



УДК 577.115.083

**ВЫДЕЛЕНИЕ ДИФОСФАТИДИЛГЛИЦЕРИНА,
ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛАМИНА И ФОСФАТИДИЛХОЛИНА
ИЗ СЕРДЦА БЫКА***Костецкий Э. Я., Герасименко Н. И.**Дальневосточный государственный университет, Владивосток*

Разработана новая эффективная методика получения с помощью колоночной хроматографии на силикагеле хроматографически чистых дифосфатидилглицерина, фосфатидилэтанолamina и фосфатидилхолина. Для этого липидный экстракт обрабатывают водным раствором $MgCl_2$, а в элюирующие системы добавляют водный аммиак. Для увеличения выхода липидов предложена дробная загрузка колонки порциями липидного экстракта с частичным элюированием нейтральных липидов хлороформом после загрузки каждой порции, при этом оптимальное соотношение фосфолипиды – силикагель составляет 1:20. Подтверждено наличие катионного обмена между липидным экстрактом и силикагелем. Обсуждено влияние этого процесса на эффективность разделения фосфолипидов.

Известные методы выделения дифосфатидилглицерина (кардиолипина) из смесей природных липидов отличаются значительной сложностью [1–9].

В данной работе обсуждается новая методика выделения хроматографически однородных ДФГ и попутно ФЭ и ФХ, главных фосфолипидов сердца быка. Предварительные результаты опубликованы ранее [10].

Фосфолипидный состав суммы липидов из сердца быка приведен в табл. 1. Из литературы известно, что получению чистого ДФГ на колонках с силикагелем в значительной степени мешают кислые фосфолипиды: ФС, ФИ и ФК [2–4, 7–11]. Поэтому основная задача при выделении ДФГ, ФЭ и ФХ сводилась к задержке элюирования кислых фосфолипидов. Поскольку ФС, ФИ и ФК при ТСХ могут существенно менять свое хроматографическое поведение в зависимости от pH хроматографических систем, мы попытались использовать это в процессе колоночной хроматографии (см. табл. 2, колонка 1). Добавка 25%-ного водного аммиака в элюирующие системы способствовала задержке элюирования ФС и ФИ с колонки, но ДФГ при этом элюировался в виде двух пиков: в системах хлороформ – метанол 93:7 и 80:20. Элюирование ДФГ в виде двух пиков в подобных системах отмечали и другие авторы [3, 4, 12]. Они связывали это с тем, что на элюирование ДФГ влияет катионный состав его самого и адсорбента, между ними возможен катионный обмен, скорость которого зависит от валентности катиона [3, 4, 12, 13].

Данные нашей работы по катионному составу исходного липидного экстракта, полученных фракций ДФГ и силикагеля согласуются с этим мнением (табл. 3, колонка 1). Так, в экстракте процентное содержание Ca^{2+} в 2 раза меньше, чем Mg^{2+} , а Na^+ – в 4 раза больше, чем K^+ . Это соотношение изменяется для обеих фракций ДФГ. Подтверждены и данные о различном катионном составе первого и второго пиков ДФГ (табл. 2, колонка 1). По нашему мнению, это еще одна из причин, затрудняющих получение ДФГ в чистом виде. Мы попытались устранить ее, изменив ионный состав исходного липидного экстракта. Обработка 5% водным $NaHCO_3$ позволила увеличить концентрацию одновалентных катионов в исходном липидном экстракте до 92% и понизить содержание двухва-

Сокращения: ДФГ – дифосфатидилглицерин; ФЭ – фосфатидилэтанолamin; ФХ – фосфатидилхолин; ФС – фосфатидилсерин; ФИ – фосфатидилинозит; ФК – фосфатидная кислота; СМ – сфингомиелин.

Жирные кислоты	Содержание, % от суммы в		
	ДФГ	ФЭ	ФХ
16:0	3,1	5,6	4,2
16:1	13,0	1,8	20,6
17:0	3,9	—	—
17:1	—	5,9	—
18:0	1,7	22,0	5,8
18:1	16,8	8,6	16,2
18:2	41,6	24,0	31,9
18:3 (9, 12, 15)	12,0	1,2	2,4
20:3 (9, 12, 15)	—	2,8	4,9
20:4 (6, 9, 12, 15) + 22:4	2,8	24,4	10,5
20:5 (6, 9, 12, 15, 18)	—	—	1,8
22:0	4,2	—	—

* Общие липиды сердца быка содержали 61,4% фосфолипидов, в которых присутствовали (в % от суммы фосфолипидов): ФХ — 41,9, лизо-ФХ — 1,5, ФЭ — 27,5, ДФГ — 9,2, ФС — 3,5, ФИ — 7,3, ФК — 0,8, СМ — 7,2.

Таблица 2

Влияние добавок 25% водного аммиака в элюирующие системы (колонка 1) и обработки исходного липидного экстракта 5% водным раствором NaHCO_3 * (колонка 2) на хроматографическое поведение ФЛ из сердца быка

Состав элюирующей смеси (мл, кол. 1/мл, кол. 2)	Элюируемые липиды	
	Колонка 1 **	Колонка 2 ***
1. Хлороформ (590/1120)	Нейтральные липиды — ****	ДФГ (первый пик)
2. Хлороформ — метанол, 93 : 7 (1120, колонка 2)	ДФГ (первый пик)	—
3. Хлороформ — метанол — 25% аммиак, 93 : 7 : 0,2 (600 мл, колонка 1)	Липидов нет	Следы ДФГ, затем ФЭ
4. Хлороформ — метанол — 25% аммиак, 90 : 10 : 0,4 (300/1300)	ДФГ (второй пик), ФЭ	ДФГ (второй пик), ФЭ, затем ФХ
5. Хлороформ — метанол — 25% аммиак, 80 : 20 : 1,5 (500/1500)	ФХ, лизо-ФЭ, СМ, лизо-ФХ	ФХ, лизо-ФЭ, СМ, лизо-ФХ
6. Хлороформ — метанол — 25% аммиак, 70 : 30 : 6,5 (400/700)	ФИ, ФС	ФИ, ФС
7. Хлороформ — метанол, 60 : 40 (400/800)		

* Обработку исходных липидов сердца 5% водным раствором NaHCO_3 проводили, как описано в «Экспериментальной части» для обработки раствором MgCl_2 .

** Колонка диаметром 22 мм заполнена 23 г силикагеля, нагрузка 0,8 г суммы липидов.

*** Колонка диаметром 30 мм заполнена 50 г силикагеля, нагрузка 1,5 г суммы липидов.

**** Система не использовалась.

лентных до 8% (табл. 3, колонка 2). Однако и в этом случае ДФГ элюировался в тех же системах двумя пиками; в первом присутствовали в основном Mg^{2+} и Ca^{2+} , во втором — преимущественно Ca^{2+} и Na^+ . Однако низкое количество ионов во втором пике (4,7 мкг/мг ДФГ) свидетельствует о преимущественном выходе ДФГ с колонки в свободной от ионов форме. Появление первого пика ДФГ, содержащего двухвалентные катионы, по нашему мнению, в значительной степени обусловлено обменом ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} силикагеля на Na^+ из экстракта. Введение в экстракт преимущественно одновалентных ионов не позволило добиться выхода ДФГ в виде одного пика. Поэтому мы попытались заменить в исходном липидном экстракте одновалентные ионы на двухвалентные ионы Mg^{2+} .

Для более полной замены ионов в исходном липидном экстракте на Mg^{2+} мы провели его двухстадийную обработку, заменив на первой ста-

Катионный состав силикагеля, липидов сердца быка (до и после обработок растворами солей) и фракции ФЭ, получаемых с колонок

Исследуемый образец	Содержание катионов, % от суммы				Сумма катионов, мг/мг фосфолипидов
	Mg	Ca	Na	K	
Силикагель L 40/100 мкм (ИССР) *	+	+	+	+	—
Липиды сердца	10	5	68	17	10,0
ДФГ 1-го пика (колонокка 1)	9	72	12	7	9,0
ДФГ со следами ФЭ — 2-й пик (колонокка 1)	2	16	78	4	8,5
Липиды сердца, обработанные 5% водным NaHCO ₃	2	6	92	—	86,0
ДФГ 1-го пика (колонокка 2)	57	36	7	—	35,0
ДФГ 2-го пика (колонокка 2)	2	53	45	—	4,7
Фракция ФС и ФИ (колонокка 2)	6	23	71	—	10,6
Липиды сердца, обработанные 2% водным MgCl ₂ (колонокка 3) **	44	47	—	9	14,0
ДФГ (колонокка 3) **	24	50	24	2	13,2
Липиды сердца, обработанные 5% водным NaHCO ₃ , затем 2% MgCl ₂ (колонокка 3)	30	2	62	6	25,0

* Количественный анализ не проводился, качественный состав определен на спектрографе ИСП-30; кроме указанных катионов найдены также Al, Si и Ti. «—» — катион не найден.

** Описание колонки 3 — см. «Эксперим. часть».

дни большую часть ионов на Na⁺ (обработка 5% водным NaHCO₃), а на второй — на Mg²⁺ (обработка 2% водным MgCl₂). В результате нам удалось повысить процентное содержание ионов Mg²⁺ в экстракте, почти полностью удалив Ca²⁺, но процент одновалентных ионов остался высоким. Вероятно, это привело к тому, что полученные результаты хроматографического разделения мало отличались от результатов, полученных на колонках 1 и 2 (в «Экспериментальной части» данные не приводятся).

Наилучший эффект был получен после обработки исходного липидного экстракта 2% водным MgCl₂ (табл. 3, колонка 3). Липидный экстракт после обработки имел в своем составе преимущественно ионы Ca²⁺ и Mg²⁺. ДФГ из такого экстракта элюировали в виде одного пика, несущего в основном двухвалентные катионы Mg²⁺ и Ca²⁺; хроматографическая чистота выделенного ДФГ — 99,5%. Добавка в элюирующие системы аммиака замедляла элюирование с колонки кислых фосфолипидов, что позволило получить дополнительно с этой же колонки еще два хроматографически чистых вещества — ФЭ и ФХ.

Для повышения выхода фосфолипидов с одной хроматографической колонки мы увеличили загрузку общих фосфолипидов на силикагель до соотношения 1:20, используя для этого ступенчатый способ нанесения общих липидов на колонку с промежуточным вымыванием нейтральных липидов хлороформом из каждой загруженной порции.

Отличительная черта этого способа — более быстрое элюирование липидов в небольшом количестве растворителей. Однако при этом можно получить только два хроматографически чистых фосфолипида — ДФГ и ФЭ, а ФХ элюировался с примесями СМ и лизо-ФХ.

ДФГ, выделенный в виде магний-кальциевой соли, хорошо растворим в хлороформе, хлороформ-метанольных смесях, бензоле, устойчив в течение полугода при -4—20°С (обычный срок хранения ДФГ ~1 мес [14]). Микро-ТСХ не показывает видимых изменений липида в течение этого срока. Жирнокислотный состав выделенных фосфолипидов приведен в табл. 1.

Экспериментальная часть

ДФГ, ФЭ и ФХ выделяли из свежего сердца быка. Липидный экстракт готовили по методу Фолча [15], отмывали дистиллированной водой, упаривали под вакуумом, растворяли в хлороформе и проводили дополни-

тельную солевую обработку. Соотношения липидов и адсорбентов даны весовые, растворителей — объемные.

Фосфолипидный состав исходного экстракта и хроматографическую чистоту полученных фосфолипидов контролировали с помощью микро-ТСХ по методу [16], используя систему: направление 1 — хлороформ — метанол — 25% аммиак, 65:35:5; направление 2 — хлороформ — уксусная кислота — вода, 50:20:10:10:5. Для одномерной ТСХ применяли первую систему. В качестве стандартов использовали ДФГ, ФЭ и ФХ, выделенные из сердца быка препаративной ТСХ. Липиды на микро-ТСХ обнаруживали с помощью молибдатного реактива [17], 0,2% нишгидрина в ацетоне, 10% серной кислоты в метаноле. Фосфолипиды определяли с помощью анализа на фосфор [17]. Анализ метиловых эфиров жирных кислот ФЭ, ФХ, ДФГ проводили как описано в работе [18]. Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле марки L40/100 (Chemapol, СССР). Общий липидный экстракт загружали на колонку в хлороформе (соотношение фосфолипиды — адсорбент 1:40 или 1:20). Липиды выделяли градиентной элюцией метанола в хлороформе.

Обработка 2% водным $MgCl_2$. К хлороформному раствору суммы липидов добавляли $\frac{1}{5}$ (от объема его экстракта) 2% раствора $MgCl_2$, интенсивно встряхивали 1—2 мин в делительной воронке, после полного разделения на две фазы на холоде нижнюю фазу упаривали под вакуумом до суха и растворяли в хлороформе, верхнюю отбрасывали.

Хроматография липидов сердца быка, обработанных 2% водным $MgCl_2$ (колонка 3). 450 мг общих липидов, содержащих 280 мг суммы фосфолипидов, обработанных $MgCl_2$, как описано выше, в 11 мл хлороформа наносили на колодку диаметром 1,5 см, заполненную суспензией 12 г силикагеля в хлороформе, и элюировали хлороформом (230 мл), затем смесями хлороформ — метанол, 93:7 (410 мл), хлороформ — метанол — 25% аммиак, 90:10:0,4 (1100 мл), хлороформ — метанол — 25% аммиак, 80:20:1,5 (600 мл). Первый элюат отбрасывали. Второй и последующие элюаты собирали фракциями по 20 мл. Первые три фракции второго элюата (60 мл) отбрасывали; оставшиеся 350 мл, содержащие ДФГ, объединяли и упаривали. Выход хроматографически чистого ДФГ 22 мг. В третьем элюате первые четыре фракции отбрасывали, последующие 1020 мл, содержащие ФЭ, объединяли и упаривали. Выход хроматографически чистого ФЭ 75 мг. В четвертом элюате отбрасывали первые четыре фракции, следующие 200 мл, содержащие ФХ, объединяли и упаривали. Выход хроматографически чистого ФХ 81 мг.

Использование нагрузки фосфолипиды — силикагель 1:20 при хроматографии липидов сердца быка. 800 мг общих липидов сердца, обработанных $MgCl_2$ (495 мг суммы фосфолипидов) порциями по 200 мг в 2 мл хлороформа наносили на колонку диаметром 1,3 см, заполненную 10 г силикагеля. После нанесения каждой 200 мг общих липидов колонку промывали 6 мл хлороформа, после чего окончательно элюировали нейтральные липиды и свободные жирные кислоты 210 мл хлороформа. Далее элюировали смесями хлороформ — метанол, 93:7 (290 мл), хлороформ — метанол — 25% аммиак, 90:10:0,4 (800 мл), хлороформ — метанол — 25% аммиак, 80:20:1,5 (460 мл). Первые 80 мл фракции хлороформ — метанол (93:7), содержащие хроматографически чистый ДФГ, объединяли и упаривали. Выход 39 мг. Последующие 210 мл отбрасывали, следующие 800 мл элюата, содержащие чистый ФЭ, упаривали. Выход 150 мг. Последний элюат содержал ФХ с примесями ФЭ, СМ и ЛФХ.

Анализ катионного состава проведен на кафедре аналитической химии Дальневосточного госуниверситета А. Ф. Гончаровым и В. А. Николенко и в лаборатории прикладной экологии и токсикологии ТИНРО Л. Т. Ковковдой, за что авторы выражают им глубокую благодарность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pangborn M. C. J. Biol. Chem., 1945, v. 161, № 1, p. 71—82.
2. Rose H. G. Biochim. et biophys. acta, 1964, v. 84, № 2, p. 109—127.
3. Shimotojo T., Ohno K. J. Biochem., 1966, v. 60, № 4, p. 462—466.

4. *Shimojo T., Ohno K.* J. Biochem., 1966, v. 60, № 4, p. 467-469.
5. *Yabuuchi H., O'Brien J. S.* J. Neurochem., 1968, v. 15, № 12, p. 1383-1385.
6. *Eighberg J., Burnham J. D.* J. Lipid Res., 1970, v. 11, № 4, p. 385-388.
7. *Murugesu N., Jayaraman J.* Ind. J. Biochem. and Biophys., 1975, v. 12, № 1, p. 67-68.
8. *Courtade S. A., McLibbin J. M.* Lipids, 1971, v. 6, № 4, p. 260-265.
9. *Joannou P. V., Goding B. T.* Progr. Lipid Res., 1979, v. 17, № 1, p. 279-318.
10. А. с. 825084 (СССР). Способ одновременного получения дифосфатидилглицерина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина / Костецкий Э. Я., Герасименко Н. И. Заявл. 07.03.79, № 2795922. Оpubл. в Б. И., 1981, № 16.
11. *Mac Farlane M. C.* Biochem. J., 1961, v. 78, № 1, p. 44-51.
12. *Shimojo T., Kanoh H., Ohno K.* J. Biochem., 1971, v. 69, № 2, p. 255-263.
13. *Nielsen H. J.* Chromatogr., 1974, v. 89, № 2, p. 259-273.
14. *Бергелсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Мологковский Ю. Г., Батраков С. Г., Барсуков Л. П., Проказова Н. В.* Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981, с. 162-164.
15. *Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H.* J. Biol. Chem., 1957, v. 226, № 1, p. 497-509.
16. *Svetashev V. I., Vaskovsky V. E.* J. Chromatogr., 1972, v. 67, № 2, p. 376-378.
17. *Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Ya., Vasendin I. M.* J. Chromatogr., 1975, v. 114, № 1, p. 129-141.
18. *Костецкий Э. Я., Герасименко Н. И., Науменко Н. В., Васильковский В. Е.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 7, с. 1069-1074.

Поступила в редакцию

14.V.1984

После доработки

18.VIII.1984

ISOLATION OF DIPHOSPHATIDYLGLYCEROL, PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE AND PHOSPHATIDYLCHOLINE FROM BOVINE HEART

KOSTETSKY E. Ya., GERASIMENKO N. I.

Far East State University, Vladivostok

A novel efficient procedure based on silica gel column chromatography has been developed for isolating chromatographically pure diposphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. For this purpose the lipid extract is treated with aqueous MgCl₂, whereas aqueous ammonia is added to the eluent systems. To raise the yield of lipids, a fractional loading of columns with portions of lipid extracts is employed, each loading being followed by partial elution of neutral lipids with chloroform. Optimal phospholipid - silica gel ratio is 1:20 for such a procedure. The presence of cation exchange between the lipid extract and silica gel is confirmed and its influence on the efficacy of phospholipid separation is discussed.