



УДК 577.115.3:593.6.088

ОБНАРУЖЕНИЕ ТЕТРАКОЗАГЕКСАЕНОВОЙ (24 : 6 ω 3) *
КИСЛОТЫ В ЛИПИДАХ МОРСКИХ КИШЕЧНОПОЛОСТНЫХ

Высоцкий М. В., Светашев В. И.

Институт биологии моря ДВНЦ Академии наук СССР, Владивосток

В кишечнополостных Охотского моря (альционариях, горгонариях и в морском пере) обнаружена тетракозагексаеновая кислота (ТГК). После выделения ТГК из липидов альционии *Eunephthya* sp. в индивидуальном состоянии для нее с помощью химических и спектральных методов доказана структура полностью-цис-6,9,12,15,18,21-тетракозагексаеноата. ТГК присутствует в полярных и нейтральных липидах указанных организмов (8–17% суммы жирных кислот).

Кишечнополостные являются одним из важнейших типов беспозвоночных, представители которого обитают в основном в море. В последние годы повысился интерес к жирным кислотам кишечнополостных в связи с тем, что в ряде животных этого типа были найдены в значительных количествах продукты превращения полиеновых жирных кислот — эйкозаноиды [1]. При анализе метиловых эфиров жирных кислот липидов кишечнополостных Охотского моря методом ГЖХ на полярной и неполярной фазах нами обнаружены кислоты, которые имели времена удерживания значительно большие, чем для кислоты 22 : 6 ω 3. После гидрирования эти кислоты превращались в тетракозановую кислоту (24 : 0), что было подтверждено как ГЖХ, так и масс-спектрометрией. ТСХ на силикагеле, пропитанном азотнокислым серебром, и хроматомасс-спектрометрия метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) показали наличие следующих компонентов: 24 : 6 (m/z 370), 24 : 5 (m/z 372), 24 : 4 (m/z 374) и 24 : 1 (m/z 380), причем преобладала первая кислота. Для структурных исследований были взяты суммарные липиды альционии *Eunephthya* sp. После переэтерификации МЭЖК очищали колоночной хроматографией и затем фракцию полиеновых ЖК выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, пропитанном азотнокислым серебром. Индивидуальные кислоты препаративно выделяли с помощью ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой. Таким образом был получен метиловый эфир кислоты 24 : 6 с чистотой, по данным ГЖХ, ~98%. Примеси составляли кислоты 20 : 5 ω 3, 22 : 6 ω 3, 24 : 4 и 24 : 5. УФ-спектр препарата показал отсутствие сопряженных двойных связей, а ИК-спектр не имел полос поглощений, характерных для транс-олефинов (960–980 см^{-1}) и тройных связей (2150 см^{-1}).

Предварительная информация о структуре изучаемой кислоты была получена из ее хроматографического поведения. На фазе средней полярности FFAP углеродное число оказалось равным 25,91. Так как для тетракозагексаеновой кислоты (22 : 6 ω 3) в этих же условиях было получено углеродное число 23,97, мы предположили, что исследуемая кислота относится к ω 3-ряду.

Поскольку масс-спектрометрия МЭЖК не дает возможности установить положение двойных связей, был использован пирролидид кислоты. Пик молекулярного иона при m/z 409 также соответствовал кислоте 24 : 6. Наличие интервала в 12 единиц между максимальными пиками для фрагментов, соответствующих атомам C8 (m/z 194) и C9 (m/z 206), C11

* В обозначении жирных кислот приведены: число С-атомов в цепи, количество двойных связей и положение первой из них, считая от СН_3 -группы; ТГК — тетракозагексаеновая кислота; ЖК — жирные кислоты; МЭЖК — метиловые эфиры жирных кислот.

Данные спектра ^{13}C -ЯМР метилового эфира кислоты 24 : 6 ω 3

Атом углерода	Химические сдвиги ^{13}C		Атом углерода	Химические сдвиги ^{13}C	
	найдено	литературные данные [10]		найдено	литературные данные [10]
1	173,8	171,04	9	127,9	128,07
2	34,06	34,06	10	128,57	128,61
3	24,7	24,65	12 **	128,20 **	128,23 **
4	29,2	29,15	21	127,02	127,09
5	26,9	26,92	22	131,98	132,02
6	129,6	129,69	23	20,6	20,59
7	128,4	128,45	24	14,1	14,25
8 *	25,80 *	25,68 *	O-CH ₃	51,19	51,41

* Аналогичные данные для C11, C14, C17, C20.

** Аналогичные данные для C13, C15, C16, C18, C19.

Таблица 2

Содержание тетракозаполиеновых кислот в липидах * трех видов кишечнополостных класса *Anthozoa*

Жирные кислоты	Отряд <i>Alcyonaria</i> <i>Eumephytha</i> sp.		Отряд <i>Gorgonaria</i> <i>Plumarella longispina</i>		Отряд <i>Pavonaria</i> <i>Pavonaria finmarchica</i>	
	ПЛ	НЛ	ПЛ	НЛ	ПЛ	НЛ
24 : 4	10,3	2,1	0,1	0,1	0,4	0,2
24 : 5	3,8	1,9	—	0,4	5,6	3,6
24 : 6 ω 3	8,4	8,7	17,0	10,9	16,9	16,4

* ПЛ и НЛ — полярные и нейтральные липиды.

(m/z 234) и C12 (m/z 246), C14 (m/z 274) и C15 (m/z 286), C17 (m/z 314) и C18 (m/z 326), говорит о наличии двойных связей при C9, C12, C15 и C18 [2, 3]. Положение остальных двойных связей (при C6 и C21) можно установить только предположительно из-за наличия более интенсивных пиков, на 2 единицы массы больших (m/z 168 и 368), чем это следует по расчету. На сходные трудности указывают и сами авторы метода [3], а также применение метода для доказательства структуры кислоты 18 : 5 ω 3 [4].

Информация о распределении остальных двойных связей получена из анализа спектра ^1H -ЯМР, в котором имеется восемь групп пиков: 0,98(т), 1,42(м), 1,66(м), 2,09(м), 2,32(т), 2,86(м), 3,67(с), 5,38(м). Наличие триплета при 0,98 м.д., относящегося к концевой метильной группе в β -положении к двойной связи [5], говорит о двойной связи при C21. Из возможных положений двойной связи при C3, C4, C5 или C6 положение 3 исключается, поскольку сигналы метиленовых протонов при C2 давали бы в этом случае дублет, а не триплет, как это наблюдается (δ 2,32 м.д.). Из всех остальных вариантов две группы сигналов метиленовых неаллильных протонов (1,42 и 1,66 м.д.) могут быть только при наличии двойной связи при C6. Таким образом, изучаемая кислота имеет структуру полностью-цис-6, 9, 12, 15, 18, 21-тетракозагексаеновой. Спектр ^{13}C -ЯМР подтверждает данную структуру. В табл. 1 приведены величины химических сдвигов для изучаемой кислоты и отнесения сигналов.

Данные по содержанию ТГК в полярных и нейтральных липидах приведены в табл. 2. Следует отметить высокое (до 17%) содержание кислоты 24 : 6 ω 3 в исследованных организмах и то, что ТГК присутствует как в полярных, так и в нейтральных липидах. Это позволяет сделать предположение об эндогенном происхождении ТГК. Скорее всего она синтезируется из докозагексаеновой, также относящейся к ω 3-семейству.

Ранее сообщений о нахождении ТГК в липидах желудочно-кишечных не было (см. обзоры [6, 7]). Длинноцепочечные полиеновые жирные кислоты, включая ТГК, были обнаружены в жирах некоторых рыб, где их концентрация не превышает 1–2% [8–10]. Недавно появилось сообщение японских авторов, которые обнаружили до 10% кислоты 24:6 ω 3 в липидах двух классов иглокожих — офиурах и морских лилиях и строго доказали ее структуру [11]. В ранних работах [8, 9] идентификация была не столь тщательной и базировалась главным образом на данных ГЖХ. Исключением является работа Линко [10], использовавшего ряд химических и физико-химических методов.

Экспериментальная часть

Образцы были взяты с помощью драги в различных частях Охотского моря в июле-августе 1986 г. Горгонария *Plumarella longispina* и морское перо *Pavonaria finmarchica* были взяты на глубине 120–130 м в районе о. Итуруп. Альциновария *Eunephthya* sp. взята на глубине 130 м в северо-западной части Охотского моря.

Для экстракции липидов животных гомогенизировали целиком и липидные экстракты получали по методу [12]. Общий липидный экстракт разделяли на нейтральную и полярную фракции с помощью колоночной хроматографии на силикагеле [13]. МЭЖК получали по методу [14] и очищали ТСХ для анализа ГЖХ. Для препаративного выделения МЭЖК очищали колоночной хроматографией на силикагеле. Фракцию метиловых эфиров полиеновых жирных кислот выделяли на силикагеле (0,040–0,100 мм), импрегнированном 20% AgNO₃, используя в качестве элюента смеси гексан — эфир. Индивидуальные МЭЖК выделяли ВЭЖХ (система Millipore Waters ALC/GPC-206z (США) на полупрепаративной колонке (7,8×300 мм) μ -Bondapak C18 (10 мкм) в системе этанол (96%) — вода, 90 : 10 (по объему), 2,5 мл/мин, детектирование при 214 нм.

Каталитическое гидрирование проводили над окисью платины по методу [15].

Физико-химические методы исследования. МЭЖК анализировали на хроматографе Sigma 2000 (Perkin — Elmer, США) с системой обработки данных Chromopak C-R3A (Shimadzu, Япония). Колонка капиллярная кварцевая (0,25 мм×25 м), фазы OV-101 и FFAP, температуры разделения 240 и 205° С соответственно. Делитель потока 1 : 60. Кроме того, использовали набивную колонку (3 мм×3 м), заполненную 3,1% Silar 5CP, температура 180→230° С (1,5°/мин). Идентификацию МЭЖК проводили при помощи стандартных смесей ЖК, по углеродным числам [16, 17], а также хроматомасс-спектрометрией (прибор LKB 2901 с хроматографом Paskard 438A, колонка капиллярная 25 м, фаза SE-54, 200° С). Для определения положения двойных связей в молекуле была применена масс-спектрометрия пирролидидов ЖК [2, 3] (ионизация электронным ударом при 70 эВ, температура колонки 230→280° С, 2,5°/мин). В случае индивидуальных пирролидидов применяли прямой ввод образцов, температура камеры 180–200° С. Инфракрасные спектры индивидуальных МЭЖК снимали на приборе G983 (Perkin — Elmer) в дейтерохлороформе, УФ-спектры — на приборе UV-3000 (Shimadzu) в метаноле.

Фракции выделенных кислот хранили при –40° С под аргоном. ЯМР-спектры были сняты на приборе WM-250 (Bruker): ¹H-ЯМР — при 250 МГц в дейтерохлороформе, ¹³C-ЯМР — при 62,9 МГц в дейтерохлороформе с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Light R. J., Samuelsson B. // Eur. J. Biochem. 1972. V. 28. № 2. P. 232–240.
2. Andersson B. A., Holman R. T. // Lipids. 1974. V. 9. № 3. P. 185–190.
3. Andersson B. A., Christie W. W., Holman R. T. // Lipids. 1975. V. 10. № 4. P. 215–219.
4. Joseph J. D. // Lipids. 1975. V. 10. № 7. P. 395–403.
5. Frost D. J., Barzilay J. // Anal. Chem. 1971. V. 43. № 10. P. 1316–1318.

6. Joseph J. D. // Prog. Lipid Res. 1979. V. 18. № 1. P. 1-30.
7. Лам Нгок Чам, Нгуен Ким Хунг, Стехов В. Б., Светашев В. И. // Биология моря. 1981. № 6. С. 44-47.
8. Головня Р. В., Кузменко Т. Е., Уралец В. П., Самусенко А. Л. // Прикл. биохимия и микробиол. 1978. Т. 14. № 4. С. 609-614.
9. Ackman R. G., Sipos J. C. // J. Fish. Res. Bd. Can. 1964. V. 21. № 4. P. 841-843.
10. Linko R. R., Karinkanta H. // J. Amer. Oil Chem. Soc. 1970. V. 47. № 2. P. 42-46.
11. Takagi T., Kaneniwa M., Itabashi Y. // Lipids. 1986. V. 21. № 7. P. 430-433.
12. Bligh E. G., Dyer W. J. // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. № 8. P. 911-917.
13. Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A. // Lipid chromatographic analysis/Ed. Marinetti G. V. N. Y.: Marcel Dekker, 1967. V. 1. P. 99-162.
14. Carreau J. P., Dubacq J. P. // J. Chromatogr. 1978. V. 151. № 3. P. 384-390.
15. Appelquist L. // J. Lipid Res. 1972. V. 13. № 1. P. 146-148.
16. Ackman R. C., Eaton C. A. // Fette, Seifen, Anstrichmittel. 1978. B. 80. № 1. S. 21-37.
17. Flanzly J., Bondon M., Leger C., Pihet J. // J. Chromatogr. Sci. 1976. V. 17. № 1. P. 17-24.

Поступила в редакцию
6.VII.1987

После доработки
2.X.1987

IDENTIFICATION OF TETRACOSAHEXAENOIC ACID (24:6 ω 3) IN LIPIDS OF SOME MARINE COELENTERATES

VYSOTSKY M. V., SVETASHEV V. I.

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

A fatty acid with an unusually long retention time was detected among common fatty acids in lipids of some marine coelenterates (Alcyonaria, Gorgonaria and Pavonaria) from the Okhotsk Sea. The acid was chromatographically isolated from lipids of the alcyonaria *Eunephthya* sp., and its structure was determined by chemical and spectral methods as *all-cis*-6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoic acid. Its content in both polar and neutral lipids of the above organisms is 8-17%.