



УДК 593.43.05+547.95.02

ЛИПИДЫ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ

1. ИДЕНТИФИКАЦИЯ СФИНГОМИЕЛИНА, СОДЕРЖАЩЕГО ОКСИКИСЛОТЫ,
В МОРСКОЙ ЗВЕЗДЕ *DISTOLASTERIAS NIPON**Костецкий Э. Я., Герасименко Н. И., Науменко Н. В.**Дальневосточный государственный университет, Владивосток**Васьковский В. Е.**Институт биологии моря ДВНЦ Академии наук СССР, Владивосток*

Показано, что драгендорф-положительный пеомыляемый фосфолипид из морской звезды, при ТСХ на силикагеле располагающийся между обычным сфингомиелином и лизофосфатидилхолином, является сфингомиелином, в состав которого входят сфингозин, дигидросфингозин, насыщенные (C_{15} – C_{27}) и моноеновые (C_{14} – C_{27}) α -оксикислоты (86% от общих кислот), впервые обнаруженные в сфингомиелине морских беспозвоночных. Главные из них $C_{16:0}$ (32,7%), $C_{15:0}$ (9,7%), $C_{24:1}$ (16,5%) и $C_{23:1}$ (12,0%). Содержание такого липида достигает 90% от общего содержания сфингомиелина.

В ходе исследования состава фосфолипидов морских беспозвоночных [1–5] мы обнаружили в некоторых из них неомыляемое соединение, близкое по хроматографическому поведению сфингомиелину, но отличающееся от него по подвижности при ТСХ. В настоящей работе показано, что этот липид является сфингомиелином, в состав которого входят оксикислоты.

В качестве источника для препаративного выделения необычного липида была выбрана морская звезда *Distolasterias nipon*. На хроматограммах ее липидного экстракта в зоне сфингомиелина – лизофосфатидилхолина обнаруживаются три пятна (рис. 1). Два крайних не отличаются по поведению от сфингомиелина из мозга быка и лизофосфатидилхолина, полученного из яичного фосфатидилхолина, а третье (X) занимает промежуточное положение. Все три пятна обнаруживаются реактивом на фосфолипиды [6] и реактивом Драгендорфа [7]. В летний период *D. nipon* содержит до 4,8% необычного липида (от суммы фосфолипидов), а в зимний – около 3%. Количество сфингомиелина составляет при этом 0,5%.

Липид был выделен с помощью колоночной хроматографии на силикагеле и окиси алюминия. В продуктах кислотного гидролиза были обнаружены сфингозин и дигидросфингозин, холин, нормальные и оксигирные кислоты (рис. 2).

Спектр ^{13}C -ЯМР липида подтвердил его сфингозиновую природу. Присутствуют сигналы 14,10 (CH_3), 22,7 (CH_2CH_3), 25,6 (CH_2CH_2CO), 27,3 ($CH_2CH=CH$), 29,9 (CH_2), 32,0 ($CH_2CH_2CH_3$), 35,3 (CH_2CO), 54,3 ($N(CH_3)_3$), 65,9 (CH_2N), 72,0 ($CHON$), 129–133 ($CH=CH$) и 175,8 м.д. ($C=O$), характерные для сфингомиелина [8]. В то же время при соп-

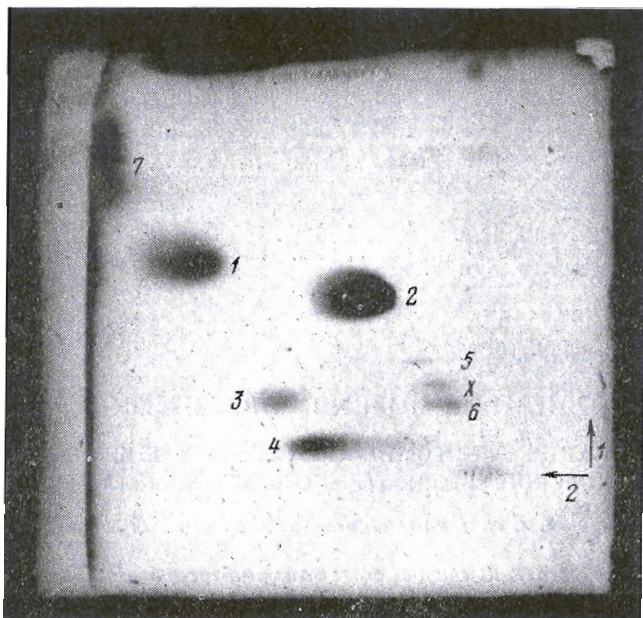


Рис. 1. Микро-ТСХ общего липидного экстракта *D. nipon*. Система: хлороформ – метанол – 25% аммиак (65 : 25 : 5) – первое направление, хлороформ – ацетон – метанол – уксусная кислота – вода (3 : 4 : 1 : 1 : 0,5) – второе направление. Обнаружение 10% H_2SO_4 в метаноле с обугливанием при $180^\circ C$. 1 – фосфатидилэтаноламин, 2 – фосфатидилхолин, 3 – фосфоинозитид, 4 – фосфатидилсерин, 5 – сфингомиелин, X – драгендорф-положительный неомыляемый фосфолипид, 6 – лизофосфатидилхолин, 7 – цереброзиды

ставлении ИК-спектра этого липида со спектром сфингомиелина из мозга [9, 10] наблюдаются различия в области $1560-1530$ (деформационные колебания CNH – Амид II) и $3200-3500\text{ см}^{-1}$ (валентные колебания NH и OH). В спектре липида отсутствует сигнал в области 1560 , но есть пик в области 1530 см^{-1} , а сигнал в области $3200-3500\text{ см}^{-1}$ значительно интенсивнее, чем в ИК-спектре сфингомиелина.

Спектр 1H -ЯМР неизвестного липида отличается от спектра сфингомиелина [11] в области двойных связей и в области 4 м.д. (CH_2OR , CH_2N^+). В спектре сфингомиелина группа CH_2OR имеет сигнал 4,17 м.д., а CH_2N^+ – 3,97 м.д., тогда как в спектре нового липида обе группы имеют один суммарный сигнал при 4 м.д. По-видимому, это место спектра перекрывается сигналом протонов OH -группы. Сигнал при 5,92 м.д. (триплетный) можно отнести к метиленовым протонам, находящимся в α -положении к OH -группе. Это позволяет предположить, что в данном липиде по сравнению со сфингомиелином мозга присутствует дополнительная оксигруппа.

Анализ жирнокислотного состава липида, проведенный с помощью ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии, показал (таблица), что в нем действительно присутствуют оксикислоты.

Таким образом, исследованный нами фосфолипид из морской звезды *D. nipon* оказался сфингомиелином, в состав которого входят преимущественно насыщенные ($C_{15}-C_{27}$) и моноеновые ($C_{14}-C_{27}$) оксикислоты (до 86% от суммы кислот), а также нормальные насыщенные ($C_{14}-C_{25}$) и моноеновые ($C_{15}-C_{25}$) кислоты. Главными среди оксикислот, как и среди нормальных, оказались кислоты $C_{16:0}$, $C_{15:0}$, $C_{24:1}$, $C_{23:1}$ и $C_{22:1}$.

Хроматографическое поведение этого липида, вероятно, обусловлено присутствием оксикислот и нормальных кислот с короткой цепью. Известно, что на хроматографическую подвижность сфингомиелина может

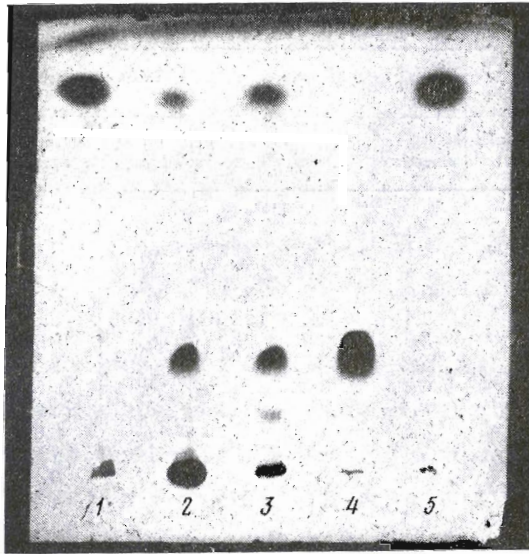


Рис. 2. Микро-ТСХ метиловых эфиров жирных кислот. Система: гексан — эфир (9 : 1). Обнаружение: 10% H_2SO_4 в метаноле с обугливанием при $180^\circ C$. 1 — сфингомиелин мозга быка, 2 — исследуемый липид из *D. piron*, 3 — цереброзиды из зоны френозина *D. piron*, 4 — метиловый эфир 2-оксистеариновой кислоты, 5 — метиловый эфир стеариновой кислоты

влиять длина жирнокислотных цепей [12], а также структура сфингозиновых оснований [13]. Так, Карлсон [13] наблюдал разделение сфингомиелина из плазмы человека на два компонента, различающихся составом сфингозинов (сфингозин C_{18} и дигидросфингозин C_{18}), а Минари с сотр. [12] — разделение выделенных из плазмы и эритроцитов человека и печени крысы сфингомиелинов на компоненты, различающиеся длиной цепей жирных кислот ($C_{24:0} + C_{24:1}$ и $C_{16:0}$).

Набор жирных кислот, подобный обнаруженному нами, не был ранее известен для сфингомиелинов морских беспозвоночных. Так, в сфингомиелине устриц [14] основные жирные кислоты — $C_{16:0}$, $C_{17:0}$ и $C_{18:0}$. Большое количество маргариновой кислоты (35%), по мнению авторов, характерно для этого липида.

Основные жирные кислоты, входящие в состав сфингомиелина большинства органов и тканей позвоночных [15–17], — насыщенные ($C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{24:0}$) и моноеновые ($C_{22:1}$). Встречаются кислоты C_{20} – C_{26} . Имеются данные о присутствии небольшого количества оксикислот в сычуге (четвертый отдел желудка жвачного) и коровьем молоке (менее 1% от общих) [18–20].

Сравнение жирнокислотного состава сфингомиелина с цереброзидами этой же звезды показало их значительное сходство, в том числе и по главным жирным кислотам (таблица). На такое же сходство указывали и другие авторы при исследовании молока и сычуга коровы [18–20]. Состав оксикислот цереброзидов других видов звезд [21] оказался близким к составу оксикислот необычного сфингомиелина и цереброзида *D. piron*. Известно, что в биосинтезе сфингомиелина и цереброзидов керамид является общим предшественником [22]. Наши данные еще раз подтверждают это.

Ранее было показано, что морские звезды отличаются от других животных высоким содержанием плазмалогенов [23], а также необычным составом сфингозиновых оснований цереброзидов, в которых широко представлены моноеновые и диеновые сфингозины C_{18} – C_{22} [24], насыщенные фитосфингозины C_{16} – C_{19} с нормальной и разветвленной углеродной цепью

Состав жирных кислот (%) цереброзидов и неизвестного липида из морской звезды
D. piper

Кис- лота	Неизвестный ли- пид		Цереброзиды *		Кис- лота	Неизвестный ли- пид		Цереброзиды *	
	нор- мальные	оксикис- лоты	нор- мальные	оксикис- лоты		нор- мальные	оксикис- лоты	нор- мальные	оксикис- лоты
14 : 1		Следы	1,1		21 : 1	Следы	1,0	Следы	Следы
14 : 0	2,7	»	6,4		21 : 0	1,1	1,1	»	1,1
15 : 1	0,9	»	0,9		22 : 1	6,2	7,0	1,4	4,9
15 : 0	6,5	9,7	2,6	4,4	22 : 0	0,9	2,8	0,5	3,7
16 : 1	3,7	Следы	3,3	Следы	23 : 1	6,8	12,0	Следы	7,8
16 : 0	26,1	32,7	24,4	33,8	23 : 0	Следы	2,1	0	0,8
17 : 1	0,7	0,5	Следы	Следы	24 : 1	5,0	16,5	1,3	19,9
17 : 0	3,7	2,7	3,4	4,3	24 : 0	0,8	0	Следы	1,6
18 : 1	5,8	Следы	7,8	—	25 : 1	2,3	3,6	0	2,8
18 : 0	9,9	1,7	25,4	9,0	25 : 0	1,3	Следы	0	
19 : 1	3,9	Следы	1,6	—	26 : 1		0,4		
19 : 0	1,1	1,6	2,0	2,4	26 : 0		1,1		
20 : 1	6,6	0,8	16,2	—	27 : 1		Следы		
20 : 0	1,6	1,7	0,7	3,4	27 : 0		0,9		
							% от об- щих 86,0		% от об- щих 45,0

* Фракция цереброзидов звезды из зоны френозина.

[24]. В морских звездах, как и в других представителях иглокожих, обнаружены гашлиозиды [25].

Необычность фосфо- и гликофинголипидов морских звезд делает их интересной моделью для выяснения функциональной роли подобных соединений в живых системах.

Экспериментальная часть

Животные были собраны в заливе Посьета Японского моря. Липиды экстрагировали по методу Фольча с сотр. [26]. Микро-ТСХ липидов проводили на силикагеле КСК по методу [27] в системах: хлороформ — метанол — 25% аммиак (65 : 35 : 5) и хлороформ — ацетон — метанол — уксусная кислота — вода (5 : 2 : 1 : 1 : 0,5) [28]. В качестве стандартов использовали сфингомиелин из мозга быка и лизофосфатидилхолин, полученный из яичного фосфатидилхолина. Обнаружение проводили молибдатным реактивом на фосфолипиды [6], 0,2% нингидрином в ацетоне, реактивом Драгендорфа [7] и 10% H₂SO₄ в метаноле с обугливанием при 180° С.

Выделение липида. Общий липидный экстракт омыляли 8 ч 1 н. КОН в метаноле при 37° С, подкисляли 1 н. HCl и вновь выдерживали 1,5 ч при 37° С. Гидролизат нейтрализовали, экстрагировали хлороформом, промывали водой, упаривали, остаток растворяли в небольшом объеме смеси петролейный эфир (т. кип. 60–80° С) — метанол (9 : 1) и осаждали ацетоном. Промытый ацетоном осадок растворяли в смеси хлороформ — метанол (9 : 1) и хроматографировали на колонке с силикагелем Л 40–100 мк (Сhemapol, СССР). Липид элюировали смесью хлороформ — метанол (1 : 1). Дополнительную очистку проводили на колонке с основной окисью алюминия (Woelm, ФРГ) при соотношении вещество — сорбент 1 : 20. Элюировали смесью хлороформ — метанол (9 : 1), липид вымывался после сфингомиелина.

Выделение цереброзидов. Цереброзиды выделяли из того же гидролизата, что и липид, с помощью препаративной ТСХ на силикагеле в системе хлороформ — метанол (8 : 2). Стандарты — керазин и френозин из мозга быка, обнаружение — водой или иодом.

Получение метиловых эфиров жирных кислот [29]. Липид (5 мг) растворяли в 5 мл метилирующей смеси (ацетилхлорид — метанол, 1 : 20), за-

паивали в ампулу и выдерживали 5 ч при 100° С. Метилловые эфиры жирных кислот экстрагировали 4 раза 3 мл *n*-гексана, а сфингозиновые основания — хлороформом, экстракты упаривали и разделяли с помощью микро-ТСХ. Разделение эфиров проводили в системе гексан — эфир (9:1). В качестве стандартов использовали метилловые эфиры стеариновой и 2-оксистеариновой кислоты. Контрольное обнаружение проводили 10% H₂SO₄ в метаноле с обугливанием при 180° С. Зоны метиловых эфиров нормальных и оксикислот удаляли с пластинки и экстрагировали гексаном.

Анализ метиловых эфиров оксикислот проводили на хроматографе GC-5A (Shimadzu, Япония) с пламенно-ионизационным детектором на стеклянной колонке длиной 1,5 м с 5% SE-30 на хромосорбе W-AW (DMCS), 80—100 меш. Газ-носитель — аргон, температура 150→270° С (3° С/мин). Анализ метиловых эфиров нормальных кислот проводили на хроматографе «Цвет 102» с пламенно-ионизационным детектором на стальной колонке (3 м) с 8% DEGS на хромосорбе P-AW (DMCS), 80—100 меш. Газ-носитель — гелий, температура 195° С. Метилловые эфиры нормальных кислот идентифицировали с помощью стандартных жирных кислот (пальмитиновой, стеариновой, олеиновой), а также расчетов с применением графика зависимости между относительным временем удерживания и длиной цепи. Для идентификации метиловых эфиров оксикислот использовали комбинированную ГЖХ-масс-спектрометрию на приборе LKB-9000 (Швеция).

Сфингозиновые основания разделяли с помощью микро-ТСХ в смеси хлороформ — метанол — 2 н. аммиак (40:20:1) [30]. Стандарты — сфингозин и дигидросфингозин. Обнаружение 0,2% пингидрином в ацетоне и 10% серной кислотой в метаноле.

Идентификация холина. Липид гидролизовали 24 ч 6 н. HCl в запаянной ампуле при 120° С. Гидролизат фильтровали через бумажный фильтр, упаривали до полного удаления HCl, остаток растворяли в небольшом количестве воды и подвергали микро-ТСХ в смеси метанол — вода — 25% аммиак (5:3:1), стандарт — холин, обнаружение — реактивом Драгендорфа [7], мо.побдатным реактивом [6] и 10% H₂SO₄ в метаноле.

ИК-спектры снимали на спектрофотометре UR-20 (Zeiss, ГДР) в диапазоне 4000—700 см⁻¹ в хлороформе. Спектры ЯМР снимали на приборе «Bruker-Physik 90E» в CDCl₃. В качестве внутреннего стандарта использован тетраметилсилан. Спектр ¹³C-ЯМР снят в смеси C₅D₅N и CDCl₃, спектр ¹H-ЯМР — в CDCl₃ с добавкой 5% CD₃OD (концентрация вещества 20%)

ЛИТЕРАТУРА

1. Костецкий Э. Я. Сравнительно-биохимическое изучение фосфо- и гликолипидов морских беспозвоночных. Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. Владивосток: Дальневосточный госуниверситет, 1969, 145 с.
2. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. Phospholipids of marine invertebrates. — Chem. and Phys. Lipids, 1969, v. 3, № 1, p. 102—105.
3. Костецкий Э. Я., Васендин И. М., Олешко Т. В., Герасименко Н. И. Сравнительно-биохимическое исследование фосфолипидного состава морских беспозвоночных. II. Всесоюзный симпозиум «Структура, превращение липидов в организме животного и человека». Л., 1975, с. 61.
4. Костецкий Э. Я., Васьковский В. Е., Светашев В. И. Изучение фосфо- и гликолипидного состава морских ежей. Материалы симпозиума «Экспериментальная экология морских беспозвоночных». Владивосток, ДВНЦ АН СССР, 1976, с. 90—96.
5. Костецкий Э. Я. Сравнительно-биохимическое исследование фосфолипидного состава морских беспозвоночных. Всесоюзная конференция «Эволюционная биохимия и происхождение жизни». Ереван, 1978, с. 53—54.
6. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. A universal reagent for phospholipid analysis. — J. Chromatogr., 1975, v. 114, № 1, p. 129—141.
7. Wagner H., Horhammer L., Wolff P. Dünnschichtchromatographie von Phosphatiden und Glykolipiden. — Biochem. Z., 1961, V. 334, H. 2, S. 175—184.
8. Шапиро Ю. Ф. Метод ЯМР-исследования фосфолипидных мембран с помощью гидрофильных парамагнитных зондов. Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. физ. наук. М.: Институт биоорганической химии, 1974, 187 с.

9. Abramson M. B., Norton W. T., Katzman R. Study of ionic structures in phospholipids by infrared spectra.— J. Biol. Chem., 1965, v. 240, № 6, p. 2389–2395.
10. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. М.: Наука, 1963, с. 289–353.
11. Chapman D., Morrison A. Physical studies of phospholipids. 4. Stigh resolution nuclear magnetic resonance spectra of phospholipids and related substances.— J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 21, p. 5044–5052.
12. Minari O., Tsubono H., Akiyama M., Sakagami T. Distribution and metabolism of 2 sphingomyelins in rat tissues.— J. Biochem., 1968, v. 64, № 2, p. 275–280.
13. Karlsson K.-A. Studies on sphingosines. 4. Composition of sphingomyelins from human plasma.— Biochem. J., 1964, v. 92, № 1, p. 39–40.
14. Sugita M., Arakawa I., Itasaka O., Hori T. Biochemical studies of shellfish lipids. XI. Isolation of sphingomyelin and its fatty acid components.— J. Jap. Biochem. Soc., 1968, v. 40, № 6, p. 254–256.
15. Ansell G. B., Hawthorne J. N., Dawson R. M. C. Form and function of phospholipids. Elsevier. Amsterdam — London — New York: 1973, p. 34–35.
16. Поре Т. Сравнительное изучение жирнокислотного состава сфингомиелина целого мозга и его отделов у позвоночных.— Ж. эвол. биохимии и физиол., 1979, т. 15, № 1, с. 29–32.
17. Adachi S., Suyama K., Sugawara H., Nagai J. Lipids in egg yolk of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).— Comp. Biochem. and Physiol., 1978, v. 60B, № 2, p. 117–120.
18. Karlsson K.-A., Nilsson K., Samuelsson B. E., Steen G. O. Presence of hydroxy fatty acids in sphingomyelins of bovine rennet stomach.— Biochim. et biophys. acta, 1969, v. 176, № 3, p. 660–663.
19. Breimer M. E. Distribution of molecular species of sphingomyelins in different parts of bovine digestive tract.— J. Lipid Res., 1975, v. 16, № 3, p. 189–194.
20. Morrison W. R., Hay J. D. Polar lipids in bovine milk. 2. Longchain bases, normal and 2-hydroxy fatty-acids, and isomeric *cis* and *trans* monoenoic fatty-acids of sphingolipids.— Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 202, № 3, p. 460–467.
21. Вавер В. А., Шапошникова Г. И., Симонова Т. Н. Структура оксикислот и фитосфингозинов цереброзидов морских звезд *Patiria pectinifera* и *Lysastrosoma anthostieta*.— Биоорг. химия, 1976, т. 2, № 5, с. 594–599.
22. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974, с. 609–611.
23. Дембицкий В. М. Плазмалогены в фосфолипидных морских беспозвоночных.— Биол. моря, 1979, № 5, с. 86–90.
24. Karlsson K.-A. Chemistry and occurrence of sphingolipid longchain bases.— Chem. and Phys. Lipids, 1970, v. 5, № 1, p. 6–43.
25. Кочетков Н. К., Жукова И. Г., Смирнова Г. П., Васильковский В. Е. Выделение сфингогликолипидов, содержащих сиаловую кислоту, из ткани гонад *Strongylocentrotus intermedius*.— Докл. АН СССР, 1967, т. 177, № 6, с. 1472–1474.
26. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. Isolation and purification of total lipides from tissues.— J. Biol. Chem., 1957, v. 226, № 1, p. 497–509.
27. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids.— J. Chromatogr., 1972, v. 67, № 2, p. 376–378.
28. Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A. Lipid chromatographic analysis. Marinetti G. V., ed. N. Y.: Marcel Dekker, 1967, v. 1, p. 99–162.
29. Лурье Л. А. Хроматографические материалы. М.: Химия, 1978, с. 365.
30. Кочетков Н. К., Жукова И. Г., Глузодед И. С. Новый тип сфинголипидов — сфингоплазмалогены.— Биохимия, 1964, т. 29, № 3, 570–575.

Поступила в редакцию
30.V.1980
После доработки
22.I.1981

LIPIDS OF MARINE ORGANISMS. I. IDENTIFICATION OF HYDROXY ACID CONTAINING SPHINGOMYELIN IN THE STARFISH *DISTOLASTERIAS NIPON*

KOSTETSKY E. Ya., GERASIMENKO N. I., NAUMENKO N. V., VASKOVSKY V. E.

Far East State University, Vladivostok; Institute of Marine Biology,
Far East Science Center, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok

A Dragendorff-positive unsaponifiable phospholipid from the starfish which on silica gel TLC occupies the position between sphingomyelin and lisophosphatidylcholine, is shown to be unusual sphingomyelin. It contains sphingosine, dihydrosphingosine, saturated (C₁₅-C₂₇) and mono-unsaturated (C₁₁-C₂₇) α -hydroxy acids (86% of total acids). These acids are found for the first time in marine invertebrates and their main constituents are C_{16:0} (32,7%), C_{15:0} (97%), C_{24:1} (16,5%) and C_{23:1} (12,0%). The lipid described accounts for 30% of the total sphingomyelin content.