



УДК 577.115.5 + 593.94-147.62.088

© 1991 г.

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

ГАНГЛИОЗИДЫ ОФИУР *OPHIOSOMA ECHINATA*  
И *OPHIOMASTIX ANNULOSA CLARK*

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

Из двух видов офиур семейства *Ophiocoridae* — *Ophiocoma echinata*, обитающей в Карибском море, и *Ophiomastix annulosa*, собранной у берегов Вьетнама, выделены ганглиозиды, структура которых определена с помощью химических деградаций, масс-спектрометрии,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии и ферментативной обработки нейраминидазой. Показано, что оба вида офиур содержат по три ганглиозиды — два главных и один минорный. В обоих случаях главные ганглиозиды — моносиалоганглиозиды и имеют структуры  $\text{NeuGc}(\alpha 2-6)\text{GlcP}(\beta 1-1)\text{Cer}$  и  $\text{NeuGc}8\text{SO}_3^-(\alpha 2-6)\text{GlcP}(\beta 1-1)\text{Cer}$ , а минорные ганглиозиды — диссиалоганглиозиды, в которых диссиалильный фрагмент присоединен к глюкозилцерамиду по  $\text{O}6$  остатка глюкозы. Минорный ганглиозид из *O. echinata* имеет структуру  $\text{NeuAc}(\text{Gc})(\alpha 2-9)\text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{GlcP}(\beta 1-1)\text{Cer}$ . Определен состав высших жирных кислот и сфингозиновых оснований ганглиозидов.

Ранее мы показали, что ганглиозиды офиуры *Ophiura sarsi* (сем. *Ophiuridae*) по структуре существенно отличаются от ганглиозидов морских звезд, но подобны ганглиозидам морских ежей [1]. Как и в ганглиозиде морских ежей, их углеводные цепи включают в себя только остатки глюкозы и сиаловой кислоты, которая присоединена к глюкозе  $\alpha 2-6$ -связью. Сиаловая кислота (N-ацетил- или N-гликолилнейраминановая кислота) может содержать сульфатную группу в положении 8. Чтобы выяснить, характерен ли такой тип структуры углеводных цепей для ганглиозидов этого класса иглокожих, мы продолжили исследование ганглиозидов офиур. В настоящей работе приведены данные по выделению и установлению структуры ганглиозидов двух видов офиур семейства *Ophiocoridae*, обитающих в разных районах Мирового океана: *Ophiocoma echinata* из Карибского моря и *Ophiomastix annulosa* из Южно-Китайского моря (побережье Вьетнама).

Препараты полярных гликолипидов получали из общего липидного экстракта офиур после диализа, последующего упаривания водного слоя, образовавшегося внутри диализного мешка, и лиофилизации. Препарат каждого вида офиур, по данным ТСХ, содержал три сиалогликолипида — два главных и один минорный, а также некоторое количество нейтральных гликолипидов, фосфолипидов и пигментов. Ганглиозиды были выделены из этих смесей с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой в ацетатной форме. Кривые элюции ганглиозидов обоих видов офиур оказались очень похожими. И в том, и в другом случае наименее полярный главный ганглиозид (ганглиозид (1а) из *O. echinata* и ганглиозид (1б) из *O. annulosa*) элюировался с DEAE-целлюлозы 0,025 М раствором ацетата аммония в метаноле как моносиалогликолипид, минорный ганглиозид ((2а) из *O. echinata* и (2б) из *O. annulosa*) — 0,1 М раствором этой соли в первых фракциях, а более полярный главный ганглиозид ((3а) из *O. echinata* и (3б) из *O. annulosa*) — тем же раствором соли, но в более далеких фракциях. Следовательно, ганглиозиды (2а), (2б) и (3а), (3б) обладали более сильными кислотными свойствами, чем ганглио-

Использованы стандартные сокращения, рекомендованные для гликолипидов; Gc — гликолил, Cer — церамид.

зиды (1а) и (1б), и различались между собой либо по кислотности, либо по длине углеводной цепи.

Выделенные соединения содержали сиаловые кислоты и нейтральные сахара (специфическое окрашивание резорциновым [2] и орциновым [3] реактивами соответственно) и не содержали фосфатной группы (отрицательная реакция с молибденовым реактивом [4]) и свободной аминогруппы (отсутствие окраски с нингидрином). В ИК-спектрах этих ганглиозидов имелись интенсивные полосы поглощения амидной группы (1640 и 1550 см<sup>-1</sup>), спиртовых гидроксильных (1040 и 1080 см<sup>-1</sup>), ассоциированных гидроксильных (3300 и 3450 см<sup>-1</sup>), ионизированной карбоксильной группы (1405 см<sup>-1</sup>) и валентных колебаний С—Н-связей алифатической цепи (2860 и 2930 см<sup>-1</sup>). В ИК-спектрах ганглиозидов (3а) и (3б) присутствовали, кроме того, полоса поглощения 1240 см<sup>-1</sup>, соответствующая колебаниям S → O-связи ионного сульфата, и полоса 810 см<sup>-1</sup>, соответствующая O—S-связи эфира серной кислоты [5]. На основании полученных данных можно было предположить, что ганглиозиды (1а) и (1б) — моносиалоганглиозиды, ганглиозиды (2а) и (2б) — диссиалоганглиозиды, а ганглиозиды (3а) и (3б) — сульфатированные ганглиозиды.

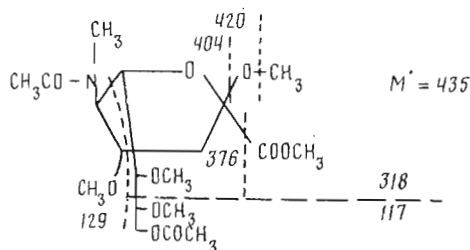
### Структура ганглиозидов офиуры *O. echinata* (ганглиозиды (1а), (2а) и (3а))

В продуктах полного кислотного гидролиза всех ганглиозидов в качестве единственного нейтрального моносахарида обнаружена глюкоза. При частичном кислотном гидролизе ганглиозидов отщепляются сиаловые кислоты и образуются нейтральные моноглюкозилцерамиды. Количественные определения показали, что ганглиозиды (1а) и (3а) содержат по одному остатку глюкозы и сиаловой кислоты, а ганглиозид (2а) — два остатка сиаловой кислоты и один остаток глюкозы. Анализ с помощью ТСХ сиаловых кислот, выделенных после частичного кислотного гидролиза ганглиозидов (1а) и (2а) ионообменной хроматографией на дауэксе 2 × 8 (СН<sub>3</sub>СОО<sup>-</sup>), показал, что в состав ганглиозидов (1а) входит N-гликолоилнейраминная кислота, а в состав ганглиозидов (2а) — N-ацетил- и N-гликолоилнейраминные кислоты в соотношении около 2:1. Поскольку можно было ожидать, что в ганглиозиде (3а) сульфатная группа находится у остатка сиаловой кислоты, как в сульфатированных ганглиозидов морских ежей [6] и офиуры *O. sarsi* [1], мы не могли использовать для ее выделения после частичного кислотного гидролиза ганглиозидов (3а) ионообменную хроматографию на дауэксе. Чтобы охарактеризовать эту кислоту, мы предварительно провели сольволитическое десульфатирование ганглиозидов (3а) нагреванием в диоксане в присутствии хлоргидрата пиридина [7]. Как показал анализ ТСХ, десульфатирование прошло полностью и образовался новый сиалогликолипид, менее полярный, чем исходный, и совпадающий по полярности с ганглиозидом (1а). В ИК-спектре полученного соединения отсутствовали полосы поглощения, характерные для сульфатной группы. При хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой (СН<sub>3</sub>СОО<sup>-</sup>) десульфатированный ганглиозид (3а) элюировался с 0,025 М раствором СН<sub>3</sub>СООН<sub>4</sub> в метаноле, как моносиалоганглиозид (1а), не содержащий сульфатной группы. Сиаловая кислота, полученная после частичного кислотного гидролиза десульфатированного ганглиозидов (3а), элюировалась с дауэкса (СН<sub>3</sub>СОО<sup>-</sup>) в обычных условиях и, по данным ТСХ, имела подвижность N-гликолоилнейраминной кислоты. Данные десульфатирования подтверждают, что соединение (3а) представляет собой сульфатированный ганглиозид.

Положение связи между моносахаридными остатками в ганглиозидов (1а) и (2а) определяли с помощью метилирования. После метанолиза метилированных производных этих ганглиозидов с помощью ГЖХ была обнаружена смесь α- и β-метил-2,3,4-три-О-метилглюкопиранозидов. Следовательно, в ганглиозидов (1а) и (2а) остаток глюкозы замещен сиаловой кислотой по положению 6. Такой тип связи сиаловых кислот характерен для ганглиозидов морских ежей [6] и обнаружен в ганглиозидов офиуры

*O. sarsi* [1], но не встречается в сиалогликоконъюгатах из других животных.

В продуктах метанолиза метилированного ганглиозида (1a) методом хроматомасс-спектрометрии обнаружен один пик производного сиаловой кислоты, масс-спектр которого совпал с масс-спектром метилового эфира метилкетозида 4,7,8,9-тетра-О-метил-N-метил-N-(О-метилгликолоил)-нейраминовой кислоты. Следовательно, в ганглиозиде (1a) концевое положение в олигосахаридной цепи занимает N-гликолоилнейраминавая кислота. В продуктах метанолиза метилированного ганглиозида (2a) после ацетилирования с помощью хроматомасс-спектрометрии были обнаружены метиловые эфиры метилкетозидов полностью метилированных производных N-ацетил- и N-гликолоилнейраминовых кислот, а также метиловый эфир метилкетозида 9-О-ацетил-4,7,8-три-О-метил-N-метил-N-ацетилнейраминовой кислоты. В масс-спектре этого соединения присутствовали пики ионов с  $m/z$  420 ( $M^+ - \text{CH}_3$ ), 404 ( $M^+ - \text{OCH}_3$ ) и 376 ( $M^+ - \text{COOCH}_3$ ), свидетельствующие о присутствии одной О-ацетильной группы в метилированном производном N-ацетилнейраминовой кислоты, пики ионов с  $m/z$  318 ( $M^+ -$  фрагмент C8—C9) и 129 (фрагмент C4—C5), показывающие, что в положениях 7 и 4 находятся метоксигруппы, а также интенсивный пик иона с  $m/z$  117 (фрагмент C8—C9), наличие которого в спектре возможно только в случае расположения О-ацетильной группы у C9 [8] (см. схему):



Аналогичное производное N-гликолоилнейраминовой кислоты практически отсутствует. Из результатов метилирования следует, что олигосахаридная цепь ганглиозида (2a) линейна, остаток глюкозы замещен по O6 остатком N-ацетилнейраминовой кислоты, который гликозилирован по O9 N-ацетил- или N-гликолоилнейраминовой кислотой. Фактически ганглиозид (2a) является смесью двух соединений, отличающихся N-ацильным заместителем в концевом остатке сиаловой кислоты.

Для определения конфигурации гликозидной связи в ганглиозидах (1a) и (2a) гликозилцерамиды, полученные при частичном кислотном гидролизе этих ганглиозидов, ацетилировали и окисляли хромовым ангидридом. В обоих случаях глюкоза разрушилась практически полностью. Следовательно, она соединена с церамидом  $\beta$ -гликозидной связью.

Конфигурации кетозидных связей сиаловых кислот в ганглиозидах (1a) и (2a) определяли ферментативным методом. При обработке ганглиозидов нейраминидазой из *Vibrio cholerae* сиаловые кислоты в обоих случаях отщепились полностью; следовательно, они соединены  $\alpha$ -кетозидными связями.

Таким образом, на основании полученных данных для углеводной цепи ганглиозида (1a) можно предложить структуру NeuGc( $\alpha$ 2-6)GlcP( $\beta$ 1-1)Cer, а для ганглиозида (2a) — структуру NeuAc(Gc)( $\alpha$ 2-9)NeuAc( $\alpha$ 2-6)-GlcP( $\beta$ 1-1)Cer.

Полученные химическим путем данные о строении олигосахаридной цепи ганглиозида (1a) подтверждены с помощью  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии. Из спектра следует, что глюкоза находится в пиранозной форме и соединена  $\beta$ -гликозидной связью (химический сдвиг сигнала C1 103,4 м. д.). Замещение глюкозы по положению 6 вытекает из сравнения значений химических сдвигов C6 (67,0 м. д.) и C5 (74,8 м. д.) в спектре ганглиозида (1a) со значениями химических сдвигов соответствующих углеродных атомов глюкозы в спектре гликозилцерамида (C6—61,6 м. д. и C5 — 76,8 м. д.). Сиаловая кислота в ганглиозиде (1a) содержит N-гликолоильный замести-

Состав высших жирных кислот (C<sub>n.o</sub>) ганглиозидов (1a)–(3a) *O. echinata* (% от суммы)

n	Незамещенные кислоты			α-Гидроксикислоты	
	(1a)	(2a)	(3a)	(2a)	(3a)
14	6,9	4,0	7,6	–	7,6
15	5,1	1,2	4,5	–	–
16	56,1	14,8	41,3	1,6	–
17	4,6	2,4	–	–	–
18	22,2	35,1	29,6	21,8	15,1
20	–	4,3	2,3	3,7	2,7
21	–	2,5	–	2,5	–
22	5,1	18,6	6,7	32,3	30,3
23	–	11,5	4,2	23,8	26,7
24	–	8,6	3,8	14,3	17,6

Таблица 2

Состав сфингозиновых оснований (C<sub>N</sub>) ганглиозидов (1a)–(3a) *O. echinata*

N	Сфингозины			Фитосфингозины	
	(1a)	(2a)	(3a)	(1a)	(2a)
17	–	–	–	7,0	5,8
18	8,5	6,3	13,5	12,1	8,3
19	11,3	7,5	29,2	43,0	46,3
20	47,5	44,6	20,5	4,0	4,7
21	4,1	4,4	–	22,1	17,5
22	20,2	18,4	22,6	–	–
23	–	–	–	–	4,2
24	–	4,4	3,8	–	–
25	–	–	–	11,8	10,6
26	8,4	11,2	10,4	–	–
27	–	–	–	–	2,6
28	–	3,2	–	–	–

тель, поскольку в спектре есть сигнал с химическим сдвигом 61,2 м. д. относящийся к углероду СН<sub>2</sub>ОН-группы остатка гликолевой кислоты.

Строение углеводной цепи сульфатированного ганглиозида (3a) устанавливали далее с помощью <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии. Как и в ганглиозиде (1a), в ганглиозиде (3a) глюкоза замещена по положению 6, что следует из низкопольного смещения сигнала С6 на 4,8 м. д. и высокопольного смещения сигнала С5 на 2,0 м. д. по сравнению с сигналами соответствующих атомов углерода в спектре глюкозилцерамида. Остальные ОН-группы глюкозы в ганглиозиде (3a) не имеют заместителей (химические сдвиги остальных С-атомов глюкозы имеют практически такие же значения, как и в спектре глюкозилцерамида). Сиаловая кислота в ганглиозиде (3a), как и в ганглиозиде (1a), представлена N-гликолоилнейраминовой кислотой (в спектре есть сигнал 61,2 м. д. углерода СН<sub>2</sub>ОН-группы гликолевой кислоты), которая замещена сульфатной группой в положение 8, о чем свидетельствует низкопольное смещение сигнала С8 (79,1 м. д.) на 6,7 м. д. и высокопольное смещение сигнала С9 (61,4 м. д.) на 1,9 м. д. по сравнению со значениями соответствующих сигналов в спектре ганглиозида (1a). Глюкоза в ганглиозиде (3a), как и в ганглиозиде (1a), находится в пиранозной форме и связана с церамидом β-гликозидной связью (химический сдвиг С1 103,5 м. д.).

Поскольку на основании спектра <sup>13</sup>C-ЯМР трудно было сделать вывод о конфигурации кетозидной связи сиаловой кислоты, мы использовали для этой цели ферментативный гидролиз нейраминидазой. Ганглиозид (3a) устойчив к действию нейраминидазы из *V. cholerae*, однако в десульф-

фатированном ганглиозиде сиаловая кислота отщепляется полностью; следовательно, ее кетозидная связь имеет  $\alpha$ -конфигурацию.

На основании полученных данных для олигосахаридной цепи ганглиозида (3а) предложена структура  $\text{NeuGc8SO}_3^-(\alpha\text{-2-6})\text{Glc}p(\beta\text{1-1})\text{Cer}$ .

Строение липидной части ганглиозидов (1а), (2а) и (3а) определено с помощью кислотного метанолиза. В продуктах метанолиза этих ганглиозидов с помощью ТСХ обнаружены метиловые эфиры высших жирных кислот и сфингозиновые основания. В состав ганглиозида (1а) входят только незамещенные высшие жирные кислоты, а в состав ганглиозидов (2а) и (3а) — незамещенные и  $\alpha$ -гидроксикислоты в соотношении 1 : 1 и 2 : 1 соответственно. Метиловые эфиры каждого типа кислот были выделены препаративной ТСХ, и их состав определен с помощью ГХЖ (см. табл. 1). Как и в случае ганглиозидов *O. sarsi* [1], ганглиозиды *O. echinata* содержат только насыщенные кислоты, главными незамещенными кислотами моносиалоганглиозидов являются пальмитиновая и стеариновая кислоты. В дисиалоганглиозиде (2а), кроме того, высоко содержание  $\text{C}_{22}$ -кислоты. Среди  $\alpha$ -гидроксикислот ганглиозидов (2а) и (3а) главными являются  $\text{C}_{22}$ -,  $\text{C}_{23}$ - и  $\text{C}_{24}$ - $\alpha$ -гидроксикислоты, которые вместе с  $\alpha$ -гидроксистерариновой кислотой составляют ~90% смеси  $\alpha$ -гидроксикислот.

Сфингозиновым основанием ганглиозидов (1а) и (2а), по данным ТСХ, является смесь равных количеств сфингозина и фитосфингозина, а ганглиозида (3а) — сфингозин. Сфингозиновое основание каждого типа было выделено препаративной ТСХ, подвергнуто окислению смесью  $\text{NaIO}_4\text{—KMnO}_4$  [9], и образовавшиеся высшие жирные кислоты были анализированы ГЖХ в виде метиловых эфиров. Состав соответствующих им сфингозиновых оснований приведен в табл. 2. Как видно из таблицы, среди сфингозиновых оснований ганглиозидов (1а) и (2а) преобладают  $\text{C}_{20}$ - и  $\text{C}_{22}$ -сфингозины и  $\text{C}_{19}$ - и  $\text{C}_{21}$ -фитосфингозины, а в ганглиозиде (3а) более 70% сфингозиновых оснований составляют  $\text{C}_{19}$ -,  $\text{C}_{20}$  и  $\text{C}_{22}$ -сфингозины.

#### Структура ганглиозидов офиуры *O. annulosa* (ганглиозиды (1б), (2б) и (3б))

Как и в случае ганглиозидов офиур *O. sarsi* [1] и *O. echinata*, после полного кислотного гидролиза ганглиозидов (1б), (2б) и (3б) в качестве единственного нейтрального моносахарида обнаружена глюкоза, а после частичного кислотного гидролиза — сиаловые кислоты и нейтральные моногликозилцерамиды. Количественные определения показали, что, как и в случае ганглиозидов *O. echinata*, ганглиозиды (1б) и (3б) содержат по одному остатку сиаловой кислоты и глюкозы, а ганглиозид (2б) — два остатка сиаловой кислоты и один остаток глюкозы. Анализ с помощью ТСХ сиаловых кислот, отщепившихся при частичном кислотном гидролизе ганглиозидов (1б) и (2б), обнаружил, что, как и в ганглиозидах *O. echinata*, наименее полярный главный ганглиозид содержит N-гликолилнейраминную кислоту, а минорный ганглиозид (2б) — смесь N-ацетил- и N-гликолилнейраминных кислот, хотя здесь преобладает N-гликолилнейраминная кислота (соотношение  $\text{NeuAc—NeuGc}$  1 : 2). Чтобы выделить и охарактеризовать сиаловую кислоту, входящую в состав сульфатированного ганглиозида (3б), мы провели предварительное десульфатирование ганглиозида в тех же условиях, что и ганглиозида (3а), и показали, что десульфатирование прошло полностью. Сиаловая кислота, отщепившаяся при мягком кислотном гидролизе десульфатированного ганглиозида (3б), была выделена из гидролизата с помощью диализа и ионообменной хроматографии на дауэксе ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) и охарактеризована ТСХ как N-гликолилнейраминная кислота, как и в случае сульфатированного ганглиозида (3а) из офиуры *O. echinata*.

Положение связи между моносахаридами в ганглиозидах (1б) и (2б) определяли с помощью метилирования. Анализ метилированных метилгликозидов, образующихся при метанолизе метилированных ганглиозидов (1б) и (2б), показал, что, как и в случае ганглиозидов (1а) и (2а) офиуры *O. echinata*, в ганглиозидах (1б) и (2б) остаток глюкопиранозы замещен

В положение 6, в ганглиозиде (16) концевой является N-гликолоилнейраминная кислота, а в ганглиозиде (26) — как N-ацетил-, так и N-гликолоилнейраминная кислота в соотношении 1 : 1,7. К сожалению, минорного ганглиозида (26) оказалось недостаточно для определения типа связи между остатками сиаловых кислот.

Для определения места замещения глюкозы в сульфатированном ганглиозиде (36) и положения сульфатной группы использовали  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопию. В спектре ганглиозида (36), как и в спектре ганглиозида (3а) из *O. echinata*, химический сдвиг сигнала С6 (66,4 м. д.) смещен на 5,3 м. д. в низкое поле, а химический сдвиг сигнала С5 (74,9 м. д.) — на 1,9 м. д. в высокое поле по сравнению с соответствующими сигналами в спектре глюкозилцерамида. Следовательно, в ганглиозиде (36) остаток глюкозы замещен в положении 6. В состав ганглиозида входит N-гликолоилнейраминная кислота (в спектре есть сигнал углерода  $\text{CH}_2\text{OH}$ -группы гликолевой кислоты с химическим сдвигом 61,3 м. д.). Химические сдвиги С8 (79,9 м. д.) и С9 (61,5 м. д.) этой кислоты имеют такое же значение, как и в спектре сульфатированного ганглиозида (3а) из *O. echinata*, и отличаются от химических сдвигов сигналов С8 (72,4 м. д.) и С9 (63,3 м. д.) незамещенной сиаловой кислоты в спектре ганглиозида (1а). Отсюда следует, что сульфатная группа в ганглиозиде (36), как и в ганглиозиде (3а), находится в положении 8N-гликолоилнейраминной кислоты. Спектр показал также, что в ганглиозиде (36) глюкоза находится в пиранозной форме и присоединена  $\beta$ -гликозидной связью (химический сдвиг С1 — 103,6 м. д.).

Для определения конфигурации глюкозидных связей в ганглиозидах (16) и (26) использовали окисление хромовым ангидридом ацетилированных глюкозилцерамидов, полученных после мягкого кислотного гидролиза этих ганглиозидов. В обоих случаях глюкоза разрушилась практически полностью. Следовательно, она присоединена  $\beta$ -гликозидной связью.

Конфигурацию кетозидных связей сиаловых кислот в главных ганглиозидах (16) и (36) определяли с помощью ферментативной обработки нейраминидазой. Сульфатированный ганглиозид (36), как и ганглиозид (3а) из *O. echinata*, устойчив к действию фермента, поэтому мы предварительно провели десульфатирование ганглиозида (36). Нейраминидаза из *V. cholerae* полностью отщепляет сиаловые кислоты от ганглиозида (16) и десульфатированного ганглиозида (36). Следовательно, их кетозидные связи имеют  $\alpha$ -конфигурацию.

На основании изложенных данных для углеводной цепи ганглиозида (16) предложена структура  $\text{NeuGc}(\alpha 2-6)\text{Glc}p(\beta 1-1)\text{Cer}$ , для ганглиозида (26) — дисиазил(2-6)Glc $p$ ( $\beta$ 1-1)Cer и для ганглиозида (36) —  $\text{NeuGc}8\text{SO}_3^-(\alpha 2-6)\text{Glc}p(\beta 1-1)\text{Cer}$ .

Строение липидной части ганглиозидов (16), (26) и (36) определяли с помощью кислотного метанолиза. В продуктах метанолиза каждого ганглиозида обнаружены метиловые эфиры незамещенных и  $\alpha$ -гидроксывысших жирных кислот и сфингозиновые основания. Как и в ганглиозидах *O. sarsi* [1] и *O. echinata*, здесь присутствуют только насыщенные кислоты и главными компонентами незамещенных кислот являются пальмитиновая и стеариновая кислоты. В ганглиозиде (26), кроме того, высоко содержание  $\text{C}_{22}$ - и  $\text{C}_{26}$ -кислот. Среди  $\alpha$ -гидроксикислот 80—90% составляют  $\text{C}_{22}$ -,  $\text{C}_{23}$ - и  $\text{C}_{24}$ -кислоты (см. табл. 3).

По данным ТСХ, сфингозиновым основанием ганглиозида (16) является сфингозин, ганглиозида (26) — сфингозин с небольшой примесью дигидросфингозина (~10%), а ганглиозида (36) — смесь примерно равных количеств сфингозина и фитосфингозина. Сфингозин и фитосфингозин были выделены из метанолизатов, разделены препаративной ТСХ и окислены смесью  $\text{NaIO}_4$ — $\text{KMnO}_4$  [9]. Полученные после окисления высшие жирные кислоты анализировали с помощью ГЖХ в виде метиловых эфиров. Состав соответствующих им сфингозиновых оснований приведен в табл. 4. Как видно из таблицы, здесь во всех ганглиозидах высоко содержание  $\text{C}_{20}$ - и  $\text{C}_{22}$ -сфингозинов, как и в случае ганглиозидов из *O. echi-*

Состав высших жирных кислот (C<sub>n:o</sub>) ганглиозидов (16)–(36) *O. annulosa* (% от суммы)

n	Незамещенные кислоты			α-Гидроксикислоты		
	(16)	(26)	(36)	(16)	(26)	(36)
14	10,5	2,6	3,8	—	—	—
15	—	—	2,5	—	—	—
16	42,0	17,3	21,7	—	—	—
17	—	—	2,0	—	—	—
18	35,4	19,3	28,0	11,6	5,2	20,4
20	3,6	3,5	3,3	—	—	—
21	—	—	2,1	—	—	—
22	8,5	14,2	12,1	38,2	38,3	41,7
23	—	9,5	7,0	30,1	31,7	22,7
24	—	10,1	5,3	20,1	24,8	15,2
25	—	5,2	2,8	—	—	—
26	—	18,4	9,7	—	—	—

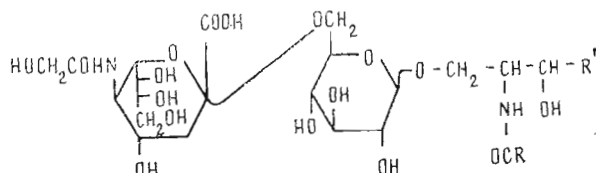
Таблица 4

Состав сфингозиновых оснований (C<sub>N</sub>) ганглиозидов (16)–(36) *O. annulosa* (% от суммы)

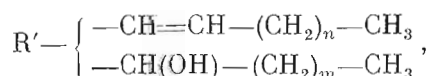
N	Сфингозины			Фитосфингозины
	(16)	(26)	(36)	(36)
14	12,1	—	—	—
16	3,6	—	—	—
17	6,4	—	—	13,7
18	13,6	11,3	12,2	24,8
19	15,5	7,7	9,3	41,0
20	30,6	50,3	44,6	—
21	—	—	—	20,5
22	18,2	30,7	20,4	—
24	—	—	3,1	—
26	—	—	7,2	—
28	—	—	3,2	—

nata. Состав дигидросфингозинов минорного ганглиозида (26) не исследовали за недостатком материала.

Таким образом, на основании приведенных выше данных для главных наименее полярных ганглиозидов офиур *O. echinata* и *O. annulosa* предложена структура:



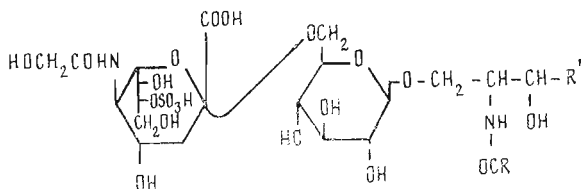
в ганглиозиде (1a) R — остаток высшей жирной незамещенной кислоты,



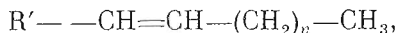
в ганглиозиде (16) R — остаток высшей жирной незамещенной или α-гидроксикислоты, R' —  $-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ .

Для сульфатированных ганглиозидов предложена структура

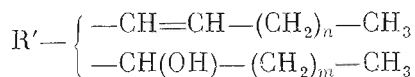




в ганглиозиде (3а)

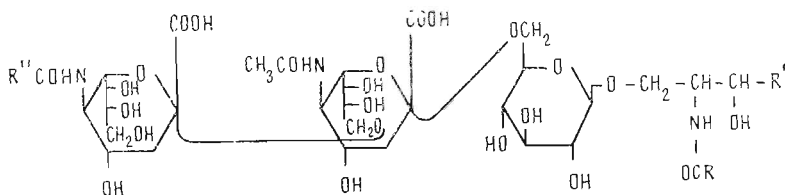


в ганглиозиде (3б)

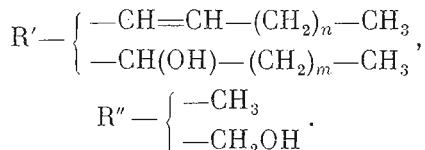


в ганглиозиде (3а) и (3б) R — остаток высшей жирной незамещенной или  $\alpha$ -гидроксикислоты.

Минорный дисиалоганглиозид (2а) из *O. echinata* имеет структуру:



R — остаток высшей жирной незамещенной или  $\alpha$ -гидроксикислоты,



Проведенное исследование показывает, что два вида офиур, *O. echinata* и *O. annulosa*, относящиеся к одному семейству (Ophiocomidae), но обитающих в разных районах Мирового океана, имеют одинаковый ганглиозидный состав. Оба вида офиур содержат по три ганглиозида, относительное содержание которых одинаково для каждого вида. Структура олигосахаридных цепей главных ганглиозидов также одинакова для обоих видов офиур, а олигосахаридные цепи минорных ганглиозидов, возможно, различаются только соотношением N-ацетильного и N-гликолильного заместителя в сиаловых кислотах. Состав липидной части ганглиозидов этих видов офиур близок по характеру, хотя и не идентичен. По структуре эти ганглиозиды сходны с ганглиозидами офиуры *O. sarsi* [1], относящейся к другому семейству (Ophiuridae) и обитающей в Японском море, и можно ожидать, что такой тип структуры является общим для всего класса офиур. Интересно, что такое же строение олигосахаридных цепей ганглиозидов у другого класса иглокожих — морских ежей, и не встречается у других животных, в том числе морских звезд, которых многие зоологи на основании морфологических исследований считают классом иглокожих, наиболее близким офиурам. Результаты исследования ганглиозидов иглокожих подтверждают данные, полученные при изучении сравнительной эмбриологии иглокожих, которые указывают на большее филогенетическое родство между офиурами и морскими ежами, чем между офиурами и морскими звездами [10]. Можно надеяться, что дальнейшее исследование ганглиозидов, а также других биологически важных соединений, выделенных из иглокожих, поможет в выяснении путей эволюции этих животных.



## Экспериментальная часть

Офиуры *O. echinata* собраны в сентябре в Карибском море, а *O. annulosa* — в апреле-мае в Южно-Китайском море. Липидный экстракт целых животных и препарат полярных гликолипидов получали по ранее описанной методике [11].

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

*Колоночная хроматография ганглиозидов O. echinata на DEAE-целлюлозе* ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ). Колонку (2,0 × 48 см) промывали последовательно 4000 мл смеси  $\text{CHCl}_3$ — $\text{CH}_3\text{OH}$  (2 : 1), 4000 мл  $\text{CH}_3\text{OH}$  и далее растворами  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  в  $\text{CH}_3\text{OH}$  (ступенчатый градиент: 1200 мл — 0,025 М, 3000 мл — 0,1 М, 2000 мл — 0,25 М); объем фракций 50 мл. По 0,5 мл каждой фракции упаривали и анализировали ТСХ. Фракции, элюированные солью одной концентрации и содержавшие ганглиозиды одинаковой полярности, объединяли, диализовали против дистиллированной воды, упаривали и лиофилизовали. Из 245 мг препарата полярных гликолипидов (одна загрузка) получили 18,0 мг ганглиозида (1а), 5,1 мг ганглиозида (2а) и 16,0 мг ганглиозида (3а).

*Колоночная хроматография ганглиозидов O. annulosa на DEAE-целлюлозе* ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ). Колонку (2,0 × 48 см) промывали последовательно 4000 мл смеси  $\text{CHCl}_3$ — $\text{CH}_3\text{OH}$  (2 : 1), 2000 мл  $\text{CH}_3\text{OH}$  и далее растворами  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  в  $\text{CH}_3\text{OH}$  (ступенчатый градиент: 1700 мл — 0,025 М, 3750 мл — 0,1 М, 1000 мл — 0,25 М); объем фракций 50 мл. По 0,5 мл каждой фракции упаривали и анализировали ТСХ. Фракции, элюированные солью одной концентрации и содержавшие ганглиозиды одинаковой полярности, объединяли, диализовали против дистиллированной воды, упаривали и лиофилизовали. Полученный препарат ганглиозида (3б) дополнительно очищали на колонке с DEAE-целлюлозой ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ). Из 680 мг препарата полярных гликолипидов (одна загрузка) получили 5,5 мкмоль ганглиозида (1б) (считая на сиаловую кислоту), 7,5 мкмоль ганглиозида (2б) и 13,0 мкмоль ганглиозида (3б).

*ИК-спектры* снимали в таблетках с KBr.

*ТСХ* проводили на силикагеле 60 Н (Merck). 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 [3] и резорциновым [2] реактивами; для нейтральных гликолипидов —  $\text{CHCl}_3$ — $\text{CH}_3\text{OH}$ — $\text{H}_2\text{O}$  (16 : 6 : 1), обнаружение — орциновым реактивом; для метилированных производных ганглиозидов —  $\text{CHCl}_3$ — $\text{CH}_3\text{OH}$  (20 : 1), обнаружение — резорциновым реактивом; для сиаловых кислот —  $n\text{-C}_3\text{H}_7\text{OH}$ — $\text{H}_2\text{O}$ —2 М  $\text{NH}_4\text{OH}$  (6 : 2 : 1), 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 —  $\text{CHCl}_3$ , обнаружение — раствором бромтимолблау и конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

*ГЖХ* выполняли на приборе фирмы Hewlett Packard, серия 5890А (США). Нейтральные моносахариды анализировали в виде ацетатов соответствующих гекситов на колонке Ultra-1 при 200—290° С (10°/мин); метиловые эфиры высших жирных кислот — на той же колонке в том же режиме температур; частично метилированные метиловые эфиры метилкетозидов сиаловых кислот — на той же колонке при 180—290° С (10°/мин); частично метилированные метилглюкозиды — на приборе Pye Unicam (Англия) на колонке с 3% NGA на диатомите С при 160° С.

*Хроматомасс-спектрометрический анализ* метиловых эфиров высших жирных кислот и метиловых эфиров метилкетозидов метилированных производных сиаловых кислот проводили на приборе Varian MAT III (ФРГ) на колонке с 3% OV-1 при ионизирующем напряжении 70 эВ.

*Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР* снимали на приборе Bruker WM-250 с рабочей частотой по углероду 62,9 МГц при 35° С, длина импульса 8 мкс (30°), объем

памяти 16К, частота повторения импульсов 0,6 с, концентрация ганглиозидов 1,2% в DMSO- $d_6$ .

*Аналитические методы:* сиаловые кислоты количественно определяли с резорциновым реактивом [2, 12], гексозы — в виде ацетатов гекситов с помощью ГЖХ (в качестве внутреннего стандарта использовали инозит).

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

*Частичный кислотный гидролиз* ганглиозидов проводили HCOOH, pH 2,1, при 80° С в течение 1,5 ч [13]. Реакционную смесь лиофилизировали и получившиеся продукты подвергли диализу. Недиализуемый продукт лиофилизировали и анализировали ТСХ. Внешний водный слой упарили до небольшого объема и в аликвоте полученного раствора определяли содержание сиаловых кислот с резорциновым реактивом, а также анализировали их с помощью ТСХ.

*Метилирование* ганглиозидов проводили по методу [14]. Полученные производные экстрагировали  $\text{CHCl}_3$ , диализовали против воды и очищали препаративной ТСХ. Далее метилированные ганглиозиды подвергали метанолизу 0,5 М HCl в  $\text{CH}_3\text{OH}$  при 80° С в течение 16 ч. Из метанолизата извлекли гексаном метиловые эфиры высших жирных кислот. Частично метилированные метилглюкозиды анализировали ГЖХ, а метилированные производные метиловых эфиров метилкетозидов сиаловых кислот после ацетилирования анализировали ГЖХ и хроматомасс-спектрометрией.

*Полный кислотный метанолиз* гликолипидов проводили 0,5 М HCl в  $\text{CH}_3\text{OH}$  при 80° С в течение 18 ч. Метиловые эфиры высших жирных кислот и сфингозиновые основания выделяли как описано ранее [11]. Метиловые эфиры кислот разделяли препаративной ТСХ на незамещенные и  $\alpha$ -гидроксизамещенные и анализировали методом ГЖХ и хроматомасс-спектрометрией.  $\alpha$ -Гидроксикислоты предварительно ацетилировали.

Сфингозиновые основания разделяли по видам препаративной ТСХ, растворяли в 0,5 мл *трет*-бутанола, добавляли 1,0 мл 5 мМ раствора  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 0,5 мл 0,1 М раствора  $\text{NaIO}_4$  и 0,5 мл 0,01 М раствора  $\text{KMnO}_4$ . Реакционную смесь встряхивали при 20° С в течение 2 ч, затем добавили твердый  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  до обесцвечивания раствора, подкислили и извлекли высшие жирные кислоты 10 мл эфира [9]. Полученные продукты подвергли полному кислотному метанолизу 0,5 М HCl в  $\text{CH}_3\text{OH}$  при 80° С в течение 16 ч. Метиловые эфиры высших жирных кислот извлекли гексаном и анализировали методом ГЖХ.

*Десульфатирование* ганглиозидов проводили в абс. лиоксане в присутствии 1—2 кристаллов  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N} \cdot \text{HCl}$  при кипячении в течение 10 мин [7]. К охлажденной смеси добавили  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и диализовали против дистиллированной воды. Недиализуемый продукт лиофилизировали и анализировали ИК-спектроскопией, колоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) и с помощью ТСХ.

*Окисление хромовым ангидридом.* Нейтральные гликолипиды, полученные при частичном кислотном гидролизе ганглиозидов, ацетилировали смесью  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O} - \text{C}_5\text{H}_5\text{N}$  (1 : 1) при 20° С в течение 16 ч, упарили с добавлением толуола, остаток растворили в смеси  $\text{CH}_3\text{COOH} - (\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$  (9 : 1) и обрабатывали  $\text{CrO}_3$ , как описано ранее [15]. Моносахариды анализировали с помощью ГЖХ.

*Ферментативный гидролиз* ганглиозидов проводили нейраминидазой из *V. cholerae* в 0,05 М Na-ацетатном буфере, pH 5,5, по методу [16]. Реакционную смесь анализировали ТСХ.

Авторы приносят благодарность В. С. Левину (Институт биологии моря ДВО АН СССР) и Фернандесу Оскару Гонсало Валиенте (Институт онкологии и радиобиологии, Куба) за обеспечение офиурами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 507—513.
2. Svennerholm L. // Biochim. et biophys. acta. 1957. V. 24. № 3. P. 604—611.
3. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Svetashev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P. // Comp. Biochem. and Physiol. 1970. V. 34. № 1. P. 163—177.
4. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. // J. Lipid Res. 1968. V. 9. № 3. P. 396.
5. Haines T. H. // Progress in the chemistry of fats and other lipids. V. 2 / Ed. Holman R. H. Oxford: Pergamon Press, 1971. Part 3. P. 299—345.
6. Смирнова Г. П. // Прогресс химии углеводов / Ред. Торгов И. В. М.: Наука, 1985. С. 126—148.
7. Кочетков Н. К., Усов А. И., Адамьяц К. С. // Журн. общ. химии. 1972. Т. 42. С. 1617—1622.
8. Halbeek H., Haverkamp J., Kamerling J. P., Vliegenthart J. F. G., Versluis C., Schauer R. // Carbohydr. Res. 1978. V. 60. № 1. P. 51—62.
9. Weiss B. // Lipid chromatographic analysis. V. 2 / Ed. Marinetti G. V. New York, Basel: Marcel Dekker, 1976. P. 701—712.
10. Fell H. B., Pawson D. L. // Physiology of echinodermata / Ed. Boolootian R. A. N. Y.: Intersci. Publ. J. Wiley, 1966. P. 1—48.
11. Кочетков Н. К., Zhukova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 326. № 1. P. 74—83.
12. Miettinen T., Takki-Luukkainen I. T. // Acta chem. scand. 1959. V. 13. № 4. P. 856—858.
13. Schauer R. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1982. V. 40. P. 131—234.
14. Larson G., Karlsson H., Hansson G. C., Pimlott W. // Carbohydr. Res. 1987. V. 161. № 2. P. 281—290.
15. Laine R. A., Renkonen O. // J. Lipid Res. 1975. V. 16. № 2. P. 102—106.
16. Ishizuka I., Kloppenburg M., Wiegandt H. // Biochim. et biophys. acta. 1970. V. 210. № 2. P. 299—305.

Поступила в редакцию  
25.V.1990

N. V. CHEKAREVA, G. P. SMIRNOVA, N. K. KOCHETKOV

GANGLIOSIDES FROM TWO SPECIES OF OPHIURA, *OPHIOCOMA*  
*ECHINATA* AND *OPHIOMASTIX ANNULOSA* CLARK

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

The structures of two major and one minor gangliosides from two species of ophiura, *Ophiocoma echinata* and *Ophiomastix annulosa*, have been established. On the basis of chemical methods, mass-spectrometry, <sup>13</sup>C NMR spectroscopy and enzymatic degradation, major gangliosides from two species were identified as NeuGc(α2-6)GlcP(β1-1)Cer and NeuGc8SO<sub>3</sub><sup>-</sup>(α2-6)GlcP(β1-1)Cer. The minor ganglioside from *O. echinata* was identified as NeuAc(Gc)(α2-9)NeuAc(α2-6)GlcP(β1-1)Cer. The minor ganglioside from *O. annulosa* was also found to be disialoganglioside, with the disialyl fragment linked to O6 of the glucose residue of the glucosylceramide moiety. The compositions of the lipid moieties of gangliosides were determined.