



УДК 591 . 1 . 05 + 593.43

## ЛИПИДЫ МОРСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

1. НЕОБЫЧНЫЙ ЛИПИД ИЗ ГУБКИ *HALICHOONDRIA PANICEA*

Дембицкий В. М., Светашев В. И., Васъковский В. Е.

Институт биологии моря ДВНЦ Академии наук СССР, Владивосток

Показано, что нингидринположительный фосфолипид из губки, идущий на хроматограммах выше обычного фосфатидилэтаноламина, является смесью 83,3% 1-алкил- и 16,7% 1-алкенил-2-ацил-глицеро-3-фосфорилэтаноламинов. Исследован состав жирных кислот, жирных альдегидов и простых эфиров, входящих в липид. Показано, что он богат кислотами 26 : 2 (20,9%) и 26 : 3 (43,5%).

При изучении в нашей лаборатории полярных липидов морских беспозвоночных [1, 2] был обнаружен ряд веществ, отличающихся по хроматографическому поведению от известных липидов. Одно из них (липид губки *Halichondria panicea*) выбрано для детального исследования. В работе был широко использован метод микротонкослойной хроматографии [3], что позволило провести все исследование вещества на количествах, не превышающих нескольких десятков миллиграммов.

При ТСХ в обычных хроматографических системах этот липид имел величину  $R_f$ , несколько большую, чем фосфатидилэтаноламин (ФЭ) из яичного желтка. Он окрашивался реактивом на фосфолипиды [4] и нингидрином.

Липид был выделен с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Окончательную очистку проводили препаративной ТСХ. При мягком щелочном гидролизе происходило отщепление жирных кислот, однако при этом вторым продуктом было не водорастворимое вещество, а липид, близкий по хроматографическому поведению лизо-ФЭ.

В ИК-спектре липида обнаружены полосы, характерные для обычного ФЭ [5] ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2965, 2935, 2860, 1475, 1380 ( $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$ ), 1740 ( $-\text{C}=\text{O}$ ), 1615 (NH), 1230 ( $\text{P}=\text{O}$ ), 1045 ( $\text{P}-\text{O}-\text{C}$ ). Кроме того, имелся пик 1150, который можно отнести к  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ -группе [6]. В спектре продукта омыления основными являются следующие полосы: 3435 ( $-\text{OH}$ ), 2965, 2935, 2865, 1470, 1380 ( $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$ ), 3035, 1660 ( $-\text{O}-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 1605 (NH), 1230 ( $\text{P}=\text{O}$ ), 1155 ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ) и 1050 ( $\text{P}-\text{O}-\text{C}$ ), т. е. в нем отсутствуют частоты сложноэфирной группы, но имеется полоса гидроксильной, а также четко выражены полосы поглощения винильной и простой эфирной связи.

Липид содержит 3,8% фосфора. Молярное соотношение фосфор — азот — сложноэфирные связи оказалось равным 1,00 : 1,05 : 1,06. Среди продуктов кислотного гидролиза с помощью ТСХ и БХ было обнаружено единственное нингидринположительное вещество — этаноламин. В смеси, образующейся при восстановлении липида алюмогидридом лития, были

найденны жирные спирты и глицерилловые эфиры. Глицерилловые эфиры образовывали изопропилиденновые производные, так же как и стандартные образцы химилового и батилового спиртов, т. е. они были  $\alpha$ -глицерилловыми эфирами. Методом микротонкослойной реакционной хроматографии [7] содержание алкенильной формы было найдено равным  $16,7 \pm \pm 0,7\%$ . Количество алкильной формы определяли по содержанию фосфора после омыления липида и гидролиза плазмалогенов [7]. Оно составило  $83,3 \pm 1,3\%$  от суммы всех форм.

Таким образом, исследованный нами фосфолипид губки оказался фосфатидилэтаноламином, в котором сложноэфирные связи в первом положении полностью заменены на простые эфирные.

Липиды с простой эфирной связью широко распространены в природе [8]. Содержание алкильной формы в фосфолипидах высших животных обычно не превышает долей процента или нескольких процентов [9]. Наиболее богаты этой формой фосфолипиды костного мозга: в ФЭ до 28% и в фосфатидилхолине (ФХ) до 12% [10]. Известно, что фосфолипиды многих раковых опухолей содержат повышенные количества алкиловых эфиров по сравнению с соответствующими здоровыми тканями [11]. Фосфолипиды беспозвоночных, прежде всего ФЭ, довольно часто могут быть представлены в значительной степени алкенильной формой [12]; что касается алкильной формы, то максимальное ее содержание обнаружено до сих пор в фосфолипидах моллюсков (49% в ФХ и 13% в ФЭ [13]) и в простейших (до 60% в ФХ и 22% в ФЭ [14]). Особый случай представляют липиды бактерий-галофилов, в которых важнейшие фосфо- и гликолипиды являются практически полностью диалкиловыми эфирами [15]. Однако их алкильные группы представляют собой не обычные смеси остатков различных жирных спиртов, а остатки полиизопреноида фитанола. Поэтому следует считать, что исследованный нами ФЭ губки имеет самое высокое содержание обычных алкильных форм, найденное до сих пор в фосфолипидах.

Хроматографическое поведение липида можно, вероятно, объяснить составом его жирных заместителей. Известно [16], что алкилдиглицериды хорошо отделяются от триглицеридов при ТСХ. Алкилацильные формы фосфолипидов в общем случае не отделяются в обычных хроматографических системах от диацильных форм [16]. Однако иногда удавалось наблюдать деление, например, для фосфонового аналога ФЭ [17]. Кейтс [15] указывает, что все дифитанольные аналоги фосфолипидов имеют при ТСХ  $R_f$  больше, чем обычные диацильные фосфолипиды.

ГЖХ жирных кислот липида губки показала, что в их состав входят два компонента с временами удерживания, большими, чем имеет кислота 22 : 6. Методом хромато-масс-спектрометрии мы показали, что эти соединения являются кислотами 26 : 2 и 26 : 3. Недавно американские исследователи [18] нашли эти же кислоты в липидах другого вида губок.

Состав жирных кислот общего липидного экстракта губки, а также жирных кислот, жирных альдегидов и глицерилловых эфиров выделенного липида приведен в таблице. Из нее видно, что содержание кислот 26 : 2 и 26 : 3 в липиде заметно выше, чем в суммарном липидном экстракте (20,9 и 43,5% против 4,9 и 26,7%). Недавно Литчфилд и соотр. [19] провели широкий скрининг жирных кислот губок класса *Demospongiae* и показали, что все они, за редким исключением, содержат значительное количество (от 22 до 55%)  $C_{26}$ -кислот. Американские авторы исследовали и губку *H. panicea* Атлантического побережья США, в которой нашли 27%  $C_{26}$ -кислот. Это близко к тому, что мы определили для нашего объекта, однако получены большие расхождения в содержании некоторых других кислот, прежде всего  $C_{13}$ . Это можно объяснить различиями в условиях обитания губок; не исключено, что мы имеем дело с видом близким, но все же отличающимся от американского.

Полученные нами результаты еще раз показали, что губки являются

**Состав жирных кислот, альдегидов и глицеридовых эфиров  
общего липидного экстракта и фосфатидилэтаноламина губки**

Число углерод- ных атомов и двойных связей в цепи	Жирные кислоты, %		Глицеридо- вые эфиры в ФЭ, %	Жирные альдегиды в ФЭ, %
	в экстракте	в ФЭ		
12:0	—	0,8	—	—
14:0	8,0	0,6	3,3	5,6
14:1	4,1	0,2	0,6	—
15:0	2,7	0,1	1,8	8,4
15:1	—	5,7	3,4	—
16:0	9,1	4,3	58,0	12,7
16:1	6,8	1,0	2,9	—
16:2+17:0	6,0	5,4	3,2	10,5
18:0	2,8	0,2	5,4	17,9
18:1	4,6	1,2	4,3	8,8
19:0	0,6	0,7	—	—
20:0	0,1	0,3	—	7,8
20:1	0,9	—	—	2,7
20:2	0,6	0,6	—	—
20:4 $\omega$ 6	4,0	7,7	—	—
20:5 $\omega$ 3	5,6	2,9	—	—
21:0	2,0	—	—	—
21:1	1,0	0,7	—	—
22:0	—	—	—	2,0
22:1	—	—	—	0,9
22:2	0,2	—	—	7,7
22:3	—	—	—	11,8
22:5 $\omega$ 3	2,2	0,5	—	—
22:6 $\omega$ 3	4,2	—	—	—
24:0	0,8	—	3,9	3,2
24:1	1,0	1,5	13,2	—
25:0	0,9	—	—	—
25:1	0,1	0,7	—	—
25:2	—	0,3	—	—
26:2	4,9	20,9	—	—
26:3	26,7	43,5	—	—

типом животных, весьма интересных с точки зрения биохимии липидов. Ранее было показано, что губки чрезвычайно богаты гликолипидами, прежде всего цереброзидами [2, 20], содержат жирные кислоты, которые не найдены в других организмах [18—20].

### Экспериментальная часть

Губки были собраны в заливе Посьета Японского моря. Из очищенной от посторонних организмов ткани липиды экстрагировали по методу, описанному в работе [22]. Липид был выделен колоночной хроматографией на силикагеле марки L40-100 (Chemapol, СССР). Липид элюировали смесью хлороформ — метанол, 8 : 2. Дополнительная очистка проведена препаративной ТСХ на пластинках 13 × 18 см с силикагелем марки L5-40 в системе хлороформ — метанол — 28% аммиак (65 : 35 : 5). Липид восстанавливали алюмогидридом лития по методу [23], мягкий щелочной гидролиз осуществляли по методике [24]. Кислотный гидролиз проводили в течение 3 ч при 120° в запаянных ампулах 2 н. HCl в метаноле. Фосфор определяли методом [4], азот — методом Глебо и сотр. [25], сложнэфирные группы — по методу Раппорта и Алонзо [26].

ИК-спектры снимали на спектрофотометре UR-20 (Zeiss, ГДР) в диапазоне 4000—700 см<sup>-1</sup> в хлороформе.

Для ГЖХ глицеридовые эфиры переводили в изопропилиденовые производные методом [27], жирные альдегиды — в диметилацетаты [28], жирные кислоты — в метиловые эфиры [29]. Анализ проводили на хроматографе GC-5A (Shimadzu, Япония) с пламенно-ионизационными детекторами и цифровым интегратором ITG-4A. Использовали стеклянные колонки с 15% диэтиленгликольсукцинатом на хромосорбе W-AW (DMCS).

Газ-носитель — аргон. Температура при ГЖХ: 180° для диметилацеталей, 190° для метиловых эфиров и 200° для изопропилиденовых производных глицероловых эфиров.

Для идентификации метиловых эфиров, диметилацеталей и изопропилиденовых производных глицероловых эфиров использовали стандартные жирные кислоты, жирные альдегиды и производные химилового, батилового и селажного спиртов, а также расчеты с применением графика логарифмической зависимости между относительными временами удерживания и длиной цепи. Жирные кислоты идентифицированы комбинацией ГЖХ-масс-спектрометрией на приборе ЛКВ-9000 (Швеция).

Авторы статьи выражают благодарность С. Забелинскому (Институт эволюционной физиологии и биохимии им. Сеченова) за помощь, оказанную при идентификации жирных кислот из губки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y. (1969) *Chem. and Phys. Lipids*, 3, 102—105.
2. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Svetashev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P. (1970) *Compar. Biochem. and Physiol.*, 34, 163—177.
3. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. (1972) *J. Chromatogr.*, 67, 376—378.
4. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. (1975) *J. Chromatogr.*, 114, 129—141.
5. Chacko G. K., Hanahan D. F. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, 164, 252—271.
6. Joo C. N., Shier T., Kates M. (1968) *J. Lipid Res.*, 9, 782—786.
7. Vaskovsky V. E., Dembitsky V. M. (1975) *J. Chromatogr.*, 115, 645—647.
8. Snyder F. (Ed.) (1972) *Ether Lipids: Chemistry and Biology*, Acad. Press, N. Y.—London.
9. Horrocks L. A. (1972) in *Ether Lipids* (Snyder F., ed.), pp. 177—272, Acad. Press, N. Y.—London.
10. Thompson G. A., Hanahan D. F. (1963) *Biochemistry*, 2, 641—644.
11. Snyder F., Wood R. (1969) *Cancer Res.*, 29, 251—265.
12. Дембицкий В. М., Васильковский В. Е. (1976) *Биол. моря*, № 5, 68—72.
13. Thompson G. A., Hanahan D. F. (1963) *J. Biol. Chem.*, 238, 2628—2633.
14. Thompson G. A. (1967) *Biochemistry*, 6, 2015—2018.
15. Kates M. (1972) in *Ether Lipids* (Snyder F., ed.), pp. 351—398, Acad. Press, N. Y.—London.
16. Viswanathan C. V. (1974) *J. Chromatogr.*, 98, 129—155.
17. Viswanathan C. V. (1973) *J. Chromatogr.*, 75, 141—146.
18. Jefferts E., Morales R. W., Litchfield C. (1974) *Lipids*, 9, 244—247.
19. Litchfield C., Greenberg A. J., Noto G., Morales R. W. (1976) *Lipids*, 11, 567—570.
20. Schmitz F. J., McDonald F. J. (1974) *J. Lipid Res.*, 15, 158—164.
21. Morales R. W., Litchfield C. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, 431, 206—216.
22. Bligh E. G., Dyer W. J. (1959) *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 37, 911—917.
23. Wood R., Snyder F. (1968) *Lipids*, 3, 129—131.
24. Dawson R. M. C. (1960) *Biochem. J.*, 75, 45—47.
25. Glebko L. I., Ulkina J. I., Vaskovsky V. E. (1967) *Anal. Biochem.*, 20, 16—23.
26. Rapport M. M., Alonzo N. (1955) *J. Biol. Chem.*, 217, 193—199.
27. Schmid H. H. O., Mangold H. K. (1966) *Biochem. Z.*, 346, 13—17.
28. Farquhar J. W. (1962) *J. Lipid Res.*, 3, 21—25.
29. Christie W. W. (1973) *Lipid Analysis*, pp. 87—89, Pergamon Press, Oxford, N. Y., Toronto, Sydney, Braunschweig.

Поступила в редакцию  
4.I.1977

#### LIPIDS OF MARINE ORIGIN. I. UNUSUAL LIPID FROM THE *HALICHONDRIA PANICEA* SPONGE

DEMBITSKY V. M., SVETASHEV V. I., VASKOVSKY V. E.

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

A ninhydrin-positive phospholipid from the sponge *Halichondria panicea* migrating on thin-layer chromatograms ahead of phosphatidylethanolamine was identified as a mixture of 83.3% 1-alkyl- and 16.7% 1-alkenyl-2-glycero-3-phosphorylethanolamines. The fatty acid composition as well as those of fatty aldehydes and glycerol ethers in the lipid were analyzed, thereby a rather high content of peculiar «demospongiae» fatty acids 26 : 2 (20.9%) and 26 : 3 (43.5%) was found.