



УДК 593.94+547.953+661.732.9

ЛИПИДЫ МОРСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ ИЗ *OPHIURA SARSI*

Дембицкий В. М.

Кафедра химии Челябинского государственного университета

Исследован состав фосфолипидов из *Ophiura sarsi*. Показано, что основными классами являются фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин. Выделен фосфатидилэтаноламин и установлено, что он представляет собой смесь (99,5%) *цис*-1-О-алк-1-енил- и (0,5%) 1-О-алкил-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламинов. Изучен состав жирных кислот, жирных альдегидов и 1-О-алкиловых эфиров глицерина, входящих в состав фосфатидилэтаноламина.

При исследовании 1-О-алк-1-енилфосфатидов в морских беспозвоночных [1] было найдено, что нингидрин-положительный фосфолипид из офиуры практически полностью является плазмалогенным, что ранее не было известно для морских беспозвоночных. Этот липид был выбран для детального изучения.

В работе широко использовалась техника микро-ТСХ [2].

Количественный анализ фосфолипидов общего липидного экстракта показал, что основными фосфолипидами являются фосфатидилхолин, который содержал 10% *цис*-1-О-алк-1-енильной формы, фосфатидилэтаноламин (99,5% *цис*-1-О-алк-1-енильной формы) и фосфатидилсерин (диацильный). Количество остальных фосфолипидов составило около 4% (см. табл. 1).

Липид, выбранный для детального исследования, был выделен из общего липидного экстракта хроматографией на силикагеле. При мягком щелочном гидролизе липид полностью переходил в лизопроизводное, которое по хроматографическому поведению было близко к лизофосфатидилэтаноламину. Липид и его дезацилированное производное окрашивалось реактивом на неорганический фосфор [3] и нингидрином.

ИК-спектроскопией показано, что выделенный фосфолипид имел характерный для липида с *цис*-1-О-алк-1-енильной связью спектр [4, 5]: 2960, 2930, 2865, 1470, 1380 (CH_3 , CH_2); 1737 ($\text{C}=\text{O}$); 3030, 1665 ($\text{O}-\text{CH}=\text{CH}$); 1620 (NH); 1227 ($\text{P}=\text{O}$); 1120 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$); 1080 ($\text{P}-\text{O}-\text{C}$); 1025 cm^{-1} ($\text{P}-\text{OH}$). В спектре продукта омыления были следующие полосы поглощения, характерные для лизофосфатида [6]: 3360 (OH); 2965, 2937, 2868, 1472, 1380 (CH_3 , CH_2); 3030, 1665 ($\text{O}-\text{CH}=\text{CH}$); 1628 (NH); 1230 ($\text{P}=\text{O}$); 1120 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$); 1083 ($\text{P}-\text{O}-\text{C}$); 1028 cm^{-1} ($\text{P}-\text{OH}$). В ИК-спектре омыленного липида отсутствовали частоты сложноэфирной группы (1737 cm^{-1}), но имелась четко выраженная полоса гидроксила (3360 cm^{-1}). Отсутствие полосы поглощения при 930 cm^{-1} указывало на то, что двойная связь ($\text{O}-\text{CH}=\text{CH}$) в липиде имеет *цис*-конфигурацию.

В спектрах ПМР сигнал протона при двойной связи ($\text{O}-\text{CH}=\text{CH}$) наблюдался при δ 5,9 м.д. (дублет), что характерно для *цис*-конфигурации (7,8). Сигналы протонов группы CH_2 глицерина проявлялись при δ 3,78—3,88 м.д., сигналы CH_2 - и CH_3 -групп длинноцепных остатков — соответственно при δ 1,3 и 0,9 м.д.; кроме того, присутствовали сигналы протонов других функциональных групп, входящих в молекулу фосфатидилэтаноламина: CH_2NH_2 (δ 3,3 м.д.), CH_2OR (δ 4,0 м.д.).

Фосфолипид содержит 2,9% фосфора. Молярное соотношение фосфор — азот — сложноеэфирные связи составляло 1,00 : 1,09 : 0,96. После восстановления липида алюмогидридом лития по методу [9] в смеси были найдены жирные спирты, моно-*цис*-1-О-алк-1-ениловые и моно-О-алкиловые эфиры глицерина, этаноламинофосфат. При кислотном гидролизе моно-*цис*-1-О-алк-1-енилглицеридов были получены жирные альдегиды и глицерин. Моно-О-алкиловые эфиры глицерина образовывали изопропилиденновые производные, так же как стандартные образцы химилового, батилового и селахилового спиртов, т. е. они представляли собой α -алкиловые эфиры глицерина. Анализ фосфолипида с помощью реакционной микро-ТСХ [10, 11] показал, что количество *цис*-1-О-алк-1-енильной формы составило $99,5 \pm 0,4\%$.

Количество 1-О-алкильной формы, определенное по содержанию фосфора после омыления сложноеэфирных связей и гидролиза винильных связей, а также спектрофотометрически после периодатного окисления [12], равнялось $0,5 \pm 0,2\%$ от суммы всех форм. Резюмируя вышеизложенное, можно сделать вывод, что этот липид является фосфатидилэтаноламином, в котором вместо сложноеэфирной связи в первом положении глицеринового остатка находится простая эфирная связь.

Липиды с О-алк-1-енильной связью (плазмалогены) широко распространены в природе. Хотя об их функциях известно сравнительно мало, они весьма важны для организма, так как содержание плазмалогенов в таких тканях, как мозг или сердечная мышца млекопитающих, достигает половины всех форм отдельных фосфолипидов, они входят в состав и других тканей, но в меньших количествах [13]; эти липиды найдены почти во всех живых организмах [14]. Известно, что миелин нервной ткани мозга человека может содержать более 90% плазмалогенов в фосфатидилэтаноламинах [15]. У других млекопитающих (бык, кролик, свинья) содержание плазмалогенов в фосфатидилэтаноламинах может достигать 84% в белом веществе мозга [16], 88% в седалищном нерве [17] и 90% в спинном мозге [18] соответственно. О-Алкиловые эфиры в отличие от плазмалогенов содержатся в живых организмах в меньших количествах — от долей процента до нескольких процентов [14].

Липиды морских организмов давно известны как богатый источник плазмалогенов [19, 20]. Содержание плазмалогенов в фосфатидилэтаноламинах у многих превышает 50%, а в морских звездах достигает 90% и выше [1, 21]. В морских звездах также найдены дюльные О-алкиловые и О-алк-1-ениловые липиды [22, 23]. Ранее нами было показано, что некоторые морские беспозвоночные содержат в составе фосфатидилэтаноламина только простые эфирные связи. Так, в морской губке *Halichondria panicea* был найден фосфатидилэтаноламин, в котором количество *цис*-1-О-алк-1-енильных связей составило 16,7%, а 1-О-алкильных — 83,3% [24].

При исследовании жирных кислот общего липидного экстракта и фосфатидилэтаноламинов с помощью ГЖХ было установлено, что в их состав входят кислоты с временами удерживания, несколько большими, чем для кислоты C_{22} : 6. С помощью хромато-масс-спектрометрии было найдено, что липиды офиуры и фосфатидилэтаноламина содержат небольшое количество жирных кислот C_{24} и C_{26} . Состав жирных кислот, жирных альдегидов и 1-О-алкиловых эфиров выделенного фосфатидилэтаноламина приведен в табл. 2. В последнее время было показано, что некоторые морские беспозвоночные, например звезда [25] и краб [26], содержат в своем липидном

Таблица 1

Фосфолипидный состав общего липидного экстракта из *Ophüra sarsi*

Классы фосфолипидов	Содержание в общих фосфолипидах, молярные %
<i>чис</i> -1-О-Алк-1-енил-2-ацил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфоэтаноламин	33,2±0,4
1-О-Алкил-2-ацил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфоэтаноламин	0,2±0,1
<i>чис</i> -1-О-Алк-1-енил-2-ацил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин	5,5±0,3
1,2-Диацил-+1-О-алкил-2-ацил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин	49,8±0,6
Фосфатидилсерин	7,2±0,6
Фосфатидилинозит	1,4±0,2
Фосфатидная кислота	0,9±0,1
Лизофосфатидилэтаноламин	0,6±0,1
Лизофосфатидилхолин	1,2±0,4

Примечание. При количественном определении фосфора среднее значение вычисляли из 4 параллельных опытов.

Таблица 2

Состав жирных кислот, жирных альдегидов и 1-О-алкиловых эфиров фосфатидилэтанолamina

Число углеродных атомов и двойных связей в цепи	Жирные кислоты, %		1-О-Алкиловые эфиры в фосфатидилэтаноламине, %	Жирные альдегиды в фосфатидилэтаноламине, %
	з экстракте	в фосфатидилэтаноламине		
12:0	Следы	1,9	—	0,8
14:0	9,3	4,0	2,4	4,6
14:1	2,1	0,1	1,1	8,2
16:0	22,9	19,9	50,0	6,4
16:1	9,8	18,0	3,1	10,6
16:2	4,5	Следы	—	—
18:0	5,5	9,8	23,4	2,1
18:1	11,7	17,4	4,4	7,8
18:2	0,1	3,9	0,1	2,4
20:0	0,1	1,4	7,2	1,4
20:1	7,4	1,4	2,4	17,0
20:2	—	0,6	0,6	6,7
20:3	—	—	—	0,7
20:4ω6	2,7	6,0	—	—
20:5ω3	19,6	4,5	—	—
22:0	0,1	0,4	1,4	3,5
22:1	0,1	0,6	3,2	16,0
22:2	—	—	0,7	6,0
22:4ω6	0,2	0,4	—	—
22:5ω3	0,3	0,6	—	—
22:6ω3	3,5	0,9	—	—
24:0	—	0,4	Следы	2,4
24:1	—	1,2	»	3,4
26:0	0,1	2,6	—	—
26:1	0,2	3,4	—	—
26:2	—	0,9	—	—
Насыщенные	38,0	40,4	84,4	21,2
Моноены	31,3	42,1	14,2	63,0
Диены	4,6	5,4	1,4	15,1
Полиены	26,3	12,8	—	0,7

составе такие же кислоты; самое большое количество этих кислот найдено в липидах морских губок [24, 27].

Результаты исследования фосфолипидов офиуры показывают, что изученный фосфатидилэтаноламин имеет самое большое содержание плазмалогенной формы, найденное в фосфолипидах морских беспозвоночных.

Экспериментальная часть

Офиуры были собраны в заливе Посыет Японского моря. После размельчения тканей липиды экстрагировали по методу Блая и Даера [28]. Количество фосфолипидов в экстракте определяли по методике Васьковского и сотр. [29]. Фосфатидилэтаноламин выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле марки L 40—100 ммк (Chemapol, ЧССР), липид элюировали системой хлороформ—метанол, 8:2. Дополнительную очистку проводили препаративной ТСХ на пластинках 20×20 см с силикагелем марки L 5—40 ммк в системе хлороформ—метанол—28% аммиак (65:35:5). Кислотный гидролиз осуществляли в запаянных ампулах с 2 н. соляной кислотой в метаноле 2 ч при 120°С. Омыление проводили по методу Доусона [30]. Этаноламин определяли в виде динитрофенильных производных [31]. Сложноэфирные связи определяли методом Ренкопена [32].

ИК-спектры снимали на спектрофотометре UR-20 (Zeiss, ГДР) в CCl_4 . Спектры ПМР были получены на приборе марки XL-100 (Varian, США) в CDCl_3 при рабочей частоте 100 МГц, в качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан.

Для ГЖХ жирные кислоты переводили в метиловые эфиры по методу [33], жирные альдегиды — в диметилацетали [34], 1-О-алкиловые эфиры глицерина — в изопропилиденовые производные [35]. Анализ проводили на хроматографах: Pye-104 (модель 24) (Англия) и GC-5A (Shimadzu, Япония) с пламенно-ионизационными детекторами и цифровым интегратором ITG-4A. Использовали стеклянные колонки с 15% диэтиленилглюкольсукцинатом на хромосорбе W-AW(DMCS), а также с 15% EGSS-X на газхром Р. Газ-носитель — гелий (70 мл/мин). Температура при ГЖХ: 180—190°С для диметилацеталей и метиловых эфиров, 195—205°С для изопропилиденовых производных.

Для идентификации метиловых эфиров, диметилацеталей и изопропилиденовых производных использовали стандарты жирных кислот C_{12} — $\text{C}_{26:0}$ и жирных альдегидов C_{11} — $\text{C}_{22:0}$, а также химилловый, батилловый и селакхилловый спирты соответственно.

Метиловые эфиры жирных кислот были идентифицированы комбинационной хромато-масс-спектрометрией на приборе LKB 9000S (Швеция).

Автор выражает благодарность И. И. Гроссману за помощь, оказанную при идентификации жирных кислот; С. М. Гейндреху, любезно предоставившему возможность получить спектры ПМР выделенных липидов и высказавшему критические замечания при работе над статьей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дембицкий В. М. (1979) Биология моря, 5, 97—101.
2. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. (1972) J. Chromatogr., 67, 376—378.
3. Vaskovsky V. E., Latyshev N. A. (1975) J. Chromatogr., 115, 246—249.
4. Warner H. R., Lands W. E. M. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 60—64.
5. Wood R., Snyder F. (1968) Lipids, 3, 129—135.
6. Frosolono M. F., Kiscic A., Rapport M. M. (1967) J. Org. Chem., 32, 3998—4000.
7. Васьковский В. Е., Серсобреникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1975) Биоорг. химия, 1, 1307—1311.
8. Hopkins C. Y. (1965) in: Progress in Chemistry of Fats and other Lipids (Holman R. T., ed.), pp. 213—257, Pergamon Press, London.
9. Thompson G. A., Jr., Lee P. (1965) Biochim. et biophys. acta, 98, 151—159.
10. Дембицкий В. М. (1975) в сб.: Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека, с. 40. Л.
11. Vaskovsky V. E., Dembitsky V. M. (1975) J. Chromatogr., 115, 645—647.
12. Karnovsky M. L., Brumm A. F. (1955) J. Biol. Chem., 216, 689—701.
13. Horrocks L. A. (1972) in: Ether Lipids: Chemistry and Biology, (Snyder F., ed.), pp. 177—272, Acad. Press, N. Y.—London.
14. Snyder F. (ed.) (1972) Ether Lipids: Chemistry and Biology, Acad. Press, N. Y.—London.
15. O'Brain J. S., Sampson E. L. (1965) J. Lipid Res., 6, 537—544.

16. Norton W. T., Autilio L. A. (1966) J. Neurochem., **13**, 243-246.
17. Gueuning C., Graff G. L. A. (1967) C. r. Soc. biol., **161**, 965-969.
18. Viswanathan C. V., Basilio M., Hoevet S. P., Lundberg W. O. (1968) J. Chromatogr., **34**, 241-245.
19. Rapport M. M., Alonzo N. (1955) J. Biol. Chem., **217**, 193-199.
20. Rapport M. M., Norton W. T. (1962) Ann. Rev. Biochem., **31**, 103-137.
21. Дембицкий В. М., Васьковский В. Е. (1976) Биология моря, **5**, 68-72.
22. Вавер В. А., Писарева Н. А., Бергельсон Л. Д. (1970) Химия природн. соедин., **6**, 657-664.
23. Vaver V. A., Pisareva N. A., Rozynov B. V., Ushakov A. N., Bergelson L. D. (1971) Chem. Phys. Lipids, **7**, 75-92.
24. Дембицкий В. М., Светашев В. И., Васьковский В. Е. (1977) Биоорг. химия, **3**, 930-933.
25. Ferguson J. C. (1976) Compar. Biochem. and Physiol., **54B**, 249-252.
26. Van der Horst D. J., Oudejans R. C. H. M., Plug A. G., Van der Sluis I. (1973) Marine Biol., **20**, 291-296.
27. Litchfield C., Greenberg A. J., Noto G., Morales R. W. (1976) Lipids, **11**, 567-570.
28. Bligh E. G., Dyer W. J. (1959) Can. J. Biochem. and Physiol., **37**, 911-917.
29. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. (1975) J. Chromatogr., **114**, 129-141.
30. Dawson R. M. C. (1967) in: Lipid Chromatographic Analysis (Marinetti G. V., ed.), part 4, pp. 163-189, M. Dekker Inc., N. Y.
31. Axelrod J., Reichenthal J., Brodie B. B. (1953) J. Biol. Chem., **204**, 903-909.
32. Renkonen O. (1961) Biochim. et biophys. acta, **56**, 367-372.
33. Christie W. W. (1973) Lipid Analysis, pp. 87-89, Pergamon Press, Oxford — N. Y.
34. Farquhar J. W. (1962) J. Lipid Res., **3**, 21-30.
35. Schmid H. H. O., Mangold H. K. (1966) Biochem. Z., **346**, 13-17.

Поступила в редакцию
21.V.1979

После доработки
30.VIII.1979

LIPIDS OF MARINE ORIGIN. A STUDY IN *OPHIURA SARSI* PHOSPHOLIPIDS

DEMBITSKY V. M.

Chemistry Department, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk

The phospholipid composition of *Ophiura sarsi* was studied. The main components were found to be phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine. Isolated phosphatidylethanolamine is a mixture of 99.5% *cis*-1-O-alk-1-enyl- and 0.5% 1-O-alkyl-2-acyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamines. The composition of fatty acids, fatty aldehydes and glycerol ethers in phosphatidylethanolamine was analyzed.