



УДК 547.567

МЕНАХИНОНЫ *ACTINOMYCES OLIVACEUS*: СТРУКТУРА  
МК-9(H<sub>6</sub>), МК-9(H<sub>8</sub>), МК-8(H<sub>6</sub>) и МК-8(H<sub>8</sub>)*Ватраков С. Г., Панюсян А. Г., Розынов В. В.,  
Копова И. В., Бергельсон Л. Д.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва;**Институт микробиологии Академии наук СССР, Москва*

В липидном экстракте клеток *Actinomyces olivaceus* обнаружены менахиноны (витамины группы К), составляющие ~ 1,5% суммы липидов или 0,05% веса сухой биомассы. Хроматографическими методами, а также при помощи масс-спектрометрии установлено, что основными компонентами менахиноновой фракции являются МК-9(II-H<sub>2</sub>)\*, МК-9(II, III-H<sub>4</sub>), МК-9(II, III, IX-H<sub>6</sub>), МК-9(II, III, VIII, IX-H<sub>8</sub>), МК-8(II-H<sub>2</sub>), МК-8(II, III-H<sub>4</sub>), МК-8(II, III, VIII-H<sub>6</sub>) и МК-8(II, III, VII, VIII-H<sub>8</sub>), которые содержатся в количественном соотношении 2 : 10 : 78 : 70 : 1 : 2 : 8 : 3; в качестве минорных компонентов присутствуют низшие изопренологи (МК-5, МК-6 и МК-7). На основании данных масс-спектрометрии определено строение ранее неохарактеризованных менахинонов МК-9(II, III, IX-H<sub>6</sub>), МК-9(II, III, VIII, IX-H<sub>8</sub>), а также впервые выделенных МК-8(II, III, VIII-H<sub>6</sub>) и МК-8(II, III, VII, VIII-H<sub>8</sub>).

При исследовании липидов штамма *Actinomyces olivaceus*\*\*, продуцента витамина В<sub>12</sub>, мы обнаружили в их составе относительно высокое содержание менахинонов (витаминов группы К). В настоящем сообщении описывается выделение и фракционирование комплексов менахинонов, а также идентификация входящих в него компонентов.

Суммарные липиды актиномицета экстрагировали из лиофильного высушенного мицелия смесями хлороформа с метанолом (2 : 1 и 1 : 1), липидные примеси удаляли гель-фильтрацией на сефадексе G-25 [2] и полученную таким образом очищенную сумму липидов подвергали ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой по методу Раузера и сотр. [3]. Фракцию нейтральных липидов, элюированную смесью хлороформ — метанол (9 : 1) и состоящую из углеводов, менахинонов, ди- и триглицеридов, рехроматографировали на колонке с силикагелем. Смесями петролейного эфира с эфиром элюировали фракцию менахинонов, составлявшую по весу около 1,5% суммы липидов или 0,05% веса сухой биомассы.

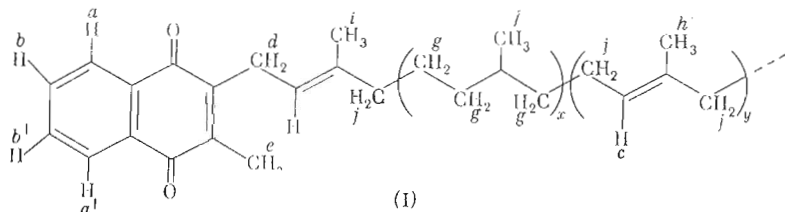
Принадлежность указанной фракции к классу менахинонов установлена на основании спектральных данных. В УФ-спектре фракции при-

\* Согласно рекомендации ИЮПАК — ИЮБ [1], менахиноны обозначаются символом МК-*n* (*m*-H<sub>*k*</sub>), где МК означает принадлежность соединения к классу менахинонов, *n* — число изопреновых, в том числе гидрированных, звеньев в углеводородной цепи менахинона, *m* — положение гидризопреновых звеньев относительно хиноновой группировки (римскими цифрами), *k* — число гидризопреновых звеньев, умноженное на 2.

\*\* Из коллекции Института микробиологии АН СССР.

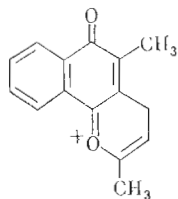
существуют характерные для менахинонов [4—9] максимумы поглощения при 244 ( $\epsilon^* 17\ 400$ ), 249 ( $\epsilon 17\ 700$ ), 264 ( $\epsilon 17\ 500$ ), 270 ( $\epsilon 17\ 300$ ), 325 ( $\epsilon 2900$ ) нм. ИК-спектр содержит полосы валентных колебаний карбонильных групп ( $1662\text{ см}^{-1}$ ) и двойной связи ( $1620\text{ см}^{-1}$ ) нафтохинонового ядра, ароматических  $\text{C}=\text{C}$ -связей ( $1598, 1500, 1450\text{ см}^{-1}$ ), связей  $\text{C}-\text{H}$  метильных ( $2962, 2872\text{ см}^{-1}$ ) и метиленовых ( $2928, 2853\text{ см}^{-1}$ ) групп, внеплоскостных деформационных колебаний  $\text{C}-\text{H}$ -связей двузамещенного бензольного ядра ( $737\text{ см}^{-1}$ ) (ср. [7]).

В спектре ПМР (см. формулу 1; ср. [5, 7, 8, 10]) менахиноновой фракции в области слабого поля имеются два двухпротонных квадруплета, один из которых отвечает ароматическим протонам ( $a$ ) и ( $a'$ ) —  $\delta 8,02$  м. д.,  $J_{ab} = J_{a'b'} = 6$  Гц,  $J_{ab'} = J_{a'b} = 3$  Гц



а другой — ароматическим протонам ( $b$ ) и ( $b'$ ) —  $\delta 7,62$  м. д.,  $J_{bb'} = J_{bb'} = 6$  Гц,  $J_{ba'} = J_{b'a} = 3$  Гц. Мультиплетный сигнал ( $\sim 6\text{H}$ ) в более сильном поле ( $\delta 5,06$  м. д.) соответствует винильным протонам ( $c$ ) алифатической цепи. Двухпротонный дублет при  $\delta 3,24$  м. д. ( $J = 7$  Гц) свидетельствует о наличии в молекулах менахинонов метиленовой группы ( $d$ ) типа  $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$ , расположенной при хиноновом цикле, а трехпротонный синглет при  $\delta 2,16$  м. д. — о наличии метильной группы ( $e$ ), связанной с тем же циклом. В области сильного поля спектра присутствует дублетный сигнал ( $\sim 12\text{H}$ ) от протонов ( $f$ ) метильных групп, присоединенных к насыщенным  $\text{C}$ -атомам ( $\delta 0,87$  м. д.,  $J = 6,5$  Гц); мультиплет при  $1,26$  м. д. принадлежит  $\text{CH}_2$ -группам ( $g$ ), также находящимся в окружении насыщенных атомов углерода. Остальными элементами спектра ПМР являются: синглетные сигналы от протонов ( $h$ )  $\text{CH}_3$ -групп при *транс*- и *цис*-олефиновых связях ( $\delta 1,58$  и  $1,66$  м. д. соответственно), трехпротонный синглет от протонов ( $i$ ) метильной группы при двойной связи, расположенной вблизи хинонового цикла ( $\delta 1,77$  м. д.), и мультиплет при  $\delta 1,98$  м. д. от протонов ( $j$ ) метиленовых групп при двойных связях.

В масс-спектре менахиноновой фракции максимальную интенсивность имеет пик при  $m/e 225$ , соответствующий иону А.



А,  $m/e 225$

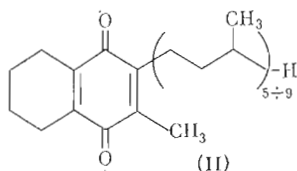
Интенсивное образование этого иона характерно для масс-спектров менахинонов [6—9, 11].

На основании описанных выше результатов можно сделать вывод, что по крайней мере основные компоненты менахиноновой фракции имеют частично гидрированную изопреноидную цепь. Об этом свидетельствует,

\* Значения  $\epsilon$  даны в расчете на средний молекулярный вес фракции — 790.

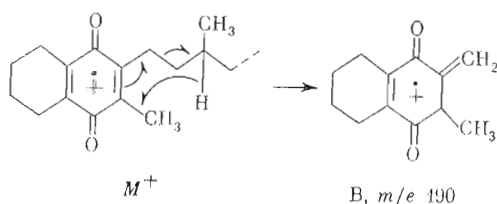
во-первых, высокая интенсивность в спектре ПМР сигналов от протонов метильных (*f*) и метиленовых (*g*) групп, связанных с насыщенными атомами углерода, а также относительно низкая интенсивность сигналов от винильных протонов (*c*). Во-вторых, в масс-спектре фракции в области наибольших массовых чисел самые интенсивные пики отвечают, судя по значениям *m/e*, молекулярным ионам менахинонов: МК-9 ( $H_8$ ) — *m/e* 792, МК-9( $H_6$ ) — *m/e* 790, МК-9( $H_4$ ) — *m/e* 788, МК-9( $H_2$ ) — *m/e* 786, МК-8( $H_5$ ) — *m/e* 724, МК-8( $H_6$ ) — *m/e* 722, МК-8( $H_4$ ) — *m/e* 720, МК-8( $H_3$ ) — *m/e* 718.

Для более детального изучения состава фракции менахинонов мы подвергли ее каталитическому гидрированию над палладием. Вопреки имеющимся в литературе сведениям [5], при гидрировании в избранных нами условиях происходило не только насыщение изопреноидной цепи, но и частичное насыщение ароматического ядра. Об этом говорит спектр ПМР гидрированных менахинонов (II)



в котором отсутствуют сигналы от ароматических протонов (*a*, *a'*, *e*, *e'*), а также данные УФ-, ИК- и масс-спектров. УФ-спектр гидрированной менахиноновой фракции содержит только три максимума поглощения:  $\lambda_{\text{макс}}$  259 ( $\epsilon$  19 600), 265 ( $\epsilon$  19 000) и 329 нм ( $\epsilon$  200), отвечающие тетраалкилзамещенному бензохиноновому хромофору [12]. В ИК-спектре не наблюдалось полос поглощения, связанных с колебаниями ароматической системы (около 1600, 1500, 730—770  $\text{см}^{-1}$ ). В масс-спектрах бензохиноновых производных (II) отсутствовал пик иона А и максимальным по интенсивности был пик иона с *m/e* 190 (В), который, вероятно, образуется по типу перегруппировки Мак-Лафферти (схема 1).

С х е м а 1



Данные ГЖХ-масс-спектрометрии гидрированной смеси менахинонов указывают на наличие в ней двух основных компонентов — соединений с 9 и 8 гидроизопреновыми звеньями ( $M^+$ : *m/e* 806 и 736 соответственно) в соотношении 92 : 8. В виде следов обнаружены низшие изопренологи с 7,6 и 5 гидроизопреновыми единицами ( $M^+$ : *m/e* 666, 596 и 526 соответственно).

Фракция менахинонов была подвергнута также субфракционированию при помощи ТСХ на силикагеле, импрегнированном нитратом серебра [13]. Было получено пять фракций, компоненты которых идентифицировали при помощи масс-спектров [6—9, 11], а для определения количественного соотношения компонентов фракции гидрировали и анализировали методом ГЖХ. Первая фракция (фракции рассматриваются в порядке увеличения хроматографической подвижности, см. «Экспериментальную часть») представляла собой смесь (2 : 1) МК-9 ( $H_8$ ) ( $M^+$ : *m/e* 786) и МК-8 ( $H_5$ ) ( $M^+$ : *m/e* 718), вторая содержала МК-9 ( $H_4$ ) ( $M^+$ : *m/e* 788) и МК-8

Масс-спектры менахинонов МК-9, МК-9 (II, III-H<sub>4</sub>), МК-9 (II, III, IX-H<sub>6</sub>), МК-9 (II, III, VIII, IX-H<sub>8</sub>), МК-8 (II, III, VIII-H<sub>6</sub>) и МК-8 (II, III, VII, VIII-H<sub>8</sub>) (приведены *m/e*, в скобках Готт, %)

Тип иона	МК-9 [9]*	МК-9 (II, III-H <sub>4</sub> ) [9]	МК-9 (II, III, IX-H <sub>6</sub> )	МК-9 (II, III, VIII, IX-H <sub>8</sub> )	МК-8 (II, III, VIII-H <sub>6</sub> )	МК-8 (II, III, VII, VIII-H <sub>8</sub> )
<i>M</i> <sup>+</sup>	784(23,6)	788(14,6)	790(31,4)	792(39,8)	722(37,2)	724(38,5)
<i>M</i> — Me <sup>+</sup>	769(3,0)	773(3,2)	775(3,2)	777(3,2)	707(3,9)	709(4,4)
<i>M</i> — R	715, 716(2,0)	719, 720(1,3)	— —	— —	— —	— —
<i>M</i> — 2·R	648, 649(1,8)	651, 652(1,6)	651(1,5)	— —	583(3,0)	— —
<i>M</i> — 3·R	579, 580(3,0)	583, 584(2,5)	583(2,4)	583(3,2)	515(2,6)	515(3,9)
<i>M</i> — 4·R	512(3,1)	515, 516(2,9)	515(2,1)	514(1,7)	447(2,2)	447(2,6)
7·R	476(1,3)	— —	— —	— —	— —	— —
<i>M</i> — 5·R	443—445 (11,2)	446—450 (3,8)	447(1,7)	447(2,2)	— —	— —
6·R	407, 408(4,4)	— —	— —	— —	— —	— —
<i>M</i> — 6·R	375, 376 (11,5)	— —	— —	— —	— —	— —
5·R	339—341 (13,5)	340, 341(3,5)	342(1,4)	344(2,9)	— —	— —
<i>M</i> — 7·R	307, 308 (19,9)	— —	— —	— —	— —	— —
4·R	272(5,2)	271—273 (6,4)	274(1,3)	276(4,3)	274(2,2)	276(2,9)
<i>M</i> — 8·R	240(11,5)	— —	— —	— —	— —	— —
A	225(100)	225(100)	225(100)	225(100)	225(100)	225(100)
3·R	226(18)	226(19,2)	226(38)	226(19,6)	226(24)	226(21)
			207(2,8)	209(1,3)	206(3,5)	209(3,3)
			187(13,6)	187(38)	187(17,4)	187(24)
	186(33)	186(32)	186(6,8)	186(20)	186(8,9)	186(11)
	149(21)	149(12)	149(4,1)	149(9,7)	149(6,2)	149(6,1)
	137(27)	137(21)	137(4,5)	137(11,6)	137(9,7)	137(10)
	135(42)	135(29)	135(8,2)	135(6,2)	135(7,0)	135(8,0)
	123(17)	123(19,4)	123(7,3)	123(20)	123(10)	123(12)
	121(25)	121(16)	121(7,3)	121(16)	121(8,8)	121(13)

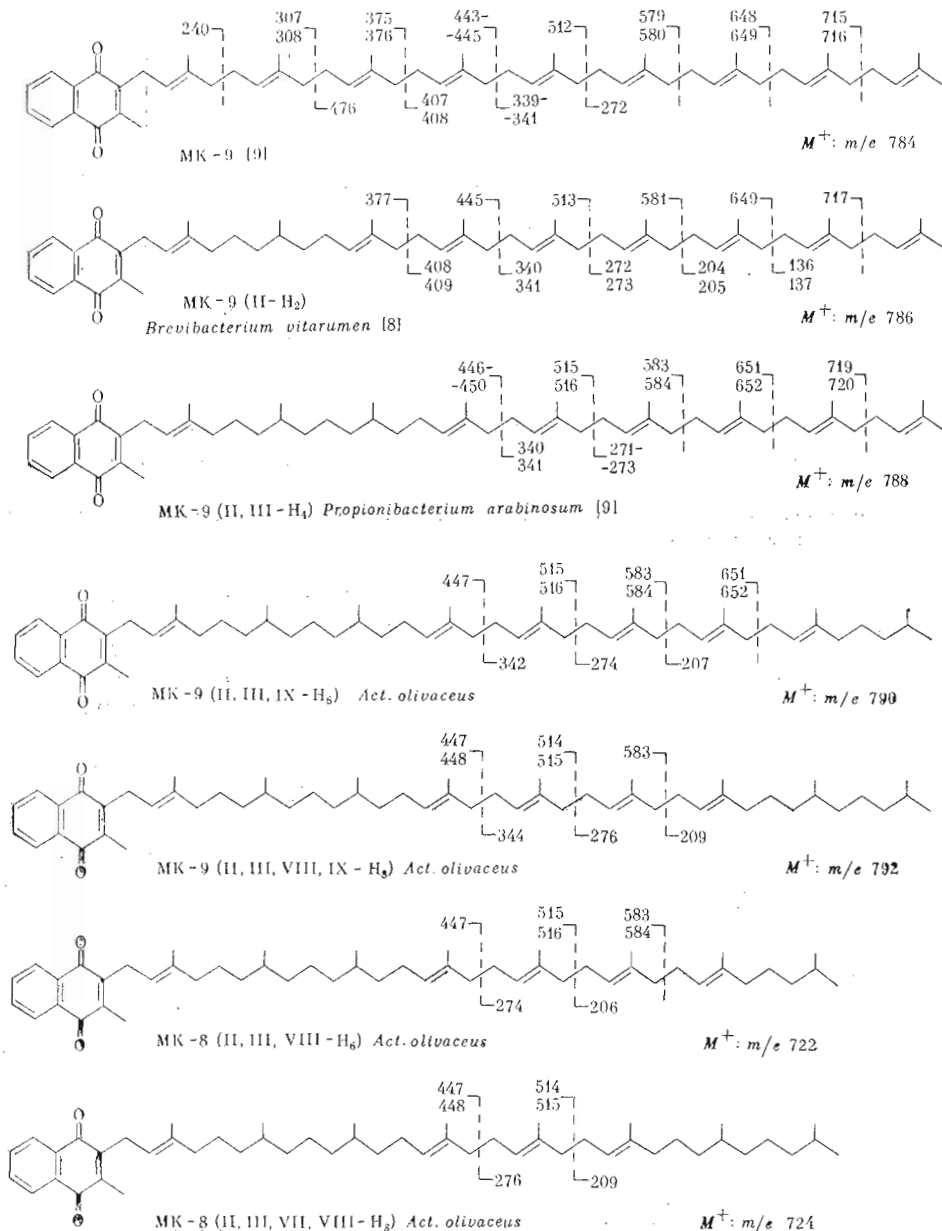
\* В цитируемой работе [9] не уточняется, для какого именно пика из приводимых групп пиков указана интенсивность.

(H<sub>4</sub>) (*M*<sup>+</sup> : *m/e* 720) в соотношении 5 : 1; третья — МК-9 (H<sub>6</sub>) (*M*<sup>+</sup> : *m/e* 790) и МК-8 (H<sub>6</sub>) (*M*<sup>+</sup> : *m/e* 722), количества которых относились как ~ 10 : 1; в четвертой основным компонентом был МК-9 (H<sub>8</sub>) (*M*<sup>+</sup> : *m/e* 792) и присутствовало ~ 3% МК-8 (H<sub>8</sub>) (*M*<sup>+</sup> : *m/e* 724); наиболее подвижная пятая фракция, по-видимому, состояла из вышеупомянутых низших изопренологов. Количественное соотношение основных компонентов — МК-9 (H<sub>2</sub>), МК-9 (H<sub>4</sub>), МК-9 (H<sub>6</sub>), МК-9 (H<sub>8</sub>), МК-8 (H<sub>2</sub>), МК-8 (H<sub>4</sub>), МК-8 (H<sub>6</sub>), МК-8 (H<sub>8</sub>) — определено как 2 : 10 : 78 : 70 : 1 : 2 : 8 : 3. В результате повторного хроматографирования фракций 3 и 4 удалось выделить индивидуальные менахиноны МК-9 (H<sub>6</sub>), МК-9 (H<sub>8</sub>), МК-8 (H<sub>6</sub>) и МК-8 (H<sub>8</sub>). Их строение было установлено на основании данных масс-спектрометрии.

В масс-спектрах перечисленных соединений (см. таблицу) содержатся интенсивные пики молекулярных ионов, значения *m/e* которых позволяют определить как размер углеводородной цепи менахинонов, т. е. общее число изопреновых звеньев, так и число гидрированных звеньев. Локализация последних вытекает из следующих данных. Как показали масс-спектры менахинонов МК-9 (II-H<sub>2</sub>) и МК-8 (II-H<sub>2</sub>) [8], МК-9 и МК-9 (II, III-H<sub>4</sub>) [9], расщепление углеводородных цепей соответствующих молекулярных ионов под электронным ударом происходит только по диаллильным связям (см. схему 2 и таблицу). Результатом такого разрыва является возникновение двух групп ионов: первая — [*M* — *p*·R]<sup>+</sup>, [*M* — *p*·R — 1]<sup>+</sup> и [*M* — *p*·R — 2]<sup>+</sup>, где R = —CH<sub>2</sub>—CH = CMe—CH<sub>2</sub>—, *p* = 1, 2, 3... 8 — образуется при локализации заряда на хивонсодержащем фрагменте,

а вторая —  $[p \cdot R]^+$  — при локализации заряда на углеводородном фрагменте. Так, в масс-спектре МК-9 присутствует ряд пиков, отвечающих фрагментам, к которым приводит потери молекулярным ионом одной, двух, трех ... и т. д. до восьми изопреновых единиц. В спектре же МК-9 (II-H<sub>2</sub>) и МК-9 (II, III-H<sub>4</sub>) этот ряд начинается с ионов  $[M - R]^+$  и заканчивается фрагментами  $[M - 6 \cdot R]^+$  и  $[M - 5 \cdot R]^+$  соответственно. В масс-спектре полученного нами МК-9 (H<sub>6</sub>) картина несколько иная — указанный ряд ионов начинается с фрагмента  $[M - R - (R + 2)]^+$  и заканчивается ионом  $[M - 4 \cdot R - (R + 2)]^+$ . Отсюда следует, что молекула этого менахинона содержит терминальное гидроизопреновое звено, а два других гидрированных звена находятся в положении II и III. Этот вывод подтверждается присутствием в масс-спектрах пиков соответствующих

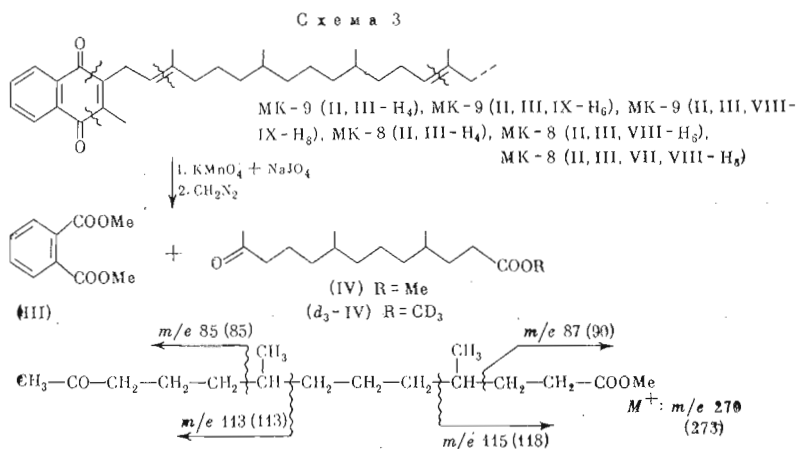
С х е м а 2



углеводородных ионов —  $[p \cdot R]^+$ , где  $p = 3, 4$  и  $5$  — и отсутствием пиков ионов того же типа с  $p = 2, 6, 7$  и  $8$ . Таким образом, выделенный нами менахион МК-9 ( $H_6$ ) представляет собой МК-9 (II, III, IX- $H_6$ ). Аналогичный подход к структурной идентификации трех остальных выделенных из *Act. olivaceus* менахинонов приводит к заключению, что они имеют строение МК-9 (II, III, VIII, IX- $H_8$ ), МК-8 (II, III, VIII- $H_6$ ), МК-8 (II, III, VII, VIII- $H_8$ ); данные, подтверждающие приведенные структуры, суммированы в таблице и на схеме 2.

Независимое доказательство смежного расположения двух дигидроизопреновых звеньев в середине углеводородной цепи молекул главных компонентов менахиноповой фракции получено в результате изучения продуктов ее периодат-перманганатного окисления (схема 3), которые анализировали в виде метиловых эфиров методом комбинированной ГЖХ-масс-спектрометрии. Были идентифицированы два основных продукта деградации. Более летучий при ГЖХ представлял собой диметил-*o*-фталат (III), образующийся при расщеплении нафтохиноновой группировки. Второй продукт идентифицирован как метиловый эфир 4,8-диметил-12-кетотридекановой кислоты (IV). Для дополнительного подтверждения структуры этой кислоты был измерен также масс-спектр ее дейтерометилового эфира ( $d_3$ -IV). В масс-спектре эфира (IV) имеется довольно интенсивный пик молекулярного иона с  $m/e$  270 (273; в скобках приведены значения  $m/e$  соответствующих ионов по масс-спектру дейтеропроизводного ( $d_3$ -IV)), а также пики ионов, образующихся из последнего путем потери  $Me^+$ ,  $m/e$  255 (258), молекулы  $H_2O$ ,  $m/e$  252 (255),  $MeCO^+$ ,  $m/e$  227 (230),  $MeCOCH_2^+$ ,  $m/e$  213 (216). Максимальным по интенсивности является пик иона  $MeC \equiv O^+$  с  $m/e$  43(43), что характерно для масс-спектров метилкетонов. Значительную интенсивность имеют также пики гомологов указанного иона с  $m/e$  57 (57) и 71(71), возникающих при разрыве  $\beta$ - и  $\gamma$ -связей по отношению к кетогруппе. В масс-спектре присутствуют пики ионов с  $m/e$  58(58) и 74 (77), образующихся в результате перегруппировки Мак-Лафферти: первый — с участием кетонного карбонила, второй — с участием сложноэфирной карбонильной группы. К серии фрагментов с  $m/e$  85 (85), 87 (90), 113 (113) и 115 (118) приводит расщепление углеводородной цепи молекулярного иона у C-атомов, связанных с боковыми метильными группами. Перечисленные значения  $m/e$  позволяют определить положение этих групп [14] (см. схему 3). Масс-спектр кетозэфира (IV) содержит также пики ионов, обычно наблюдаемых при масс-спектрометрии метиловых эфиров жирных кислот:  $[M - MeO]^+$  с  $m/e$  239 (239) и  $[M - ^\bullet CH_2COOMe]^+$  с  $m/e$  197 (197).

Менахиноны с частично гидрированной олигопребнильной цепью обнаружены ранее в микроорганизмах, принадлежащих к различным так-



сономическим группам: в микрококках [15], брeвибактериях [8], микробактериях [5, 6, 16, 17], коринебактериях [6, 17—19], пропионобактериях [9]; наиболее широкий спектр менахинонов такого рода содержат высшие формы актиномицетов [7, 19]. В настоящее время достаточно хорошо охарактеризовано строение МК-9 и МК-8 с одним насыщенным изопентановым звеном [6—8, 16], а также МК-9 с двумя дигидроизопреновыми звеньями [9]. Установлено, что они имеют структуру МК-9 (II-Н<sub>2</sub>), МК-8 (II-Н<sub>2</sub>) и МК-9 (II, III-Н<sub>4</sub>) соответственно. По-видимому, такую же структуру имеют менахиноны с одной и двумя гидроизопреновыми единицами, выделенные нами из *Act. olivaceus*. О строении менахинонов с более высокой степенью насыщенности ранее было известно только, что в молекуле МК-9 (Н<sub>6</sub>) углеводородная цепь оканчивается насыщенным изопентановым остатком [7]. Совершенно отсутствовали сведения о локализации дигидроизопреновых звеньев в МК-9 (Н<sub>8</sub>). Что же касается низших изопренологов — МК-8 (Н<sub>4</sub>) и МК-8(Н<sub>6</sub>), то их существование лишь предполагалось, но не было доказано [7]. Менахинон с восемью изопреновыми единицами, четыре из которых насыщены — МК-8(Н<sub>8</sub>) — обнаружен впервые нами и описан в настоящей работе.

### Экспериментальная часть

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Specord UV-VIS (Zeiss, ГДР) в гептане, ИК-спектры — на спектрографе UR-10 (Zeiss, ГДР) в пленке вещества, спектры ПМР — на приборе XL-100 (Varian, США) в ССl<sub>4</sub> при рабочей частоте 100 МГц с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта. Масс-спектры нативных менахинонов измеряли на хромато-масс-спектрометре ЛКВ 9000 (Швеция) при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и ускоряющем напряжении 3,5 кВ; исследуемые образцы вводили непосредственно в ионный источник. Комбинированную ГЖХ-масс-спектрометрию гидрированных менахинонов проводили на том же приборе. Для разделения смесей на компоненты использовали колонку (1000 × 2 мм) с 1,5% OV-1 на хромосорбе W (80—100 меш) при температуре 295°, газ-носитель — гелий (30 мл/мин). ГЖХ гидрированных менахинонов выполняли на хроматографе Pye Unicam-64, снабженном пламенно-ионизационным детектором и вышеуказанной колонкой, с программированием температуры (260 → 300°, 5 град/мин; далее режим изотермический — 300°), газ-носитель — аргон (50 мл/мин).

Выращивание культуры *Act. olivaceus*, экстракцию клеточных липидов и их очистку от нелипидных примесей проводили по ранее описанной методике [20].

**Выделение фракции менахинонов.** На колонку размером 3,5 × 40 см, заполненную DEAE-целлюлозой (Reanal, Венгрия) в ацетатной форме [3], наносили 1 г суммы липидов актиномицета в 10 мл смеси СНCl<sub>3</sub> — MeOH (9 : 1), 1,5 л той же смеси растворителей вымывали 350 мг фракции нейтральных липидов. Последнюю растворяли в 5 мл петролейного эфира и наносили на колонку с 25 г силикагеля КСК(100—150 меш), обработанного ранее описанным способом [20]. Колонку промывали 200 мл петролейного эфира, затем смесями петролейный эфир — эфир (10 : 0,5; 10 : 1, 10 : 2, 10 : 3 ... 10 : 10; по 200 мл). Собирали элюаты по 10 мл, которые анализировали при помощи ТСХ на пластинках (9 × 12 см) с силикагелем КСК (250—300 меш), приготовленных по методике [21]. Хроматограммы проявляли в следующих системах растворителей: циклогексан (а), гексан — эфир, 15 : 1 (б), гексан — эфир, 2 : 1 (в). Вещества на хроматограммах обнаруживали опрыскиванием 0,2% раствором морины в спирте (пятна наблюдали в УФ-свете), а также опрыскиванием 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с последующим нагреванием пластинок при ~ 200°. Фракция, элюированная петролейным эфиром, представляла собой углеводороды (38 мг), R<sub>f</sub> 0,8 в системе а; смесями петролейный эфир — эфир (10 : 1 и 10 : 2)

вымывались хроматографически чистые менахиноны (15 мг),  $R_f$  0,7 в системе б, смесями тех же растворителей (10 : 4 и 10 : 5) — триглицериды (260 мг),  $R_f$  0,8 в системе в, и смесями (10 : 7 и 10 : 8) — диглицериды (23 мг),  $R_f$  0,4 в системе в.

*Фракционирование суммы менахинонов.* Менахиноны фракционировали при помощи ТСХ на пластинках размером  $20 \times 20$  см с силикагелем КСК, содержащим 5%  $\text{AgNO}_3$  (ср. [13]); толщина слоя адсорбента  $\sim 0,4$  мм. Пластинки готовили по методике [21]. На каждую пластинку наносили по 20 мг смеси менахинонов. Хроматограммы проявляли в системе гексан — ацетон (85 : 15) и после высушивания в вакууме (50—70 мм, 20 мин) опрыскивали 0,1% раствором родамина 6G в спирте. Положение зон отдельных фракций отмечали в УФ-свете. Обнаружено 5 зон с  $R_f$  0,10 (фракция 1), 0,22 (2), 0,35 (3), 0,50 (4), 0,74 (5). Каждую из них удаляли с пластинки и элюировали смесью  $\text{CHCl}_3$ — $\text{MeOH}$  (3 : 1). Элюаты упаривали, остатки после упаривания распределяли в системе гексан — вода (2 : 1), из органических фаз после упаривания получали фракции менахинонов.

Основные в количественном отношении фракции — 3 и 4 — повторно хроматографировали в тех же условиях, но с двукратным проявлением в одном направлении (перед вторым проявлением хроматограммы сушили 15 мин в вакууме). На хроматограммах вышеописанным способом обнаруживали только одну зону. Из верхнего края зоны в случае фракции 3 получали индивидуальный МК-9 (II, III, IX-Н<sub>6</sub>), из нижнего — индивидуальный МК-8 (II, III, VIII-Н<sub>6</sub>). Аналогично из фракции (4) выделяли МК-9 (II, III, VIII, IX-Н<sub>8</sub>) и МК-8 (II, III, VII, VIII-Н<sub>8</sub>).

*Гидрирование менахинонов.* Раствор 1—3 мг суммы менахинонов или отдельной фракции в 1 мл гептана гидрировали над 5 мг  $\text{PdO}_2$  при 20—22° до полного прекращения поглощения водорода ( $\sim 1$  ч). Катализатор отфильтровывали, фильтр упаривали, получали смесь гидрированных менахинонов (II),  $R_f$  0,75 в системе б, которые анализировали методами ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии.

*Окисление менахиноновой фракции.* Смесь 20 мг суммы менахинонов, 0,5 мл 0,002 М раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2 мл окисляющей смеси (раствор 214 мг  $\text{NaJO}_4$  и 39,5 мг  $\text{KMnO}_4$  в 100 мл воды) и 1 мл воды встряхивали 12 ч при 20—22°, после чего добавляли безводный  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  до исчезновения окраски перманганата. Смесь подкисляли 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  до pH 1 и экстрагировали эфиром ( $5 \times 5$  мл). Объединенный экстракт обрабатывали избытком эфирного раствора  $\text{CH}_3\text{N}_2$ , упаривали, остаток анализировали при помощи комбинированной ГЖХ-масс-спектрометрии. Для разделения смеси применяли колонку ( $1500 \times 4$  мм) с 3% SE-30 на хромосорбе W (80—100 меш) при температуре  $80 \rightarrow 200^\circ$  (4 град/мин).

Для получения дейтерометилловых эфиров продуктов окисления вышеуказанный объединенный эфирный экстракт упаривали, остаток кипятили 5 ч с 1 мл раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в  $\text{CD}_3\text{OH}$ , по охлаждению смесь разбавляли 0,5 мл воды и экстрагировали гексаном ( $4 \times 2$  мл), экстракт промывали 1 мл воды, упаривали, остаток анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Commission on Biochemical Nomenclature IUPAC — IUB (1974) Arch. Biochem. Biophys., 165, 1—5.
2. Wuthier R. E. (1966) J. Lipid Res., 7, 558—561.
3. Rouser G., Kritchevsky G., Heller D., Lieber E. (1963) J. Amer. Oil Chem. Soc., 40, 425—454.
4. Morton R. A. (1965) Biochemistry of Quinones, Acad. Press, London, Chapter 2.
5. Gale P. H., Arison B. H., Trenner N. R., Page A. C., Folkers K. (1963) Biochemistry, 2, 200—203.
6. Campbell I. M., Bentley R. (1968) Biochemistry, 7, 3323—3327.
7. Phillips P. G., Dunphy P. J., Servis K. L., Brodie A. F. (1969) Biochemistry, 8, 2856—2861.
8. Kanzaki T., Sugiyama Y., Kitano K., Ashida Y., Imada J. (1974) Biochim. et biophys. acta, 348, 162—165.



9. Sone N. (1974) *J. Biochem.*, **76**, 133—136.
10. Frydman B., Rapoport H. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 823—825.
11. Di Mari S. J., Supple J. H., Rapoport H. (1966) *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 1226—1232.
12. Flaig H., Salfeld A., Baume H. (1958) *Liebigs Ann.*, **618**, 117—119.
13. Dunphy P. J., Phillips P. G., Brodic A. F. (1971) *J. Lipid Res.*, **12**, 442—449.
14. Ryhage R., Stenhagen E. (1963) *Mass Spectrometry of Organic Ions* (McLafferty F. W., ed.), pp. 399—452, Acad. Press, N. Y.—London.
15. Jeffries L., Cawthorne M. A., Harris M., Diplock A. T., Green J., Price S. A. (1967) *Nature*, **215**, 257—259.
16. Azerad R., Cyrot M.-O., Lederer E. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **27**, 249—252.
17. Beau S., Azerad R., Lederer E. (1966) *Bull. Soc. chim. biol.*, **48**, 569—581.
18. Scholes P. B., King H. K. (1965) *Biochem. J.*, **97**, 766—768.
19. Campbell I. M., Robins D. J., Kelsey M., Bentley R. (1971) *Biochemistry*, **10**, 3069—3078.
20. Batrakov S. G., Panosyan A. G., Konova I. V., Bergelson L. D. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **337**, 29—40.
21. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Воронкова В. В. (1961) *Докл. АН СССР*, **141**, 84—86.

Поступила в редакцию  
6.IV.1976

### MENAQUINONES OF *ACTINOMYCES OLIVACEUS*: ON THE STRUCTURES OF MK-9(H<sub>6</sub>), MK-9(H<sub>8</sub>), MK-8(H<sub>6</sub>) AND MK-8(H<sub>8</sub>)

BATRAKOV S. G., PANOSYAN A. G., ROSYNOV B. V.,  
KONOVA I. V., BERGELSON L. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, and Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Menaquinones (vitamins K) have been isolated from the *Actinomyces olivaceus* total lipids. This fraction accounts to 1.5% of the latter or 0.05% of dry mycelium weight. As it has been shown by chromatography and mass spectrometry, the major components of the total menaquinone fraction are MK-9 (II-H<sub>2</sub>), MK-9 (II, III-H<sub>4</sub>), MK-9 (II, III, IX-H<sub>6</sub>), MK-9 (II, III, VIII, IX-H<sub>8</sub>), MK-8 (II-H<sub>2</sub>), MK-8 (II, III-H<sub>4</sub>), MK-8 (II, III, VIII-H<sub>6</sub>), and MK-8 (II, III, VII, VIII-H<sub>8</sub>) which are present in the ratio 2 : 10 : 78 : 70 : 1 : 2 : 8 : 3, the MK-5, MK-6, and MK-7 components occur as traces. The MK-9 (II, III, IX-H<sub>6</sub>), MK-9 (II, III, VIII, IX-H<sub>8</sub>), MK-8 (II, III, VIII-H<sub>6</sub>), and MK-8 (II, III, VII, VIII-H<sub>8</sub>) have been isolated in individual state utilizing chromatography on AgNO<sub>3</sub>-impregnated silica gel, their structure being inferred from the mass spectrometry data.