



УДК 593.92-147.11.088 : 577.115.5

© 1990 г.

Г. П. Смирнова

ГАНГЛИОЗИДЫ С СИАЛОВОЙ КИСЛОТОЙ ВНУТРИ
ОЛИГОСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ И КОНЦЕВОЙ ГАЛАКТОФУРАНОЗОЙ
ИЗ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ACANTHASTER PLANCI*

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

Из морской звезды *Acanthaster planci* выделены три моносиалоганглиозида, два главных и минорный. С помощью химических и спектральных методов показано, что главные ганглиозиды имеют структуру β -галактофуранозил-(1 \rightarrow 4)- α -N-ацетилнейраминозил-(2 \rightarrow 3)- β -галактопиранозил-(1 \rightarrow 4)- β -глюкопиранозил-(1 \rightarrow 1)-церамидов, в которых сфингозиновым основанием является C_{16} -фитосфингозин. Более полярный ганглиозид содержит высшие α -гидроксигирные кислоты, а менее полярный — незамещенные высшие жирные кислоты. Минорный ганглиозид имеет такую же углеводную цепь, фитосфингозин и незамещенные высшие жирные кислоты, а кроме того, содержит аминокислоты.

Ранее мы показали, что олигосахаридные цепи ганглиозидов морских звезд разнообразны по структуре и в отличие от ганглиозидов морских ежей не имеют общего типа структуры, характерного для этого класса иглокожих [1—3]. Ганглиозиды даже близких в таксономическом отношении морских звезд (одно семейство) могут различаться моносахаридным составом и местом связи сиаловых кислот. Но, по-видимому, наиболее сильные различия в структуре встречаются в ганглиозидах морских звезд, таксономически наиболее далеких, т. е. относящихся к разным отрядам. Так, если в состав ганглиозидов морских звезд отряда Педицилляриевых, как и ганглиозидов позвоночных, входят глюкоза, галактоза и иногда N-ацетилгалактозамин, а сиаловые кислоты расположены на конце олигосахаридной цепи в виде единичного остатка или ди- и трисиалильного фрагмента, то в ганглиозидах морских звезд *Patiria pectinifera* отряда Игольчатых звезд и *Luidia quinaria bispinosa* отряда Явнопластинчатых звезд сиаловые кислоты расположены внутри олигосахаридных цепей и гликозилированы по O-4 остатком галактозы [1—3]. Кроме того, в ганглиозидах *P. pectinifera* концевое положение в цепи занимает арабиноза, которая не обнаружена в ганглиозидах животных других видов. Поскольку эти особенности строения олигосахаридных цепей ганглиозидов Игольчатых и Явнопластинчатых звезд обнаружены пока только на примере одного из видов морских звезд каждого отряда, мы продолжили исследование морских звезд других видов с целью выяснить, являются ли такие особенности характерными для ганглиозидов этих отрядов морских звезд. В настоящей работе приведены данные по структуре ганглиозидов морской звезды *Acanthaster planci* отряда Игольчатых звезд.

Препарат полярных гликолипидов был получен из общего липидного экстракта целых морских звезд *A. planci*. Полученный препарат, по данным ТСХ, содержал два близких по подвижности сиалогликолипида, главный, более полярный (ганглиозид 1), и в меньшем количестве менее полярный (ганглиозид 2), а также нейтральные гликолипиды, фосфолипиды и пигменты. Сиалогликолипиды были выделены из этой смеси с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой при элюции растворами ацетата аммония в метаноле. Оба ганглиозида элюировались вместе 0,025 М раствором соли и, следовательно, имели

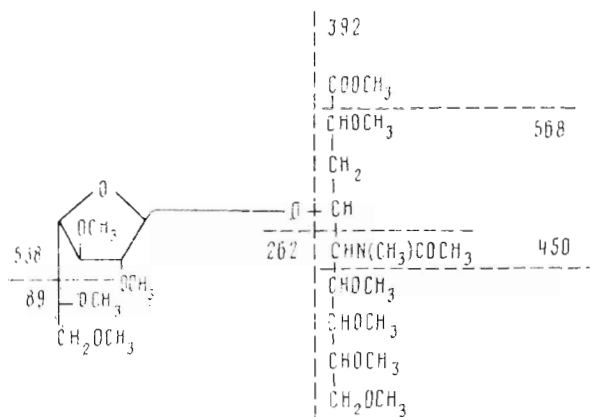
одинаковую кислотность, подобную кислотности моносиалоганглиозидов. Их разделение и дополнительную очистку проводили с помощью препаративной ТСХ на силикагеле. Оба ганглиозида вели себя как индивидуальные соединения при ТСХ в нейтральной и основной системах растворителей. Кроме того, небольшое количество сиалосодержащего материала было выделено при элюции колонки 0,1 М раствором $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ и дополнительной очистки препаративной ТСХ (ганглиозид 3). Ганглиозиды 1—3 были выделены в соотношении $\sim 28 : 7 : 3$ (считая на сиаловую кислоту).

Структуры ганглиозидов 1 и 2. Структуры олигосахаридных цепей ганглиозидов установлены с помощью полного и частичного кислотного гидролиза, метилирования, окисления хромовым ангидридом и ЯМР. После полного кислотного гидролиза ганглиозидов обнаружены глюкоза и галактоза, аминокислоты отсутствуют. Для ганглиозида 1 действием глюкозооксидазы и галактозооксидазы показано, что глюкоза и галактоза имеют *D*-конфигурацию. В обоих ганглиозидах соотношение глюкоза — галактоза — сиаловая кислота равно 1 : 2 : 1. При частичном кислотном гидролизе ганглиозидов 0,1 н. H_2SO_4 , когда в первую очередь расщепляются кислотолабильные кетозидные связи сиаловых кислот, образуются нейтральные гликолипиды и сиалосодержащие фрагменты. После разделения продуктов гидролиза с помощью диализа недиализуемые гликолипиды анализировали ТСХ. Оказалось, что в обоих случаях при гидролизе образуется гликолипид с подвижностью лактозилцерамида. Он был выделен из гидролизатов препаративной ТСХ на силикагеле; с помощью кислотного гидролиза было показано, что в обоих случаях он содержит глюкозу и галактозу в соотношении 1 : 1. Дигексозилцерамид, полученный из ганглиозида 1, метилировали и после метанолиза анализировали образовавшиеся метилированные метилгликозиды ГЖХ. Из полученных данных следует, что концевой является галактопираноза, которая присоединена к глюкозе по О-4.

Углеводные фрагменты, отщепившиеся при частичном кислотном гидролизе ганглиозидов, были выделены из внешней диализной воды. Анализ сиалосодержащих фрагментов ТСХ показал, что в обоих случаях присутствует практически одно соединение с подвижностью несколько меньшей, чем у *N*-гликолилнейраминовой кислоты ($R_{\text{NeuGe}} 0,83$). После полного кислотного гидролиза фрагментов обнаружена галактоза в количестве, соответствующем содержанию сиаловой кислоты. После обработки фрагментов KBH_4 сиаловая кислота не дает больше окрашивания с резорциновым реактивом, следовательно, она расположена на восстанавливаемом конце этих дисахаридов. Для определения места присоединения галактозы к сиаловой кислоте и типа последней использовали метилирование. Дисахарид, полученный при мягком кислотном гидролизе ганглиозида 1, обрабатывали KBH_4 , метилировали и анализировали с помощью хромато-масс-спектрометрии. Было показано присутствие одного главного соединения, в масс-спектре которого имеются пики ионов с m/z 568 ($M - 59$), 450 (азотсодержащий фрагмент, образующийся при разрыве С-5—С-6-связи сиаловой кислоты), 392 (производное *N*-ацетилнейраминовой кислоты) и 262 (С-5—С-9-фрагмент сиаловой кислоты), которые свидетельствуют, что в состав дисахарида входит *N*-ацетилнейраминовая кислота, гликозилированная гексозой в положение 4. Наличие в спектре пиков с m/z 538 и 89 показывает, что галактоза находится в фуранозной форме (см. схему 1).

Необходимо отметить относительную устойчивость галактофуранозидной связи в условиях мягкого кислотного гидролиза. При нагревании ганглиозидов с 0,1 н. H_2SO_4 в условиях, когда кетозидные связи сиаловых кислот расщепляются практически полностью, галактофураноза не отщепляется, и среди углеводных продуктов гидролиза обнаруживается только дисахарид $\text{Gal1} \rightarrow 4\text{NeuAc}$ и нет галактозы и *N*-ацетилнейраминовой кислоты. Эти моносахариды появляются в небольшом количестве при гидролизе ганглиозидов 0,2 н. H_2SO_4 . При этом среди гликолипидных фрагментов можно обнаружить не только дигексозилцерамид, но и моно-

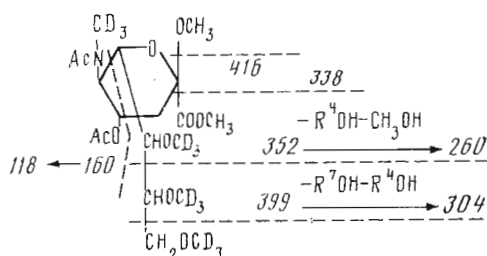
Схема 1



гексозилцерамид (глюкоцереброзид), т. е. начинает отщепляться остаток галактопиранозы, связанной с глюкозой. Следовательно, устойчивость галактофуранозильной и галактопиранозильной связей в этих условиях гидролиза практически одинакова.

Для определения места присоединения *N*-ацетилнейраминовой кислоты к дигексозилцерамиду, а также выяснение того, нет ли *O*-метильных заместителей в остатке *N*-ацетилнейраминовой кислоты, что характерно для ганглиозидов морских звезд [3], использовали тридеутерометилирование. Производные, образующиеся при метанолизе тридеутерометилированных ганглиозидов, анализировали с помощью ГЖХ, а после дополнительного ацетилирования — с помощью хроматомасс-спектрометрии. Было показано, что в обоих ганглиозидах остаток галактофуранозы является концевым, галактопираноза замещена в положение 3, а глюкоза — в положение 4. Следовательно, оба ганглиозида имеют на конце углеводной цепи галактофуранозу и одинаковые места замещения нейтральных моносахаридов. Масс-спектрометрическая фрагментация производных сиаловой кислоты, полученных из обоих ганглиозидов, также одинакова и соответствует фрагментации метилового эфира метилкетозида 4-*O*-ацетил-7,8,9-три-*O*-тридеутерометил-*N*-ацетил-*N*-тридеутерометилнейраминовой кислоты. Характеристические пики и их происхождение показаны на схеме 2.

Схема 2



R^4 и R^7 — заместители при *O*-4 и *O*-7.

Таким образом, в состав ганглиозида 2 также входит *N*-ацетилнейраминовая кислота, которая расположена внутри цепи и гликозилирована в положение 4 галактофуранозой.

Конфигурации гликозидных связей в ганглиозиде 1 определены с помощью спектроскопии ЯМР. В аномерной области спектра ^{13}C -ЯМР имеются четыре сигнала: три (110,26; 104,03 и 103,70 м. д.) относятся к *C*-1 β -связанных остатков *D*-Gal β , *D*-Gal α и *D*-Glc α , а четвертый (96 м. д.) — к *C*-2 остатка NeuAc. Вывод об α -конфигурации кетозидной связи *N*-ацетилнейраминовой кислоты сделан на основании спектра ^1H -ЯМР, где *H*-3 α соответствует сигнал 2,35 м. д., а *H*-3 β — 1,25 м. д. Разница между

сигналами аксиального и экваториального протонов у С-3 здесь находится в том же интервале, как и в известных спектрах α -связанных остатков сиаловых кислот, и больше, чем в спектрах β -связанных остатков [4].

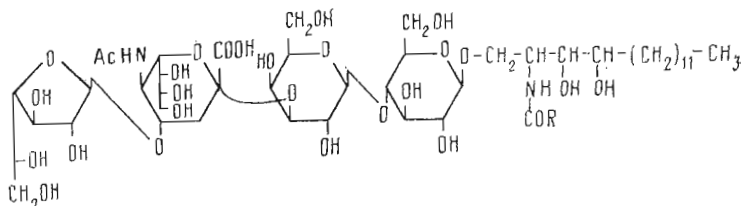
Поскольку ганглиозида 2 было недостаточно для получения спектров ЯМР, конфигурации гликозидных связей в нем определяли с помощью окисления CrO_3 . Образующиеся при мягком кислотном гидролизе ганглиозида 2 дигексозилцерамид и дисахарид $\text{Gal}1 \rightarrow 4\text{NeuAc}$ (последний восстанавливали KBH_4) ацетилировали, обрабатывали хромовым ангидридом и оставшиеся моносахариды анализировали с помощью ГЖХ. В дигексозилцерамиде остатки глюкозы и галактозы в значительной мере разрушились, что указывает на β -конфигурацию их гликозидных связей. В производном дисахарида количество галактозы осталось примерно таким же, как было до окисления. Тот же результат мы получили при окислении ацетилированного производного β -галактофуранозил-(1 \rightarrow 3) маннита, взятого в качестве модельного соединения. На основании этих данных, а также принимая во внимание отмеченную ранее в литературе устойчивость β -связанных остатков галактофуранозы к окислению CrO_3 и разрушение α -связанных остатков в условиях окисления [5], мы сделали вывод, что в ганглиозиде 2 остаток галактофуранозы присоединен β -гликозидной связью.

Таким образом, приведенные результаты показывают, что углеводные цепи ганглиозидов 1 и 2 одинаковы и имеют структуру $\text{Gal}f(\beta 1 \rightarrow 4)\text{NeuAc}(\alpha 2 \rightarrow 3)\text{Gal}p(\beta 1 \rightarrow 4)\text{Glc}p(\beta 1 \rightarrow 4)\text{Cer}$. Поскольку разница в подвижности ганглиозидов при ТСХ может быть связана с присутствием в менее полярном ганглиозиде О-ацильного заместителя, который может теряться в используемых методах химического анализа, мы провели мягкую щелочную обработку менее полярного ганглиозида 2 и обнаружили, что его подвижность при ТСХ не изменилась. Следовательно, его большая подвижность не связана с присутствием О-ацильного заместителя.

Структура липидных частей ганглиозидов установлена с помощью метанолиза и периодатного окисления. В продуктах метанолиза ганглиозидов обнаружены метиловые эфиры высших жирных кислот и сфингозиновые основания. По данным ТСХ, ганглиозид 1 содержит главным образом α -гидроксикислоты, а ганглиозид 2 — незамещенные кислоты. Сфингозиновым основанием в обоих случаях является фитосфингозин. Метиловые эфиры высших жирных кислот выделяли из метанолизатов препаративной ТСХ и анализировали ГЖХ, метиловые эфиры гидроксикислот предварительно ацетилировали. Приведенные в таблице результаты анализа показывают, что набор α -гидроксикислот в ганглиозиде 1 невелик: это C_{16} , C_{20} , C_{22} , C_{23} и C_{24} -кислоты, среди которых последняя составляет 35% смеси. В ганглиозиде 2 среди незамещенных кислот преобладает стеариновая кислота.

Состав сфингозиновых оснований ганглиозидов определен с помощью ГЖХ-анализа высших жирных спиртов, которые образуются из фитосфингозина при периодатном окислении ганглиозидов и последующем восстановлении высших альдегидов KBH_4 . В обоих случаях обнаружен только C_{13} -спирт, следовательно, сфингозиновым основанием ганглиозидов 1 и 2 является C_{16} -фитосфингозин.

На основании изложенных данных для ганглиозидов 1 и 2 предложена структура



в ганглиозиде 1 $\text{R} = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13, 17, 19-21}\text{CHOH}-$
 в ганглиозиде 2 $\text{R} = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$, $n = 16$ (преобладает), 18, 20.

Состав высших жирных кислот ганглиозидов *Acanthaster planci**

Кислоты	Ганглиозид 1		Ганглиозид 2		Ганглиозид 3	
	незамещенные кислоты	α -гидроксикислоты	незамещенные кислоты	α -гидроксикислоты	незамещенные кислоты	α -гидроксикислоты
C _{14:0}	2,8	0	0	0	6,7	0
C _{15:0}	3,4	0	0	0	4,8	0
C _{16:0}	17,9	20,3	7,0	13,8	42,0	15,2
C _{17:1}	7,3	0	0	0	3,0	0
C _{18:0}	42,3	0	54,0	1,5	24,0	1,5
C _{19:1}	11,6	0	6,2	0	0	0
C _{20:0}	10,6	4,5	12,3	5,6	6,6	5,4
C _{21:0}	2,4	0	0	0	0	0
C _{22:0}	0	25,2	11,5	19,5	9,3	25,3
C _{23:0}	0	15,0	9,0	14,4	0	0
C _{24:0}	0	35,0	0	45,2	3,6	52,6

* Приведено содержание кислот каждого типа в процентах от суммы кислот данного класса. Содержание незамещенных кислот в ганглиозиде 1 составляет не более 5% от суммы всех кислот; α -гидроксикислоты содержатся в ганглиозиде 3 в следовых количествах, в ганглиозиде 2 их менее 5%.

Следовательно, ганглиозиды 1 и 2 различаются только составом высших жирных кислот: более полярный ганглиозид 1 содержит α -гидроксикислоты, а менее полярный ганглиозид 2 — незамещенные кислоты. Обнаружение минорных количеств (около 5%) незамещенных кислот в ганглиозиде 1 и α -гидроксикислот в ганглиозиде 2 можно объяснить незначительной примесью альтернативных ганглиозидов в очищенных препаратах.

Интересно, что эти ганглиозиды при хранении в растворе хлороформ — метанол — вода (2 : 3 : 1) частично подвергаются автогидролизу с образованием лактозилцерамида и сиалосодержащего фрагмента, а также могут давать лактон, обладающий большей подвижностью при ТСХ, чем исходный ганглиозид. Лактон можно выделить из смеси с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой при элюции хлороформом с метанолом (2 : 1) как нейтральный гликолипид. При мягкой щелочной обработке лактон полностью превращается в исходный ганглиозид.

Ганглиозид 3. Подвижность этого соединения при ТСХ на силикагеле такая же, как и у главного ганглиозида 1, элюирующегося 0,025 М раствором соли. Для установления его структуры использовали те же химические методы, что и для ганглиозидов 1 и 2. Показано, что в его состав входят глюкоза, галактоза и сиаловая кислота в соотношении 1 : 2 : 1. При мягкой кислотном гидролизе ганглиозида 3 образуется лактозилцерамид и сиалосодержащий фрагмент с такой же подвижностью при ТСХ, как и дисахарид Gal(β 1 \rightarrow 4)NeuAc, полученный при частичном кислотном гидролизе ганглиозидов 1 и 2. По данным метилирования, ганглиозид 3 имеет такую же углеводную цепь, как и ганглиозиды 1 и 2: Gal(1 \rightarrow 4)-NeuAc(2 \rightarrow 3)Galp(1 \rightarrow 4)Glc. В состав его липидной части входят фитосфингозин и главным образом незамещенные высшие жирные кислоты, среди которых преобладают пальмитиновая и стеариновая. Таким образом, по данным химического анализа, ганглиозид 3 имеет практически такую же структуру, как ганглиозид 2, хотя отличается от него поведением при ионообменной хроматографии и ТСХ. Полный кислотный гидролиз ганглиозида 3 (4 н. HCl) показал присутствие в нем аминокислот, содержание которых по отношению к сиаловой кислоте составляет 7 : 1 (моль/моль). В ганглиозидах 1 и 2 аминокислоты не обнаружены. Возможно, ганглиозид 3 представляет собой комплекс ганглиозида 2 с пептидом. Ранее в литературе отмечалось существование ганглиозид-белковых комплексов [6], по-видимому, могут образовываться и ганглиозид-пептидные комплексы.

Таким образом, из морской звезды *A. planci* отряда Игольчатых звезд выделены необычные ганглиозиды, в которых N-ацетилнейраминаовая кислота расположена внутри олигосахаридной цепи и гликозилирована кон-

цевой галактофуранозой, обнаруженной в ганглиозидах впервые. Эти ганглиозиды по химической структуре отличаются от моносиалоганглиозидов морской звезды *P. pectinifera* того же отряда Игольчатых звезд, где концевое положение в цепи занимает арабинофураноза [7], и скорее похожи на ганглиозид из морской звезды *L. quinaria bispinosa* отряда Явнопластинчатых звезд, где также имеется тетрасахаридная цепь с субтерминальной N-ацетилнейраминовой кислотой и концевой галактозой, однако там N-ацетилнейраминовая кислота имеет O-метильную группу у C-8, а концевая галактоза находится в пиранозной форме [8]. Можно предположить, что либо углеводные цепи ганглиозидов морских звезд этих двух отрядов не имеют четких различий, характерных для каждого отряда, либо существенно то, что пространственное строение галактофуранозы ближе к строению арабинофуранозы, чем галактопиранозы, и, следовательно, в пространственном отношении терминальные участки углеводных цепей ганглиозидов *A. planci* и *P. pectinifera* отряда Игольчатых звезд похожи и отличаются от ганглиозида *L. quinaria bispinosa* отряда Явнопластинчатых звезд. Дальнейшее исследование ганглиозидов из представителей этих отрядов позволит выяснить, существуют ли особенности структуры, характерные для ганглиозидов животных каждого отряда, и насколько широки вариации структур ганглиозидов внутри каждого отряда морских звезд.

Экспериментальная часть

Морские звезды *A. planci* собраны в заливе Няганг (Вьетнам). В работе использовали N-ацетилнейраминовую кислоту (Koch-Light, Англия), N-гликолилнейраминовую кислоту (Sigma, США), галактозооксидазу (Sigma, США), глюкозооксидазу (Boehringer Mannheim, ФРГ), пероксидазу из хрена.

Хлороформ перед использованием перегоняли. Аналитическую и препаративную ТСХ проводили на силикагеле 60 Н (Merck, ФРГ). Использовали системы растворителей: для ганглиозидов хлороформ — метанол — вода (6 : 4 : 1) и хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH (60 : 35 : 8), обнаружение резорциновым [9] и орциновым [10] реактивами; для нейтральных гликолипидов хлороформ — метанол — вода (64 : 25 : 4), обнаружение орциновым реактивом; для сиаловых кислот пропанол — вода — 2 н. NH_4OH (30 : 10 : 5) и пропанол — вода (7 : 3), обнаружение резорциновым реактивом; для метилированных гликолипидов хлороформ — метанол (47 : 3), обнаружение орциновым реактивом; для сфингозиновых оснований хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH (40 : 10 : 1), обнаружение 0,2% раствором нингидрина в ацетоне; для метиловых эфиров высших жирных кислот хлороформ, обнаружение раствором бромтимолового голубого и конц. H_2SO_4 .

ГЖХ выполняли на приборе Pye Unicam 104 (Англия), скорость азота 60 мл/мин, длина колонки 1,5 м. 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 диатомите С при 190° С, ацетаты частично метилированных метилкетозидов сиаловых кислот — на колонке с 3% OV-1 на диатомите С при 200—250° С (3° С/мин), алифатические спирты и их ацетаты, а также метиловые эфиры высших жирных кислот — на той же колонке при 160—220 и 180—280° С (3° С/мин) соответственно. Хроматомасс-спектрометрический анализ проводили на приборе М-80А (Hitachi, Япония), снабженном колонкой с 2% OV-1 на газхроме Q, при ионизирующем напряжении 70 эВ.

Спектры ЯМР ганглиозида 1 снимали на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) с рабочей частотой по углероду 62,9 МГц при 35° С, длина импульса 8 мкс, частота повторения импульса 0,6 с; концентрация вещества 1,2% в смеси CDCl_3 — CD_3OD — D_2O (2 : 3 : 1).

Аналитические методы: сиаловые кислоты количественно определяли с резорциновым реактивом [11, 12], гексозы в виде ацетатов гекситов —

с помощью ГЖХ, используя в качестве внутреннего стандарта инозит-Аминокислоты определяли на аминокислотном анализаторе Т-339 (ЧССР) после гидролиза ганглиозидов 4 М НСl в течение 24 ч при 100° С.

Выделение полярных липидов. Грубо измельченные морские звезды обезвоживали ацетоном и хранили в ацетоне. Перед экстракцией ацетон отделяли, ткань гомогенизировали в метаноле, добавляли к гомогенату хлороформ и метанол в таком количестве, чтобы соотношение хлороформ — метанол было 2 : 1, а растворитель — обезвоженная ткань 10 : 1. Смесь встряхивали, раствор отделяли центрифугированием, остаток еще дважды экстрагировали смесью хлороформ — метанол 2 : 1 и дважды смесью 1 : 1. Экстракты объединяли, упаривали в вакууме (температура в бане не выше 37° С), остаток растворяли в смеси хлороформ — метанол — вода, 40 : 20 : 3, и диализовали против дистиллированной воды. Водный слой, образовавшийся внутри мешка, отделяли, к хлороформному слою добавляли метанол, смесь размешивали и вновь диализовали. Обработку повторяли еще раз. Объединенные водные слои упаривали и лиофилизовали. Из 1 кг морских звезд получали 2,6 г суммы полярных липидов.

Колоночную хроматографию полярных липидов на DEAE-целлюлозе (CH_3COO^-) проводили как описано ранее [13]. Ганглиозиды 1 и 2 элюировали 0,025 М раствором $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ в метаноле, ганглиозид 3 — 0,1 М раствором соли, фракции анализировали ТСХ. Сходные по составу фракции объединяли, упаривали, остаток растворяли в воде, диализовали против дистиллированной воды, лиофилизовали и очищали ганглиозиды с помощью препаративной ТСХ. Из 2,6 г суммы липидов получали 28,3 мкмоль ганглиозида 1, 7,2 мкмоль ганглиозида 2 и 2,9 мкмоль ганглиозида 3.

Полный кислотный гидролиз гликолипидов (0,1—2 мкмоль) проводили 2 М водной НСl (1 мл) при 100° С в течение 6 ч. Гидролизат промывали 1 мл хлороформа, водный слой нейтрализовали смолой АВ 17 × 8 (HCO_3^-), обрабатывали 4 ч KBH_4 при 20° С, нейтрализовали 2 М $\text{CH}_3\cdot\text{COOH}$, пропускали через колонку (1,3 × 10 см) со смолой IR-120 (H^+), элюируя водой. Элюат упаривали с добавлением метанола в конце упаривания, остаток обрабатывали 16 ч смесью уксусный ангидрид — пиридин (1 : 1) при 20° С и анализировали ГЖХ.

Частичный кислотный гидролиз ганглиозидов (0,1—2 мкмоль) проводили 0,05—0,1 М H_2SO_4 при 80° С в течение 1,5 ч, гидролизат диализовали 24 ч против дистиллированной воды. Недализуемые продукты лиофилизовали и анализировали ТСХ, нейтральные гликолипиды выделяли препаративной ТСХ и определяли моносахаридный состав после их полного гидролиза. Внешний водный раствор, полученный после диализа, упаривали до объема 5 мл, пропускали через колонку, содержащую 6 мл даякса 2 × 8 (CH_3COO^-), колонку промывали 10 мл воды, сиалосодержащий фрагмент элюировали 10 мл 1 М Na-ацетатного буфера, рН 4,6 [11]. Кислый элюат пропускали через колонку со смолой IR-120 (H^+), упаривали, лиофилизовали и анализировали ТСХ. Определяли содержание сиаловой кислоты (с резорциновым реактивом) и нейтральных сахаров после полного кислотного гидролиза с помощью ГЖХ.

Метилирование и тридейтерометилирование проводили по Хакомори [14], а также $\text{CH}_3\text{I}(\text{CD}_3\text{I})$ в диметилсульфоксиде в присутствии порошкообразного NaOH [15]. Метилированные или тридейтерометилированные производные нагревали 14 ч с 0,5 М НСl в CH_3OH при 80° С и частично метилированные или тридейтерометилированные метилгликозиды анализировали с помощью ГЖХ. Далее продукты, полученные из тридейтерометилированных производных ганглиозидов, ацетиловали 2 ч при 100° С уксусным ангидридом в пиридине (1 : 1), раствор упаривали, остаток анализировали с помощью ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии. Кислый углеводный фрагмент, полученный при частичном кислотном гидролизе ганглиозидов, сначала обрабатывали 4 ч при 20° С KBH_4 , пропускали через колонку со смолой IR-120 (H^+), элюировали водой, упаривали с добавлением метанола в конце упаривания и затем метилировали по методу [15].

Периодатное окисление ганглиозидов проводили 0,02 М NaIO_4 при 20° С

в течение 16 ч, избыток периодата разрушали добавлением нескольких капель 10% раствора этиленгликоля и высшие жирные альдегиды извлекали гексаном. Гексановый раствор упаривали, остаток растворяли в метаноле и восстанавливали KBH_4 как описано выше. Полученные алифатические спирты анализировали ГЖХ, а после ацетилирования искусственным ангидридом в пиридине (1 : 1) при 20° С в течение 16 ч — хроматомасс-спектрометрией.

Окисление хромовым ангидридом: ацетилированные производные дигексозилцерамида и дисахарида, предварительно восстановленного KBH_4 , обрабатывали CrO_3 45 мин в смеси уксусная кислота — уксусный ангидрид (9 : 1) при 40° С по методу [16]. Моносахариды анализировали с помощью ГЖХ.

Метаноллиз ганглиозидов проводили 18 ч 1 М HCl в CH_3OH при 80° С. Метилловые эфиры высших жирных кислот извлекали из кислого раствора экстракцией гексаном, гексан упаривали, остаток анализировали ТСХ. Метилловые эфиры незамещенных и α -гидроксикислот разделяли препаративной ТСХ, метилловые эфиры гидроксикислот ацетилировали 16 ч при 20° С искусственным ангидридом в пиридине (1 : 1); оба типа кислот анализировали ГЖХ. Метанольный раствор после экстракции гексаном подщелачивали 4 н. KOH и извлекали сфингозиновые основания экстракцией эфиром. Эфирный раствор упаривали, сфингозиновые основания анализировали ТСХ.

Обработка глюкозооксидазой [17]: 0,39 г смеси, содержащей глюкозооксидазу, пероксидазу и NaH_2PO_4 (из набора «Глюкостат» фирмы Boehringer), растворяли в 20 мл воды и добавляли 2 мг *o*-дианизидина в 0,2 мл спирта. Этот реагент (2 мл) добавляли к 0,5 мл раствора, полученного после полного кислотного гидролиза 0,1 мкмоль (по сиаловой кислоте) ганглиозида 1, обработки гидролизата хлороформом и нейтрализации водного слоя смолой АВ 17 × 8 (HCO_3^-). Через 1 ч измеряли поглощение раствора при 430 нм. Калибровочную кривую строили по глюкозе.

Обработка галактозооксидазой [18]: около 1 мг фермента растворяли в 25 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,0, добавляли около 2 мг пероксидазы из хрена и 3 мг *o*-дианизидина в 0,3 мл спирта. Полученный реагент (2 мл) добавляли к 0,5 мл раствора сахаров из 0,1 мкмоль ганглиозида 1 (см. выше). Через 7 ч измеряли поглощение раствора при 430 нм. Калибровочную кривую строили по галактозе.

Авторы выражают благодарность В. Л. Садовской (ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии ВАСХНИЛ) за получение высококачественных масс-спектров и участие в их обсуждении, а также В. С. Левину (Институт биологии моря ДВО АН СССР) за сбор и первичную обработку морских звезд.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kochetkov N. K., Smirnova G. P. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1986. V. 44. P. 387—438.
2. Smirnova G. P. // Прогресс химии углеводов / Ред. Торгов И. В. М.: Наука, 1985. С. 126—148.
3. Smirnova G. P. // Биология моря. 1987. № 1. С. 3—11.
4. Haverkamp J., Van Halbeek H., Dorland L., Vliegthart F. G., Pfeil R., Schauer R. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 122. № 2. P. 305—311.
5. Oshima M., Ariga T. // FEBS Lett. 1976. V. 64. № 2. P. 440—442.
6. Sonnino S., Ghidoni R., Marshesini S., Tettamanti G. // J. Neurol. 1979. V. 33. № 4. P. 117—121.
7. Smirnova G. P., Kochetkov N. K. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 618. № 3. P. 486—495.
8. Smirnova G. P., Kochetkov N. K. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 12. С. 1650—1655.
9. Svennerholm L. // Biochim. et biophys. acta. 1957. V. 24. № 3. P. 604—611.
10. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Svetashev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P. // Comp. Biochem. and Physiol. 1970. V. 34. № 3. P. 163—177.
11. Svennerholm L. // Acta chem. scand. 1959. V. 12. № 3. P. 547—554.
12. Miettinen T., Takki-Luukkainen I. T. // Acta chem. scand. 1959. V. 13. № 4. P. 856—858.
13. Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Smirnova G. P., G'ukhoded I. S. // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 326. № 1. P. 74—83.

14. Hakomori S. // J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. № 2. P. 205—208.
15. Larson G., Karlsson H., Hansson G. C., Pimlott W. // Carbohydr. Res. 1987. V. 161. № 2. P. 281—290.
16. Laine R. A., Renkonen O. // J. Lipid Res. 1975. V. 16. № 2. P. 102—106.
17. Okuda J., Miwa I. // Methods Biochem. Anal. 1973. V. 21. P. 155—189.
18. Avigad G., Asensio Bretons C., Amaral D., Horecker B. L. // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. P. 2736—2743.

Поступила в редакцию
14.VII.1989

G. P. SMIRNOVA

GANGLIOSIDES WITH THE SIALIC ACID RESIDUE IN THE INNER
PART OF THE OLIGOSACCHARIDE CHAIN AND WITH THE TERMINAL
GALACTOFURANOSE RESIDUE FROM THE STARFISH
ACANTHASTER PLANCI

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

Three unusual gangliosides — two major and one minor — were isolated from the total lipid extract of the starfish *Acanthaster planci*. On the basis of chemical and spectral data the major gangliosides were identified as β -galactofuranosyl-(1→4)- α -N-acetylneuraminosyl-(2→3)- β -galactopyranosyl-(1→4)- β -glucopyranosyl-(1→1)-ceramide containing C₁₆-phytosphingosine as the long-chain base. The more polar of the major gangliosides contains α -hydroxy fatty acids, whereas the other one includes normal fatty acids. The minor ganglioside was shown to consist of the same oligosaccharide chain as the major gangliosides, phytosphingosine, unsubstituted fatty acids and amino acids.