



УДК 593.92.088 : 577.115.5

© 1990 г.

И. С. Глухобед, Г. П. Смирнова, Н. К. Кочетков

СТРУКТУРА ГАНГЛИОЗИДОВ ОБОЛОЧКИ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ
PATIRIA PECTINIFERA

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

Из оболочки морской звезды *Patiria pectinifera* выделена смесь двух моносиалоганглиозидов, структуру которых определили с помощью химических и спектральных методов. Показано, что они имеют такой же тип структуры, как и ганглиозиды, выделенные ранее из печени морской звезды этого вида, но различаются числом моносахаридных остатков. Для ганглиозидов оболочки предложена структура $\text{Ara}f(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Gal}p(\beta 1 \rightarrow 4)\text{NeuAc}(\alpha 2 \rightarrow 3)\text{Gal}p(\beta 1 \rightarrow 4)\text{Glc}p(\beta 1 \rightarrow 1)\text{Cer}$, где сфингозиновым основанием являются фитосфингозины C_{16} , C_{17} и C_{18} , имеющие главным образом разветвленную цепь, а высшие жирные кислоты представлены в основном α -гидроксикислотами, среди которых преобладают кислоты с 22, 23 и 24 атомами углерода. Ганглиозиды различаются наличием в одном из них 8-О-метильной группы в остатке N-ацетилнейраминовой кислоты.

Ранее мы показали, что в печени морской звезды *Patiria pectinifera* содержатся два сиалогликолипида — моно- и дисиалоганглиозиды, в которых остатки сиаловой кислоты расположены внутри углеводной цепи, а концевое положение занимает арабиноза в фуранозной форме. Для моносиалоганглиозида была предложена структура $\text{Ara}f1-3\text{Gal} \alpha 1-6(\text{Ara}f 1-3)\text{Gal}\beta 1-4\text{NeuAc}2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-1\text{Cer}$ [1], а для дисиалоганглиозида — структура $\text{Ara}f1-3\text{Gal} \alpha 1-4(8\text{Me})\text{NeuAc}2-3\text{Gal}1-3\text{Gal}1-4\text{NeuAc}2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc} \beta 1-1\text{Cer}$ [2]. Японские исследователи выделили из целых морских звезд *Asterina pectinifera*, вида, который биологи считают тождественным *P. pectinifera*, три моносиалоганглиозида [3]. Главный имел структуру $\text{Ara}f\beta 1-6\text{Gal}\beta 1-4(\text{Gal}\beta 1-8)\text{NeuGc}2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-1\text{Cer}$ [4], а в двух других отсутствовал остаток галактозы у О-8 N-гликолилнейраминовой кислоты и один из них имел О-метильную группу в положении 8 сиаловой кислоты [5]. Как можно видеть, олигосахаридные цепи ганглиозидов, выделенных нами из печени и японскими исследователями из целых морских звезд, имеют общие главные структурные особенности, которые отличают их от ганглиозидов других животных: положение сиаловой кислоты внутри углеводной цепи и присутствие арабинозы, которая находится на конце цепи. Однако в структуре моносиалоганглиозидов есть и существенные различия. Сюда относится тип сиаловой кислоты, количество, место присоединения и размер цикла остатков арабинозы, а также положение одного из остатков галактозы. Так, в ганглиозиде из печени *P. pectinifera* присутствует N-ацетилнейраминовая кислота, два остатка арабинофуранозы, связанные с остатками галактозы по О-3, и нет концевых остатков галактозы. В состав ганглиозидов из *A. pectinifera* входят N-гликолилнейраминовая кислота, один остаток арабинозы (смесь арабинопиранозы и арабинофуранозы), связанный с галактозой по О-6, и один из остатков галактозы находится в разветвлении и является концевым. Кроме того, в *A. pectinifera* не обнаружен дисиалоганглиозид. Поскольку основную часть массы морской звезды составляет оболочка, можно предположить, что ганглиозиды, выделенные из целых морских звезд, — это главным образом ганглиозиды оболочки и обнаруженное различие в структуре ганглио-

* Сокращения: § Cer — церамид, NeuGc — N-гликолилнейраминовая кислота, (8Me)NeuAc — N-ацетил-8-О-метилнейраминовая кислота.

зидов объясняется тем, что разные ткани морской звезды имеют свой набор ганглиозидов. Тканевая специфичность ганглиозидного состава надежно показана для млекопитающих [6], а для иглокожих такие исследования до сих пор не проводились. Чтобы выяснить, различаются ли структуры ганглиозидов разных тканей одного и того же вида морской звезды, в данной работе мы выделили и установили структуры ганглиозидов оболочки *P. pectinifera*.

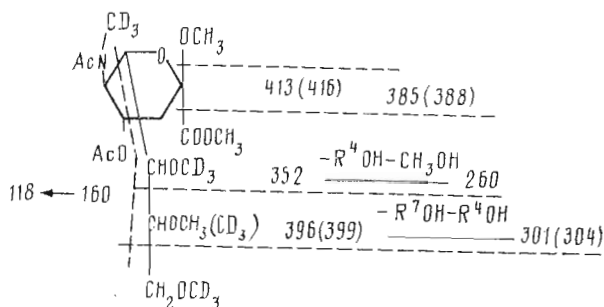
Суммарный препарат полярных гликолипидов получали из общего липидного экстракта морских звезд, из которых были удалены печень и гонады. Препарат, по данным ТСХ, содержал два ганглиозида — главный и минорный, а также нейтральные гликолипиды, фосфолипиды и пигменты. Дальнейшее выделение ганглиозидов проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой, элюируя кислые гликолипиды растворами ацетата аммония в метаноле [7]. Главный ганглиозид элюировался 0,025 М раствором соли, что характерно для моносиалоганглиозидов, а минорный — 0,1 М раствором и, следовательно, обладал более кислым характером или более длинной углеводной цепью; они были получены в соотношении $\sim 8 : 0,3$. Главный ганглиозид без дальнейшей очистки вел себя как индивидуальное соединение при ТСХ в нейтральной и основной системах растворителей, а для минорного ганглиозида потребовалась дополнительная очистка с помощью препаративной ТСХ на силикагеле. Оказалось, что содержание ганглиозидов в препарате полярных гликолипидов из оболочки *P. pectinifera* хоть и меньше, но сравнимо с содержанием ганглиозидов в препарате из печени этой морской звезды, поэтому при работе с целыми морскими звездами ганглиозиды печени действительно могут оказаться минорными компонентами.

Структура олигосахаридной цепи главной ганглиозида была установлена с помощью полного и частичного кислотного гидролиза, метилирования, периодатного окисления и спектроскопии ЯМР. По результатам полного кислотного гидролиза ганглиозид содержит глюкозу, галактозу и арабинозу в соотношении 1 : 2 : 1. При частичном кислотном гидролизе ганглиозида были получены нейтральные гликолипиды и углеводные фрагменты. После разделения продуктов гидролиза диализом в недиализуемых продуктах с помощью ТСХ были обнаружены два нейтральных гликолипида: главный с подвижностью лактозилцерамида и минорный с подвижностью цереброзида. Оба соединения были выделены препаративной ТСХ; оказалось, что главное содержит глюкозу и галактозу в соотношении 1 : 1, следовательно, является дигексозилцерамидом, а минорное — глюкозу и является глюкоцереброзидом. Углеводные фрагменты были выделены из внешней диализной воды ионообменной хроматографией. Во фракции нейтральных моносахаридов были обнаружены в свободном виде арабиноза и следы галактозы, а в кислой фракции — сиалосодержащий фрагмент, в котором после полного кислотного гидролиза показано присутствие галактозы и арабинозы. Содержание галактозы не менялось при варьировании условий мягкого кислотного гидролиза (0,05; 0,075; 0,1 н. H_2SO_4) и соответствовало содержанию сиаловой кислоты в кислой фракции, а количество арабинозы менялось в зависимости от условий гидролиза от 0,4 до 0,8 мкмоль на 1 мкмоль сиаловой кислоты, однако суммарное содержание арабинозы в нейтральной и кислой фракциях соответствовало содержанию сиаловой кислоты в кислой фракции. Следовательно, при частичном кислотном гидролизе ганглиозида расщепляется не только кетозидная связь сиаловой кислоты, но и арабинозидная и образуются арабиноза и два сиалосодержащих олигосахарида, один из которых включает в себя галактозу, а другой — галактозу и арабинозу. При ТСХ на силикагеле в системе для разделения сиаловых кислот эти олигосахариды идут одним пятном с меньшей подвижностью, чем N-ацетил- или N-гликолилнейраминавая кислота (R_{NeuGc} 0,83).

Для определения мест замещения моносахаридов в ганглиозиде и типа сиаловой кислоты использовали метилирование и тридегтерометилирование. В масс-спектре метилированного ганглиозида имеется пик иона с m/z 175, соответствующий концевому остатку арабинозы, и пик иона

с m/z 344, соответствующий фрагменту N-ацетилнейраминовой кислоты, который образуется при разрыве кетозидной связи и отщеплении заместителя из положения 4 и водорода из положения 3. В спектре отсутствуют пики ионов, соответствующих концевой N-ацетилнейраминовой кислоте и фрагментам N-гликолилнейраминовой кислоты. Следовательно, в состав ганглиозида входит N-ацетилнейраминовая кислота, которая находится внутри цепи, и терминальный остаток арабинозы. Частично метилированные метилгликозиды, полученные при метанолизе метилированного ганглиозида, анализировали ГЖХ. Анализ показал, что в ганглиозиде глюкоза замещена в положение 4, галактоза — в положение 3, а арабиноза является концевой и находится в фуранозной форме. Не обнаружены метилированные метиларабинопиранозиды, а также производные метилгалактозидов со свободным гидроксилом при С-6. После метанолиза тридеутерометилированного ганглиозида производные ацетилировали и затем анализировали с помощью хроматомасс-спектрометрии. ГЖХ показала присутствие одного пика, соответствующего производному сиаловой кислоты, а из масс-спектрометрической фрагментации следовало, что этот пик содержит два соединения — метиловые эфиры метилкетозидов 4-О-ацетил-7,8,9-три-О-тридеутерометил- и 4-О-ацетил-7,9-ди-О-тридеутерометил-8-О-метил-N-тридеутерометил-N-ацетилнейраминовых кислот. Характеристические пики и их происхождение указаны на схеме 1.

Схема 1



R^4 и R^7 — заместители при О-4 и О-7.

Следовательно, главный ганглиозид, выделенный из оболочки морской звезды *P. pectinifera*, представляет собой смесь двух соединений, одно из которых содержит N-ацетилнейраминовую кислоту, а другое — ее 8-О-метильное производное. Поскольку по интенсивности пиков в масс-спектре нельзя было сделать однозначный вывод о количественном соотношении этих соединений, мы использовали для его определения периодатное окисление. Ганглиозид окисляли IO_4^- , восстанавливали KVH_4 , метилировали и производные сиаловых кислот после метанолиза и ацетилирования анализировали ГЖХ. Анализ показал присутствие производного C_7 -N-ацетилнейраминовой кислоты, которая образовалась в результате окисления N-ацетилнейраминовой кислоты, не имеющей О-метильной группы, и производного 8-О-метил-N-ацетилнейраминовой кислоты, которая не изменилась при окислении, в количестве 57 и 43% соответственно. Следовательно, ганглиозидная фракция из оболочки *P. pectinifera* включает в себя примерно равные количества ганглиозидов с N-ацетилнейраминовой и 8-О-метил-N-ацетилнейраминовой кислотой. N-Ацетилнейраминовая кислота была обнаружена нами и в моносиалоганглиозиде из печени *P. pectinifera*, а 8-О-метил-N-ацетилнейраминовая кислота наряду с N-ацетилнейраминовой кислотой — в дисиалоганглиозиде из печени, в то время как в ганглиозиде из целых морских звезд *A. pectinifera* показано присутствие N-гликолилнейраминовой кислоты и ее 8-О-метильного производного в соотношении 2 : 1 [5].

Конфигурации гликозидных связей нейтральных сахаров в ганглиозиде определены с помощью спектроскопии ^{13}C -ЯМР. В аномерной обла-

Таблица 1

Таблица 2

Состав высших жирных кислот
ганглиозидов оболочки
Patiria pectinifera

Кислоты	Незамещенные кислоты	α -Гидроксикислоты
	% от их сумм	% от их сумм
C _{14:0}	4,9	0
C _{16:0}	42,2	14,3
C _{18:0}	40,2	8,4
C _{20:0}	3,4	2,5
C _{22:0}	5,9	35,5
C _{23:0}	0	22,7
C _{24:0}	2,8	16,7

Состав фитосфингозинов
ганглиозидов оболочки
Patiria pectinifera

Спирты *	Соответствующие фитосфингозины	Содержание, % от суммы
C _{13:0}	C _{16:0}	8,6
<i>изо</i> -C _{13:0}	<i>изо</i> -C _{16:0}	9,6
C _{14:0}	C _{17:0}	2,8
<i>изо</i> -C _{14:0}	<i>изо</i> -C _{17:0}	65,0
C _{15:0}	C _{18:0}	1,5
<i>изо</i> -C _{15:0}	<i>изо</i> -C _{18:0}	12,5

* Получены при расщеплении сфингозиновых оснований — см. «Экспер. часть».

сти спектра имеются сигналы 110,40 м. д. (α -L-Araf), 104,25 и 104,10 м.д. (два остатка β -D-Galp) и 103,70 м. д. (β -D-Glcp). Абсолютные конфигурации сахаров здесь приняты такие же, как и в ганглиозиде из печени морской звезды этого вида, исследованном нами ранее [1]. Вывод об α -конфигурации кетозидной связи сиаловой кислоты сделан нами на основании спектра ¹H-ЯМР ганглиозида, где экваториальному протону в положении 3 соответствует химический сдвиг 2,77 м. д., что попадает в область резонансов для α -аномеров сиаловых кислот (2,6—2,8 м.д.) и отличается от области β -аномеров (2,1—2,5 м. д.) [8]. В ганглиозидах из *A. pectinifera* японские исследователи на основании данных окисления хромовым ангидридом приписали гликозидным связям всех нейтральных сахаров β -конфигурации [5].

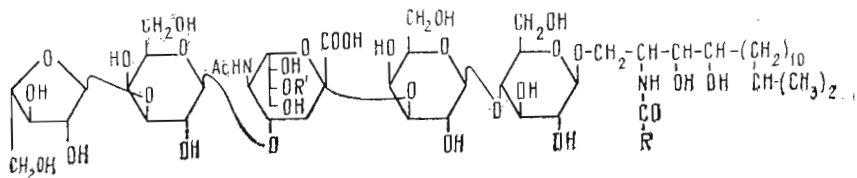
Для анализа липидной части ганглиозидов оболочки *P. pectinifera* использовали метанолиз и периодатное окисление. В продуктах метанолиза с помощью ТСХ были обнаружены метиловые эфиры высших жирных кислот и сфингозиновые основания с подвижностью фитосфингозина. Среди метиловых эфиров около 90% смеси составляют метиловые эфиры α -гидроксикислот, остальное — эфиры незамещенных кислот. Анализ кислот с помощью ГЖХ показал, что около 75% суммы α -гидроксикислот составляют C₂₂-, C₂₃- и C₂₄-гомологи, а среди незамещенных главными являются пальмитиновая и стеариновая кислоты (см. табл. 1). В ганглиозиды печени *P. pectinifera* [1, 2] и целых звезд *A. pectinifera* [4, 5] были обнаружены только α -гидроксикислоты, среди которых также преобладают C₂₂-, C₂₃- и C₂₄-кислоты.

Для определения состава фитосфингозинов ганглиозиды оболочки *P. pectinifera* окисляли периодатом, алифатические альдегиды, образующиеся при разрыве С-3—С-4-связи фитосфингозина, экстрагировали гексаном, обрабатывали КВН₄ и спирты анализировали с помощью ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии. Как видно из табл. 2, в состав ганглиозидов входят фитосфингозины с прямой цепью и разветвленные, последние составляют около 90% смеси; главным компонентом является C₁₇-изофитосфингозин. Сходная картина с преобладанием разветвленных фитосфингозинов была получена ранее при анализе ганглиозидов *A. pectinifera* [4, 5] и печени *P. pectinifera* [1, 2].

На основании приведенных данных для главных ганглиозидов оболочки *P. pectinifera* предложена структура, изображенная на схеме 2

Минорный ганглиозид, который элюируется 0,1 М раствором ацетата аммония при делении ганглиозидов на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой, по данным ТСХ, более полярен, чем главный (подвижность по отношению к главному ганглиозиду равна 0,66), и содержит арабинозу, галактозу, глюкозу и сиаловую кислоту в соотношении 1,3 : 2,9 : 1 : 1, т. е. также является моносиалоганглиозидом, но содержит дополнительный остаток галактозы. Следовательно, в оболочке *P. pectinifera* отсутствует диссиалоганглиозид, обнаруженный нами в печени. При гидролизе ганглиозида

Схема 2



R-остаток высшей жирной кислоты, R' = H, CH₃.

0,1 н. H₂SO₄ отщепляется арабиноза и олигосахаридный фрагмент, содержащий сиаловую кислоту на восстанавливающем конце, и образуется нейтральный дигексозилцерамид. Следовательно, в минорном ганглиозиде, как и в главном, сиаловая кислота находится внутри олигосахаридной цепи, а арабиноза — на конце цепи.

Таким образом, выделенные здесь ганглиозиды оболочки морской звезды *P. pectinifera* и полученные ранее ганглиозиды печени *P. pectinifera* и целых морских звезд *A. pectinifera* имеют большое сходство в структуре как углеводной, так и липидной частей. Это относится в первую очередь к таким необычным структурным особенностям, как положение сиаловой кислоты внутри углеводной цепи и арабинозы на конце цепи. Ганглиозиды имеют одинаковый набор нейтральных моносахаридов, в начале их углеводных цепей лежит лактоза, к О-3 остатка галактозы которой присоединена сиаловая кислота, гликозилированная в положение 4 галактозой. Сфингозиновыми основаниями ганглиозидов являются фитосфингозины, состав которых во всех случаях сходен. Кроме того, ганглиозиды оболочки и печени *P. pectinifera* содержат N-ацетилнейраминовую кислоту (или ее 8-О-метильное производное) и арабинозу в фуранозной форме. Однако в деталях структуры ганглиозиды оболочки *P. pectinifera* отличаются как от ганглиозидов печени, так и от ганглиозидов целых морских звезд *A. pectinifera*. От ганглиозидов печени их отличает отсутствие дисиалоганглиозидов, а также меньшее содержание арабинозы и галактозы в моносиалоганглиозидов. Отсюда следует, что разные ткани одного и того же вида морской звезды могут иметь различный состав ганглиозидов, хотя общий тип структуры этих соединений остается одинаковым. Интересно проверить, справедливо ли это положение для других тканей этой морской звезды, а также для других видов морских звезд.

При сравнении ганглиозидов оболочки морской звезды *P. pectinifera* с ганглиозидами целых морских звезд *A. pectinifera* видно, что соотношение моносахаридов в них такое же, как и в двух ганглиозидов из *A. pectinifera*, но практически отсутствует главный в *A. pectinifera* разветвленный ганглиозид с тремя остатками галактозы. Однако в сходных по составу сахаров ганглиозидов есть и различия, прежде всего в сиаловых кислотах: ганглиозиды из *P. pectinifera* содержат N-ацетил- и 8-О-метил-N-ацетилнейраминовую кислоту, а ганглиозиды *A. pectinifera* — N-гликолил- и 8-О-метил-N-гликолилнейраминовую кислоту. Кроме того, в ганглиозидов *P. pectinifera* арабиноза присутствует в фуранозной форме и присоединена к галактозе по О-3, а в ганглиозидов *A. pectinifera* она может быть и в пиранозной форме и гликозилирует соседнюю галактозу в положение 6. Можно было бы предположить, что эти различия в структуре ганглиозидов связаны с разными местами и, отсюда, с разными условиями обитания морских звезд. Однако это кажется маловероятным, так как все морские звезды собраны в Японском море (*P. pectinifera* — у западного побережья недалеко от Владивостока, а *A. pectinifera* — у берегов Японии), где условия обитания сходны. Кроме того, для млекопитающих установлено, что состав сиаловых кислот ганглиозидов является специфическим для вида [9] и не зависит от места обитания животного, хотя у животных отдельных пород может отличаться от обычного для этого вида, и это отличие определено генетически [10, 11]. Для иглокожих такие сведения отсутствуют, хотя недавно мы показали, что в двух видах морских звезд одного рода, *Asterias amurensis* и *A. rubens*, обитающих в разных

морях (Японском и Белом соответственно), углеводные цепи ганглиозидов идентичны по структуре [12, 13]. По-видимому, морские звезды *P.* и *A. pectinifera*, хотя и относятся к одному виду, не вполне тождественны друг другу и имеют различия в генотипе. Для окончательного выяснения этого вопроса необходимы дальнейшие химические, биохимические и биологические исследования.

Экспериментальная часть

Морские звезды *P. pectinifera* собраны в сентябре в сублиторальной зоне залива Посыет Японского моря. Липидный экстракт получали из целых морских звезд после удаления печени и гонад по ранее описанной методике [14]. В работе использовали *N*-ацетилнейрамининовую кислоту (Koch-Light, Англия), *N*-гликолилнейрамининовую кислоту (Sigma, США). Хлороформ перед использованием перегоняли.

Аналитическую и препаративную ТСХ проводили на силикагеле G 60 H (Merck, ФРГ). Использовали системы растворителей: для ганглиозидов хлороформ — метанол — вода (60 : 40 : 10) и хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH (60 : 35 : 8), обнаружение резорциновым [15] и орциновым [16] реактивами; для нейтральных гликолипидов хлороформ — метанол — вода (64 : 24 : 4), обнаружение орциновым реактивом; для сиаловых кислот пропанол — вода — 2 н. NH_4OH (30 : 10 : 5), обнаружение резорциновым реактивом; для сфингозиновых оснований хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH (40 : 10 : 1), обнаружение 0,2% раствором нингидрина в ацетоне; для метиловых эфиров высших жирных кислот хлороформ, обнаружение бромтимоловым голубым и конц. H_2SO_4 .

ГЖХ выполняли на приборах Pye Unicam 104 (Англия) и Hewlett Packard 5890A (США), скорость азота 60 мл/мин. Нейтральные моносахариды анализировали в виде ацетатов соответствующих полиолов на капиллярной колонке (15 м) с Ultra-1 при 200—270° С (10° С/мин); частично метилированные метилгликозиды — на колонке (1,5 м) с 3% NGA на диатомите С при 190° С; ацетаты частично тридегтерометилированных метилкетозидов сиаловых кислот — на колонке с 3% OV-1 на диатомите С при 180—250° С (3° С/мин); алифатические спирты и их ацетаты — на той же колонке при 160—220° С (3° С/мин); метиловые эфиры высших жирных кислот — на колонке с Ultra-1 при 180—290° С для незамещенных кислот и 200—290° С для α -гидроксикислот (10° С/мин).

Масс-спектр метилированного ганглиозида снимали на приборе Hitachi M-80A E (Япония) при ионизирующем напряжении 70 эВ. Хроматомасс-спектрометрический анализ ацетатов частично тридегтерометилированных метилкетозидов сиаловых кислот проводили на том же приборе, снабженном колонкой с 2% OV-1 на газхроме Q, ацетатов алифатических спиртов — на приборе Varian MAT III (ФРГ); колонка с 3% OV-1 на диатомите С, ионизирующее напряжение 70 эВ.

Спектры ЯМР снимали на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) с рабочей частотой по углероду 62,9 МГц при 35° С; концентрация вещества около 1,2% в смеси CDCl_3 — CH_3OD — D_2O (2 : 3 : 1).

Аналитические методы: сиаловые кислоты количественно определяли с резорциновым реактивом [17, 18], нейтральные сахара — в виде ацетатов полиолов с помощью ГЖХ, используя в качестве внутреннего стандарта инозит.

Колоночную хроматографию полярных липидов на DEAE-целлюлозе (ацетатная форма) проводили как описано ранее [7]. Главный ганглиозид элюировали 0,025 М раствором $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ в метаноле, минорный — 0,1 М раствором. Фракции анализировали ТСХ. Сходные по составу фракции объединяли, упаривали, остаток растворяли в воде, диализовали против дистиллированной воды, упаривали и лиофилизовали. Минорный ганглиозид дополнительно очищали с помощью препаративной ТСХ. Из 690 мг препарата полярных липидов получали 16,8 мкмоль главного ганглиозида и 0,61 мкмоль минорного ганглиозида.

Полный кислотный гидролиз ганглиозидов (0,1—2 мкмоль) проводили 2 М HCl (1 мл) при 100° С в течение 4 ч. Гидролизат промывали 1 мл хло-

роформа, водный слой нейтрализовали смолой АВ 17 × 8 (HCO_3^-), обрабатывали KВН_4 12 ч при 20° С, избыток KВН_4 разрушали 2 н. CH_3COOH , пропускали через колонку со смолой IR-120 (H^+), элюируя водой. Элюат упаривали с добавлением метанола в конце упаривания, остаток обрабатывали 16 ч смесью пиридин — уксусный ангидрид (1 : 1) при 20° С. Полученные ацетаты полиолов анализировали ГЖХ.

Частичный кислотный гидролиз ганглиозидов (0,1—2 мкмоль) проводили при 80° С действием 0,05; 0,075 и 0,1 н. H_2SO_4 в течение 1,5—2 ч. Гидролизат диализовали 1 сут против дистиллированной воды. Недиализуемые продукты анализировали ТСХ, нейтральные гликолипиды выделяли препаративной ТСХ и определяли моносахаридный состав после их полного кислотного гидролиза. Внешний водный раствор, полученный после диализа, упаривали до 5—7 мл, пропускали через колонку, содержащую 6 мл дауэкса 2 × 8 (CH_3COO^-), колонку промывали 10 мл воды и затем элюировали сиалосодержащие соединения 10 мл 1 М Na-ацетатного буфера, рН 4,6 [17]. Кислый элюат деионизировали на колонке со смолой IR-120 (H^+), упаривали, лиофилизовали и анализировали ТСХ. В кислой и нейтральной фракциях определяли содержание сиаловой кислоты с резорциновым реактивом и нейтральных сахаров (в кислой фракции — после полного кислотного гидролиза) с помощью ГЖХ.

Метилирование и тридегтерометилирование ганглиозида проводили по методу Хакомори [19], а также CH_3I (CD_3I) в диметилсульфоксиде в присутствии порошкообразного NaOH при комнатной температуре [20]. Метилированный ганглиозид анализировали с помощью масс-спектрометрии, а также подвергали кислотному метанолизу 0,5 М HCl в метаноле при 80° С в течение 14 ч. Метилвые эфиры высших жирных кислот экстрагировали гексаном, метанольный раствор упаривали и частично метилированные метилгликозиды анализировали с помощью ГЖХ. Тридегтерометилированный ганглиозид подвергали метанолизу в тех же условиях, после удаления метиловых эфиров высших жирных кислот метанольный раствор упаривали и 2 ч обрабатывали смесью уксусный ангидрид — пиридин (1 : 1) при 100° С. Раствор упаривали, производные сиаловых кислот анализировали с помощью ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии.

Периодатное окисление ганглиозида проводили 0,02 М NaIO_4 при 20° С в течение 16 ч, избыток периодата разрушали 10% раствором этиленгликоля. Высшие жирные альдегиды экстрагировали гексаном, раствор упаривали, остаток растворяли в метаноле и обрабатывали 16 ч KВН_4 при 20° С. Алифатические спирты экстрагировали гексаном, очищали ТСХ и анализировали ГЖХ, а после ацетилирования уксусным ангидридом в пиридине (1 : 1) при 20° С в течение 16 ч — методом ГЖХ-масс-спектрометрии. Водный раствор после экстракции высших жирных альдегидов обрабатывали KВН_4 (16 ч при 20° С), диализовали против дистиллированной воды, недиализуемые продукты лиофилизовали и метилировали по методу [20]. Метилированное производное подвергали метанолизу, как описано выше, метиловые эфиры высших жирных кислот экстрагировали гексаном, метанол упаривали, остаток обрабатывали 2 ч смесью уксусный ангидрид — пиридин (1 : 1) при 100° С, производные сиаловых кислот анализировали ГЖХ. Соотношение производных C_7 - и C_9 -N-ацетилнейраминоновых кислот определяли по площадям пиков на хроматограмме.

Кислотный метанолиз ганглиозида проводили 3 М HCl в CH_3OH при 80° С в течение 18 ч. Метиловые эфиры высших жирных кислот и сфингозиновые основания выделяли как описано ранее [14] и анализировали ТСХ. Метиловые эфиры незамещенных и α -гидроксикислот разделяли ТСХ и анализировали ГЖХ, метиловые эфиры α -гидроксикислот предварительно ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине 16 ч при 20° С.

Авторы выражают благодарность В. Л. Садовской (ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии ВАСХНИЛ) за получение высококачественных масс-спектров и участие в их обсуждении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smirnova G. P., Kochetkov N. K. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 618. № 3. P. 486—495.
2. Kochetkov N. K., Smirnova G. P. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 759. № 1. P. 192—198.
3. Sugita M., Hori T. // J. Biochem. (Tokyo). 1976. V. 80. № 2. P. 637—640.
4. Sugita M. // J. Biochem. (Tokyo). 1979. V. 86. № 2. P. 289—300.
5. Sugita M. // J. Biochem. (Tokyo). 1979. V. 86. № 3. P. 765—772.
6. Iwamori M., Nagai Y. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 665. № 2. P. 214—220.
7. Winterbourn C. C. // J. Neurochem. 1971. V. 18. № 6. P. 1153—1155.
8. Kamerling J. P., Dorland L., van Halbeek H., Vliegthart J. F. G., Messer M., Schauer R. // Carbohydr. Res. 1982. V. 100. P. 331—340.
9. Yamakawa T., Nagai Y. // Trends Biochem. Sci. 1978. V. 3. № 6. P. 128—131.
10. Yasue S., Handa S., Miyagawa S., Inoue J., Hasegawa A., Yamakawa T. // J. Biochem. (Tokyo). 1978. V. 83. № 4. P. 1101—1107.
11. Hamanaka (nee Yasue) S., Handa S., Inoue J., Hasegawa A., Yamakawa T. // J. Biochem. (Tokyo). 1979. V. 86. № 3. P. 695—698.
12. Смирнова Г. П., Глухoded И. С., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 7. С. 971—979.
13. Смирнова Г. П., Глухoded И. С., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 636—641.
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. Svennerholm L. // Biochim. et biophys. acta. 1957. V. 24. № 3. P. 604—611.
16. 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.
17. Svennerholm L. // Acta chem. scand. 1958. V. 12. № 3. P. 547—554.
18. Miettinen T., Takki-Luukkainen I. // Acta chem. scand. 1959. V. 13. № 4. P. 856—858.
19. Hakomori S. // J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. № 2. P. 205—208.
20. Larson G., Karlsson H., Hansson G. C., Pimlott W. // Carbohydr. Res. 1987. V. 161. № 2. P. 281—290.

Поступила в редакцию
14.VII.1989

I. S. GLUKHODED, G. P. SMIRNOVA, N. K. KOCHETKOV

**STRUCTURES OF GANGLIOSIDES FROM THE BODY OF THE STARFISH
*PATIRIA PECTINIFERA***

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A mixture of two gangliosides containing glucose, galactose, arabinose and N-acetylneuraminic acid was isolated from the starfish *Patiria pectinifera* after removing hepatopancreas and gonads. On the basis of chemical and spectral data the gangliosides were identified as Araf($\alpha 1 \rightarrow 3$)Galp($\beta 1 \rightarrow 4$)NeuAc($\alpha 2 \rightarrow 3$)Galp($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc($\beta 1 \rightarrow 1$)Cer, one of them having O-methylgroup in the position 8 of the N-acetylneuraminic acid residue. The long-chain bases are C₁₆, C₁₇ and C₁₈ phytosphingosines with both branched and linear chains. The fatty acids are presented mainly with α -hydroxy acids (C₂₂, C₂₃ and C₂₄ α -hydroxy acids prevailing), with a low amount of normal fatty acids. Hence, these gangliosides belong to the same structural type as the gangliosides from hepatopancreas of this starfish species, differing in the number of monosaccharide residues and the presence of normal fatty acids.