

*Бородин Н.Д., Данилов Д.А., Киселева Д.В., Шиловский О.П*

## **ЖИРОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ФОССИЛИЙ ИЗ ПЕРМСКИХ ОТЛОЖЕНИЙ МЕТОДОМ ГХ/МС**

*Аннотация.* Статья посвящена исследованию жирокислотного состава ихнофоссилии (предположительно яйцо парарептилии) из Котельничского местонахождения парейазавров методом ГХ/МС. Был установлен жирокислотный профиль ихнофоссилии и проведено сравнение с жирокислотным составом яиц современных яйцекладущих животных.

*Ключевые слова:* ГХ/МС, ихнофоссилии, Котельничское местонахождение парейазавров, Жирокислотный состав.

*Abstract.* The article is devoted to the study of the fat-acid composition of ichnofossils (supposedly, parareptile eggs) from the Kotelnichsky location of pareiasaurs by GC/MS. The fatty acid composition of ichnofossils was established and compared with the fatty acid composition of eggs of modern oviparous animals.

*Keywords:* GC/MS, ichnofossil, Kotelnichsky location of pareiasaurs, Fatty acid composition.

### **Введение**

Фоссилии представляют собой ископаемые остатки древних организмов, или следы их жизнедеятельности. Исследование фоссилий может предоставить много информации об организмах эпохи своего образования, указать на особенности строения, эволюционного развития организмов. При этом процессам fossilization подвергается ничтожная часть вымерших растений и животных. Как правило, их останки либо поедаются другими животными, либо разлагаются под воздействием грибков и бактерий.

Ихнофоссилии – представляют собой следы жизнедеятельности древних организмов, которые чаще всего сохраняются во вмещающих осадочных породах в виде биогенных структур, таких как следы/отпечатки лап, отпечатки беспозвоночных, зубные отметины, яйца и яичная скорлупа, окаменевшие фекалии (копролиты) и др. [Seilacher, 2007], являясь результатом непосредственного взаимодействия организмов и внешней среды. Чаще всего они сохраняются в виде отпечатков, реже в виде слабообъёмных образований.

Так как фоссилии могут нести в себе органические вещества [Dawid Surmik et al., 2016], то изучение дошедших до наших дней органических веществ в ископаемых образцах фоссилий может указать происхождение и эволюцию организмов.

Исследование ископаемых яиц позволяет получить больше информации о строении яиц древних яйцекладущих, пищевых предпочтениях этих животных. В

яйце жирные кислоты служат для создания клеточных мембран, обеспечения эмбриона энергией и развития его тканей. Изучение жирокислотного состава яйца может помочь установить его родственные связи с современными представителями яйцекладущих животных.

Котельничское местонахождение парейазавров – на данный момент одно из крупнейших в мире местонахождений первых парейазавров (Pareiasauridae). Вследствие уникальных тафономических условий, геохимических условий fossilization до наших дней доходит большое число хорошо сохранившихся скелетов, копролитов и других fossil. Кроме целых скелетов и их фрагментов, в терригенных отложениях северодвинского яруса на правом берегу реки Вятки неоднократно находились различные образцы ихнофossil. Природа образования этих fossil пока что до конца не ясна, что приводило исследователей к разнообразной идентификации собранного материала [Шиловский и др., 2020]. Определение жирокислотного состава методом ГХ/МС и конфигурации содержания липидов в образце fossil (предположительно яйца парарептилии) из котельничского местонахождения парейазавров позволит установить природу жирных кислот, принадлежащих образцу, а также определить его близость к современным животным. Что в свою очередь поможет отнести эту fossil к той, или иной группе ископаемых животных.

### **Образцы и методика эксперимента**

#### **– Оборудование**

Анализ выполнялся при помощи газового хроматографа Perkin Elmer Clarus 600 с масс-спектрометром Perkin Elmer Clarus 600T (рис. 1), капиллярная колонка Elite-5MS 30 м×250 мкм, лайнер с внутренним диаметром 4 мм, в режиме бесбросового ввода образцов. Температура инжектора составляла 200°C с фазой испарения равной 1 мин. По программе температура термостата изменялась от 30 °C до 300 °C с последующим изотермическим периодом, составившим 10 мин. Масс-спектрометр работал в режиме ионизации электронным ударом (70 эВ). Диапазон регистрации масс-спектров по величине  $m/z$  составил от 35 до 400 Да. Идентификация пиков проведена с использованием встроенной библиотеки масс-спектров и литературных источников, а также собственной интерпретации масс-спектров.



Рисунок 1 – Газовый хроматограф Perkin Elmer Clarus 600 и масс-спектрометр Perkin Elmer Clarus 600Т

– Пробоподготовка

Для выполнения анализа был взят образец ихнофоссилии (предположительно, фрагмент окаменевшего яйца парарептилии) найденный в отложениях северодвинского яруса местонахождений пермских тетрапод на р. Вятка под г. Котельнич (Котельничское местонахождение парейазавров, Ванюшонковская пачка, Кировская обл.) (рис. 2).

Перед анализом выделили пять точек (две точки в области вмещающей породы, одна точка на границе между включением фоссилии и вмещающей породы и ещё две в образце включения), в выбранных точках исследуемый образец был просверлен (диаметр отверстий 1,2 мм). Полученный при этом материал был взят для дальнейшего анализа.



Рисунок 2 – Исследуемый образец ихнофоссилии (1)

Для экстракции жирных кислот (ЖК) из навесок к ним прилили 1 см<sup>3</sup> смеси хлороформ-метанол (2:1). Растворитель отогнали в потоке азота, а к сухому остатку прилили 1 см<sup>3</sup> кислого метанола, для лучшего протекания реакции метилирования пробы поместили в ультразвуковую ванну на 20 мин. Образцы были центрифугированы в течение 10 минут при 3000 об/мин. Раствор был отделен, после чего растворитель отогнали в потоке азота. Полученный экстракт растворили в ацетонитриле. После чего экстракт был подвергнут дериватизации при помощи N,N-диметил-формаид диметил ацеталь (ДМФ-ДМА) для более полного метилирования ЖК.

## Результаты и обсуждение

Переход от полностью водного образа потомками лопастепёрых рыб к наземному положил начало развитию надклассу четвероногих (Tetrapoda). В свою очередь в надклассе тчетвероногих рассматривают два класса: амниот (рептиломорфов) и амфибий (земноводных). В классе амниот рассматривают две клады: завропсид (рептилий) и синапсид (включающих млекопитающих). На основании современных представлений о эволюционном развитии завропсид можно предположить, что ЖК-профиль ихнофоссилии должен быть ближе к ЖК-профилям яиц современных рептилий, чем к ЖК-профилям икры земноводных.

Метод ГХ/МС позволяет установить жирокислотный состав исследуемых объектов, однако при определении жирокислотного профиля невозможно установить к какому классу липидов относились найденные жирные кислоты. В данном исследовании рассматривались три возможных источника жирных кислот: триглицериды, фосфолипиды и свободные жирные кислоты. Триглицериды представляют собой большую часть липидов, входящих в состав желтков яиц современных животных, они служат для создания энергетического запаса эмбриона, а также входят в состав клеточной мембраны. Фосфолипиды – главный компонент клеточных мембран обеспечивают текучие и пластические свойства мембран клеток и клеточных органелл.

ГХ/МС анализ установил наличие шести насыщенных жирных кислот с линейной цепью. ЖК-профиль ихнофоссилии оказался близок к яйцам современных яйцекладущих животных. Аналогично яйцам современных яйцекладущих, преобладающей насыщенной жирной кислотой в ихнофоссилии является пальмитиновая. При этом холостые определения не имели значительного влияния.

Было установлено, что интенсивность пиков искомым жирных кислот, увеличивалась по мере приближения к включению ихнофоссилии (рис. 3), при этом ЖК-профиль значительно не изменяется (отношение пальмитиновой кислоты к стеариновой (P/S) составило 3.0). Из чего можно сделать вывод о том, что эти жирные кислоты относятся к исследуемому включению. Они могли попасть в породу при нарушении целостности яйца в процессе фоссилизации, а в дальнейшем диффундировать в породу на большую глубину, а разница в жирокислотном составе может быть вызвана различными условиями фоссилизации в породу и ихнофоссилии, а также небольшим количеством ЖК из окружающей среды (растения, почвенные организмы и т.д.).

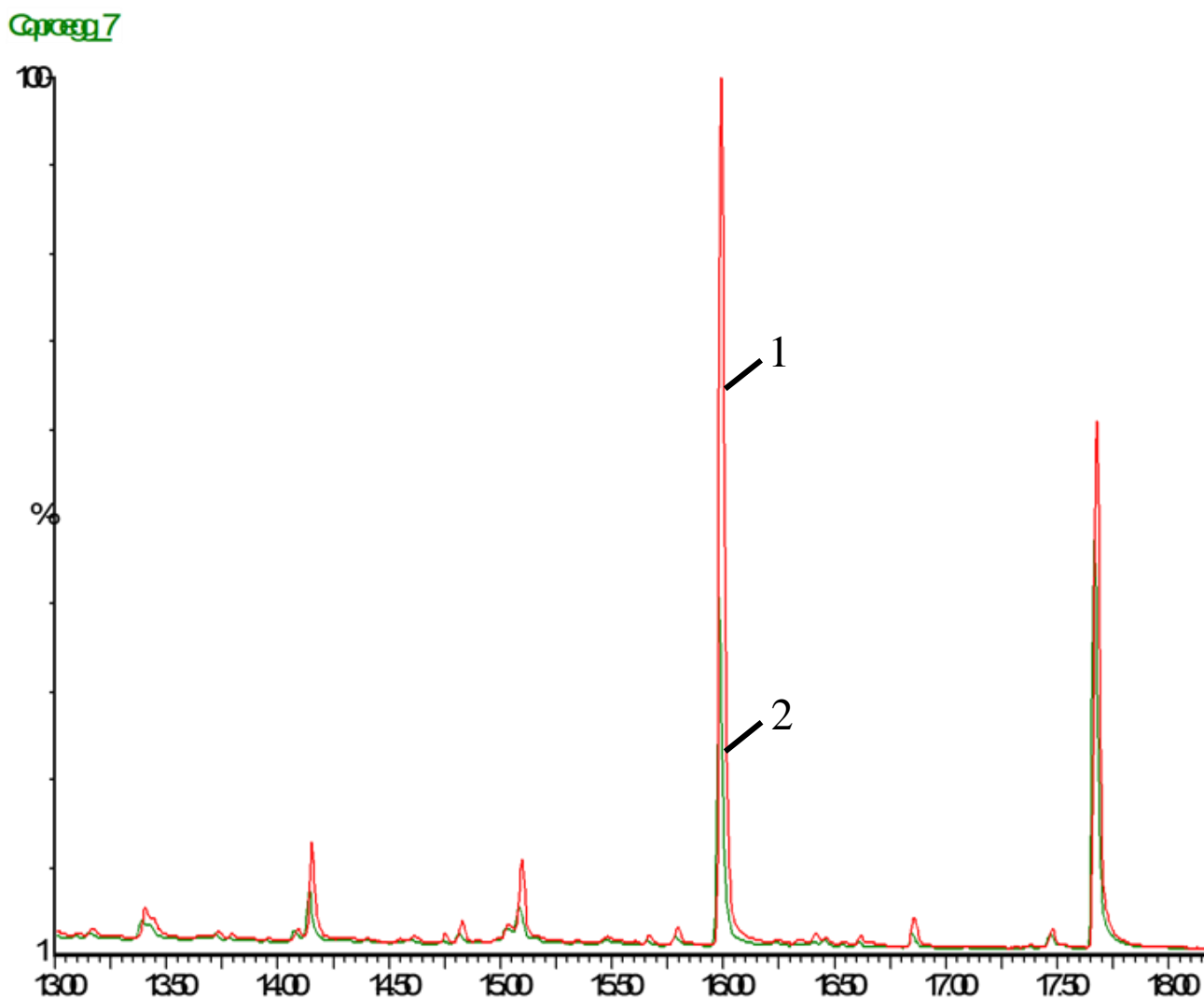


Рисунок 3. Пики пальмитиновой (С16) и стеариновой (С18) кислот в образце ихнофоссилии (1) и породе (2)

Таблица 1 – Жирокислотный состав ихнофоссилии, вмещающей породы и желтков яиц современных животных.

Образец	C14	C15	C16	C17	C18	C20	P/S
Ихнофоссилия	9.5	5.9	63.3	1.8	18.6	0.9	3.4
Порода	8.7	6.1	61.6	1.8	20.7	0.9	3.0
Курица Gallus gallus	-	-	23.51	-	7.7	-	3.05
Индейка Meleagris gallopavo	-	-	25.27	-	7.96	-	3.18

Аллигатор Alligator mississippiensis	-	-	26.53	-	5.90	-	4.5
Заборная игуана Sceloporus jarrovi	-	-	16.86	-	2.54	-	6.64
Восточный трехлинейный сцинк Bassiana duperreui	1.75	-	18.24	-	5.66	-	3.22
Балканская черепаха Testudo hermanni	0.92	0.06	13.84	0.05	3.63	0.06	3.81
Нильский крокодил Crocodylus niloticus	3.84	1	28.28	0.98	8.62	0.2	3.28
Песочная жаба Bufo arenarum	1.49	-	28.94	-	14.96	-	1.94

Из таблицы видно, что исследуемый образец ихнофоссилии по жирокислотному составу близок к желткам яиц современных яйцекладущих рептилий. Менее всего образец схож с икрой жабы и яйцами птиц, что может являться ещё одним подтверждением гипотезы принадлежности данной ихнофоссилии к яйцам парарептилии.

### **Заключение**

В результате проведения исследования образца ихнофоссилии установили наличие шести насыщенных жирные кислоты с линейной цепью. Обнаружили близость жирокислотного состава исследуемого образца к яйцам современных яйцекладущих животных.

### **Библиографический список**

1. Шиловский О. П. Первая находка кладки ископаемых яиц пермских тетрапод Котельничского местонахождения, Кировская область / О. П. Шиловский, А. С. Бакаев, Д. В. Киселева // Металлогения древних и современных океанов. – 2020. – № 1. – С. 232–235.
2. Evaluation of different chemical compositions in eggs of the Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*) / M. Stvarnik, Z. Bajc, K. Sinigoj-Gacnik, A. Dovc // Slovenian Veterinary Research. – 2017. – Lit. 54, St. 1. – S. 11–20.
3. Noble R. C. Lipid and Fatty Acid Compositional Differences Between Eggs of Wild and Captive-Breeding Alligators (*Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo*, *Alligator mississippiensis*, *Sceloporus jarrovi*): An Association with Reduced Hatchability? /

- R. C. Noble, R. McCartney, M. W. J. Ferguson // *Journal Zoology*. – 1993. – Vol. 230. – P. 639–649.
4. Comparison of the Lipid Composition of Three Adipose Tissue Types of Male and Female Wild Nile Crocodiles (*Crocodylus niloticus*) / G. Osthoff, A. Hugo, D. Govender [et al.] // *Journal of Herpetology*. – 2014. – Vol. 48, Iss. 4. – P. 525–531.
  5. Speake B. K. Lipid composition of eggs of an oviparous lizard (*Bassiana duperreyi*) / B. K. Speake, M. B. Thompson, R. J. McCartney // *Lipids*. – 1999. – Vol. 34, Iss. 11. – P. 1207–1210.
  6. Buschiazzo J. Detailed Lipid Analysis of Yolk Platelets of Amphibian (*Bufo arenarum*) Oocytes / J. Buschiazzo, A. Bruzzone, T. S. Alonso. – DOI 10.1002/JEZ.A.10252 // *Journal of Experimental Zoology*. – 2003. – 1 June, Part A : Comparative experimental biology. – P. 37.
  7. Spectroscopic studies on organic matter from Triassic reptile bones, Upper Silesia, Poland. / D. Surmik, A. Boczarowski, K. Balin [et al.] // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – P. e0151143.
  8. Seilacher A. *Trace Fossil Analysis* / A. Seilacher. – Berlin : Springer, 2007. – XIII, 226 p. – ISBN 978-3-540-47225-4.