БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 7 * № 1 * 1981

УДК 547.95.02

СТРУКТУРА СИАЛОСФИНГОЛИПИДА ИЗ ТКАНИ ГОНАД МОРСКОГО ЕЖА *ECHINOCARDIUM CORDATUM*

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

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

Из липидного экстракта ткани гонад морского ежа *Echinocardium cordatum* выделен главный сиалогликолипид. Показано, что он является сфингогликолипидом. На основании данных полного и частичного кислотного гидролиза, частичного щелочного гидролиза, метанолиза, метилирования, ферментативного гидролиза, окисления периодатом и хромовым ангидридом для него предложена структура 4-O-X-N-гликолилнейраминозил(α2→6)*D*-глюкопиранозил(β1→1)церамида. Сфингозиновое основание гликолипида является смесью фитосфингозинов, состав которой установлен с помощью ГЖХ. Установлен также состав высших жирных кислот.

Ранее мы сообщали о выделении трех сиалогликолипидов из ткани гонад морского ежа *Echinocardium cordatum* [1]. Структура двух из них была установлена: наиболее кислый сиалогликолипид (III) имел строение 8-сульфо-N - гликолилнейраминозил(α2→6)глюкопиранозил(β1 → 1)церамида и был первым представителем сульфатированных сиалогликолипидов [1]; минорный гликолипид (II), имевший строение N-гликолилнейраминозил(α2 → 4)-N - гликолилнейраминозил(α2 → 6)глюкопиранозил-(β→1)церамида, содержал необычный (2→4)-тип связи остатков сиаловых кислот друг с другом [2]. В настоящем сообщении приводятся данные по структуре менее кислого и менее полярного при ТСХ сиалогликолипида (I).

Все три сиалогликолипида *E. cordatum* были выделены ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе (CH_3COO^-), как описано ранее [1]. Сиалогликолипид (I) элюировался 0,025 М раствором CH_3COONH_4 в CH_3OH как моносиалоганглиозид. По данным ТСХ, выделенное соединение было однородным и содержало сиаловую кислоту и нейтральные сахара (окрашивание с резорциновым [3] и орциновым [4] реактивами) и не содержало фосфатной группы и свободной аминогруппы (отсутствие окраски с молибдатным реактивом [5] и нингидрином). В ИК-спектре сиалогликолипида(I) наряду с полосами поглощения, типичными для обычных сиалогликолипидов, присутствовала полоса 1735 $см^{-1}$, характерная для валентных колебаний группы C=O сложного эфира или лактона. После обработки гликолипида (I) 0,1 н. NaOH в условиях, когда происходит расщепление сложноэфирной связи и раскрытие лактона [6], эта полоса поглощения исчезла. Щелочная обработка гликолипида не изменила его кислотности: обработанный гликолипид элюировался с DEAE-целлюлозы в тех же условиях, что и исходный. Отсюда следует, что гликолипид (I) не содержит лактона, раскрытие которого должно было бы уси-

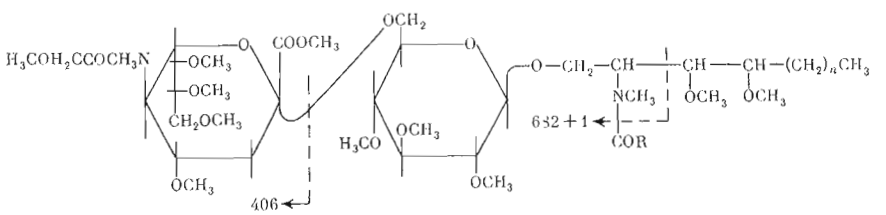
лить кислотные свойства гликолипида, а, по-видимому, несет заместитель, связанный сложноэфирной связью.

В состав гликолипида (I) входят фитосфингозин, высшие жирные кислоты, глюкоза и сиаловая кислота в соотношении 1 : 1 : 1 : 1. Однако количественное определение сложноэфирных групп в гликолипиде реакцией с гидроксиламином в присутствии $FeCl_3$ [7] дало отрицательный результат, хотя при обработке щелочным гидроксиламином щелочелабильный заместитель отщепляется (в ИК-спектре исчезает полоса 1735 $см^{-1}$).

Строение олигосахаридной цепи гликолипида исследовали методами метилирования, частичного кислотного и щелочного гидролизов, ферментативного гидролиза, окисления CrO_3 и периодатом.

Из масс-спектра метилированного гликолипида следовало, что на невосстанавливающем конце углеводной цепи находится N-гликолилнейраминовая кислота (пики ионов с *m/e* 406 и 374), замещающая глюкозу, связанную с фитосфингозином по первичному гидроксилу (пик иона с *m/e* 683) (схема 1). Щелочелабильный заместитель, по-видимому, при

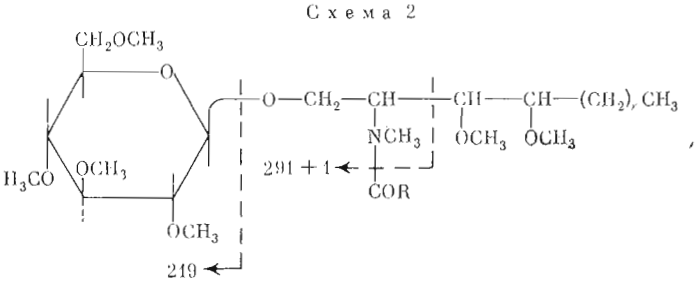
Схема 1



метилировании по Хакомори отщепляется. Анализ продуктов метанолиза метилированного гликолипида обнаружил, что глюкопираноза замещена по $C_{(6)}$, как и во всех сиалогликолипидах морских ежей, изученных до сих пор [1, 2, 8—10].

При частичном кислотном гидролизе гликолипида (I) (0,1 н. H_2SO_4) в обычных условиях отщеплялась сиаловая кислота и образовывался моноглюкозилцерамид. В масс-спектре метилированного моноглюкозилцерамида присутствовал пик иона с *m/e* 219, соответствующий концевой глюкозе, и пик иона с *m/e* 292, относящийся к фрагменту, подтверждающему связь глюкозы с фитосфингозином (схема 2). При действии хромового ан-

Схема 2



гидрида на ацетат моноглюкозилцерамида глюкоза полностью окислялась, что свидетельствовало о β-конфигурации глюкозидной связи.

Остаток глюкозы сиалогликолипида, поскольку он окислялся глюкозоксидазой, отнесен к *D*-ряду.

Сиаловая кислота, отщепившаяся при мягком кислотном гидролизе гликолипида, имела такой же ИК-спектр, как и незамещенные N-ацетил- и N-гликолилнейраминовые кислоты. Анализ отщепившейся сиаловой кислоты с помощью ТСХ обнаружил N-гликолилнейраминовую кислоту в качестве главного компонента и N-ацетилнейраминовую кислоту — в качестве минорного. Смесь этих кислот подвергли мягкому кислотному ме-

танолизу и ацетилированию. Полные ацетаты метиловых эфиров метоксинейраминовых кислот анализировали с помощью ГЖХ и масс-спектрометрии [11]. По данным ГЖХ, смесь содержала 87% N-гликолил- и 13% N-ацетилнейраминовых кислот. В масс-спектре полученных производных присутствовали все пики ионов, характерные для N-гликолилнейраминовой кислоты, и значительно менее интенсивные пики ионов соответствующего производного N-ацетилнейраминовой кислоты [11].

После частичного кислотного гидролиза гликолипида 0,1 н. H_2SO_4 при концентрации его в растворе 0,8% (вместо обычных 0,1—0,2%) удалось выделить сиаловые кислоты, в ИК-спектре которых присутствовала полоса поглощения 1735 $см^{-1}$. Следовательно, щелочелабильный заместитель гликолипида находится в остатке сиаловой кислоты. Главным компонентом выделенных кислот, по данным ТСХ, была сиаловая кислота, подвижность которой почти не отличалась от подвижности N-гликолилнейраминовой кислоты. Она имела такую же подвижность при электрофорезе, как N-ацетил- и N-гликолилнейраминовые кислоты, и давала такой же спектр поглощения хромофора с резорцином, как обычные сиаловые кислоты ($\lambda_{макс}$ 585 нм). Следовательно, заместитель не изменяет кислотности выделенной кислоты и должен быть полярным (несмотря на присутствие заместителя в N-гликолилнейраминовой кислоте, полярность соединения не уменьшилась). Однако эта сиаловая кислота не дала цветной реакции на сложный эфир.

Сиалогликолипид (I) был устойчив к ферментативному гидролизу нейраминидазой из *Vibrio cholerae*, но после щелочной обработки гликолипида фермент количественно отщеплял сиаловую кислоту. Следовательно, кетозидная связь сиаловой кислоты имеет α-конфигурацию. Эти данные показывают также, что щелочелабильный заместитель находится у остатка сиаловой кислоты и мешает действию фермента.

Для определения положения заместителя в сиаловой кислоте гликолипид был окислен периодатом. При этом выделялся 1 моль формальдегида; следовательно, положения 8 и 9 в сиаловой кислоте гликолипида свободны. Из окисленного гликолипида (I) после его восстановления KBH_4 и частичного кислотного гидролиза была выделена C_7-сиаловая кислота, давшая характерный спектр поглощения хромофора с резорциновым реактивом ($\lambda_{макс}$ 630 нм) [12]. Следовательно, связь $C_{(7)}—C_{(8)}$ расщепилась периодатом, т. е. положение 7 в сиаловой кислоте гликолипида также свободно. Таким образом, в N-ацетилнейраминовой кислоте, входящей в состав гликолипида, заместитель может находиться при $C_{(4)}$. Мы предполагаем, что характер замещения сиаловых кислот в гликолипиде (I) одинаковый, т. е. N-гликолилнейраминовая кислота также замещена по $C_{(4)}$, а не по гидроксилу гликолевой кислоты [12а].

Известно, что в состав природных гликопротеинов и гликолипидов иногда входят замещенные сиаловые кислоты. Как правило, это О-ацетильные или О-гликолильные производные сиаловых кислот. Описан единственный случай выделения 9-О-*L*-лактил-N-ацетилнейраминовой кислоты [13]. Хотя эти производные сиаловых кислот вызывают окрашивание с гидроксиламином, а гликолипид (I) и его сиаловая кислота не дают этой реакции, мы проверили, присутствуют ли О-ацетильная, О-гликолильная и О-лактильная группы в гликолипиде. После мягкой щелочной обработки гликолипида реакционную смесь диализовали и во внешней воде определяли присутствие ацетата в виде этилового эфира с помощью ГЖХ [14], гликолата — спектрофотометрически после реакции с 2,7-диоксинафталином [15] и *L*-лактата — с помощью лактатдегидрогеназы в присутствии NAD. Анализ показал, что перечисленные О-ацильные группы в гликолипиде отсутствуют. Из данных ГЖХ следовало также, что в щелочном гидролизате гликолипида отсутствуют формиат и пропионат. Отсутствие О-гликолильной группы было подтверждено также количественным определением гликолевой кислоты в исходном гликолипиде (I) и в гликолипи-

Таблица 1

Состав сфингозиновых оснований сиалогликолипида (I)

Спирты	Соответствующий фитосфингозин	% от суммы	Спирты	Соответствующий фитосфингозин	% от суммы
$C_{13:0}$	$C_{16:0}$	6,1	$C_{16:0}$	$C_{19:0}$	42,5
$C_{14:0}$	$C_{17:0}$	14,2	$C_{17:0}$	$C_{20:0}$	7,1
$C_{15:0}$	$C_{18:0}$	26,4	$C_{18:0}$	$C_{21:0}$	3,5

Таблица 2

Состав высших жирных кислот сиалогликолипида (I)

Незамещенные кислоты	% от суммы незамещенных кислот	α-Окси-кислоты после гидрирования	% от суммы α-окси-кислот	Незамещенные кислоты	% от суммы незамещенных кислот	α-Окси-кислоты после гидрирования	% от суммы α-окси-кислот
$C_{14:0}$	12,0	$C_{13:0}$	2,4	$C_{20:1}$	9,7	$C_{20:0}$	3,8
$C_{15:0}$	5,1	$C_{14:0}$	2,4	$C_{22:1}$	3,5	$C_{21:0}$	1,0
$C_{16:0}$	35,6	$C_{15:0}$	31,0	$C_{22:0}$	1,1	$C_{22:0}$	5,5
$C_{17:0}$	2,5	$C_{16:0}$	2,4	$C_{23:1}$	2,4	$C_{23:0}$	4,9
$C_{18:1}$	2,9	$C_{17:0}$	18,3	$C_{23:0}$	1,4	$C_{24:0}$	12,9
$C_{18:0}$	8,8	$C_{18:0}$	4,9	$C_{24:1}$	7,7	$C_{25:0}$	2,4
$C_{19:1}$	7,4	$C_{19:0}$	1,4			$C_{26:0}$	7,0

де, обработанном щелочью. Оба определения дали одинаковый результат. Следовательно, в гликолипиде находится только одна N-гликолильная группа.

Поскольку в природных соединениях иногда встречаются производные сахаров, включающие пировиноградную кислоту (правда, в виде кеталя, а не сложного эфира), мы проверили содержание пировиноградной кислоты в щелочном гидролизате гликолипида (I) с помощью лактатдегидрогеназы в присутствии NADH [16]. Оказалось, что эта кислота также отсутствует. Таким образом, в состав гликолипида (I) входит необычный щелочелабильный заместитель (достаточно неустойчивый и в кислых условиях), природа которого пока неизвестна. По-видимому, в выяснении этого вопроса смогут помочь физико-химические методы исследования, например ^{13}C-ЯМР-спектроскопия.

Липидная часть гликолипида (I) была изучена методами периодатного окисления и кислотного метанолиза.

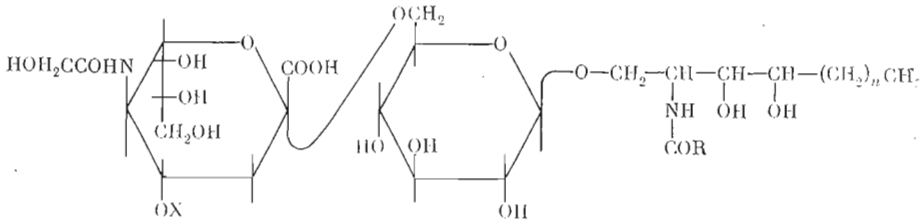
Строение и состав сфингозиновых оснований установлены на основании данных периодатного окисления гликолипида (I). Продукты окисления были восстановлены KBH_4 и распределены между водой и гексаном. Из водного слоя после метанолиза был выделен 2-амино-1,3-пропандиол, который анализировали в виде 2,4-динитрофенильного производного с помощью масс-спектрометрии [1]. В органическом слое были обнаружены высшие жирные спирты. Обнаружение этих продуктов показывает, что гидроксильные группы находятся у $C_{(1)}$, $C_{(3)}$ и $C_{(4)}$, а аминогруппа — у $C_{(2)}$, т. е. функциональные группы занимают те же положения, что и в фитосфингозине. Состав фитосфингозинов был установлен на основании изучения состава высших жирных спиртов методом ГЖХ (табл. 1). Как видно из таблицы, C_{19}-фитосфингозин является главным компонентом смеси в отличие от гликолипидов (II) и (III), в которых преобладает C_{18}-фитосфингозин [1, 2].

В продуктах метанолиза гликолипида (I) были обнаружены высшие жирные незамещенные кислоты и монооксикислоты, причем последние составляли не более 10% смеси. Состав кислот анализировали методом ГЖХ

(табл. 2). Из таблицы следует, что незамещенные кислоты являются смесью насыщенных и ненасыщенных кислот в соотношении примерно 7 : 3. Главный компонент незамещенных кислот гликолипида (I) — кислота $C_{16:0}$ (35,6%). Интересно, что в сульфатированном гликолипиде (III) из этого же вида морского ежа содержание непредельных кислот не превышает 7% [1], хотя в сиалогликолипидах других видов морских ежей непредельные кислоты могут составлять половину суммы или более [8, 9].

Монооксикислоты гликолипида (I) анализировали в виде метоксипроизводных. Так как хроматографическая картина разделения этих кислот оказалась очень сложной из-за присутствия полиненасыщенных соединений, оценка состава смеси сделана после гидрирования (табл. 2). Следует отметить широкий диапазон α-оксикислот по длине цепи (от 13 до 26 С-атомов). В сульфатированном гликолипиде (III) [1] из того же источника, а также в несульфатированных сиалогликолипидах морских ежей *S. nudus* [17] и *S. intermedius* [8] полиненасыщенные α-оксикислоты не обнаружены, хотя содержание моноеновых оксикислот составляет ~30%.

На основании полученных данных для сиалогликолипида (I) *E. cordatum* предложена следующая структура:



n = 11, 12, 13, 14, 15, 16; R — остаток высшей жирной кислоты; X — неизвестный заместитель

Экспериментальная часть

Морские ежи *E. cordatum* собраны в сублиторальной зоне залива Посьет Японского моря в августе-сентябре. Липидный экстракт гонад и неочищенный препарат сиалогликолипидов получены по ранее описанной методике [8]. В работе применяли N-ацетилнейраминовую кислоту (Koch-Light), N-гликолилнейраминовую кислоту (Sigma), нейраминидазу *Vibrio cholerae* (500 ед. акт./мл, Calbiochem), лактатдегидрогеназу (450 ед. акт./мг, Serva). Органические растворители перед использованием перегоняли.

Колоночную хроматографию сиалогликолипидов на DEAE-целлюлозе (CH_3COO^-) выполняли как описано ранее [1]. Колонку (2,5×70 см) промывали последовательно 1200 мл смеси $CHCl_3$—CH_3OH (3 : 1), 1000 мл CH_3OH, 1050 мл 0,025 М CH_3COONH_4 в CH_3OH, 500 мл 0,1 М CH_3COONH_4 в CH_3OH и 1200 мл 0,25 М CH_3COONH_4 в CH_3OH; объем фракций 50 мл. 0,5 мл каждой фракции упаривали и определяли содержание сиаловой кислоты с резорциновым реактивом [3]. Фракции, содержащие сиалогликолипиды, диализовали против дистиллированной воды, упаривали и лиофилизовали. Из 1 г исходной смеси сиалогликолипидов *E. cordatum* получали 120 мг гликолипида (I), содержащего 15% сиаловых кислот.

ИК-спектры снимали в таблетках с KBr.

ТСХ проводили на силикагеле КСК (150 меш), содержавшем 5% гипса, с использованием тех же систем растворителей, что описаны ранее [8].

ГЖХ выполняли на приборе «Pye Unicam 104» (Англия), скорость газа-носителя 60 мл/мин. Нейтральные моносахариды анализировали в виде ацетатов соответствующих гекситов на колонке с 3% ECNSS-M на диатомите С при 180° С, частично метилированные метилгликозиды — на колонке с 3% NGA на диатомите С при 155° С, полные ацетаты метило-

вых эфиров метоксисиаловых кислот — на колонке с 3% SE-30 на диатомите С при 240° С, этиловые эфиры муравьиной, уксусной и пропионовой кислот — на колонке с 20% полиэтиленгликоля-400 на хроматоне N-AW-DMCS при 50° С, алифатические спирты и метиловые эфиры высших жирных незамещенных кислот и метоксикислот — на колонке с 3% SE-30 на диатомите С при 150→220° С и 170→280° С соответственно (2° С/мин).

Масс-спектры снимали на приборе «Varian MAT CH-6» при энергии ионизирующих электронов 70 эВ.

Сфингозиновое основание количественно определяли по методу Лаутера и Тремса [18]; калибровочную кривую строили по френозину, выделенному по методу Картера [19] из мозга крупного рогатого скота.

Полный кислотный гидролиз гликолипидов (2 мг) проводили 2 н. HCl (1 мл) при 100° С в течение 4 ч. Моносахариды анализировали ГЖХ в виде ацетатов соответствующих гекситов. В качестве внутреннего стандарта использовали инозит.

Абсолютную конфигурацию глюкозы, полученной полным кислотным гидролизом гликолипида, после выделения препаративной бумажной хроматографией в системе бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3) определяли по методу [20].

Частичный кислотный гидролиз сиалогликолипида. А. Гликолипид (5 мг) гидролизовали 0,1 н. H_2SO_4 (5 мл) при 80° С в течение 1,5 ч. Реакционную смесь диализовали 24 ч против дистиллированной воды (500 мл) при 20° С. Недиализуемый продукт лиофилизовали и анализировали ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода (64 : 24 : 4). Внешний водный раствор упаривали до 5 мл и сиаловые кислоты выделяли на дауэксе 2×8 (CH_3COO^-) элюцией 1 М ацетатным буфером, pH 4,6 (10 мл). Количество сиаловой кислоты в элюате определяли реакцией с резорциновым реактивом [3]. Элюат деионизовали смолой JR-120(H^+) и лиофилизовали, сиаловые кислоты анализировали с помощью ТСХ на силикагеле, импрегнированном 0,2 М NaH_2PO_4, в системе *н*-пропанол — вода — 2 н. NH_4OH (30 : 10 : 5) и с помощью ГЖХ и масс-спектрометрии в виде полных ацетатов метиловых эфиров метоксисиаловых кислот [11].

Б. Сиалогликолипид (8 мг) гидролизовали 0,1 н. H_2SO_4 (1 мл) при 80° С в течение 1,5 ч. Реакционную смесь диализовали против дистиллированной воды (50 мл) в течение 24 ч при 20° С. Внешний водный раствор упаривали до 5 мл, нейтрализовали 0,1 н. NaOH и лиофилизовали. В ИК-спектре полученного продукта присутствовали полосы поглощения при 3300 и 3450 $см^{-1}$ (ассоциированные гидроксилы), 2860 и 2930 $см^{-1}$ (связи С—Н), 1735 $см^{-1}$ (сложный эфир), 1640 и 1550 $см^{-1}$ (амидная группа), 1400 $см^{-1}$ (карбоксильная группа), 1040 и 1080 $см^{-1}$ (спиртовые гидроксилы). Для удаления Na_2SO_4 смесь обрабатывали последовательно дауэксом 2×8 (CH_3COO^-) (элюция 10 мл 1 М ацетатного буфера, pH 4,6) и смолой JR-120 (H^+) (элюция 20 мл воды). Элюат упаривали до небольшого объема и лиофилизовали. Выделенную сиаловую кислоту характеризовали с помощью ТСХ (см. пункт *А*) и электрофореза (0,07 М пиридин-ацетатный буфер, pH 4,5; 400 В, 4 мА, 1 ч).

Кислотный метанолиз сиалогликолипида (2 мг) проводили 3 н. HCl в CH_3OH (1,5 мл) при 80° С в течение 18 ч. Из метанолизата гексаном (2×2 мл) извлекали метиловые эфиры высших жирных кислот, которые анализировали с помощью ТСХ в дихлорэтане. После разделения препаративной ТСХ незамещенные кислоты и монооксикислоты анализировали с помощью ГЖХ. Предварительно монооксикислоты превращали в метоксипроизводное действием CH_3I в присутствии Ag_2O [21].

Метанольный слой подщелачивали 4 н. KOH в 90%-ном водном метаноле, диэтиловым эфиром (10 мл) извлекали сфингозиновые основания, которые анализировали с помощью ТСХ в системе хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH (40 : 10 : 1).

Метилирование сиалогликолипида (5 мг) и нейтрального гликолипида, полученного частичным кислотным гидролизом сиалогликолипида, проводили по методу Хакомори [22]. Метилированные производные экстрагировали $CHCl_3$ (10 мл), диализовали против воды и очищали с помощью ТСХ в системе хлороформ — метанол (20 : 1). Метилированные гликолипиды элюировали с силикагеля смесью хлороформ — метанол (4 : 1) и анализировали с помощью масс-спектрометрии (температура 350° С). Метилированный сиалогликолипид подвергали кислотному метанолизу 3 н. HCl в метаноле (1,5 мл) при 80° С в течение 18 ч и частично метилированные метилглюкозиды анализировали с помощью ГЖХ.

Окисление хромовым ангидридом нейтрального гликолипида, полученного частичным кислотным гидролизом сиалогликолипида, проводили по методу [23]. Моносахариды, образующиеся при гидролизе окисленного гликолипида, анализировали с помощью ГЖХ в виде ацетатов гекситов (внутренний стандарт — инозит).

Периодатное окисление сиалогликолипида (10 мг) проводили 0,02 М $NaIO_4$ (10 мл) при 20° С в течение 18 ч в темноте. Избыток периодата разрушали добавлением 2—3 капель 10%-ного этиленгликоля. Через 30 мин к реакционной смеси добавляли KBH_4 до pH 8,0 и через 2 ч нейтрализовали 2 н. CH_3COOH. Высшие жирные спирты экстрагировали гексаном (2×2 мл), очищали препаративной ТСХ в системе хлороформ — метанол (99 : 1) и анализировали с помощью ГЖХ. Водный раствор после экстракции диализовали против воды, недиализуемый продукт лиофилизовали и гидролизовали 0,1 н. H_2SO_4 (5 мл) при 80° С в течение 1,5 ч. Гидролизат диализовали против дистиллированной воды (500 мл), внешний водный раствор упаривали до небольшого объема и сиаловые кислоты характеризовали спектром поглощения хромофора, полученного с резорциновым реактивом. Недиализуемый продукт подвергали кислотному метанолизу 3 н. HCl в метаноле (1,5 мл) при 80° С в течение 18 ч. Метиловые эфиры высших жирных кислот экстрагировали из реакционной смеси гексаном (2×2 мл) и анализировали с помощью ТСХ в дихлорэтане. Метанольный слой упаривали досуха и получившийся 2-амино-1,3-пропандиол обрабатывали 2,4-динитрофторбензолом [24]. 2,4-Динитрофенильное производное выделяли препаративной ТСХ в системе хлороформ — метанол (9 : 1), элюировали с силикагеля смесью хлороформ — метанол (3 : 1) и анализировали с помощью масс-спектрометрии (140° С).

Формальдегид в продуктах периодатного окисления количественно определяли по методу Васьковского и Исай [25], калибровочную кривую строили по манниту.

Частичный щелочной гидролиз сиалогликолипида (2 мг) проводили 0,1 н. NaOH (1 мл) при 38° С в течение 4 ч. Гидролизат нейтрализовали 2 н. CH_3COOH до pH 7,5 и диализовали против дистиллированной воды (50 мл) в течение 24 ч при 20° С. Недиализуемый продукт лиофилизовали и анализировали с помощью ИК-спектроскопии. Внешний водный раствор упаривали до небольшого объема и лиофилизовали.

Количественное определение сложного эфира в сиалогликолипиде и сиаловой кислоте, полученной частичным кислотным гидролизом (*Б*) гликолипида, проводили по методу Хестрина [7].

Ферментативный гидролиз сиалогликолипида (2 мг) до и после мягкой щелочной обработки проводили действием нейраминидазы из *Vibrio cholerae* в ацетатном буфере, pH 5,5 [26]. Сиаловую кислоту, устойчивую к действию нейраминидазы, количественно определяли с резорциновым реактивом после обработки реакционной смеси KBH_4 [27]. Состав сиаловых кислот после ферментативного гидролиза гликолипида, обработанного щелочью, анализировали с помощью ТСХ на силикагеле, импрегнированном 0,2 М NaH_2PO_4, в системе *н*-пропанол — вода — 2 н. NH_4OH (30 : 10 : 5).

Формиат, ацетат, пропионат в виде этиловых эфиров анализировали в щелочном гидролизате гликолипида с помощью ГЖХ [14].

Гликолат в гликолипиде до и после щелочной обработки количественно определяли реакцией с 2,7-диоксинафталином [15].

Лактат в щелочном гидролизате гликолипида определяли спектрофотометрически с помощью *L*-лактатдегидрогеназы в присутствии NAD и гидразина (набор для определения *L*-лактата фирмы Boehringer, ФРГ), калибровочную кривую строили по *L*-молочной кислоте.

Пируват в щелочном гидролизате гликолипида определяли с помощью лактатдегидрогеназы в присутствии NADH [16], калибровочную кривую строили по пирувату натрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Chekareva N. V. (1976) Biochim. et biophys. acta, 424, 274–283.
2. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. (1978) Биоорган. химия, 4, 937–942.
3. Svennerholm L. (1957) Biochim. et biophys. acta, 24, 604–611.
4. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. I., Svetashev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P. (1970) Comp. Biochem. and Physiol., 34, 163–177.
5. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. I. (1968) J. Lipid Res., 9, 396.
6. Bhattacharjee A. K., Jennings H. J., Kenny C. P., Martin A., Smith I. C. P. (1975) J. Biol. Chem., 250, 1926–1932.
7. Hestrin S. (1949) J. Biol. Chem., 180, 249–261.
8. Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. (1973) Biochim. et biophys. acta, 326, 74–83.
9. Hoshi M., Nagai Y. (1975) Biochim. et biophys. acta, 388, 152–162.
10. Проказова Н. В., Кочаров С. Л., Садовская В. Л., Мошенский Ю. В., Бергельсон Л. Д., Звездина Н. Д. (1979) Биоорган. химия, 5, 458–467.
11. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Kadentsev V. I., Smirnova G. P., Zhukova I. G. (1973) Carbohyd. Res., 27, 5–10.
12. Kuhn R., Gauche A. (1965) Chem. Ber., 98, 395–413.
12a. Hakomori S., Saito T. (1969) Biochemistry, 8, 5082–5088.
13. Schauer R., Haverkamp J., Wember M., Vliegenthart J. F. G., Kamerling J. P. (1976) Eur. J. Biochem., 62, 237–242.
14. Сизова Г. С., Усова Э. П., Знаменская А. П. (1977) Ж. аналит. химии, 32, 1034–1036.
15. Eegriwe E. (1932) Z. analyt. chem., 89, 121–125.
16. Duckworth M., Yaphe W. (1970) Chem. and Ind., 23, 747.
17. Кочетков Н. К., Смирнова Г. П., Глуходед И. С. (1978) Биоорган. химия, 4, 1093–1099.
18. Lauter C. J., Trams E. G. (1962) J. Lipid Res., 3, 136–138.
19. Carter H. E., Haines W. J., Ledyard W. E., Norris W. P. (1947) J. Biol. Chem., 169, 77–82.
20. Huggett A. S. G., Nixon D. A. (1957) Biochem. J., 66, 12p.
21. Radin N. S., Kishimoto Y. (1959) J. Lipid Res., 1, 72–78.
22. Hakomori S. I. (1964) J. Biochem. (Tokyo), 55, 205–208.
23. Laine R. A., Renkonen O. (1975) J. Lipid Res., 16, 102–106.
24. Grassmann W., Hörmann H., Endres H. (1953) Chem. Ber., 86, 1477–1482.
25. Vaskovsky V. E., Isay S. V. (1969) Anal. Biochem., 30, 25–31.
26. Ishizuka I., Kloppenburg M., Wiegandt H. (1970) Biochim. et biophys. acta, 210, 299–305.
27. Schneir M. L., Rafelson M. E. (1966) Biochim. et biophys. acta, 130, 1–11.

Поступила в редакцию
14.IV.1980

STRUCTURE OF SIALOSPHINGOLIPID FROM GONADS OF THE SEA URCHIN *ECHINOCARDIUM CORDATUM*

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

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

The structure of a major sialoglycolipid from gonads of the sea urchin *Echinocardium cordatum* has been established. On the basis of total and partial acid hydrolysis, partial alkaline hydrolysis, methanolysis, methylation, enzymatic hydrolysis, periodate and chromium trioxide oxidation, this compound was identified as 4-O-X-*N*-glycolylneuraminosyl(α2→6)-*D*-glucopyranosyl(β1→1)ceramide. The long-chain bases of the sialolipid were found to constitute a mixture of phytosphingosines, whose composition was determined by gas-liquid chromatography. The fatty acids of this sialoglycolipid were shown to be a mixture of normal and α-hydroxy acids.