



УДК 577.115.083:582.26

ДИАЦИЛГЛИЦЕРО-4'-О-(N,N,N-ТРИМЕТИЛ)ГОМОСЕРИН  
В ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЯХ-МАКРОФИТАХХотимченко С. В., Высоцкий М. В., Светашев В. И.,  
Васюковский В. Е.

Институт биологии моря ДВНЦ Академии наук СССР, Владивосток

Полярный липид, выделенный из зеленой водоросли *Ulva fenestrata*, на основании хроматографического поведения, химических свойств, данных ИК- и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектроскопии идентифицирован с диацилглицеро-4'-О-(N,N,N-триметил)гомосерином. Исследован состав жирных кислот DGTS\*. Он был обнаружен с помощью микро-ТСХ в ряде других зеленых водорослей и не найден ни в одной из красных и бурых водорослей.

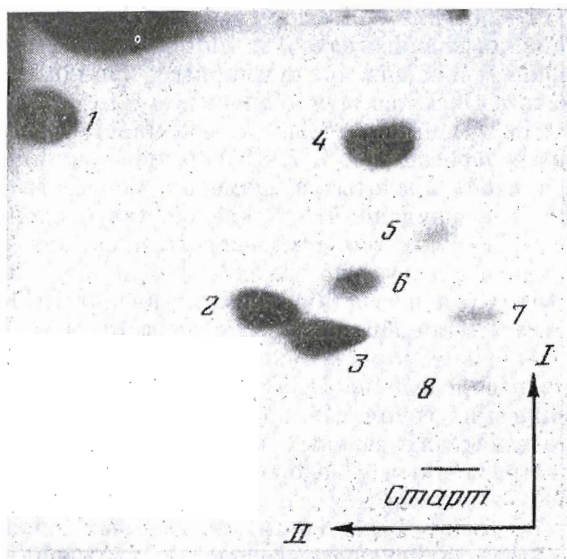
В ходе исследования полярных липидов морских водорослей-макрофитов мы обнаружили, что в зеленой водоросли ульве (*Ulva fenestrata*) одним из главных полярных липидов является соединение, не содержащее фосфора и остатков моносахаридов. На основании сравнения хроматографического поведения этого липида с заведомым образцом, исследования его химических свойств, а также результатов физико-химического анализа он был идентифицирован с DGTS — полярным липидом, выделенным впервые из золотистой водоросли *Ochromonas danica* [1] и обнаруженным затем в ряде других микроводорослей [2–9], патогенном грибе [10] и папоротнике [11]. Кроме того, мы исследовали общие закономерности распределения DGTS в морских водорослях-макрофитах.

При микро-ТСХ липидных экстрактов *U. fenestrata* в системах для разделения полярных липидов водорослей [12] мы наблюдали на хроматограммах (см. рисунок) в области расположения фосфолипидов интенсивное пятно вещества с большей хроматографической подвижностью, чем у фосфатидилэтаноламина, которое отличалось по  $R_f$  от всех обычных растительных фосфо- и гликолипидов. Оно окрашивалось реактивом Драгендорфа и не содержало остатков моносахаридов, судя по реакции с антроновым реагентом [13]. Хотя при обнаружении молибдатным реагентом [14] вещество давало синее пятно, как фосфолипид, дополнительная проверка с реактивом на фосфорсодержащие соединения [15] и количественный анализ [14] показали, что фосфора в нем нет. При омылении метилатом натрия в метаноле соединение разлагалось с образованием метиловых эфиров жирных кислот. Таким образом, было показано, что неизвестное вещество из ульвы является омыляемым липидом, не содержащим фосфора и остатков моносахаридов.

Липид активно включал меченные радиоактивными изотопами глицерин и жирные кислоты. В первом случае при омылении метка из липида переходила преимущественно в водную фазу, во втором меченые жирные кислоты практически полностью превращались в метиловые эфиры.

При нагревании исследуемого липида со щелочью выделялся амин, обнаруживаемый по запаху и с помощью индикаторной бумаги. По хроматографическому поведению и химическим свойствам липид из ульвы напоминал DGTS, найденный ранее в нескольких зеленых микроводорослях [2–9]. Для более тщательного хроматографического сравнения заведомый образец DGTS был выделен из липидного экстракта зеленой микроводоросли *Dunaliella salina*. Микро-ТСХ в различных системах растворителей [4, 12, 16] не выявила различий в подвижности и цветных

\* DGTS — диацилглицеро-4'-О-(N,N,N-триметил)гомосерин.



Двумерная микротонкослойная хроматограмма липидов водоросли *Ulva fenestrata*. Системы растворителей: хлороформ – ацетон – метанол – НСООН – вода (100 : 40 : 20 : 20 : 8); ацетон – бензол – НСООН – вода (200 : 30 : 3 : 10). Обнаружение: 10% серная кислота в метаноле с последующим нагреванием. 1 – моногалактозилдиацилглицерин, 2 – дигалактозилдиацилглицерин, 3 – сульфохиновозилдиацилглицерин, 4 – DGTS, 5 – фосфатидилэтанолламин, 6 – фосфатидилглицерин, 7 – фосфатидилсерин, 8 – фосфатидилинозит

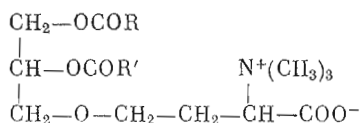
реакциях обоих липидов. Для более строгой идентификации липид из ульвы выделили в чистом виде колоночной и препаративной тонкослойной хроматографией и исследовали его физико-химические характеристики.

ИК-спектр липида имел следующие характерные полосы поглощения ( $\text{см}^{-1}$ ): 970 ( $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ), 1120 (C–O–C), 1632 ( $\text{COO}^-$ ), 1732 (C=O, эфир). Он не отличался от спектров, приведенных в литературе для DGTS из других объектов [2, 9, 11].

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектр полярного липида из ульвы имел следующие сигналы (м.д.): 0,89 (т,  $\text{CH}_3$  жирных кислот); 0,98 (т,  $\text{CH}_3$  жирных кислот  $\omega$ 3-ряда); 1,30 (м,  $\text{CH}_2$  жирных кислот); 1,62 (м,  $\text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—COO}$ ); 2,08 (м, аллильные протоны); 2,35 (м,  $\text{CH}_2\text{—COO}$ ); 2,82 (м,  $\text{CH}=\text{CH}\text{—CH}_2\text{CH}=\text{CH}$ ); 3,30 (с,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ); 3,67 (м, протоны скелета гомосерина); 4,12 и 4,32 (м,  $\text{CH}_2$  глицерина); 5,20 (м,  $\text{CH}$  глицерина); 5,36 (м,  $\text{CH}=\text{CH}$ ). Указанные сигналы не отличались существенно от приведенных в литературе для  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров DGTS, выделенного из других растений [5, 11].

В масс-спектре липида имеются пики молекулярных ионов с  $m/z$  757, 731; пики с  $m/z$  699 и 672, соответствующие фрагментам, возникающим при отщеплении триметиламина от исходных молекул, а также пики с  $m/z$  313, 117, 84 и 58, характерные для DGTS из зеленой микроводоросли [8] и папоротника [11].

Таким образом, полученные данные показывают, что обнаруженный нами в зеленой водоросли *U. fenestrata* неизвестный липид является диацилглицеро-4'-O-(N,N,N-триметил)гомосерином.



В составе жирных кислот DGTS из ульвы обнаружены следующие компоненты (в %): 18 : 4 $\omega$ 3—30,4; 16 : 0—26,6; 18 : 1—25,5; 18 : 3 $\omega$ 3—4,4;

22:5 $\omega$ 3—4,1; 16:1—2,0; 22:1—1,9; 18:2 $\omega$ 6 и 18:3 $\omega$ 6 — по 1,0, а также ряд других в меньших количествах. Для липида характерны те же кислоты, что были ранее найдены в суммарных липидных препаратах из ульвы [17], однако в DGTS заметно больше, чем в смеси липидов, кислот 16:0, 18:1 и 18:4 $\omega$ 3, меньше 18:2 $\omega$ 6 и особенно 18:3 $\omega$ 3. По сравнению с DGTS из других водорослей [1, 4, 7, 8] наш препарат имеет повышенное содержание олеиновой кислоты и заметно более высокое — кислоты 18:4 $\omega$ 3. Недавно было найдено, что в зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardi* DGTS является тем веществом, в котором происходит десатурация олеиновой кислоты до линолевой, а линолевой до  $\gamma$ -линоленовой (18:3 $\omega$ 6) [18]. Судя по составу жирных кислот DGTS из ульвы, он может быть субстратом для образования кислоты 18:4 $\omega$ 3.

С помощью микро-ТСХ в нескольких системах растворителей [12, 16] было исследовано распределение DGTS в водорослях-макрофитах из различных систематических групп. Липид был обнаружен во всех проанализированных представителях зеленых водорослей, однако его количество было существенно различным у водорослей двух классов этого отдела. Во всех улотриковых водорослях — *Ulva fenestrata*, *Enteromorpha linza*, *Monostroma grevillei* — DGTS был одним из главных полярных липидов. В представителях класса сифоновых водорослей содержание липида менялось в широких пределах: несколько меньше, чем в ульве, в *Chaetomorpha moniligera*, *Cladophora stipsoni*; заметно ниже в *Codium fragile* и следы в *Bryopsis plumosa*. DGTS не был обнаружен ни в одном из 13 видов красных и 15 видов бурых водорослей. В бурых водорослях из порядков диктиотовые и фукусовые присутствует полярный липид, который по цветным реакциям и хроматографической подвижности в системах [12] не отличается от DGTS, но имеет заметно отличающееся значение  $R_f$  в других системах растворителей [16].

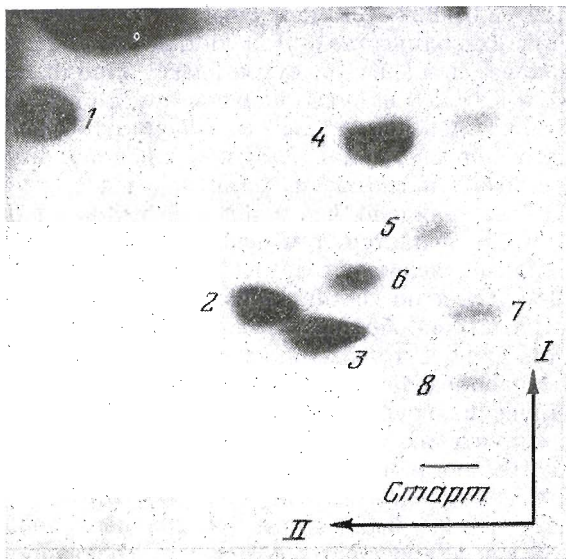
DGTS впервые обнаружен нами в водорослях-макрофитах. Ранее японские исследователи нашли в зеленой водоросли *Monostroma nitidum* N,N,N-триметилгомосерин [19], а также его простой эфир с глицерином, который назвали ульвалином [20].

Уже имеющиеся в литературе сведения о распространении DGTS в природе, его химические и физические свойства, активный метаболизм показывают, что необходимо исследование этого липида как компонента биомембран, а также его биологической активности. Зеленые водоросли-макрофиты широко распространены в различных морях мира, доступны в больших количествах во все периоды года. Поэтому они являются самым удобным объектом для препаративного выделения DGTS из описанных до сих пор.

### Экспериментальная часть

Водоросли были собраны в бухте Витязь (Японское море) в летний и осенний периоды 1983 г. Экстракцию липидов проводили модифицированным методом [21], как описано в работе [12]. Липиды разделяли двумерной хроматографией на микропластинках [12, 16]. Для обнаружения использовали неспецифический реагент (10% серую кислоту) с последующим нагреванием пластинки и специфические реагенты — реактив Драгендорфа [22], молибдатный реактив на фосфолипиды [14], модифицированный реактив на гликолипиды [13] (концентрация антрона была снижена до 0,2% и серой кислоты — до 5%), реагент на основе малахитового зеленого для обнаружения фосфорсодержащих веществ [15]. Содержание фосфора в липидах определяли методом [14].

Для препаративного выделения DGTS 1,2 г липидного экстракта, полученного из 100 г свежей ульвы, хроматографировали на колонке (18×2,5 см) с силикагелем. Нейтральные липиды вымывали хлороформом, основную часть гликолипидов — смесью хлороформ — ацетон (1:1) и чистым ацетоном. DGTS с примесью гликолипидов был вымыт смесью хлороформ — метанол (9:1). Дальнейшую очистку DGTS проводили препаративной ТСХ на пластинках со слоем силикагель — гипс в системе хлороформ — ацетон — метанол — HCOOH — вода (100:40:20:20:8), по-



Двумерная микротонкослойная хроматограмма липидов водоросли *Ulva fenestrata*. Системы растворителей: хлороформ – ацетон – метанол – НСООН – вода (100 : 40 : 20 : 20 : 8); ацетон – бензол – НСООН – вода (200 : 30 : 3 : 10). Обнаружение: 10% серная кислота в метаноле с последующим нагреванием. 1 – моногалактозилдиацилглицерин, 2 – дигалактозилдиацилглицерин, 3 – сульфохиновозилдиацилглицерин, 4 – DGTS, 5 – фосфатидилэтаноламин, 6 – фосфатидилглицерин, 7 – фосфатидилсерин, 8 – фосфатидилинозит

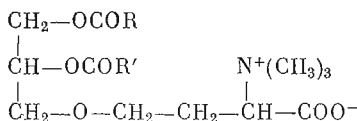
реакциях обоих липидов. Для более строгой идентификации липид из ульвы выделили в чистом виде колоночной и препаративной тонкослойной хроматографией и исследовали его физико-химические характеристики.

ИК-спектр липида имел следующие характерные полосы поглощения ( $\text{см}^{-1}$ ): 970 ( $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ), 1120 (C–O–C), 1632 ( $\text{COO}^-$ ), 1732 (C=O, эфир). Он не отличался от спектров, приведенных в литературе для DGTS из других объектов [2, 9, 11].

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектр полярного липида из ульвы имел следующие сигналы (м.д.): 0,89 (т,  $\text{CH}_3$  жирных кислот); 0,98 (т,  $\text{CH}_3$  жирных кислот  $\omega$ 3-ряда); 1,30 (м,  $\text{CH}_2$  жирных кислот); 1,62 (м,  $\text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—COO}$ ); 2,08 (м, аллильные протоны); 2,35 (м,  $\text{CH}_2\text{—COO}$ ); 2,82 (м,  $\text{CH}=\text{CH}\text{—CH}_2\text{CH}=\text{CH}$ ); 3,30 (с,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ); 3,67 (м, протоны скелета гомосерина); 4,12 и 4,32 (м,  $\text{CH}_2$  глицерина); 5,20 (м,  $\text{CH}$  глицерина); 5,36 (м,  $\text{CH}=\text{CH}$ ). Указанные сигналы не отличались существенно от приведенных в литературе для  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров DGTS, выделенного из других растений [5, 11].

В масс-спектре липида имеются пики молекулярных ионов с  $m/z$  757, 731; пики с  $m/z$  699 и 672, соответствующие фрагментам, возникающим при отщеплении триметиламина от исходных молекул, а также пики с  $m/z$  313, 117, 84 и 58, характерные для DGTS из зеленой микроводоросли [8] и папоротника [11].

Таким образом, полученные данные показывают, что обнаруженный нами в зеленой водоросли *U. fenestrata* неизвестный липид является диацилглицеро-4'-O-(N,N,N-триметил)гомосерином.



В составе жирных кислот DGTS из ульвы обнаружены следующие компоненты (в %): 18 : 4 $\omega$ 3—30,4; 16 : 0—26,6; 18 : 1—25,5; 18 : 3 $\omega$ 3—4,4;

22:5 $\omega$ 3—4,1; 16:1—2,0; 22:1—1,9; 18:2 $\omega$ 6 и 18:3 $\omega$ 6 — по 1,0, а также ряд других в меньших количествах. Для липида характерны те же кислоты, что были ранее найдены в суммарных липидных препаратах из ульвы [17], однако в DGTS заметно больше, чем в смеси липидов, кислот 16:0, 18:1 и 18:4 $\omega$ 3, меньше 18:2 $\omega$ 6 и особенно 18:3 $\omega$ 3. По сравнению с DGTS из других водорослей [1, 4, 7, 8] наш препарат имеет повышенное содержание олеиновой кислоты и заметно более высокое — кислоты 18:4 $\omega$ 3. Недавно было найдено, что в зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardi* DGTS является тем веществом, в котором происходит десатурация олеиновой кислоты до линолевой, а линолевой до  $\gamma$ -линоленовой (18:3 $\omega$ 6) [18]. Судя по составу жирных кислот DGTS из ульвы, он может быть субстратом для образования кислоты 18:4 $\omega$ 3.

С помощью микро-ТСХ в нескольких системах растворителей [12, 16] было исследовано распределение DGTS в водорослях-макрофитах из различных систематических групп. Липид был обнаружен во всех проанализированных представителях зеленых водорослей, однако его количество было существенно различным у водорослей двух классов этого отдела. Во всех улотриковых водорослях — *Ulva fenestrata*, *Enteromorpha linza*, *Monostroma grevillei* — DGTS был одним из главных полярных липидов. В представителях класса сифоновых водорослей содержание липида менялось в широких пределах: несколько меньше, чем в ульве, в *Chaetomorpha moniligera*, *Cladophora stimpsoni*; заметно ниже в *Codium fragile* и следы в *Bryopsis plumosa*. DGTS не был обнаружен ни в одном из 13 видов красных и 15 видов бурых водорослей. В бурых водорослях из порядков диктиотовые и фукусовые присутствует полярный липид, который по цветным реакциям и хроматографической подвижности в системах [12] не отличается от DGTS, но имеет заметно отличающееся значение  $R_f$  в других системах растворителей [16].

DGTS впервые обнаружен нами в водорослях-макрофитах. Ранее японские исследователи нашли в зеленой водоросли *Monostroma nitidum* N,N,N-триметилгомосерин [19], а также его простой эфир с глицерином, который назвали ульвалином [20].

Уже имеющиеся в литературе сведения о распространении DGTS в природе, его химические и физические свойства, активный метаболизм показывают, что необходимо исследование этого липида как компонента биомембран, а также его биологической активности. Зеленые водоросли-макрофиты широко распространены в различных морях мира, доступны в больших количествах во все периоды года. Поэтому они являются самым удобным объектом для препаративного выделения DGTS из описанных до сих пор.

### Экспериментальная часть

Водоросли были собраны в бухте Витязь (Японское море) в летний и осенний периоды 1983 г. Экстракцию липидов проводили модифицированным методом [21], как описано в работе [12]. Липиды разделяли двумерной хроматографией на микропластинках [12, 16]. Для обнаружения использовали неспецифический реагент (10% серную кислоту) с последующим нагреванием пластинки и специфические реагенты — реактив Драгендорфа [22], молибдатный реактив на фосфолипиды [14], модифицированный реактив на гликолипиды [13] (концентрация антрона была снижена до 0,2% и серой кислоты — до 5%), реагент на основе малахитового зеленого для обнаружения фосфорсодержащих веществ [15]. Содержание фосфора в липидах определяли методом [14].

Для препаративного выделения DGTS 1,2 г липидного экстракта, полученного из 100 г свежей ульвы, хроматографировали на колонке (18×2,5 см) с силикагелем. Нейтральные липиды вымывали хлороформом, основную часть гликолипидов — смесью хлороформ — ацетон (1:1) и чистым ацетоном. DGTS с примесью гликолипидов был вымыт смесью хлороформ — метанол (9:1). Дальнейшую очистку DGTS проводили препаративной ТСХ на пластинках со слоем силикагель — гипс в системе хлороформ — ацетон — метанол — HCOOH — вода (100:40:20:20:8), по-

лучили 130 мг хроматографически чистого липида. DGTS из *D. salina* выделяли одномерной ТСХ последовательным разделением в каждой из систем [12].

Омыление липидов проводили 0,2 н. метилатом натрия в метаноле в течение 30 мин при 40° С. Метилловые эфиры жирных кислот хроматографировали в системе гексан — диэтиловый эфир —  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (85 : 15 : 1).

Для анализа продуктов термического разложения липида упаренную досуха в пробирке порцию его раствора нагревали до 200° С. В верхнюю часть пробирки помещали смоченную дистиллированной водой полоску индикаторной бумаги.

Перед инкубацией с [ $^{14}\text{C}$ ]глицерином или [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]олеиновой кислотой слоевица ульвы промывали морской водой, профильтрованной через мембранный фильтр (0,4 мкм). Инкубацию вели в такой же воде (10 мл на 1 г водоросли) 4 ч при комнатной температуре. Меченую олеиновую кислоту вводили в инкубационную смесь в виде раствора натриевой соли. Меченый DGTS выделяли из липидных экстрактов двумерной ТСХ в системах [12]. Определение радиоактивности проводили на спектрометре SL-30 (Intertechnique, Франция) в сцинтилляционном составе [23].

ИК-спектр DGTS снят в хлороформе на спектрофотометре Specord 751R (С. Zeiss, ГДР); спектр ПМР — в дейтерохлороформе на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) (внутренний стандарт — тетраметилсилан).

Масс-спектр получен на приборе LKB 9000 (Швеция) с прямым вводом пробы в ионный источник при температуре 150° С и ионизирующем напряжении 7 эВ.

Метилловые эфиры получали метанолизом липида с 1% метилатом натрия в метаноле в течение 30 мин при 55° С [24] и очищали ТСХ на силикагеле в системе гексан — диэтиловый эфир (95 : 5). Жирные кислоты анализировали на хроматографе Shimadzu GC-5A (Япония) с пламенно-ионизационным детектором. Использовали стеклянные колонки (500×0,3 см) с 3% Carbowax 20M на хроматоне. Температура 210° С, скорость гелия 40 мл/мин. Метилловые эфиры идентифицировали с использованием заведомых образцов и по значениям углеродных чисел [25]. Процентное содержание кислот в смесях рассчитывали по методу [26].

Авторы выражают благодарность Н. Г. Ключковой за определение морских водорослей, Н. А. Лэйздайчер за предоставление биомассы микроводоросли *Dunaliella salina*, С. М. Калинову и В. В. Исакову за помощь в снятии спектров ИК и ЯМР соответственно, Ю. Н. Елькину за регистрацию масс-спектров и помощь в их расшифровке.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Brown A. E., Elovson J. Biochemistry, 1974, v. 13, № 17, p. 3476—3482.
2. Eichenberger W., Boschetti A. FEBS Lett., 1978, v. 88, № 2, p. 201—204.
3. Moseley K. R., Thompson G. A. Plant Physiol., 1980, v. 65, № 2, p. 260—265.
4. Evans R. W., Kates M., Ginzburg M., Ginzburg B.-Z. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 712, № 1, p. 186—196.
5. Evans R. W., Kates M., Wood G. W. Chem. and Phys. Lipids, 1982, v. 31, № 4, p. 331—338.
6. Eichenberger W. Plant Sci. Lett., 1982, v. 24, № 1, p. 91—95.
7. Janero D. R., Barnett R. Phytochemistry, 1982, v. 21, № 1, p. 47—50.
8. Janero D. R., Barnett R. J. Lipid Res., 1982, v. 23, № 2, p. 307—316.
9. Fried A., Tietz A., Ben-Amotz A., Eichenberger W. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 713, № 2, p. 419—426.
10. Yamada T., Nozawa Y. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 574, № 3, p. 433—439.
11. Sato N., Furuya M. Plant and Cell Physiol., 1983, v. 24, № 6, p. 1113—1120.
12. Vaskovsky V. E., Khotimchenko S. V. J. High Resol. Chrom., 1982, v. 5, № 11, p. 635—636.
13. Van Gent C. M., Roseleur O. J., van der Bijl P. J. Chromatogr., 1973, v. 85, № 1, p. 174—176.
14. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. J. Chromatogr., 1975, v. 114, № 1, p. 129—141.
15. Vaskovsky V. E., Latyshev N. A. J. Chromatogr., 1975, v. 115, № 1, p. 246—249.
16. Vaskovsky V. E., Terekhova T. A. J. High Resol. Chrom., 1979, v. 2, № 11, p. 671—672.
17. Хотимченко С. В., Светашев В. И. Биол. моря, 1983, № 5, с. 45—50.

18. Schlapfer P., Eichenberger W. Plant Sci. Lett., 1983, v. 32, № 1-2, p. 243-252.
19. Abe S., Kaneda T. Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 1974, v. 40, № 11, p. 1199.
20. Abe S., Kaneda T. Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 1975, v. 41, № 5, p. 557-571.
21. Bligh E. G., Dyer W. J. Can. J. Biochem. and Physiol., 1959, v. 37, № 8, p. 911-917.
22. Wagner H., Horhammer L., Wolff P. Biochem. Z., 1961, B. 334, № 2, S. 175-184.
23. Pyrovolakis J. A., Harry D. S., Martin M. J., McIntyre N. Clin. chim. acta, 1974, v. 50, № 3, p. 441-444.
24. Carreau J. P., Dubacq J. P. J. Chromatogr., 1978, v. 151, № 3, p. 384-390.
25. Jamieson G. R. J. Chromatogr. Sci., 1975, v. 13, № 10, p. 491-497.
26. Carroll K. K. Nature, 1961, v. 191, № 4786, p. 377-378.

Поступила в редакцию  
22.VI.1984

## DIACYLGLYCERO-4'-O-(N,N,N-TRIMETHYL) HOMOSERINE IN MACROPHYTIC GREEN ALGAE

KHOTIMCHENKO S. V., VYSOTSKY M. V., SVETASHEV V. I., VASKOVSKY V. E.

*Institute of Marine Biology, Far East Science Center, Academy  
of Sciences of the USSR, Vladivostok*

A polar lipid from marine green alga *Ulva fenestrata* was identified by TLC, chemical and spectral analyses as diacylglycero-4'-O-(N,N,N-trimethyl)homoserine. The lipid was detected by micro-TLC in each of 7 species of green algae and in none of 13 species of red or 15 species of brown algae investigated.