



УДК 547.95.02+593.93:578.088

СИАЛОГЛИКОЛИПИД, СОДЕРЖАЩИЙ N-АЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИН
ИЗ ПЕЧЕНИ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *EVASTERIAS RETIFERA*

Смирнова Г. П., Кочетков Н. Е.

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

Из печени морской звезды *Evasterias retifera* выделен и охарактеризован главный сиалогликолипид. На основании данных полного и частичного кислотного гидролиза, метанолиза, метилирования, ферментативного расщепления нейраминидазой, окисления периодатом и хромовым ангидридом для него предложена структура N-ацетилнейраминозил-(α 2 \rightarrow 9)-N-ацетилнейраминозил-(α 2 \rightarrow 3)-N-ацетилгалактозаминил-(β 1 \rightarrow 3)-галактозил-(β 1 \rightarrow 4)-глюкозил-(β 1 \rightarrow 1)-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.

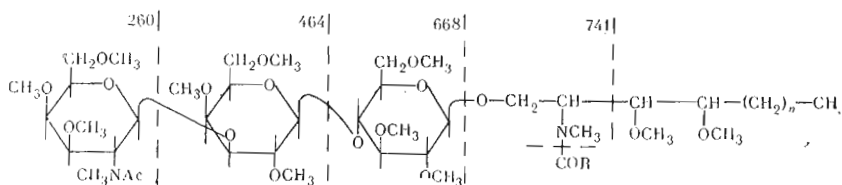
Ранее мы показали, что ткани различных классов иглокожих содержат сиалогликолипиды [1, 2], которые в других типах морских беспозвоночных не обнаружены. Исследование сиалогликолипидов представителей класса морских ежей показало, что олигосахаридные цепи этих соединений построены по одному плану: содержат глюкозу и сиаловую кислоту, связанную с первичным гидроксилом глюкозы [3–9]. Такой тип структур в ганглиозидах позвоночных не встречается. Сиалогликолипиды других классов иглокожих изучены мало. К настоящему времени установлены структуры сиалогликолипидов из морских звезд *Distolasterias nipon* (отряд Педидцелляриевых звезд) [10] и *Patiria (Asterina) pectinifera* (отряд Игольчатых звезд) [11–13] и показано, что углеводные цепи этих соединений различны для звезд разных отрядов: сиалогликолипид из *D. nipon* — трисиалилгалактозилцерамид, а сиалогликолипиды из *P. (A.) pectinifera* — ганглиозиды нового типа. В состав сиалогликолипидов входит арабиноза, а сиаловая кислота расположена внутри олигосахаридной цепи. Чтобы выяснить, является ли гематоид типичной структурой сиалогликолипидов Педидцелляриевых звезд, мы продолжили исследование этого отряда иглокожих. В настоящей работе сообщается о структуре сиалогликолипида из печени морской звезды *Evasterias retifera*.

Сырой препарат полярных гликолипидов был получен после диализа общего липидного экстракта печени *E. retifera*, как описано ранее [3]. Этот препарат, по данным ТСХ, содержал один главный и два минорных сиалогликолипида, фосфолипиды, нейтральные гликолипиды и пигменты. Для выделения сиалогликолипидов использовали ионообменную хроматографию на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой, элюируя кислые гликолипиды растворами ацетата аммония в метаноле [14]. При концентрации соли 0,025 М элюировался наименее полярный минорный сиалогликолипид (~5% суммы), 0,1 М раствором — главный сиалогликолипид и 0,25 М — полярный минорный сиалогликолипид (~15% суммы). Главный гликолипид был дополнительно очищен препаративной ТСХ на силикагеле и вел себя как индивидуальное соединение при ТСХ в нейтральной и основной системах растворителей. Он содержал сиаловую кислоту и нейтральные сахара (специфическое окрашивание резорциновым [15] и ординным [2] реактивами соответственно) и не содержал фосфатной (отрицательная реакция с молибденовым реактивом [16]) и свободной аминогруппы (нет окраски с нингидрином). ИК-спектр его подобен спектрам других сиалогликолипидов: имеются полосы поглощения амидной группы (1640 и

1550 cm^{-1}), спиртовых гидроксильных (1040 и 1080 cm^{-1}), ассоциированных гидроксильных (3300–3450 cm^{-1}), ионизированной карбоксильной группы (1405 cm^{-1}), валентных колебаний C–H-связей алифатической цепи (2860 и 2930 cm^{-1}).

Структура олигосахаридной цепи гликолипида изучена методами полного и частичного кислотного гидролиза, метанолиза, метилирования, ферментативного гидролиза, окисления периодатом и хромовым ангидридом. После полного кислотного гидролиза сиалогликолипида обнаружены глюкоза, галактоза и галактозамин в соотношении 1 : 1 : 1. Это первый случай обнаружения аминсахара в сиалогликолипидах иглокожих, хотя в ганглиозидах позвоночных N-ацетилглюкозамин и N-ацетилгалактозамин являются обычными компонентами. После частичного кислотного гидролиза сиалогликолипида была выделена сиаловая кислота, подвижность которой при ТСХ была такая же, как у N-ацетилнейраминной кислоты. Структура ее была определена с помощью масс-спектрометрии: полного ацетата метилового эфира производного моноовой кислоты, полученного после восстановления кетогруппы сиаловой кислоты в спиртовую обработку KBH_4 . В масс-спектре имелись все пики ионов, соответствующие фрагментации производного N-ацетилнейраминной кислоты [17]: m/z 577 (M^+), 288 ($\text{C}_{(1)}-\text{C}_{(5)}$ -фрагмент), 360 ($\text{C}_{(5)}-\text{C}_{(9)}$ -фрагмент), а также вторичные фрагменты, образующиеся при дальнейшем отщеплении молекул уксусной кислоты и кетена. Количественные измерения показали, что молекула гликолипида содержит два остатка N-ацетилнейраминной кислоты.

Для определения последовательности моносахаридов в цепи использовали частичный кислотный гидролиз и частичный метанолиз. При обработке сиалогликолипида 0,1 н. H_2SO_4 при 80° С был получен асиалогликолипид, содержащий глюкозу, галактозу и галактозамин. В масс-спектре полностью метилированного асиалогликолипида имелся интенсивный пик с m/z 260, соответствующий концевому метилированному N-ацетилгексозамину, пики ионов с m/z 464 и 668, которые образуются при отщеплении концевых ди- и трисахаридного фрагментов соответственно, и пик иона с m/z 741, включающий в себя олигосахаридную цепь и $\text{C}_{(1)}-\text{C}_{(2)}$ -фрагмент сфингозинового основания (схема).



Из этих данных следует, что асиалогликолипид является тригексозилцерамидом, олигосахаридная цепь которого линейна, присоединена к первичному гидроксильному сфингозинового основания и имеет на конце N-ацетилгалактозамин. После полного метанолиза метилированного асиалогликолипида обнаружены α - и β -метил-2,3,6-три-O-метилгалактопиранозиды 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) образуются моно- и дигексозилцерамиды, которые были разделены препаративной ТСХ на силикагеле, и было показано, что моногексозилцерамид содержит глюкозу, а дигексозилцерамид — глюкозу и галактозу. Следовательно, непосредственно к сфингозинового основания присоединен остаток глюкозы, и асиалогликолипид имеет структуру N-ацетилгалактозаминил-(1 → 3)-галактопиранозил-(1 → 4) - глюкопиранозил-(1 → 1)-церамида.

Положение остатков N-ацетилнейраминной кислоты в сиалогликолипиде определяли с помощью метилирования. В масс-спектре полностью метилированного сиалогликолипида имеется интенсивный пик иона с m/z 376, соответствующий концевому остатку N-ацетилнейраминной кислоты, и пик иона с m/z 737, отвечающий фрагменту из двух остатков N-аце-

тилнейраминовой кислоты. В спектре отсутствует пик иона с m/z 260, характерный для концевого N-ацетилгексозамина. Отсюда следует, что олигосахаридная цепь линейна и имеет на конце дисиалилльный остаток. После метанолиза метилированного сиалогликолипида частично метилированные метилгликозиды анализировали методом ГЖХ, а после дополнительного ацетилирования — методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

Анализ ГЖХ показал, что в сиалогликолипиде, как и в асиалопроизводном, глюкоза замещена в положение 4, а галактоза — в положение 3. Масс-спектр ацетата частично метилированного метилгликозида N-ацетилгалактозамина полностью совпал с масс-спектром метил-3-O-ацетил-2-дезоксид-4,6-ди-O-метил-2-(N-метилацетида)-галактопиранозида [18]. Следовательно, в сиалогликолипиде дисиалилльный остаток присоединен в положение 3 N-ацетилгалактозамина. Для N-ацетилнейраминовой кислоты было обнаружено два производных, относительные времена удерживания которых при ГЖХ на колонке с фазой SE-30 были 1 и 1,24. Масс-спектр производного с меньшим временем удерживания идентичен масс-спектру полностью метилированного метилкетозида N-ацетилнейраминовой кислоты [19], а масс-спектр производного с большим временем содержал все пики, характерные для метилового эфира метилкетозида 4,7,8-три-O-метил-9-O-ацетил-N-метил-N-ацетилнейраминовой кислоты [19]. Следовательно, остатки N-ацетилнейраминовых кислот связаны между собой 2→9-связью.

Этот вывод подтвержден данными периодатного окисления. Сиаловые кислоты, выделенные после обработки сиалогликолипида по Смитсу, имеют в спектре поглощения их хромофора с резорцином один максимум при 630 нм, характерный для C_7 -сиаловых кислот [20]. Значит, оба остатка N-ацетилнейраминовой кислоты окисляются периодатом с расщеплением $C_{(7)} - C_{(8)}$ -связи, т. е. гидроксильные группы при $C_{(7)}$ и $C_{(8)}$ свободны. При окислении каждая молекула гликолипида выделяет одну молекулу формальдегида; следовательно, в одном из остатков N-ацетилнейраминовой кислоты гидроксил при $C_{(9)}$ также свободен, а в другом замещен.

Обнаружение 2→9-связи между сиаловыми кислотами в сиалогликолипиде из *E. retifera* представляет большой интерес, так как такой тип связи не встречается в полисиалоганглиозидах позвоночных, а также в других исследованных сиалогликолипидах иглокожих: в ганглиозидах позвоночных и в трисиалогликолипиде из морской звезды *D. nipon* [10] сиаловые кислоты соединены между собой 2→8-связями, а в дисиалогликолипидах из морских ежей *S. nudus* [6] и *E. cordatum* [5] — 2→4-связями. Недавно 2→9-связи между остатками N-ацетилнейраминовой кислоты обнаружены в гомополимере сиаловой кислоты из *Neisseria meningitidis* [21].

α -Конфигурация кетозидных связей N-ацетилнейраминовых кислот в гликолипиде определена с помощью нейраминидазы из *Vibrio cholerae*, которая отщепляет оба остатка сиаловых кислот.

β -Конфигурации гликозидных связей глюкозы, галактозы и N-ацетилгалактозамина определены окислением ацетилированного асиалогликолипида хромовым ангидридом.

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-аминопропандиол-1,3, а в гексановом слое обнаружены высшие жирные спирты. Отсюда следует, что в сфингозиновом основании гидроксильные группы находятся у $C_{(1)}$, $C_{(3)}$ и $C_{(4)}$, а аминогруппа — у $C_{(2)}$, как и в фитосфингозине.

Состав фитосфингозинов сиалогликолипида определен в результате анализа спиртов методом ГЖХ и ацетатов спиртов методом ГЖХ-масс-спектрометрии (табл. 1). После гидрирования смеси спиртов над Pd/C их хроматографическая картина не изменилась, т. е. непредельные спирты отсутствуют. В смеси обнаружены спирты с прямой цепью и изостроения, в которых положение разветвления следует из масс-спектров их ацетатов,

Состав фитосфингозинов сиалогликолипида из печени морской звезды
Evasterias retifera

Спирты	Соответствующие фитосфингозины	% от суммы	Спирты	Соответствующие фитосфингозины	% от суммы
<i>n</i> -C _{12:0}	<i>n</i> -C _{15:0}	1,2	<i>изо</i> -C _{15:0}	<i>изо</i> -C _{18:0}	12,7
<i>изо</i> -C _{13:0}	<i>изо</i> -C _{16:0}	1,0	<i>n</i> -C _{15:0}	<i>n</i> -C _{18:0}	11,3
<i>n</i> -C _{13:0}	<i>n</i> -C _{16:0}	26,0	<i>изо</i> -C _{16:0}	<i>изо</i> -C _{19:0}	3,1
<i>изо</i> -C _{14:0}	<i>изо</i> -C _{17:0}	27,2	<i>n</i> -C _{16:0}	<i>n</i> -C _{19:0}	7,6
<i>n</i> -C _{14:0}	<i>n</i> -C _{17:0}	9,9			

Таблица 2

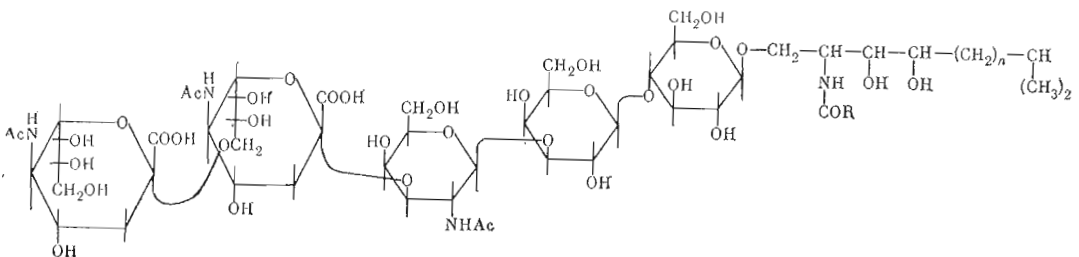
Состав высших жирных кислот сиалогликолипида из печени морской звезды
Evasterias retifera

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 _{12:0}	1,8	—	C _{18:0}	23,5	5,6
C _{13:0}	1,8	—	C _{19:0}	1,1	0,9
C _{14:0}	8,3	14,7	C _{20:0}	1,7	3,0
C _{15:1}	2,5	—	C _{21:0}	0,5	0,8
C _{15:0}	5,6	22,2	C _{22:0}	4,2	2,9
C _{16:0}	39,6	42,8	C _{23:0}	0,7	1,7
C _{17:1}	1,8	—	C _{24:0}	0,4	2,0
C _{17:0}	2,4	1,9	C _{25:0}	0,4	0,5
C _{18:1}	3,7	1,0			

где наряду с ионами фрагментов ($M^* - \text{CH}_2\text{COOH}$) и ($M^* - \text{CH}_2\text{OSCOCH}_3$) имеются также пики ионов, соответствующие фрагментам ($M^* - \text{CH}_2\text{COOH} - \text{CH}_3$), ($M^* - \text{CH}_2\text{COOH} - (\text{CH}_2)_2\text{CH}$), ($M^* - \text{CH}_2\text{OSCOCH}_3 - \text{CH}_3$) и ($M^* - \text{CH}_2\text{OSCOCH}_3 - (\text{CH}_2)_2\text{CH}$). Разветвленные спирты составляют более 40% смеси. Таким образом, по составу фитосфингозинов сиалогликолипида из *E. retifera* отличается от сиалогликолипидов морских ежей, где разветвленные соединения не найдены [3–9], и сиалогликолипида из морской звезды *D. nipon*, где разветвленный фитосфингозин обнаружен лишь в виде минорного компонента [10], но близок сиалогликолипиду из морской звезды *P. pectinifera*, где также высоко содержание фитосфингозинов изостроения [22].

Метилловые эфиры высших жирных кислот, полученные после метанолиза сиалогликолипида, по данным ТСХ, являются смесью незамещенных и монооксикислот, причем последние составляют ~80% смеси (табл. 2). Оба класса кислот выделяли препаративной ТСХ и анализировали ГЖХ, метилловые эфиры оксикислот предварительно метилировали. Главными компонентами смеси незамещенных кислот являются пальмитиновая и стеариновая кислоты, а среди α -оксикислот преобладают насыщенные C₁₄-, C₁₅- и C₁₆- α -оксикислоты.

Согласно изложенным данным, структура сиалогликолипида из печени *E. retifera* следующая:



$n = 9, 10, 11, 12$; R — остаток высшей жирной кислоты.

Таким образом, сиалогликолипиды из морских звезд *E. retifera* и *D. nipon*, относящихся к одному отряду, заметно различаются по структуре. В состав сиалогликолипида из *E. retifera* наряду с глюкозой и галактозой входит N-ацетилгалактозамин, впервые обнаруженный в ганглиозидах иглокожих, сиаловые кислоты связаны между собой необычной для ганглиозидов 2→9-связью и высоко содержание разветвленных фитосфингозинов. В сиалогликолипиде из *D. nipon* аминсахара отсутствуют, сиаловые кислоты соединены 2→8-связями, обычными для ганглиозидов, и разветвленный фитосфингозин обнаружен только в виде минорного компонента. Дальнейшее исследование гликолипидов морских звезд позволит выяснить, встречаются ли другие типы структур сиалогликолипидов в этом классе иглокожих и насколько широки вариации в структурах этих соединений внутри одного отряда.

Экспериментальная часть

Морские звезды *E. retifera* собраны в бухте Посыет Японского моря в сентябре. Липидный экстракт печени и сырой препарат сиалогликолипидов получали по описанной ранее методике [3]. В работе использовали N-ацетилнейраминную кислоту (Koch-Light, Англия), нейраминидазу из *Vibrio cholerae* (500 ед/мл; Calbiochem, США). Органические растворители перед использованием перегоняли.

Колоночную хроматографию сиалогликолипидов на DEAE-целлюлозе (CH_2COO^-) выполняли как описано ранее [4], главный сиалогликолипид элюировали 0,1 н. раствором ацетата аммония в метаноле и очищали препаративной ТСХ. Из 2 г сырого препарата сиалогликолипидов получили 120 мг главного сиалогликолипида.

ИК-спектры снимали в таблетках с KBr.

ТСХ проводили на силикагеле КСК (150 меш), содержащем 5% гипса, с использованием систем растворителей, описанных ранее [3].

ГЖХ выполняли на приборе «Pye Unicam 104» (Англия), скорость азота 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 160° С, ацетаты частично метилированных метилгликозидов — на колонке с 3% SE-30 на диатомите С при 200–250° С (3° С/мин), алифатические спирты и их ацетаты, а также метиловые эфиры высших жирных незамещенных и метоксикислот — на той же колонке 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 MAT III» (ФРГ); колонка с 3% OV-1, ионизирующее напряжение 70 эВ.

Масс-спектры метилированных сиалогликолипида и тригексозилцерамида снимали на приборе «Varian MAT CN-6» (США) при ионизирующем напряжении 70 эВ и температуре нагрева образцов 280° С.

Сфингозиновое основание количественно определяли по методу [23], калибровочную кривую строили по фрепозину.

Сиаловые кислоты количественно определяли с резорциновым реактивом [24, 25].

Полный кислотный гидролиз гликолипидов (2 мг) проводили в течение 4 ч 2 н. HCl (1 мл) при 100° С. Нейтральные моносахариды анализировали БХ, а в виде ацетатов гекситов — ГЖХ. Оба метода показали присутствие глюкозы и галактозы в соотношении 1 : 1. Для анализа аминсахаров гликолипиды гидролизывали 24 ч 4 н. HCl при 100° С, гидролизат упаривали и анализировали на аминокислотном анализаторе «Biotronik LC 4010». 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 при 18° С против дистиллированной воды (200 мл). Недиализуемый продукт

лиофилизировали и анализировали ТСХ. Обнаружили один нейтральный гликолипид, который выделяли препаративной ТСХ, и анализировали его моносахаридный состав после полного кислотного гидролиза, как описано выше. Внешний водный раствор, образовавшийся после диализа, упаривали до 5 мл и сиаловые кислоты выделяли на дауэксе 2×8 (CH_3COO^-) элюцией 1 М ацетатным буфером, pH 4,6 [24]. Элюат деионизировали смолой IR-120 [H^+] и лиофилизировали, сиаловые кислоты анализировали ТСХ на силикагеле, импрегнированном 0,2 М NaH_2PO_4 , в системе *n*-пропанол — вода — 2 н. NH_4OH (30 : 10 : 5). Было обнаружено одно соединение с подвижностью *N*-ацетилнейраминовой кислоты. Его структура была доказана с помощью масс-спектрометрии в виде ацетата метилового эфира 5-ацетамидо-3,5-дидезоксиноновой кислоты [17].

Полный кислотный метанолиз сиалогликолипида проводили 1 н. HCl в метаноле при 80° С в течение 18 ч. Метилловые эфиры высших жирных кислот и фитосфингозины выделяли, как описано ранее [3], и анализировали ТСХ. Метилловые эфиры незамещенных и монооксикислот разделяли препаративной ТСХ и анализировали ГЖХ. Метилловые эфиры оксикислот предварительно метилировали.

Частичный метанолиз сиалогликолипида (8 мг) проводили 0,3 н. HCl в смеси хлороформ — метанол (2 : 1) при 60° С в течение 1 ч, реакционную смесь упаривали и анализировали ТСХ. Образовавшиеся цереброзид и дигексозилцерамид выделяли препаративной ТСХ, подвергали полному кислотному гидролизу и анализировали моносахариды методом ГЖХ. В цереброзиде обнаружена глюкоза, а в дигексозилцерамиде — глюкоза и галактоза в соотношении 1 : 1.

Метилирование гликолипидов (5—8 мг) и метиловых эфиров α -оксикислот проводили по Хакомори [26]. Метилированные производные экстрагировали хлороформом, диализовали против дистиллированной воды и очищали с помощью ТСХ. Метилловые эфиры α -метоксикислот анализировали с помощью ГЖХ, а метилированные гликолипиды — с помощью масс-спектрометрии. Метилированные гликолипиды подвергали метанолизу 0,5 н. HCl в метаноле при 80° С в течение 14 ч, частично метилированные метилгликозиды анализировали ГЖХ. Далее продукты метанолиза ацетилировали 2 ч смесью уксусный ангидрид — пиридин (1 : 1) при 100° С и анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

Окисление асиалогликолипида хромовым ангидридом и последующий анализ моносахаридов проводили по методу [27]. Предварительно гликолипид ацетилировали 14 ч смесью уксусный ангидрид — пиридин (1 : 1) при 20° С, в качестве внутреннего стандарта добавляли инозит.

Периодатное окисление сиалогликолипида (10 мг) проводили 0,02 М NaIO_4 , как описано ранее [3], реакционную смесь обрабатывали 2 ч KVO_4 при 20° С и нейтрализовали 2 н. CH_3COOH . Алифатические спирты экстрагировали гексаном (3×3 мл), очищали препаративной ТСХ в системе хлороформ — метанол (99 : 1) и анализировали ГЖХ. Спирты ацетилировали 14 ч смесью уксусный ангидрид — пиридин (1 : 1) при 20° С и анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии. Водный раствор после экстракции гексаном диализовали, недиализуемый продукт лиофилизировали и гидролизовали 0,1 н. H_2SO_4 при 80° С в течение 1,5 ч. Гидролизат диализовали против дистиллированной воды (200 мл), внешний водный раствор упаривали в вакууме до небольшого объема и сиаловые кислоты характеризовали спектром поглощения хромофора, полученного с резорциновым реактивом. В спектре обнаружен один максимум при 630 нм. Недиализуемый продукт в течение 18 ч подвергали кислотному метанолизу 3 н. HCl в метаноле при 80° С, метилловые эфиры высших жирных кислот экстрагировали гексаном. Метанольный слой упаривали досуха и добавляли 1 мл спирта, 0,75 мл 0,75% водного NaHCO_3 и затем раствор 10 мг 2,4-динитрофторбензола в 0,5 мл спирта. Смесь выдерживали 12 ч в темноте при 20° С, добавляли 3 мл воды и экстрагировали эфиром (3×5 мл). Эфир упаривали, 2,4-динитрофенильное производное 2-амино-1,3-пропандиола выделяли препаративной ТСХ в системе хлороформ — метанол (9 : 1) и анализировали с помощью масс-спектрометрии.

Ферментативный гидролиз сиалогликолипида (2 мг) проводили обработкой нейраминидазой из *V. cholerae* в ацетатном буфере, pH 5,5 [28]. Сиаловую кислоту определяли с резорциновым реактивом после обработки реакционной смеси КВН, [29]. Через 2 ч сиаловая кислота полностью отщепилась.

Формальдегид, выделяющийся при периодатном окислении сиаогликолипида, количественно определяли по методу [30], калибровочную кривую строили по манниту.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков Н. К., Жукова И. Г., Смирнова Г. П., Васьяковский 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. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 7, с. 937-942.
7. Кочетков Н. К., Смирнова Г. П., Глухoded И. С. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1093-1099.
8. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1667-1673.
9. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочетков Н. К. Биооргани. 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. Sugita M. J. Biochem. (Tokyo), 1979, v. 86, № 2, p. 298-300.
12. Sugita M. J. Biochem. (Tokyo), 1979, v. 86, № 3, p. 765-772.
13. Смирнова Г. П., Кочетков Н. К. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 618, № 3, p. 486-495.
14. Winterbourn C. C. J. Neurochem., 1971, v. 18, № 6, p. 1153-1155.
15. Svennerholm L. Biochim. et biophys. acta, 1957, v. 24, № 3, p. 604-611.
16. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. J. Lipid Res., 1968, v. 9, № 3, p. 396.
17. Smirnova G. P., Chekareva N. V., Chizhov O. S., Zolotarev B. M., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1977, v. 59, № 2, p. 235-239.
18. Kundu S. K., Ledeen R. W., Gorin P. A. J. Carbohydr. Res., 1975, v. 39, № 2, p. 179-191.
19. Halbeek H., Haverkamp J., Kamerling J. F. G. Carbohydr. Res., 1978, v. 60, № 1, p. 51-62.
20. Kuhn R., Gauhe A. Chem. Ber., 1965, B. 98, № 2, S. 395-413.
21. Bhattacharjee A. K., Jennings H. J., Kenny C. P., Martin A., Smith I. C. P. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 5, p. 1926-1932.
22. Кочетков Н. К., Смирнова Г. П. Биооргани. химия, 1977, т. 3, № 8, с. 1048-1054.
23. Lauter C. J., Grams E. G. J. Lipid Res., 1962, v. 3, № 1, p. 126-138.
24. Svennerholm L. Acta chem. scand., 1958, v. 12, № 3, p. 547-554.
25. Miettinen T., Takki-Luukainen I. T. Acta chem. scand., 1959, v. 13, № 4, p. 856-858.
26. Hakomori S.-I. J. Biochem. (Tokyo), 1964, v. 55, № 2, p. 205-208.
27. Laine R. A., Renkonen O. J. Lipid Res., 1975, v. 16, № 2, p. 102-106.
28. Ishizuka I., Kloppenburg M., Wiegand H. Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 210, № 2, p. 229-303.
29. Schneir M. L., Rafelson M. E. Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 130, № 1, p. 1-11.
30. Vaskovsky V. E., Isay S. V. Anal. Biochem., 1969, v. 30, № 1, p. 25-31.

Поступила в редакцию
21.VII.1981

N-ACETYL GALACTOSAMINE CONTAINING SIALOGLYCOLIPID FROM HEPATOPANCREAS OF THE STARFISH *EVASTERIAS RETIFERA*

SMIRNOVA G. P., KOCHETKOV N. K.

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

The structure of a major sialoglycolipid from hepatopancreas of the starfish *Evasterias retifera* has been established. On the basis of the results of total and partial acid hydrolyses, methanolysis, methylation, enzymatic cleavage with neuraminidase, periodate and chromium trioxide oxidation, this sialoglycolipid was identified as N-acetylneuraminosyl-(α 2 \rightarrow 9)-N-acetylneuraminosyl-(α 2 \rightarrow 3)-N-acetylgalactosaminyl-(β 1 \rightarrow 3)-galactosyl-(β 1 \rightarrow 4)-glucosyl-(β 1 \rightarrow 1)-ceramide. The long-chain bases were found to constitute a mixture of phytosphingosines with both 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 the sialoglycolipid was determined by GLC and GLC-MS.