



УДК 547.95.02:593.93.088

РАЗВЕТВЛЕННЫЙ ДИСИАЛОГЛИКОЛИПИД
ИЗ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS AMURENSIS*

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

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

Из печени морской звезды *Asterias amurensis* выделен и охарактеризован главный сиалогликолипид. На основании данных полного и частичного кислотного гидролиза, метанолиза, метилирования, окисления периодатом и хромовым ангидридом для него предложена структура 8-О-метил-N-гликолилинейраминозил-(2→6)-[8-О-метил-N-гликолилинейраминозил-(2→3)]-N-ацетилгалактозаминил-(β1→3)-галактозил-(β1→4)-глюкозил-(β1→4)-церамида. Сфингозиновое основание гликолипида является смесью фитосфингозинов с прямой цепью и изостроения, состав которых определен с помощью ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии. Высшие жирные кислоты гликолипида представлены незамещенными и α-оксикислотами; состав кислот установлен с помощью ГЖХ.

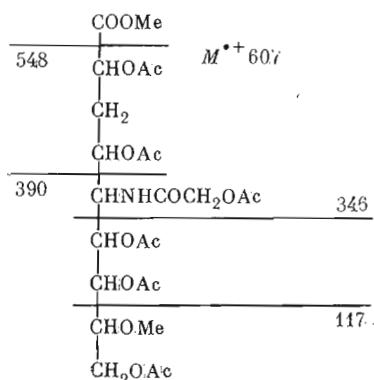
Ранее мы обнаружили, что ткани различных классов иглокожих содержат сиалогликолипиды [1, 2], которые в других типах беспозвоночных отсутствуют. Исследование сиалогликолипидов, выделенных из морских ежей, показало, что олигосахаридные цепи этих соединений построены по одному плану: они содержат глюкозу и сиаловую кислоту, связанную с первичным гидроксильной группой глюкозы [3–9]. Сиалогликолипиды класса морских звезд изучены мало. Было установлено строение сиалогликолипидов из двух видов морских звезд отряда Педицелляриевых и одного вида отряда Игольчатых. Оказалось, что структуры олигосахаридных цепей этих соединений, выделенных из морских звезд разных отрядов, существенно отличаются друг от друга и есть некоторые различия в структурах сиалогликолипидов морских звезд внутри одного отряда. Так, сиалогликолипид из морской звезды *Distolasterias nipon* (отряд Педицелляриевых) является трисиалилгалактозилцерамидом [10], а в состав сиалогликолипида морской звезды *Evasterias retifera* того же отряда наряду с глюкозой и галактозой входит N-ацетилгалактозамин [11], впервые обнаруженный нами в ганглиозах иглокожих. Чтобы выяснить, насколько широки вариации структур сиалогликолипидов морских звезд внутри одного отряда, мы исследовали структуру сиалогликолипида из еще одного представителя отряда Педицелляриевых — морской звезды *Asterias amurensis*.

Сырой препарат полярных гликолипидов получен после диализа общего липидного экстракта печени *A. amurensis*, как описано ранее [3]. Этот препарат, по данным ТСХ, содержал один главный и два минорных сиалогликолипида, фосфолипиды, нейтральные гликолипиды и пигменты. Дальнейшее выделение сиалогликолипидов проводили ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой, элюируя кислые гликолипиды растворами ацетата аммония в метаноле [12]. При концентрации соли 0,025 М элюировался наименее полярный минорный сиалогликолипид (~15% суммы сиалогликолипидов), 0,1 М раствором — главный сиалогликолипид и 0,25 М раствором — полярный минорный сиалогликолипид (~5% суммы). Главный гликолипид, дополнительно очищенный препаративной ТСХ на силикагеле, вел себя как индивидуальное соединение при ТСХ в нейтральной и основной системах растворителей. Он содержал сиаловую кислоту и нейтральные сахара (специфическое окрашивание резорциновым [13] и орциновым [2] реактивами соответственно) и не содержал фосфатной группы (отрицательная реакция с молибденовым реактивом [14]) и свободной аминогруппы (нет окраски с нингидрином). ИК-спектр

его подобен спектрам других сиалогликолипидов: имеются полосы поглощения амидной группы (1640 и 1550 см^{-1}), спиртовых гидроксильных (1040–1080 см^{-1}), ассоциированных гидроксильных (3300–3450 см^{-1}), ионизированной карбоксильной группы (1405 см^{-1}), валентных колебаний С—Н-связи алифатической цепи (2860 и 2930 см^{-1}).

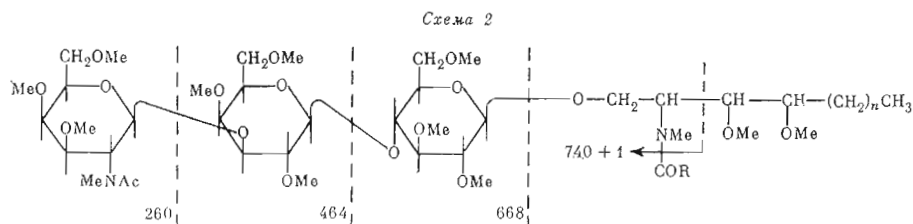
Структура олигосахаридной цепи гликолипида изучена методами полного и частичного кислотного гидролиза, метанолиза, метилирования, окисления периодатом и хромовым ангидридом и деметилирования. После полного кислотного гидролиза сиалогликолипида обнаружены глюкоза, галактоза и галактозамин в соотношении 1:1:1. При частичном кислотном гидролизе отщепляется сиаловая кислота и образуется асиалогликолипид. Количественные измерения показали, что олигосахаридная цепь сиалогликолипида содержит два остатка сиаловой кислоты. При анализе выделенной сиаловой кислоты методом ТСХ было обнаружено одно соединение с $R_{\text{AcNeu}} 1,09$. Структура его была определена с помощью масс-спектрометрии полного ацетата метилового эфира 5-ацетиламино-3,5-дидезоксиноновой кислоты [15]. В масс-спектре имеются пики ионов с $m/z 607$ (M^+) и $m/z 548$ ($M^+ - 59$), которые меньше на 28 единиц соответствующих пиков того же производного N-гликолилнейраминавой кислоты. Отсюда следует, что в производном сиаловой кислоты из морской звезды *A. amurensis* имеется один метильный заместитель вместо ацетильного. Положение метильной группы также следует из масс-спектра. Фрагменту C1 — C5 (схема 1) соответствует пик иона с $m/z 346$, как и в аналогичном производном N-гликолилнейраминавой кислоты, а фрагменту C5 — C9 — пик иона с $m/z 390$, который на 28 единиц меньше такого же производного N-гликолилнейраминавой кислоты. Кроме того, в спектре есть интенсивный пик иона с $m/z 117$, который однозначно показывает, что метоксигруппа находится у 8-го углеродного атома. Следовательно, в состав сиалогликолипида входят 2 остатка 8-О-метил-N-гликолилнейраминавой кислоты. Эти данные были подтверждены с помощью деметилирования [16]. После обработки сиалогликолипида BCl_3 были получены N-гликолилнейраминавая кислота (~95%) и N-ацетилнейраминавая кислота (~5%). 8-О-Метил-N-ацетилнейраминавая кислота была обнаружена ранее в качестве минорного компонента в сиалогликолипиде из морской звезды *D. nipon* [17], а 8-О-метил-N-гликолилнейраминавая кислота выделена из морской звезды *Asterias forbesi* [18].

Схема 1



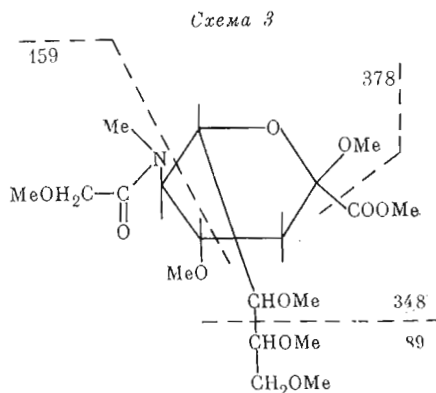
Для определения последовательности моносахаридов в цепи использовали частичный кислотный гидролиз и частичный метанолиз. Было показано, что асиалогликолипид, полученный при частичном кислотном гидролизе сиалогликолипида, содержит глюкозу, галактозу и галактозамин. В масс-спектре полностью метилированного асиалогликолипида имелся интенсивный пик иона с $m/z 260$, соответствующий концевому метилированному N-ацетилгексозамину, пики ионов с $m/z 464$ и 668 , которые образуются при отщеплении ди- и трисахаридных фрагментов соответственно,

и пик иона с m/z 741, который включает в себя олигосахаридную цепь и C1 — C2-фрагмент сфингозинового основания (схема 2).



Из этих данных следует, что асиалогликолипид является тригексозилцерамидом, олигосахаридная цепь которого лишена, присоединена к первичному гидроксилу сфингозинового основания и имеет на конце N-ацетилгалактозамин. После полного метанолиза метилированного асиалогликолипида обнаружены α - и β -метил-2,3,6-три-O-метилглюкопиранозиды и α - и β -метил-2,4,6-три-O-метилгалактопиранозиды, т. е. остаток глюкозы замещен в положение 4, а остаток галактозы — в положение 3. При частичном метанолизе сиалогликолипида 0,3 н. HCl в смеси хлороформ — метанол (2:1) [19] образуются моно- и дигексозилцерамиды, которые были разделены препаративной ТСХ на силикагеле. Было показано, что моногексозилцерамид содержит глюкозу, а дигексозилцерамид — глюкозу и галактозу. Следовательно, непосредственно к сфингозиновому основанию присоединен остаток глюкозы, и асиалогликолипид имеет структуру N-ацетилгалактозаминил-(1 \rightarrow 3)-галактопиранозил-(1 \rightarrow 4)-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 1)-церамида. При обработке ацетилированного тригексозилцерамида хромовым ангидридом глюкоза, галактоза и N-ацетилгалактозамин разрушились практически полностью; следовательно, их гликозидные связи имеют β -конфигурацию.

Положение остатков сиаловой кислоты было определено с помощью метанолиза метилированного сиалогликолипида. Полученные частично метилированные метилгликозиды анализировали методом ГЖХ, а после дополнительного ацетилирования — методом ГЖХ-масс-спектрометрии. Для сиаловой кислоты было получено только одно производное, масс-спектр которого соответствует масс-спектру полностью метилированного метилкетозида N-гликолилнейраминовой кислоты. Так, в масс-спектре присутствуют пики ионов с m/z 378 (M^+ — COOCH_3), m/z 348 (M^+ — CHOCH_3 — CH_2OCH_3), m/z 159 (фрагмент C4 — C5) и m/z 89 (фрагмент C8 — C9) (схема 3).



Из этого следует, что оба остатка сиаловой кислоты являются концевыми, т. е. олигосахаридная цепь сиалогликолипида разветвлена. В производном сиаловой кислоты, полученном при метанолизе дейтерометилированного сиалогликолипида, имеются пики ионов тех же фрагментов с m/z 393, 360, 168 и 92, что подтверждает присутствие метоксигруппы у C8 концевых остатков N-гликолилнейраминовой кислоты. Анализ с помощью ГЖХ продуктов метанолиза метилированного гликолипида показал, что в

сиалогликолипиде, как и в асиалопроизводном, глюкоза замещена в положение 4, а галактоза — в положение 3, т. е. по остаткам глюкозы и галактозы разветвлений нет. Масс-спектр ацетата частично метилированного метилгликозида N-ацетилгалактозамина содержит пики ионов, указывающие на наличие двух ацетильных остатков в молекуле: m/z 274 ($M^+ - OCH_3 - CH_2CO$), m/z 256 ($M^+ - OCH_3 - CH_2COOH$) и m/z 242 ($M^+ - OCH_3 - CH_2OH - CH_2CO$). Для моноацетильного производного N-ацетилгалактозамина эти пики соответственно меньше на 28 единиц [20]. Пики ионов с m/z 157 (фрагмент C2—C3) и m/z 115 ($157 - CH_2CO$) показывают, что один ацетильный остаток находится в положении 3. Наличие пика иона с m/z 169 ((фрагмент C2—C4) — CH_2OH) указывает на то, что в положении 4 находится метильный остаток. Значит, второй ацетильный остаток должен находиться в положении 6. Кроме того, полученный масс-спектр совпал с описанным в литературе масс-спектром метил-3,6-ди-O-ацетил-2-дезоксид-4-O-метил-2-(N-метилацетиламино)-L,D-гликопиранозиды [20a]. Следовательно, олигосахаридная цепь сиалогликолипида имеет разветвление по остатку N-ацетилгалактозамина и остатки сиаловых кислот присоединены к нему в положениях 3 и 6.

Оба остатка сиаловой кислоты устойчивы к действию нейраминидазы из *Vibrio cholerae*. Однако отсюда не следует β -конфигурация кетозидных связей, так как известно, что действительно этого фермента могут мешать как заместитель в остатках α -связанных сиаловых кислот, так и невыгодное расположение сиаловых кислот в олигосахаридной цепи. Присутствие такой малосъемной и незаряженной группы, как O-метильная, у C8 N-гликолилнейраминового кислоты сиалогликолипида из *A. amurensis*, по-видимому, не может влиять на ее способность отщепляться нейраминидазой. Так, показано, что ацетильные группы при C7 или C8 сиаловых кислот не мешают действию фермента [21]. Возможно, устойчивость α -кетозидных связей к нейраминидазе обусловлена пространственным расположением сиаловых кислот в молекуле: оба остатка 8-O-метил-N-гликолилнейраминового кислоты присоединены к остатку N-ацетилгалактозамина, находящегося в узле разветвления. Известно, что нейраминидаза из *V. cholerae* не отщепляет сиаловую кислоту, связанную α -кетозидной связью с C3 остатка галактозы, находящейся в узле разветвления, как, например, в гашлиозидах G_{M1} , G_{M2} и G_{D13} [22]. Показано также, что бактериальные нейраминидазы не отщепляют N-гликолилнейраминового кислоты, связанную с C3 остатка N-ацетилгалактозамина, находящегося внутри цепи [23].

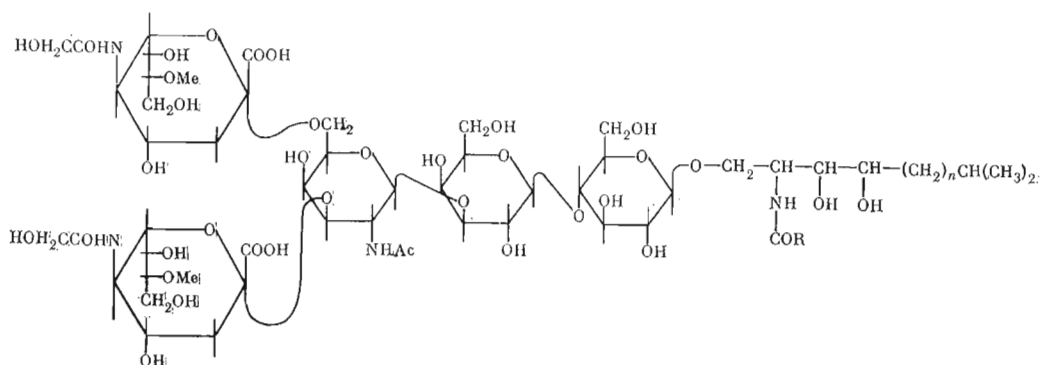
Структуру липидной части сиалогликолипида устанавливали методами кислотного метанолиза и периодатного окисления. В продуктах метанолиза обнаружены сфингозиновое основание и метиловые эфиры высших жирных кислот. Сфингозиновое основание, по данным ТСХ, идентично фитосфингозину. После периодатного окисления гликолипида и восстановления КВН₄ продукты реакции распределяли между водой и гексаном. Из водного слоя после метанолиза был выделен 2-аминопропан-1,3-диол, который анализировали методом масс-спектрометрии в виде 2',4'-динитрофенильного производного [5], а в гексановом слое обнаружены высшие жирные спирты. Отсюда следует, что в сфингозиновом основании гидроксильные группы находятся у C1, C3 и C4, а аминогруппа — у C2, как и в фитосфингозине.

Состав фитосфингозинов сиалогликолипида был определен в результате анализа спиртов методом ГЖХ и ацетатов спиртов — методом ГЖХ-масс-спектрометрии (табл. 1). В смеси обнаружены спирты с прямой цепью и разветвленной, последние составляют ~70% смеси. Положение разветвления следует из масс-спектров ацетатов спиртов, где наряду с ионами фрагментов ($M^+ - CH_2COOH$) и ($M^+ - CH_2OCOSH_3$) имеются также пики ионов, соответствующие фрагментам ($M^+ - CH_3COOH - CH_3$), ($M^+ - CH_3COOH - (CH_3)_2CH$), ($M^+ - CH_2OCOSH_3 - CH_3$) и ($M^+ - CH_2OCOSH_3 - (CH_3)_2CH$); следовательно, разветвление находится у предпоследнего углеродного атома. После гидрирования смеси спиртов над Pd/C и анализа их методом ГЖХ было показано, что в смеси присутствует небольшое количество мононенасыщенных спиртов C₁₈ и C₁₉. Таким образом, по составу фитосфинго-

зинов сиалогликолипид из *A. amurensis* близок к сиалогликолипидам из морских звезд *Patiria pectinifera* [24] и *E. retifera* [11], где также велико содержание фитосфингозинов изостроения.

Метилвые эфиры высших жирных кислот, полученные после метанолиза сиалогликолипида, по данным ТСХ, являются смесью незамещенных и монооксикислот в соотношении 1:1. Оба класса кислот выделили препаративной ТСХ и анализировали ГЖХ, метилвые эфиры оксикислот предварительно метилировали. Состав кислот приведен в табл. 2. Главными компонентами смеси незамещенных кислот являются C_{16} - и C_{18} -кислоты, а среди α -оксикислот преобладают C_{16} -, C_{22} -, C_{23} - и C_{24} - α -оксикислоты. По составу высших жирных кислот сиалогликолипид из *A. amurensis* близок к сиалогликолипиду из *E. retifera* [11], где также высоко содержание α -оксикислот, а среди незамещенных кислот основными компонентами смеси являются пальмитиновая и стеариновая кислоты.

На основании изложенных данных сиалогликолипид из морской звезды *A. amurensis* имеет следующую структуру:



$$n = 8, 9, 10, 11, 12, 13$$

R — остаток высшей жирной кислоты

Таким образом, сиалогликолипиды из морских звезд *E. retifera* и *A. amurensis* отряда Педицелляриевых очень близки по составу сахаров. Кроме глюкозы и галактозы они содержат по одному остатку N-ацетилгалактозамина и по два остатка сиаловой кислоты. В обоих случаях сиаловые кислоты присоединены к N-ацетилгалактозамину, в то время как в сиаогликолипидах позвоночных сиаловые кислоты присоединены, как правило, к галактозе. Рассмотренные гликолипиды звезд отряда Педицелляриевых различаются характером сиаловых кислот и их расположением в углеводной цепи. В состав гликолипида из *E. retifera* входит N-ацетилнейраминавая кислота, два остатка которой связаны между собой 2 → 9-связью, и дисиаозильный остаток присоединен к N-ацетилгалактозамину в положении 3. В состав гликолипида из *A. amurensis* входят два остатка 8-O-метил-N-гликолилнейраминавой кислоты, которые присоединены к одному и тому же остатку N-ацетилгалактозамина в положения 3 и 6. Такое расположение сиаловых кислот в сиаогликолипидах других иглокожих, а также в ганглиозидах позвоночных до сих пор не было обнаружено.

Экспериментальная часть

Морские звезды *A. amurensis* собраны в бухте Посыет Японского моря в сентябре. Липидный экстракт печени и сырой препарат сиаогликолипидов получали по описанной ранее методике [3]. Были использованы N-ацетилнейраминавая кислота (Koch-Light, Англия), N-гликолилнейраминавая кислота (Sigma, ФРГ), нейраминидаза из *Vibrio cholerae* (500 ед. акт./мл, Calbiochem). Органические растворители перед использованием перегоняли.

Аналитическую и препаративную ТСХ проводили на силикагеле марки КСК (150–200 меш), содержащем 5% гипса. Использовались системы

Состав фитосфингозных сиалогликолипида из печени морской звезды
A. amurensis

Спирты	Соответствующие фитосфингозины	Содержание, % от суммы	Спирты	Соответствующие фитосфингозины	Содержание, % от суммы
<i>изо</i> -C _{12:0}	<i>изо</i> -C _{15:0}	0,3	<i>н</i> -C _{16:0}	<i>н</i> -C _{19:0}	1,1
<i>н</i> -C _{13:0}	<i>н</i> -C _{16:0}	4,6	<i>изо</i> -C _{16:0}	<i>изо</i> -C _{19:0}	19,1
<i>изо</i> -C _{13:0}	<i>изо</i> -C _{16:0}	0,3	<i>н</i> -C _{17:0}	<i>н</i> -C _{20:0}	1,3
<i>н</i> -C _{14:0}	<i>н</i> -C _{17:0}	3,8	<i>изо</i> -C _{17:0}	<i>изо</i> -C _{20:0}	9,5
<i>изо</i> -C _{14:0}	<i>изо</i> -C _{17:0}	14,3	<i>н</i> -C _{18:0}	<i>н</i> -C _{21:0}	1,1
<i>н</i> -C _{15:0}	<i>н</i> -C _{18:0}	11,3	<i>н</i> -C _{18:1}	<i>н</i> -C _{21:1}	1,0
<i>изо</i> -C _{15:0}	<i>изо</i> -C _{18:0}	21,9	<i>н</i> -C _{19:1}	<i>н</i> -C _{22:1}	10,5

Таблица 2

Состав высших жирных кислот сиалогликолипида из печени морской звезды
A. amurensis

Кислоты	Незамещенные кислоты, % от суммы незамещенных кислот	α -Окси-кислоты, % от суммы α -оксикислот	Кислоты	Незамещенные кислоты, % от суммы незамещенных кислот	α -Окси-кислоты, % от суммы α -оксикислот
C _{14:0}	4,9	2,5	C _{19:0}	1,8	0,7
C _{14:0} *	2,2	—	C _{20:0}	3,6	3,0
C _{15:0}	4,0	7,2	C _{20:1}	1,6	—
C _{15:0} *	5,8	—	C _{21:0}	2,0	2,3
C _{16:0}	28,4	33,0	C _{21:1}	0,3	—
C _{16:0} *	5,6	—	C _{22:0}	3,5	16,3
C _{17:0}	3,1	2,0	C _{23:0}	2,2	8,4
C _{17:0} *	3,1	1,6	C _{24:0}	3,0	17,0
C _{18:0}	18,5	6,0	C _{25:0}	1,7	—
C _{18:1}	4,7	—			

* Разветвленные.

растворителей: для сиалогликолипидов — хлороформ — метанол — вода (6:4:1) и хлороформ — метанол — 2 н. NH₄OH (60:35:8), обнаружение орциновым [2] и резорциновым [13] реактивами; для нейтральных гликолипидов — хлороформ — метанол — вода (64:25:4), обнаружение орциновым реактивом; для сфингозиновых оснований — хлороформ — метанол — 2 н. NH₄OH (40:10:1), обнаружение 2% раствором нипидрина в бутаноле; для алифатических спиртов — хлороформ — метанол (49:1), обнаружение раствором бромтимолблау и конц. H₂SO₄; для метиловых эфиров кислот — дихлорэтан, обнаружение раствором бромтимолблау и конц. H₂SO₄.

Колоночную хроматографию сиалогликолипидов на DEAE-целлюлозе (CH₃COO⁻) выполняли как описано ранее [4]. Главный сиалогликолипид элюировали 0,1 М раствором ацетата аммония в метаноле и очищали препаративной ТСХ. Из 2 г сырого препарата сиалогликолипидов получали 60 мг главного сиалогликолипида.

ИК-спектры снимали в таблетках с KBr. ГЖХ выполняли на приборе «Pye Unicam» (Англия), скорость азота 60 мл/мин. Нейтральные моносахариды анализировали в виде ацетатов соответствующих гекситов на колонке с 3% ECNSS-M на газхроме Q при 180° С, частично метилированные метилгликозиды — на колонке с 3% NGA на газхроме Q при 160° С, ацетаты частично метилированных метилгликозидов — на колонках с 3% SE-30 и 3% OV-I на диатомите С «Q» при 200–250° С (3° С/мин), алифатические спирты и их ацетаты, а также метиловые эфиры высших жирных незамещенных и метоксикилот — на колонке с 3% SE-30 при 160–220 и 180–280° С соответственно (2° С/мин).

Хроматомасс-спектрометрический анализ ацетатов спиртов и ацетатов частично метилированных метилгликозидов проводили на приборе «Varian

МАТ 111» (ФРГ), колонка с 3% OV-I, ионизирующее напряжение 70 эВ. Масс-спектр метилированного тригексозилцерамида снимали на приборе СН-6 «Varian МАТ СН-6» (США) при ионизирующем напряжении 70 эВ и температуре нагрева образцов 280°С.

Сфингозиновое основание определяли по методу [25], калибровочную кривую строили по френозину; сиаловые кислоты количественно определяли с резорциновым реактивом [26, 27].

Полный кислотный гидролиз гликолипидов (2 мг) проводили 4 ч 2 н. HCl при 100°С. Нейтральные моносахариды анализировали БХ на ватмане FN № 11 в системе бутанол — пиридин — вода (6:4:3), а в виде ацетатов гекситов — ГЖХ. Оба метода показали присутствие глюкозы и галактозы в соотношении 1:1. Для анализа аминсахаров гликолипиды гидролизировали 24 ч 4 н. HCl при 100°С, гидролизат упаривали и анализировали на аминокислотном анализаторе «Biotronic LC 4010» (ФРГ). Обнаружили галактозамин в количестве, эквивалентном содержанию сфингозинового основания в пробе.

Частичный кислотный гидролиз сиалогликолипида (5 мг) проводили 1,5 ч 0,1 н. H₂SO₄ при 80°С. Реакционную смесь диализовали 24 ч против дистиллированной воды при 20°С. Недиализуемый продукт лиофилизировали и анализировали ТСХ. Нейтральный гликолипид выделяли препаративной ТСХ и анализировали его моносахаридный состав после полного кислотного гидролиза, как описано выше. Внешний водный раствор, образовавшийся после диализа, упарили до 5 мл, пропустили через колонку с дауэксом 2×8 (CH₃COO⁻) и сиаловые кислоты элюировали 1 М ацетатным буфером, рН 4,6 [27]. Элюат деионизировали смолой IR-120 (H⁺) и лиофилизировали, сиаловые кислоты анализировали ТСХ на силикагеле, импрегнированном 0,2 М NaH₂PO₄, в системе *n*-пропанол — вода — 2 н. NH₄OH (30:10:5). Было обнаружено одно соединение с R_{AcNcu} 1,09. Полученную сиаловую кислоту растворяли в 1 мл воды и обрабатывали КВН, 2 ч при 20°С. Смесь нейтрализовали 2 н. CH₃COOH, деионизировали смолой IR-120 (H⁺), упаривали досуха с добавлением метанола. Остаток растворяли в 1 мл метанола и добавляли 1 мл раствора диазометана в эфире, выдерживали 12 ч при 20°С, упаривали досуха, ацетилировали 12 ч смесью пиридин — уксусный ангидрид (1:1) при 20°С и анализировали методом масс-спектрометрии. В масс-спектре имелись пики ионов с *m/z* (*I*, %): 83(90), 85(79), 96(53), 117(100), 127(49), 159(61), 166(39), 172(53), 180(42), 186(40), 198(33), 202(30), 210(46), 214(47), 228(59), 244(28), 258(32), 262(25), 286(28), 288(40), 300(35), 304(100), 330(100), 346(100), 348(20), 360(90), 390(100), 402(22), 416(12), 431(12), 446(14), 474(9), 476(10), 488(12), 502(18), 506(12), 516(22), 534(18), 548(14), 561(7), 579(1), 607(1) (ср. [15]). Таким образом, главным компонентом смеси явилась 8-О-метил-N-гликолилнейраминовая кислота и минорным — N-ацетилнейраминовая кислота.

Деметилирование сиалогликолипида (2 мг) проводили в CH₂Cl₂ (1 мл) с ВCl₃ (1 мл) при -80°С 1 ч и при 20°С 12 ч [16]. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в смеси хлороформ — метанол (2:1) и деметилированный сиалогликолипид выделяли препаративной ТСХ, подвергали частичному кислотному гидролизу. Сиаловую кислоту выделяли, как описано выше, и анализировали ТСХ. Обнаружили N-гликолилнейраминовою кислоту (95%) и N-ацетилнейраминовою кислоту (5%).

Полный кислотный метанолиз сиалогликолипида (20 мг) проводили в течение 18 ч 1 н. HCl в метаноле при 80°С. Метилловые эфиры высших жирных кислот и сфингозиновых оснований выделяли как описано ранее [3], анализировали методом ТСХ. Метилловые эфиры нормальных и α-оксикислот разделяли препаративной ТСХ и анализировали методом ГЖХ. Метилловые эфиры α-оксикислот предварительно метилировали [28].

Частичный метанолиз сиалогликолипида (8 мг) проводили 1 ч 0,3 н. HCl в смеси хлороформ — метанол (2:1) при 60°С, реакционную смесь упаривали и анализировали ТСХ. Образовавшиеся церебозид и дигексозилцерамид выделяли препаративной ТСХ, подвергали полному кислотному гидролизу и анализировали моносахариды методом ГЖХ. В церебро-

виде обнаружена глюкоза, а в дигексозилцерамиде — глюкоза и галактоза в соотношении 1 : 1.

Метилирование и дейтерометилирование сиалогликолипидов (10—15 мг) проводили по Хакомори [28] и полученные производные экстрагировали хлороформом, диализовали против дистиллированной воды и очищали препаративной ТСХ. Метилированный нейтральный гликолипид анализировали с помощью масс-спектрометрии. Метилированные и дейтерометилированные сиалогликолипиды, а также метилированный нейтральный гликолипид подвергали метанолизу в течение 14 ч 0,5 н. HCl в метаноле при 80° С. Частично метилированные метилглюкозиды и метилгалактозиды анализировали ГЖХ. Продукты метанолиза ацетилировали 2 ч смесью пиридин — уксусный ангидрид (1 : 1) при 100° С и анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии. В масс-спектре дейтерометилированного производного сиаловой кислоты имелись пики ионов с m/z (I , %): 48(80), 78(61), 81(46), 88(39), 92(100), 108(79), 134(65), 139(40), 162(51), 168(98), 172(67), 181(95), 204(98), 217(57), 219(44), 240(57), 246(34), 260(51), 278(29), 293(99), 313(31), 334(98), 360(76), 393(70), 404(4), 422(6) (ср. [29]). Следовательно, в смеси присутствуют метилкетозид метилового эфира N-дейтерометилгликолил-N-дейтерометил-4,7,9-три-O-дейтерометил-8-O-метилнейраминової кислоты и метилкетозид метилового эфира N-ацетил-N-дейтерометил-4,7,8,9-тетра-O-дейтерометилнейраминової кислоты. В масс-спектре ацетата частично метилированного производного N-ацетилгалактозамина имелись пики ионов с m/z (I , %): 43(178), 56(37), 71(40), 73(147), 87(69), 94(44), 98(37), 115(100), 126(22), 130(37), 142(40), 154(19), 157(20), 168(15), 169(10), 172(7), 182(6), 196(5), 207(3), 214(6), 242(6), 256(8), 274(9), 316(1,5) (ср. [20]). Следовательно, это метил-3,6-ди-O-ацетил-2-дезоксид-2-(N-метилацетамида)-4-O-метилгалактозид.

Окисление асиалогликолипида хромовым ангидридом и последующий анализ моносахаридов проводили по методу [30]. Предварительно гликолипид ацетилировали 14 ч смесью пиридин — уксусный ангидрид (1 : 1) при 20° С, в качестве внутреннего стандарта добавляли инозит.

Периодатное окисление сиалогликолипида (10 мг) проводили 0,02 М NaIO₄, как описано ранее [3], реакционную смесь обрабатывали 2 ч KBH₄ при 20° С и нейтрализовали 2 н. CH₃COOH. Алифатические спирты экстрагировали гексаном (3×3 мл), очищали препаративной ТСХ и анализировали ГЖХ. Далее спирты ацетилировали как описано выше и анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии. Водный раствор после экстракции гексаном диализовали, недиализуемый продукт лиофилизировали и подвергали частичному кислотному гидролизу. Гидролизат диализовали против дистиллированной воды (200 мл) и внешний водный раствор упаривали в вакууме до 10 мл. В 1 мл этого раствора определяли сиаловую кислоту реакцией с резорциновым реактивом [13]. В спектре поглощения полученного хромофора обнаружен один максимум при 585 нм. Недиализуемый продукт подвергали полному кислотному метанолизу и метиловые эфиры высших жирных кислот экстрагировали гексаном. Метанольный слой упаривали досуха и добавляли 1 мл спирта, 0,75 мл 0,75% водного раствора NaHCO₃ и раствор 10 мг 2,4-динитрофторбензола в 0,5 мл спирта. Смесь выдерживали в темноте 12 ч при 20° С, добавляли 3 мл воды и экстрагировали эфиром (3×5 мл). Эфир упаривали, 2',4'-динитрофенильное производное 2-аминопропан-1,3-диола выделяли препаративной ТСХ в системе хлороформ — метанол (9 : 1) и анализировали с помощью масс-спектрометрии.

Ферментативный гидролиз сиалогликолипида (2 мг) проводили обработкой нейраминидазой из *Vibrio cholerae* в ацетатном буфере, рН 5,5 [31]. Сиаловую кислоту определяли с резорциновым реактивом после обработки реакционной смеси KBH₄ [32].

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков Н. К., Жукова И. Г., Смирнова Г. П., Васильковский В. Е. Докл. АН СССР, 1967, т. 177, № 6, с. 1472–1474.
2. 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.
3. Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 326, № 1, p. 74–83.
4. Hoshi M., Nagai Y. Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 388, № 1, p. 152–162.
5. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Chekareva N. V. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 424, № 2, p. 274–283.
6. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 7, с. 937–942.
7. Кочетков Н. К., Смирнова Г. П., Глухoded И. С. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1093–1099.
8. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1667–1673.
9. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 1, с. 123–130.
10. Жукова И. Г., Богдановская Т. А., Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. Докл. АН СССР, 1973, т. 208, № 4, с. 981–984.
11. Смирнова Г. П., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 102–108.
12. Winterbourn C. C. J. Neurochem., 1971, v. 18, № 6, p. 1153–1155.
13. Svennerholm L. Biochim. et biophys. acta, 1957, v. 24, № 3, p. 604–611.
14. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. J. Lipid Res., 1968, v. 9, № 3, p. 396.
15. Smirnova G. P., Chekareva N. V., Chizhov O. S., Zolotarev B. M., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1977, v. 59, № 2, p. 235–239.
16. Bonner T. G., Saville N. M. J. Chem. Soc., 1960, p. 2851.
17. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Kadentsev V. I., Smirnova G. P., Zhukova I. G. Carbohydr. Res., 1973, v. 27, № 1, p. 5–10.
18. Warren L. Biochim. et biophys. acta, 1964, v. 83, № 1, p. 129–132.
19. Slomiany B. L., Slomiany A. Eur. J. Biochem., 1978, v. 90, № 1, p. 39–49.
20. Kundu S. K., Ledeen R. W., Gorin P. A. J. Carbohydr. Res., 1975, v. 39, № 2, p. 179–191.
- 20a. Елькин Ю. Н., Томшич С. В., Зурабян С. Э. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 12, с. 1859–1865.
21. Schauer R., Faillard H. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1968, v. 349, № 8, p. 961–968.
22. Drzeniek R. Histochem. J., 1973, v. 5, № 3, p. 271–290.
23. Inone S., Iwasaki M., Matsumura G. In: Glycoconjugates / Eds Yamakawa T., Osa-wa T., Handa S. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1981, p. 271–272.
24. Кочетков Н. К., Смирнова Г. П. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 8, с. 1048–1054.
25. Lauter C. J., Trams E. G. A. J. Lipid Res., 1962, v. 3, № 1, p. 126–138.
26. Svennerholm L. Acta chem. scand., 1958, v. 12, № 3, p. 547–554.
27. Miettinen T., Takki-Luukkainen I. T. Acta chem. scand., 1959, v. 13, № 4, p. 856–858.
28. Nakomori S.-I. J. Biochem. (Tokyo), 1964, v. 55, № 2, p. 205–208.
29. Halbeek H., Haverkamp J., Kamerling J. P., Vliegenthart J. F. G., Versluis C., Schauer R. Carbohydr. Res., 1978, v. 60, № 1, p. 51–62.
30. Laine R. A., Renkonen O. J. Lipid Res., 1975, v. 16, № 2, p. 102–106.
31. Ishizaka I., Kloppenburg M., Wiegand H. Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 210, № 2, p. 229–303.
32. Schneir M. L., Refelson M. E. Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 130, № 1, p. 1–11.

Поступила в редакцию
6.1.1982

BRANCHED DISIALOGLYCOLIPID FROM THE STARFISH *ASTERIAS AMURENSIS*

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

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

The structure of the major sialoglycolipid from hepatopancreas of the starfish *Asterias amurensis* has been established. On the basis of total and partial acid hydrolysis, methanolysis, methylation, periodate and chromium trioxide oxidations, this sialoglycolipid was identified as 8-O-methyl-N-glycolylneuraminosyl-(2→6)-[8-O-methyl-N-glycolylneuraminosyl-(2→3)]-N-acetyl-galactosaminyl-(β1→3)-galactosyl-(β1→4)-glucosyl-(β1→1)-ceramide. The long-chain bases were found to constitute a mixture of phyto-sphingosines with branched and normal chains. The fatty acids were shown to be a mixture of normal and α-hydroxy acids. The composition of the lipid moiety of the sialoglycolipid was determined by GLC and GLC-MS.