text{KBH}_4$  разрушали 2 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и реакционную смесь диализовали против дистиллированной воды. Недализуемый продукт лиофилизировали и подвергали частичному кислотному гидролизу. Сиаловые кислоты выделяли, как описано выше, анализировали ТСХ и характеризовали спектром поглощения с резорциновым реактивом [3].

Десульфатирование ганглиозида (II) (3 мг) проводили в 3 мл абс. диоксиана в присутствии 1—2 кристаллов  $C_5H_5N \cdot HCl$  при кипячении в течение 10 мин [11]. К охлажденной смеси добавляли  $Na_2CO_3$  и диализовали против дистиллированной воды. Педиализуемый продукт лиофилизировали и анализировали колоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе ( $CH_3COO^-$ ) и с помощью ТСХ.

Окисление хромовым ангидридом. Нейтральные гликолипиды, полученные при частичном кислотном гидролизе ганглиозидов, ацетилировали смесью уксусный ангидрид — пиридин (1 : 1) при 20° С в течение 16 ч, упаривали с добавлением толуола, остаток растворяли в смеси уксусная кислота — уксусный ангидрид (9 : 1) и обрабатывали  $CrO_3$ , как описано ранее [23]. Моносахариды анализировали с помощью ГЖХ.

Ферментативный гидролиз ганглиозидов проводили нейраминидазой из *V. cholerae* в 0,05 М Na-ацетатном буфере, рН 5,5, по методу [24]. Реакционную смесь анализировали ТСХ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Смирнова Г. П. В кн.: Прогресс химии углеводов. М.: Наука, 1985, с. 126—148.
3. Svennerholm L. *Biochim. et biophys. acta*, 1957, v. 24, № 3, p. 604—611.
4. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. *J. 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 Press, 1971, v. 2, part 3, p. 299—345.
6. Miettinen T., Takki-Luukkainen I. T. *Acta chem. scand.*, 1959, v. 13, № 4, p. 856—858.
7. Svennerholm L. *Acta chem. scand.*, 1958, v. 12, № 3, p. 547—554.
8. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Chekareva N. V. *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 424, № 2, p. 274—283.
9. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 11, с. 1667—1673.
10. Dabrowsky J., Shashkov A. S., Smirnova G. P., Chekareva N. V. In: XIIth Int. Carbohydr. Symp., Abstracts/Eds Vliegenthart J. F. G., Kamerling J. P., Veldink G. A. Zeist: Vonk Publishers, 1984, p. 446.
11. Кочетков Н. К., Усов А. И., Адамьяц К. С. *Журн. общ. химии*, 1972, т. 42, с. 1617—1622.
12. Kuhn R., Gauche A. *Chem. Ber.*, 1965, B. 98, № 2, S. 395—413.
13. Slomiany B. L., Kojima K., Hanas-Grustka Z., Murty V. E. N., Galeshi E. I., Slomiany A. Eur. J. Biochem., 1981, v. 119, № 3, p. 647—650.
14. Slomiany A., Kojima K., Hanas-Grustka Z., Slomiany B. L. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1981, v. 100, № 2, p. 778—784.
15. Weiss B. In: *Lipid chromatographic analysis*/Ed. Marinetti G. V. New York, Basel: Marcel Dekker, 1976, v. 2, p. 701—712.
16. Hoshi M., Nagai J. *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 388, p. 152—162.
17. Дьяконов А. М. В кн.: *Морские звезды морей СССР*. М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1950. 203 с.
18. Fell H. B., Pawson D. L. In: *Physiology of Echinodermata*/Ed. Boolootian R. A. N. Y.: Wiley Intersci., 1966, p. 1—48.
19. Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. *Biochim. et biophys. acta*, 1973, v. 326, № 1, p. 74—83.
20. Hotta K., Hamazaki H., Kurokawa M. *J. Biol. Chem.*, 1970, v. 245, № 20, p. 5434—5440.
21. Lauter C. J., Trams E. G. *J. Lipid Res.*, 1962, v. 3, № 1, p. 136—138.
22. Hakomori S.-I. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1964, v. 55, № 2, p. 205—208.
23. Laine R. A., Renkonen O. *J. Lipid Res.*, 1975, v. 16, № 2 p. 102—106.
24. Ishizuka I., Kloppenburg M., Wiegandt H. *Biochim. et biophys. acta*, 1970, v. 210, № 2, p. 299—305.

Поступила в редакцию  
14.X.1985

#### GANGLIOSIDES OF OPHIURA OPHIURA SARSI

SMIRNOVA G. P., CHEKAREVA N. V., KOCHETKOV N. K.  
N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow

Two monosialogangliosides were isolated from the ophiura *Ophiura sarsi* by DEAE- and TEAE-cellulose column chromatography and preparative TLC on silica gel. Their structures were determined by total and partial acid hydrolyses, methanolysis, methylation analysis, periodate oxidation, neuraminidase treatment, solvolytic desulfation, chromium trioxide oxidation and  $NaIO_4$ — $KMnO_4$  oxidation. The minor ganglioside(I) was found to be sialosyl-( $\alpha$ 2-6)-glucopyranosyl-( $\beta$ 1-1)-ceramide, while the main ganglioside (II) had additional sulfate group at position 8 of the sialic acid residue. The ceramide moieties of gangliosides contain sphingosine and normal fatty acids, the composition of the latter being determined by GLC and GLC-mass-spectrometry.