



УДК 577.115.3 : 593.6.988

© 1990 г.

М. В. Высоцкий, А. А. Попков, В. И. Светашев

ТЕТРАКОЗАПЕНТАЕНОВАЯ (24 : 5 ω 6) КИСЛОТА В ЛИПИДАХ
МОРСКИХ КИШЕЧНОПОЛОСТНЫХ

Институт биологии моря ДВО АН СССР, Владивосток

Из горгонарии *Paragorgia arborea* и мягкого коралла *Gersemia rubiformis* выделена новая кислота, содержащая 24 атома углерода и пять двойных связей. При помощи химических и физико-химических методов исследования показано, что это *цис*-6,9,12,15,18-тетракозапентаеновая кислота, присутствующая в различных представителях северных и тропических горгонарий и мягких кораллов, причем ее количество может достигать 14% от суммы жирных кислот. Ранее она была известна только как минорный компонент липидов сперматозоидов свиньи, и, кроме того, тетракозапентаеновые кислоты неустановленного строения были найдены в липидах креветки *Penaeus japonicus* и фоторецепторных клетках сетчатки быка.

В липидах ряда морских кишечнополостных (горгонарий и мягких кораллов) обнаружена кислота с необычными хроматографическими характеристиками. Кислота была выделена из липидов горгонарии *Paragorgia arborea* и мягкого коралла *Gersemia rubiformis* посредством комбинации колоночной хроматографии и ТСХ в индивидуальном состоянии, и ее структура была установлена с помощью химических и физико-химических методов (гидрирование, УФ-, ИК- и масс-спектрометрия) как *цис*-6,9,12,15,18-тетракозапентаеновой кислоты (ТПК). Содержание ТПК составляло 4–14% от суммы жирных кислот липидной фракции исследованных видов.

Ранее при исследовании липидов морских кишечнополостных нами были обнаружены полиненасыщенные жирные кислоты, содержащие 24 атома углерода. Главную из них идентифицировали при помощи химических и физико-химических методов как тетракозагексаеновую кислоту (24 : 6 ω 3) (ТГК) [1]. Были обнаружены также минорные компоненты, соотношенные при помощи хроматомасс-спектрометрии с тетракозатетраеновой и тетракозапентаеновой кислотами [24 : 4 и 24 : 5]. Малое содержание этих кислот в изученных объектах не позволило установить их структуру.

Исследование было продолжено на горгонариях и мягких кораллах, собранных в Охотском и Беринговом морях. В них при анализе метиловых эфиров жирных кислот методом капиллярной ГЖХ на полярной и неполярной фазах мы нашли жирные кислоты, сходные по хроматографическому поведению с ранее обнаруженными кислотами (24 : 6 ω 3 и 24 : 5), причем в некоторых видах содержание последней составляло до 14% от суммы жирных кислот. Эквивалентная длина цепи [2] этой кислоты, равная 25,36 на полярной фазе Silar-5CP и 22,93 на неполярной фазе OV-101, позволила предположить принадлежность кислоты к ω 6-серии, поскольку для возможного аналога — кислоты (22 : 5 ω 6) этот параметр равен 23,40 [3] и 21,03 [4] соответственно. Хроматомасс-спектрометрия метиловых эфиров показала наличие молекулярного иона с m/z 372, соответствующего кислоте (24 : 5). Кроме того, в масс-спектре интенсивность пика иона с m/z 150 значительно превышала интенсивность пиков ионов с m/z 108 и 192, что характерно для метиловых эфиров жирных кислот ω 6-серии [5]. Продукт исчерпывающего гидрирования исследуемой кислоты не отличался при ГЖХ на различных фазах от заведомого образца кислоты нормального строения (24 : 0).

Сокращения: ТПК — *цис*-6,9,12,15,18-тетракозапентаеновая кислота, ТГК — тетракозагексаеновая кислота 24 : 6 ω 3.

Для детального установления химической структуры исследуемая кислота была выделена из суммы метиловых эфиров жирных кислот горгонарии *Parorgia arborea* с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, пропитанном нитратом серебра, с последующей обращенно-фазовой препаративной ТСХ. Всего было выделено около 10 мг метилового эфира исследуемой кислоты с чистотой более 99% (по данным ГЖХ, основная примесь — метиловый эфир арахидоновой кислоты). УФ-спектр препарата показал отсутствие сопряженных двойных связей, а ИК-спектр не имел поглощений, характерных для *транс*-олефинов (960—980 см⁻¹), а также для тройных связей (2150 см⁻¹). Для определения положения двойных связей в молекуле жирной кислоты применили пирролидиновые производные [6], нашедшие широкое применение в химии липидов для установления строения моно- и полиеновых кислот. Масс-спектр пирролидида исследуемой кислоты представлял собой набор кластеров с главными пиками с *m/z* 98 (C1, 15,5%), 113 (C2, 100%), 126 (C3, 35,7%), 140 (C4, 5,8%), 154 (C5, 3,8%), 166 (C6, 2,1%), 180 (C7, 4,5%), 194 (C8, 3,8%), 206 (C9, 1,7%), 220 (C10, 3,3%), 234 (C11, 2,0%), 246 (C12, 2,3%), 260 (C13, 2,6%), 272 (C14, 1,2%), 274 (C14, 1,2%), 286 (C15, 1,5%), 300 (C16, 2,4%), 314 (C17, 0,7%), 326 (C18, 0,8%), 340 (C19, 0,7%), 354 (C20, 0,5%), 368 (C21, 0,2%), 382 (C22, 0,1%), 396 (C23, 0,1%), 411 (C24, M⁺, 1,8%).

Наличие в масс-спектре интервала в 12 *m/z* между главными пиками кластеров C5—C6, C8—C9, C11—C12, C17—C18 указывает, в соответствии с правилом [6], на присутствие двойных связей в положениях 6, 9, 12 и 18. Положение оставшейся двойной связи было неясным, так как в кластере C14 наблюдали два основных пика (*m/z* 272 и 274) с одинаковой интенсивностью, что не позволяло однозначно установить положение двойной связи. Авторы метода указывали, что для пирролидидов кислот, содержащих 4 и более двойных связей, применимо другое правило, согласно которому наличие относительно более интенсивного пика между кластерами с предполагаемым интервалом в 12 *m/z* говорит о присутствии метиленового мостика между двойными связями [7]. В нашем случае наблюдается интенсивный пик кластера C13, так же как и C7, C10 и C16. Это означает наличие метиленовых мостиков в положениях C8, C11, C14 и C17 и соответственно двойных связей в положениях 6, 9, 12, 15 и 18. Данные УФ-спектроскопии указывают на отсутствие сопряженных связей. Поскольку в молекуле ТПК, по данным ИК-спектроскопии, отсутствуют *транс*-олефиновые связи, кислота, выделенная из фракции липидов горгонарии *P. arborea*, является *цис*-6,9,12,15,18-тетракозапентаеновой. Другими основными кислотами у этого вида были олеиновая (10,9%) и арахидоновая (18,2%). Содержание тетракозаполненовых кислот составляло 14,1% для ТПК и 3,8% для ТГК. По аналогичной методике ТПК была выделена из липидов мягкого коралла *Gersemia rubiformis*, и строение ее было установлено сходным образом. Содержание ТПК в этом случае составило 7,4, ТГК — 3,3%, другими основными кислотами были пальмитиновая (16,4%) и арахидоновая (24,9%). Обе тетракозаполненовые кислоты были найдены и в липидах ряда других северных и тропических горгонарий и мягких кораллов. Статья о детальном исследовании распространения кислот (24 : 5ω6 и 24 : 6ω3) в липидах морских желудочнополостных подготавливается к публикации.

Ранее о нахождении ТПК в липидах желудочнополостных не сообщалось. Имеются сведения об обнаружении кислоты (24 : 5) неустановленного строения в липидах креветки *Penaeus japonicus* [8] и в мембранах фоторецепторных клеток сетчатки быка [9]. Незначительные количества кислоты (24 : 5ω6), обнаруженные при помощи хроматомасс-спектрометрии, отмечены в липидах сперматозоидов свиньи [5].

Экспериментальная часть

Работа была выполнена на борту научно-исследовательского судна «Академик Опарин» во время 7-го рейса (июнь — ноябрь 1988 г.) Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО АН СССР. Образцы

горгонарии *P. arborea* были взяты при помощи драги в различных частях Охотского моря, образцы мягкого коралла *G. rubiformis* были собраны при помощи легководолазной техники в Авачинской губе Берингова моря. Образцы непродолжительное время сохраняли при -30°C , после чего липиды экстрагировали по методу [10], метиловые эфиры получали переэтерификацией по методу [11] и для ГЖХ очищали тонкослойной хроматографией на силикагеле в бензоле. Для препаративного выделения метиловые эфиры очищали колоночной хроматографией на силикагеле (элюция смесью гексан — эфир, 99 : 1). Полученные метиловые эфиры жирных кислот далее разделяли на колонке с силикагелем, импрегнированным 20% нитрата серебра. Насыщенные, моно- и диеновые кислоты элюировали бензолом, а фракции, обогащенные полиеновыми кислотами, — эфиром. На этой стадии чистота целевого продукта достигала 80% с примесями кислот (20 : 4w6 и 18 : 4w3). Дальнейшую очистку проводили препаративной обращенно-фазовой ТСХ [12]. Таким образом было выделено 10 мг ТПК из горгонарии *P. arborea* и 9 мг из мягкого коралла *G. rubiformis*. Чистота ТПК была выше 99%. Каталитическое гидрирование проводили над окисью платины по методу [13]. Пирролидиды жирных кислот получали по методу [6].

Физико-химические методы исследования. Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили на газожидкостном хроматографе Sigma 2000 (Perkin — Elmer, США) с системой обработки данных Chromatorak C-R3A (Shimadzu, Япония). Колонки капиллярные кварцевые (0,25 мм×25 м) OV-101 (иммобилизованная, Shimadzu, Япония) и Silag-5CP. Температуры разделения 230 и 190°С соответственно. Газ-носитель — гелий, делитель потока 1 : 60. Идентификацию метиловых эфиров проводили при помощи стандартных смесей жирных кислот, по эквивалентной длине цепи (углеродные числа) [2], а также хроматомасс-спектрометрией (прибор LKB-2901 с хроматографом Packard-438A, колонка капиллярная кварцевая (0,31 мм×25 м), иммобилизованная фаза SE-54, температуру программировали со 160 до 200°С, 1°С в 1 мин).

Масс-спектр пирролидиды исследуемой кислоты был получен путем прямого ввода образца, температура камеры 100—160°С, энергия электронного удара 70 эВ.

Инфракрасные спектры снимали на приборе G-983 (Perkin — Elmer, США) в хлороформе, УФ-спектр — на приборе UV-3000 (Shimadzu, Япония) в этаноле.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Высоцкий М. В., Светашев В. И. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 8. С. 1133—1136.
2. Ackman R. G., Eaton C. A. // Fette, Seifen, Anstrichmittel. 1978. V. 80. № 1. P. 21—37.
3. Patton G. M., Cann S., Brunengraber H., Lowenstein J. M. // Methods Enzymol. 1981. V. 72. P. 8—20.
4. Gillan F. T. // J. Chromatogr. Sci. 1978. V. 21. P. 293—297.
5. Poulos A., Sharp P., Johnson D., White I., Fellenberg A. // Biochem. J. 1986. V. 240. № 3. P. 891—895.
6. Andersson B. A., Holman R. T. // Lipids. 1974. V. 9. № 3. P. 185—190.
7. Andersson B. A., Christie W. W., Holman R. T. // Lipids. 1975. V. 10. № 4. P. 215—219.
8. Guaru J.-C., Kayama M., Murakami Y. // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1974. V. 40. № 10. P. 1027—1032.
9. Andersson R. E., Feldman G. L., Feldman L. S. // Biochim. et biophys. acta. 1970. V. 202. № 2. P. 367—373.
10. Bligh E. G., Dyer W. J. // Can. J. Biochem. and Physiol. 1959. V. 37. № 8. P. 911—917.
11. Carreau J. P., Dubacq J. P. // J. Chromatogr. 1978. V. 151. № 3. P. 384—390.
12. Svetashev V. I., Zhukova N. V. // J. Chromatogr. 1985. V. 330. № 2. P. 396—399.
13. Appelquist L. // J. Lipid Res. 1972. V. 13. № 1. P. 146—148.

Поступила в редакцию
26.V.1989

M. V. VYSOTSKY, A. A. POPKOV, V. I. SVETASHEV
TETRACOSAPENTAENOIC (24:5 ω 6) ACID IN LIPIDS OF SOME
MARINE COELENTERATES

*Institute of Marine Biology, Far-Eastern Division of Academy of Sciences
of the USSR, Vladivostok*

A tetracosapentaenoic acid was detected in lipids of gorgonarian *Paragorgia arbo-rea* and soft coral *Gersemia rubiformis*. Its structure was determined by means of chemical and spectral methods (hydrogenation, UV-, IR- and mass-spectrometry) as *all-cis*-6,9,12,15,18-tetracosapentaenoic acid. The acid was also found in various gorgonarians and soft corals, both northern and tropical. The total lipids of these coelenterates may contain up to 14% of this acid.