



УДК 547.915.5.02 + 576.852.21

ЛИПИДЫ МИКОБАКТЕРИЙ

I. НЕОБЫЧНОЕ ПРОИЗВОДНОЕ ТРЕГАЛОЗЫ ИЗ
Mycobacterium paraffinicum

Батраков С. Г., Розынов Б. В., Коронелли Т. В.,
Кожухова Р. А., Бергельсон Л. Д.

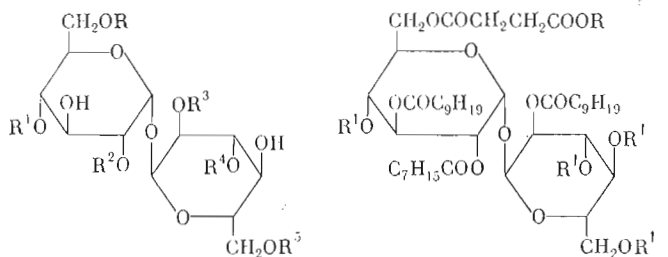
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва;
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Биологический факультет

Из клеточных липидов парафиноокисляющей бактерии *Mycobacterium paraffinicum* хроматографией на силикагеле и ДЕАЕ-целлюлозе выделен необычный кислый гликолипид, который на основании данных ИК- и ПМР-спектров, масс-спектров высокого разрешения, а также результатов деградации пер-О-метильного производного идентифицирован как 2-О-октаноил-2',3-ди-О-деканойл-6-О-сукциноил- α,α -D-трегалоза.

Среди разнообразных липидов микобактерий и родственных им микроорганизмов особое место по структуре и физиологическим свойствам занимают жирнокислотные производные трегалозы (см. обзоры [1—4]). Эти вещества представляют собой компоненты клеточных стенок, и некоторые из них являются мощными иммуностимуляторами. Высказано предположение, что они ответственны за противоопухолевую активность стенок микобактерий [5]. В настоящее время установлена структура нескольких типов трегалолипидов. К ним относятся 6,6'-димиколаты этого дисахарида («корд-фактор») (I), найденные во многих штаммах родов *Mycobacterium*, *Nocardia* и *Corynebacterium* [1—4], а также в *Brevibacterium thiovaginalis* [6] и *Arthrobacter paraffineus* [7], 6-мономиколат (II), выделенный из вирулентного штамма H37Rv *M. tuberculosis* [4], его 6'-ацетильное производное (III), идентифицированное в липидах авирулентного штамма H37Ra [4]. Несимметричные диэфиры трегалозы и относительно низкомолекулярных кислот (C₁₆ — C₁₉) (IV) обнаружены в *M. fortuitum* [8,9]. В *M. phlei* и *M. smegmatis* найден дисахарид, полностью ацилированный полиненасыщенными (флеевыми) кислотами (главным образом гексатриаконта-4,8,12,16,20-пентаеновой кислотой) [10], а из вирулентного штамма H37Rv *M. tuberculosis* выделен сульфоллипид (V) [11]. В настоящем сообщении описывается выделение и структурная идентификация ранее неизвестного липидного производного трегалозы (VI), обнаруженного нами в липидах парафиноокисляющей микобактерии *Mycobacterium paraffinicum* [12].

При анализе клеточных липидов *M. paraffinicum* методом ТСХ мы обнаружили несколько углеводсодержащих компонентов, которые на хроматограммах давали положительную реакцию с антроновым [13] и дифениламиновым [14] реагентами. Для выделения одного из основных гликолипидов (VI) суммарные липиды микроорганизма хроматографировали на колонке с силикагелем. В результате была получена фракция, обога-

щенная липидом (VI), но содержащая также около 15% других гликолипидов. Указанную фракцию подвергали ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой [15]. При этом главный компонент фракции —



I—V

VI—IX

- (I) R и R⁵ — миконоил, R¹=R²=R³=R⁴=H
 (II) R — миконоил, R¹=R²=R³=R⁴=R⁵=H
 (III) R — миконоил, R¹=R²=R³=R⁴=H, R⁵=Ac
 (IV) R и R¹ — C₁₆ — C₁₉-ацил (R ≠ R¹), R²=R³=R⁴=R⁵=H
 (V) R=R⁵—40-оксифитопераноил, R¹=H, R²=SO₂OH, R³ — пальмитонил,
 R⁴=COCHMe(CH₂CHMe)₆C₁₆H₃₃
 (VI) R=R'=H
 (VII) R=Me, R'=H
 (VIII) R=Me, R'=Ac
 (d₁₂-VII) R=Me, R'=COCD₃
 (IX) R=R'=Me

гликолипид (VI) — элюировался только кислотными или основными системами растворителей, что говорит о его кислотном характере. Очищенный таким образом гликолипид (VI) при ТСХ в различных системах растворителей вел себя как гомогенная липидная фракция. Его содержание в суммарных липидах микроорганизма составляло 3—4% или 15—20% от суммы полярных липидов.

На хроматограммах липид (VI) давал положительную реакцию с периодатом-реактивом Шиффа [16], и, таким образом, его молекула содержит α-гликольную группировку. В ИК-спектре липида присутствуют полосы поглощения спиртовых HO-групп (3400—3500 см⁻¹), HO-группы карбоксила (2600—2750 см⁻¹), сложноэфирного (1742 см⁻¹) и карбоксильного (1715 см⁻¹) карбонидов. Последняя полоса исчезает после обработки липида триэтиламинном, но при этом появляется интенсивная полоса поглощения ионизированной карбоксильной группы при 1598 см⁻¹.

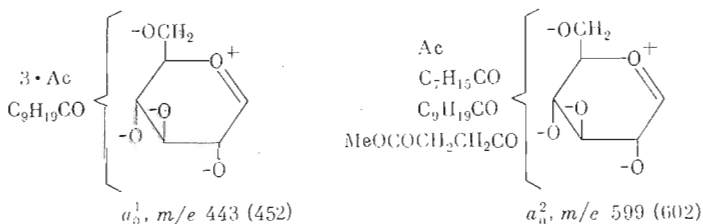
В условиях кислотного метанолиза гликолипид (VI) образовал в качестве единственного углеводного продукта распада метилглюкозиды, а при щелочном метанолизе — трегалозу. Метилловый эфир (VII), полученный действием диазометана на гликолипид (VI), при алкоголизе бензильным спиртом в присутствии бензилата натрия также дал трегалозу. Кроме того, среди продуктов алкоголиза методом комбинированной ГЖХ масс-спектрометрии были идентифицированы бензильные эфиры янтарной, *n*-октановой и *n*-декановой кислот [17], которые присутствовали в молярном соотношении 1 : 1 : 2*. Приведенные результаты анализа показывают, что молекула гликолипида (VI) содержит в качестве единственного углеводного компонента трегалозу, которая несет только ацильные заместители, причем кислотный характер липида обусловлен свободной карбоксильной группой сукцинильного остатка. Более детальную информацию о

* Расщепление метилового эфира липида (VII) бензилатом натрия использовалось вместо традиционного метанолиза для того, чтобы избежать потерь легколетучих метиловых эфиров низкомолекулярных кислот.

структуре дал спектр ПМР перацетильного производного метилового эфира липида (VIII), полученного ацетилированием метилового эфира (VII) уксусным ангидридом в пиридине (аналогично получали соответствующий дейтероацетат (d_{12} -VIII)).

В спектре ПМР ацетата (VIII) в области сильного поля содержится девятипротонный триплет (δ 0,87 м. д.; J 6,5 Гц), соответствующий протонам метильных групп жирнокислотных остатков. Расщепление сигнала на три линии подтверждает отсутствие метильных разветвлений в углеводородной цепи последних. Триплетный сигнал (6H) при δ 2,21 м. д. (J 7,5 Гц) отвечает протонам α -метиленовых групп тех же остатков, а мультиплет (6H) при δ 1,52 м. д. — протонам β -метиленовых групп. Расположенный в области более сильного поля (δ 2,56 м. д.) четырехпротонный синглет, очевидно, принадлежит протонам двух метиленовых групп сукцинильного остатка, а трехпротонный синглет при 3,67 м. д. — протонам сложноэфирной метоксильной группы. Ацетильным группам в спектре ПМР отвечает 12-протонный мультиплет в области δ 1,94—2,00 м. д. α,α -Аномерная конфигурация трегалозного остатка подтверждается характером соответствующего сигнала от аномерных протонов: дублет (2H), δ 4,82 м. д., J 2 Гц. Остальными элементами спектра ПМР являются мультиплеты: в области 3,84—4,10 м. д. (6H) от протонов при атомах C₍₅₎ и C₍₆₎ глюкозных остатков, в области 4,90—5,50 м. д. (6H) от протонов при атомах C₍₂₎, C₍₃₎ и C₍₄₎ тех же остатков и широкий сигнал при δ 1,26 м. д. от протонов метиленовых групп, расположенных в середине углеводородных цепей жирноацильных заместителей. Подсчет площадей под рассмотренными выше сигналами показывает, что остаток трегалозы в молекуле (VIII) содержит в качестве заместителей один сукцинильный остаток, три остатка жирных кислот и четыре ацетильные группы. Поскольку в спектрах ПМР дейтероацетильного производного (d_{12} -VIII) и пер-О-метильного производного (IX, см. ниже) сигналы от протонов ацетильных групп отсутствовали, можно сделать вывод, что молекула нативного липида (VI) имеет четыре свободные HO-группы. Сведения о расположении перечисленных выше ацильных заместителей получены при изучении масс-спектров (МС) ацетильного (VIII) и дейтероацетильного (d_{12} -VIII) производных (см. табл. 1).

Имеющиеся данные по масс-спектрометрическому изучению липидных производных трегалозы [1, 4, 8, 9, 18, 19] дают основание ожидать, что одно из основных направлений распада под электронным ударом молекулярного иона соединения (VIII) должно заключаться в разрыве гликозидных связей с образованием соответствующих оксониевых ионов. Поэтому мы предположили, что присутствующие в МС ацетатов (VIII) и (d_{12} -VIII) интенсивные пики при m/e 443 (452*) и 599 (602) отвечают фрагментам указанного типа — a_0^1 и a_0^2 . Смещение в МС дейтероацетата (d_{12} -VIII) пика



первого иона на 9, а второго — на 3 массовые единицы подтверждает предположение о том, что в состав фрагмента a_0^1 входит три, а в состав a_0^2 — одна ацетильная группа. Кроме того, указанное различие в значениях m/e подтверждает данные спектра ПМР об отсутствии в молекуле нативного липида (VI) иных заместителей при трегалозном остатке, кроме сукцинильного и трех жирнокислотных остатков. Изображенная выше струк-

* В скобках указываются значения m/e соответствующих ионов по МС дейтероацетата (d_{12} -VIII).

Таблица 1

Основные пики в масс-спектрах ацетильных производных (VIII) и (d_{12} -VIII)

m/e	$I_{\text{отн.}}, \%$	Тип иона	Точное значение m/e			m/e по МС (d_{12} -VIII)
			Измерено	Брутто-формула	Вычислено	
1058	0,01	M^+				1070
1027	0,04	d				1039
999	0,10	e				1008
985	0,02	f				994
927	1,0	g				939
915	0,15	h				927
913	0,10	i				925
887	0,25	j				899
627	1,0	a_0^2				630
599	31	a_0^2	599,3428	$C_{31}H_{51}O_{11}$	599,3430	602
598	4	b^2	598,3384	$C_{31}H_{50}O_{11}$	598,3351	601
571	3	a_0^2	571,3120	$C_{29}H_{47}O_{11}$	571,3117	574
514	0,9	c_2^2				517
486	2,8	c_1^2	486,2087	$C_{23}H_{34}O_{11}$	486,2099	489
443	59	a_0^1	443,2287	$C_{22}H_{35}O_9$	443,2279	452
442	4,6	b^1	442,2132	$C_{22}H_{34}O_9$	442,2201	451
427	1,6	a_1^2	427,1937	$C_{21}H_{31}O_9$	427,1966	430
415	6,4	a_0^1	415,1942	$C_{20}H_{31}O_9$	416,1967	424
383	0,9	a_2^1	383,2082	$C_{20}H_{31}O_7$	383,2069	389
341	0,7	a_3^1	341,1898	$C_{18}H_{29}O_6$	341,1962	344
330	2,1	c^1	330,0968	$C_{14}H_{18}O_9$	330,0949	339
323	1,0	a_4^1	323,1864	$C_{18}H_{27}O_5$	323,1858	326
313	0,7	a_2^2	313,1646	$C_{16}H_{25}O_6$	313,1650	316
301	1,3	a_3^2	301,0909	$C_{13}H_{17}O_8$	301,0922	304
281	1,0	a_5^1	281,1774	$C_{16}H_{25}O_4$	281,1752	281; 282
271	0,7	a_6^1	271,0784	$C_{12}H_{15}O_7$	271,0817	280
257	2,1	n	257,1747	$C_{14}H_{25}O_4$	257,1752	263
253	0,7	a_4^2	253,1388	$C_{14}H_{21}O_3$	253,1439	253
229	1,1a	a_7^1	229,0698	$C_{10}H_{12}O_6$	229,0711	235; 236
211	1,3	a_8^1	211,0601	$C_{10}H_{11}O_5$	211,0605	217
187	1,0	a_9^1	187,0604	$C_8H_{11}O_5$	187,0606	192
169	33	a_{10}^1	169,0501	$C_8H_9O_4$	169,0500	172
155	20	l	155,1433	$C_{10}H_{19}O$	155,1435	155
145	0,6	a_6^2	145,0511	$C_6H_9O_4$	145,0500	146
127	10	m	127,1126	$C_8H_{15}O$	127,1122	127
127	3,9	a_{11}^1	127,0391	$C_6H_7O_3$	127,0394	128; 129
115	100	k	115,0391	$C_5H_7O_3$	115,0394	115
109	13,5	a_{12}^1	109,0288	$C_6H_7O_2$	109,0289	109; 110

тура ионов a_0^1 и a_0^2 окончательно доказывается характером их последующей фрагментации, состоящей в ступенчатом элиминировании ацетильных, жирноацильных и сукцинильного заместителя, как это показано на схемах 1 и 2 (см. также табл. 1).

Схема 1

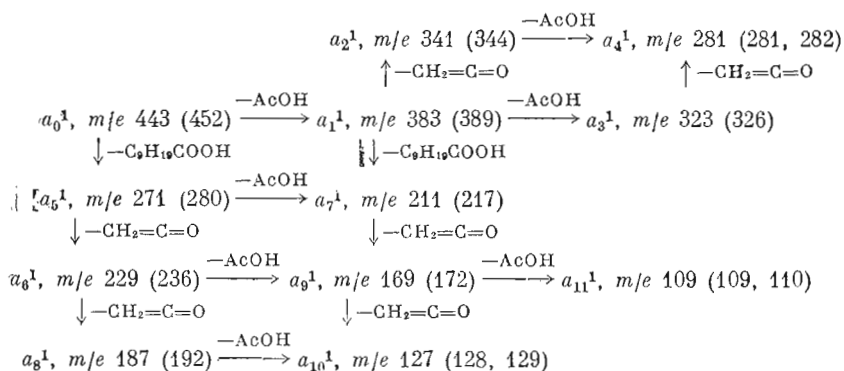
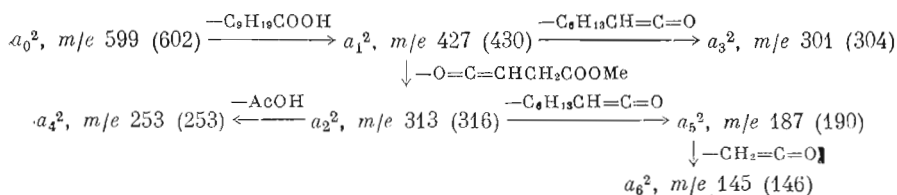


Схема 2

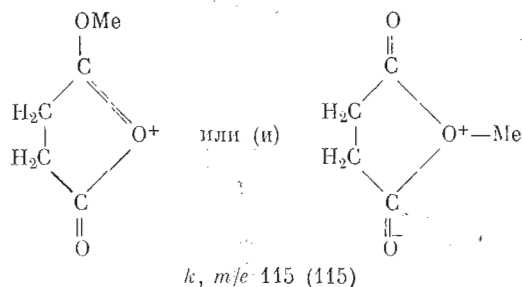


Другим диагностически важным направлением распада молекулярного иона ацетата (VIII) является аналогичное расщепление гликозидных связей, но протекающее с потерей заряженным фрагментом H-атома. В результате этого процесса возникают ионы b^1 с m/e 442 (451) и b^2 с m/e 598 (601). Распад этих ионов по механизму перегруппировки Маклафферти приводит к фрагментам c^1 с m/e 330 (339), c_1^2 с m/e 486 (489) и c_2^2 с m/e 514 (517).

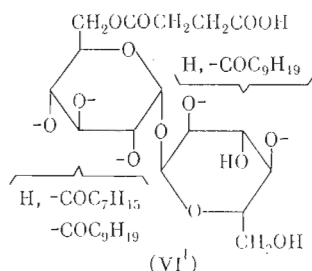
Значения m/e ионов a_0^1 и a_0^2 дают возможность определить молекулярный вес тетраацетата (VIII) липида: 443 (m/e иона a_0^1) + 599 (m/e иона a_0^2) + 16 (гликозидный O-атом) = 1158 . Таким образом, пик при наибольшем значении m/e в МС соединения (VIII) — m/e 1158 (1170) — отвечает молекулярному иону. Этот пик имеет чрезвычайно низкую интенсивность. Более интенсивны пики ионов, образующихся из молекулярного при элиминировании метоксильного и ацилсодержащих фрагментов: $[M - \text{MeO}]^+$ (d), $[M - \text{AcO}]^+$ (e), $[M - \text{AcO}\dot{\text{C}}\text{H}_2]^+$ (f), $[M - \text{MeOSOC}\text{H}_2\text{CH}_2\text{COO}]^+$ (g), $[M - \text{C}_7\text{H}_{15}\text{COO}]^+$ (h), $[M - \text{C}_9\text{H}_{19}\text{COO}]^+$ (i), $[M - \text{MeOSOC}\text{H}_2\text{CH}_2\cdot\text{COO}\dot{\text{C}}\text{H}_2]^+$ (j). Структуры перечисленных ионов подтверждаются соответствующими сдвигами их пиков в МС дейтеропроизводного (d_{12} -VIII). Два из этих ионов, а именно « f » и « j », особенно важны для установления структуры гликолипида (VI), поскольку их возникновение возможно только при условии, что одна из первичных кислородных функций тетраацетата (VIII) связана с ацетильной группой, а вторая — с сукцинильным остатком. Отсюда следует, что в молекуле нативного липида (VI) сукцинильный остаток присоединен к одному из первичных гидроксильных трегалозы, в то время как другая первичная гидроксильная группа свободна.

Максимальную интенсивность в МС ацетильных производных (VIII) и (d_{12} -VIII) имеет пик при m/e 115 , который отвечает сукцинил-иону. Вы-

сокая интенсивность этого пика, вероятно, связана со стабильной циклической структурой этого иона (*k*) (ср. [20]).



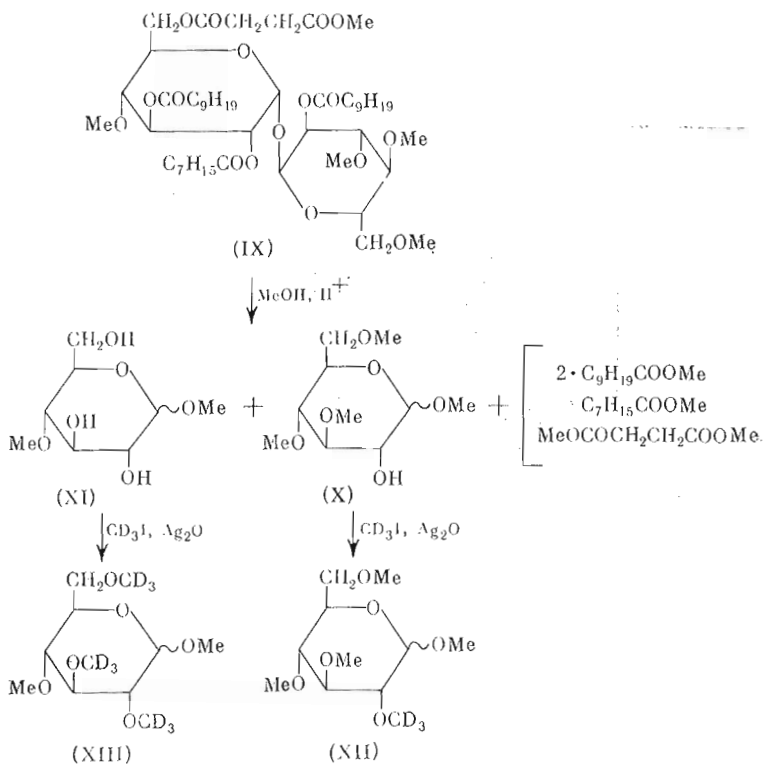
К числу интенсивных пиков МС тетраацетата (VIII) относятся также пики деканоил-иона $[C_9H_{19}CO]^+$ (*l*) с *m/e* 155 (155), октаноил-иона — $[C_7H_{15}CO]^+$ (*m*) с *m/e* 127 (127), а также пик деканоилдиацетилноксониевого иона — $C_9H_{19}COO^+Ac_2$ (*n*) с *m/e* 257 (263). Данные масс-спектрометрического исследования производных (VIII) и (d_{12} -VIII) гликолипида (VI) позволяют приписать последнему структуру (VI') (местонахождение деканоильного остатка при $C_{(3)}-O$ моноацилированного глюкозного остатка исключено, так как липид (VI) способен окисляться периодатом (см. выше)).



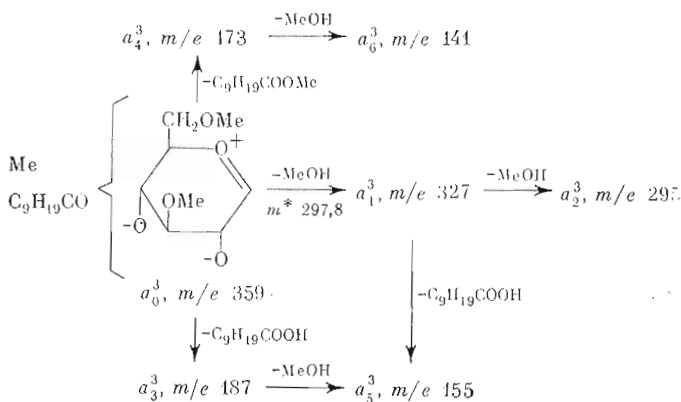
Окончательно локализация жирнокислотных остатков была определена путем исчерпывающего *O*-метилирования метилового эфира (VII) липида и последующей деградации пер-*O*-метилпроизводного (IX) (см. схему 3). Масс-спектрометрическое поведение производного (IX) в основном не отличалось от поведения ацетатов (VIII) и (d_{12} -VIII) (см. табл. 2). В МС содержатся интенсивные пики ионов типа «а»: a_0^3 с *m/e* 359 и a_0^4 с *m/e* 571, структура которых доказывается образованием характерных фрагментов их распада (см. схемы 4 и 5 и табл. 2), присутствует пик молекулярного иона с *m/e* 946 ($359 + 571 + 16$), а максимальным по интенсивности, так же как и в случае ацетатов, является пик сукцинил-иона (*k*) с *m/e* 115. Высокой интенсивностью обладают пики деканоил- и октаноил-ионов (*l*) и (*m*) с *m/e* 155 и 127 соответственно. Расположение сукцинильной группировки при первичной кислородной функции остатка трегалозы подтверждается наличием в МС пика иона $[M - MeOSCOCH_2CH_2COOCH_2]^+$.

В результате кислотного метанолиза перметильного производного (IX) образовались два частично метилированных метилглюкозида (X) и (XI) (схема 3), которые были выделены в индивидуальном состоянии хроматографирующим на силикагеле. Гомогенность каждого из очищенных метилглюкозидов установлена при помощи ТСХ и ГЖХ. Менее подвижный при хроматографии метилглюкозид (XI) давал положительную реакцию с периодатом-реактивом Шиффа [16] и, следовательно, содержал свободную α -гликольную группировку. Расположение свободных гидроксильных групп в обоих глюкозидах было выяснено путем их дейтерометилирования и последующего масс-спектрометрического анализа полученных дейтерометильных производных (XII) и (XIII) [21]. Данные анализа поз-

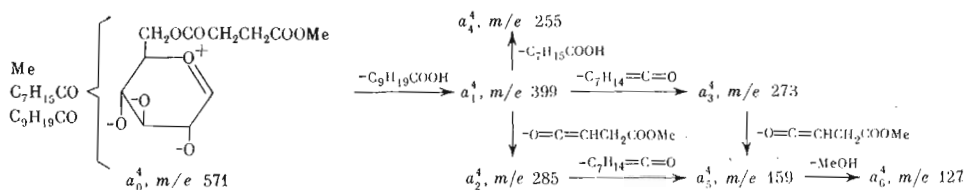
С х е м а 3



С х е м а 4



С х е м а 5



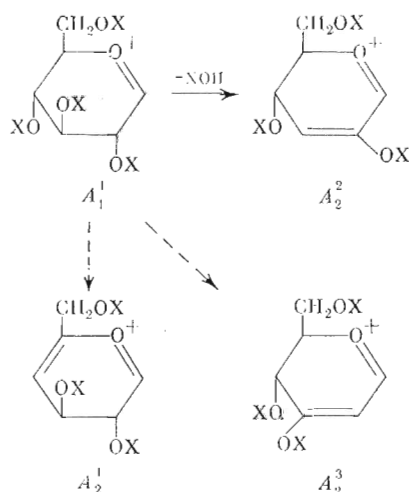
Основные пики в масс-спектре пер-О-метилпроизводного липида (IX)

<i>m/e</i>	<i>I</i> _{отн.} , %	Тип иона	Точное значение <i>m/e</i>		
			Измерено	Брутто-формула	Вычислено
946	0,05	<i>M</i> ⁺			
915	0,5	<i>M</i> — MeO [•]			
901	0,1	<i>M</i> — MeOĈH ₂			
887	0,1	<i>M</i> — ĈOO Me			
845	0,2	<i>M</i> — MeOCOCH ₂ CH ₂ COO [•]			
803	0,1	<i>M</i> — C ₇ H ₁₅ COO [•]			
801	0,3	<i>M</i> — MeOCOCH ₂ CH ₂ — —COOĈH ₂	801,5218	C ₄₃ H ₇₇ O ₁₃	801,5356
799	1,4	<i>M</i> — MeOCOCH ₂ CH ₂ CO [•] — —MeOH	799,5132	C ₄₃ H ₇₅ O ₁₃	799,5200
775	0,15	<i>M</i> — C ₉ H ₁₉ COO [•]			
771	0,25	<i>M</i> — MeO [•] — C ₇ H ₁₆ COOH	771,4665	C ₄₀ H ₆₇ O ₁₄	771,4523
743	0,15	<i>M</i> — MeO [•] — C ₉ H ₁₉ COOH			
599	1,6	<i>a</i> ₀ ⁴			
571	24	<i>a</i> ₀ ⁴	571,3526	C ₃₀ H ₅₁ O ₁₀	571,3479
543	2,5	<i>a</i> ₀ ⁴	543,3168	C ₂₈ H ₄₇ O ₁₀	543,3168
399	9,5	<i>a</i> ₁ ⁴	399,2015	C ₂₀ H ₃₁ O ₈	399,2018
359	58	<i>a</i> ₀ ³	359,2460	C ₁₉ H ₃₅ O ₈	359,2423
331	2,8	<i>a</i> ₀ ³	331,2116	C ₁₇ H ₃₁ O ₆	331,2119
327	23	<i>a</i> ₁ ³	327,2172	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	327,2171
295	2,1	<i>a</i> ₂ ³	295,1917	C ₁₇ H ₂₇ O ₄	295,1908
285	1,8	<i>a</i> ₂ ⁴	285,1697	C ₁₅ H ₂₅ O ₅	285,1701
273	2,4	<i>a</i> ₃ ⁴	273,0973	C ₁₂ H ₁₇ O ₇	273,0973
255	6,8	<i>a</i> ₄ ⁴	255,0861	C ₁₂ H ₁₅ O ₆	255,0867
241	2,8	*	241,1787	C ₁₄ H ₂₅ O ₃	241,1803
213	2,2	*	213,1507	C ₁₂ H ₂₁ O ₃	213,1490
187	8	<i>a</i> ₃ ³	187,0967	C ₉ H ₁₅ O ₄	187,0970
173	38	<i>a</i> ₄ ³	173,0815	C ₈ H ₁₃ O ₈	173,0813
159	2,3	<i>a</i> ₅ ⁴	159,0657	C ₇ H ₁₁ O ₄	159,0656
155	19	<i>l</i>	155,1439	C ₁₀ H ₁₉ O	155,1435
155	5	<i>a</i> ₅ ³	155,0716	C ₈ H ₁₁ O ₃	155,0708
141	21	<i>a</i> ₆ ³	141,0549	C ₇ H ₉ O ₃	141,0551
127	13	<i>m</i>	127,1119	C ₈ H ₁₅ O	127,1122
127	1,2	<i>a</i> ₆ ⁴	127,0392	C ₆ H ₇ O ₃	127,0394
115	100	<i>k</i>	115,0389	C ₅ H ₇ O ₃	115,0394
102	5,1	<i>K</i> ₁ [*]	102,0687	C ₃ H ₁₀ O ₂	102,0680
101	18	<i>F</i> [*]	101,0595	C ₅ H ₉ O ₂	101,0602

* Ионы идентичны фрагментам, образующимся при распадах молекулярных ионов пента-О-метилгексапиреноз; об их структуре см. [21].

волили приписать гликозиду (XII) структуру 2-О-тридейтерометил-3,4,6-три-О-метилметилгликопиранозида, а гликозиду (XIII) — структуру 2,3,6-три-О-тридейтерометил-4-О-метилметилгликопиранозида. Поскольку положение тридейтерометильных групп в молекулах метилгликозидов (XII) и (XIII) соответствует положению ацильных остатков в молекуле метилпроизводного (IX), а следовательно, и в молекуле нативного гликолипида (VI), можно сделать вывод, что в последнем ацилированы кислородные функции при $C_{(2)}$, $C_{(3)}$, $C_{(6)}$ и $C_{(2')}$ трегалозы. Выше было показано, что первичная кислородная функция (при $C_{(6)}$) трегалозного остатка ацилирована сукцинильным остатком; таким образом, остальные замещенные гидроксильные группы дисахарида должны быть ацилированы жирными кислотами. Из структуры ионов a_0^1 и a_0^2 следует, что моноацилированный глюкозный остаток липидной молекулы содержит деканоильную группу, другой же остаток моносахарида несет два жирнокислотных заместителя — деканоильный и октаноильный. Вывод о распределении двух последних заместителей между $C_{(2)}$ —О- и $C_{(3)}$ —О-функциями может быть сделан на основании следующих соображений. По литературным данным (см., например, [21]), наиболее вероятной начальной стадией фрагментации оксониевых ионов типа A_1^1 (схема б) является элиминирование заместителя

С х е м а б



(X—OH) от атома $C_{(3)}$ с образованием иона A_2^2 ; отщепление заместителей из других положений, приводящее к ионам A_2^1 , и A_2^3 , — процесс значительно менее вероятный (для обозначения ионов использованы символы, принятые в работе [21]). В МС тетраацетатов (VIII) и (d_{12} -VIII) пик иона a_0^1 с m/e 427 (430), возникающего в результате элиминирования ионом a_0^2 молекулы декановой кислоты, имеет заметную интенсивность (см. табл. 1), тогда как пик иона $[a_0^2 - C_7H_{15}COOH]^+$ с m/e 455 (458) регистрируется лишь в виде следов. Та же картина наблюдается в МС перметилпроизводного (IX), где иону a_1^4 соответствует интенсивный пик при m/e 399, а пик иона $[a_0^4 - C_4H_9COOH]^+$ с m/e 427 имеет интенсивность примерно в 15 раз меньшую. Так как небольшое различие в химической природе деканоильного и октаноильного остатков не может быть причиной столь существенных различий в их склонности к элиминированию, следует считать, что первый из них связан с кислородным атомом при $C_{(3)}$, а второй — с кислородным атомом при $C_{(2)}$ остатка трегалозы. Таким образом, гликолипид, выделенный нами из клеток *M. paraffinicum*, должен иметь структуру 2-О-октаноил-2',3-ди-О-деканоил-6-О-сукциноил- α , α , *D*-трегалозы (VI) (отнесение остатка трегалозы к *D*-ряду вытекает из значительного положительного оптического вращения липида и его производных).

В принципе при метилировании гликолипида иодистым метилом в присутствии окиси серебра не исключена возможность миграции ацильных остатков. Однако образование при метанолизе метилированного липида (IX) только двух частично метилированных метилглюкозидов (X) и (XI) свидетельствует об отсутствии такой миграции, так как трудно предположить, чтобы обратимый процесс, каким является ацильная миграция, приводил количественно к стерически невыгодному производному глюкозы, у которого все заместители (ацильные и гликозидный) находятся при смежных углеродных атомах.

Следует отметить, что гликолипид (VI) представляет собой доминирующий, но не единственный компонент выделенной гликолипидной фракции. В МС ацетатов (VIII) и (d_{12} -VIII) наряду с пиками ионов a_0^1 и a_0^2 имеются пики гомологичных им фрагментов: a_0^1 с m/e 415 (424), a_0^2 с m/e 571 (574) и a_0^{*2} с m/e 627 (630). Ион a_0^1 с m/e 415 отличается от фрагмента a_0^1 наличием октаноильного остатка вместо деканоильного, второй из перечисленных ионов является аналогом иона a_0^2 , содержащим два октаноильных остатка, а третий — аналогом того же иона с двумя деканоильными группами. Относительно низкая интенсивность пиков этих ионов говорит о незначительном содержании в гликолипидной фракции компонентов с иным по сравнению с соединением (VI) распределением и составом жирных кислот.

Экспериментальная часть

Материалы и общие методы. Культуру *M. paraffinicum* выращивали на среде с гексадеканом ранее описанным способом [22]. Клетки отделяли центрифугированием, промывали дистиллированной водой, гексаном и лиофильно высушивали. Суммарные клеточные липиды экстрагировали смесями CHCl_3 — MeOH (2 : 1 и 1 : 1), как описано в работе [23].

Для хроматографии на колонках применяли силикагель марки КСК (75—100 меш), который перед использованием обрабатывали по методике [23]. ТСХ проводили на силикагеле той же марки микрометодом Светашева и сотр. [24]. Вещества на хроматограммах обнаруживали опрыскиванием следующими реагентами: 50% H_2SO_4 с последующим нагреванием пластинок при $\sim 200^\circ$, 0,2% раствором морина в MeOH (пятна веществ наблюдали в УФ-свете), антроновым реагентом [13], дифениламиновым реагентом [14], периодатом-реактивом Шиффа [16].

ИК-спектры регистрировали на спектрографе UR-10 (Zeiss, ГДР) в пленке вещества, спектры ПМР — на приборе XL-100 (Varian, США) в CCl_4 при рабочей частоте 100 МГц с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта; оптическую активность измеряли на спектрополяриметре Perkin-Elmer 141 (Швеция). МС получали на хромато-масс-спектрометре LKB 9000 (Швеция) при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и ускоряющем напряжении 3,5 кВ. Комбинированную ГЖХ-масс-спектрометрию бензиловых эфиров кислот и триметилсилиловых эфиров углеводов осуществляли на том же приборе. Для разделения смеси бензиловых эфиров на компоненты применяли колонки: (а) с 3% OV-101 и (б) с 8% полидиэтиленгликольсукцината на хромосорбе W (60—80 меш) при температурах 170 и 190° соответственно; газ-носитель — гелий (20—30 мл/мин). При анализе триметилсилиловых эфиров углеводов использовали колонку (а) при температуре 160 → 290° (4 град/мин). МС высокого разрешения измеряли на масс-спектрометре MS-902 (Англия) с системой обработки данных DS-30; энергия ионизирующих электронов 70 эВ, температура ионизационной камеры 250°, разрешающая способность 10 000.

Выделение гликолипида (VI). Сумму липидов (7,7 г), экстрагированную из 17,6 г лиофилизированных клеток, наносили в 100 мл CHCl_3 на колонку (4,2 × 35 см) с силикагелем. Колонку промывали 1,5 л CHCl_3 , после чего элюирование продолжали смесями CHCl_3 — MeOH — 20 : 1 (900 мл),

15 : 1 (900 мл), 10 : 1, 9 : 1, 8 : 1..... 1 : 1 (по 600 мл). Собирали фракции объемом по 20 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в системе растворителей CHCl_3 — MeOH —вода (65 : 25 : 4). Часть фракций, элюированных смесью CHCl_3 — MeOH (15 : 1), содержала гликолипид (VI). Эти фракции объединяли, упаривали, остаток растворяли в 30 мл смеси CHCl_3 — MeOH (9 : 1) и раствор наносили на колонку (2,7 × 20 см) с DEAE-целлюлозой (Reanal, Венгрия) в AsO^- -форме [15]. Колонку промывали 800 мл смеси CHCl_3 — MeOH (2 : 1), затем 400 мл смеси CHCl_3 — AsOH (4 : 1) элюировали 215 мг хроматографически чистого гликолипида (VI); R_f 0,46 (CHCl_3 — MeOH —вода, 65 : 25 : 4), 0,32 (CHCl_3 — MeOH —конц. NH_4OH , 65 : 25 : 4), 0,22 (CHCl_3 — MeOH — AsOH —вода, 80 : 13 : 8 : 1); $[\alpha]_D^{20} + 54,6^\circ$ (CHCl_3 — MeOH , 5 : 1, c 3,0).

Действием избытка диазометана в эфире на гликолипид (VI) получали метиловый эфир (VII); R_f 0,65 (CHCl_3 — MeOH , 9 : 1); $[\alpha]_D^{22} + 49,8^\circ$ (CHCl_3 ; c 2,7).

ИК-спектр ($\nu_{\text{макс}}$, см^{-1}): 3580—3350 ($\nu_{\text{O-H}}$), 1742 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1260, 1155, 1055 ($\nu_{\text{C-O}}$).

Кислотный метанолит гликолипида (VI). Смесь 3—5 мг гликолипида (VI) и 0,5 мл 3% раствора сухого HCl в MeOH кипятили 5 ч, по охлаждении разбавляли 3 мл MeOH , нейтрализовали дауэксом 1 (HO^-) и упаривали. В остатке при помощи ТСХ в системах CHCl_3 — MeOH —вода (65 : 25 : 4), CHCl_3 — MeOH (9 : 1) и метилэтилкетон— MeOH —вода (3 : 1 : 1) обнаружили метилглюкозиды, а при ТСХ в системе гексан—эфир (9 : 1) — метиловые эфиры жирных кислот (в качестве стандарта в первом случае использовали метил- α -D-глюкопиранозид, во втором — метиллаурат). Указанный остаток распределяли в системе гексан—эфир—вода (1 : 1 : 2), водную фазу промывали смесью гексан—эфир (1 : 1) и упаривали досуха. Остаток превращали в триметилсилиловые эфиры и анализировали методами ГЖХ (для сравнения использовали триметилсилиловые эфиры метилглюкопиранозидов) и ГЖХ-масс-спектрометрии [25]. На хроматограммах присутствовали только пики триметилсилиловых производных метилглюкопиранозидов.

Щелочной метанолит гликолипида (VI). Смесь 3—5 мг гликолипида (VI) и 0,5 мл 0,3 M раствора KOH в MeOH нагревали 1 ч при 50° , по охлаждении разбавляли 2 мл MeOH , нейтрализовали амберлитом IRC-50 (H^+) и упаривали. К остатку добавляли 3 мл воды, смесь дважды промывали CHCl_3 (по 2 мл) и упаривали. Остаток, по данным ТСХ в системах CHCl_3 — MeOH —вода (60 : 30 : 6) и n -бутанол—пиридин—вода (5 : 4 : 3) с заведомым образцом, представлял собой трегалозу. Тот же остаток превращали в триметилсилиловый эфир и идентифицировали как трегалозу методами ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии, для сравнения использовали заведомый образец триметилсилилового эфира трегалозы. Пики других веществ на хроматограммах отсутствовали.

Бензилолит метилового эфира гликолипида (VII). К смеси 5—7 мг метилового эфира (VII) и 0,2 мл свежеперегнанного бензилового спирта добавляли 0,2 мл 0,5 M раствора бензилата натрия в бензиловом спирте. Смесь нагревали 15 мин при 50° , затем оставляли на 2 ч при 20° , подкисляли несколькими каплями AsOH , разбавляли 3 мл гексана и промывали водой (2 × 2 мл). Объединенные водные экстракты упаривали, остаток идентифицировали как трегалозу вышеописанными методами. Гексановый раствор наносили на колонку с 15 г Al_2O_3 (нейтр., акт. II). 20 мл смеси гексан—бензол (2 : 1) элюировали бензиловые эфиры кислот, которые анализировали при помощи ГЖХ и комбинированной ГЖХ-масс-спектрометрии.

Ацетилпроизводные (VIII) и (d_{12} -VIII). Раствор 50 мг метилового эфира (VII) в 0,5 мл пиридина обрабатывали при 20° 0,5 мл уксусного ангидрида. Смесь оставляли при той же температуре на 12 ч, после чего упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 2 мл CH_2Cl_2 и раствор нано-

сили на колонку с 8 г силикагеля. Колонку промывали 50 мл CH_2Cl_2 , затем 25 мл CHCl_3 элюировали 45 мг тетраацетата (VIII); R_f 0,57 (бензол — EtOAc , 5 : 1); $[\alpha]_D^{22} + 44,0^\circ$ (CHCl_3 ; c 1,8).

ИК-спектр ($\nu_{\text{макс}}$, см^{-1}): 1750 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1232, 1158, 1040 ($\nu_{\text{C-O}}$).

Аналогично действием $(\text{CD}_3\text{CO})_2\text{O}$ в пиридине на метиловый эфир (VII) получали дейтероацетильное производное (d_{12} -VIII).

Пер-О-метилпроизводное (IX). Смесь 40 мг метилового эфира (VII), 1 мл CHCl_3 , 2 мл MeI и избытка Ag_2O кипятили при перемешивании 6 ч, по охлаждении осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 1,5 мл MeI и раствор кипятили 8 ч при перемешивании с избытком Ag_2O . По охлаждении осадок отфильтровывали, промывали CHCl_3 , объединенный фильтрат упаривали, остаток наносили в 1 мл CH_2Cl_2 на колонку (2×15 см) с силикагелем. Колонку промывали 100 мл CH_2Cl_2 , затем элюировали смесями CH_2Cl_2 — CHCl_3 (1 : 1 и 1 : 2, по 150 мл). Собирали фракции по 10 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в системе растворителей бензол — этилацетат (5 : 1). Из фракций, элюированных последней смесью растворителей, получили 33 мг пер-О-метилпроизводного (IX); R_f 0,42 (бензол — этилацетат, 5 : 1).

ИК-спектр ($\nu_{\text{макс}}$, см^{-1}): 1750 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1200, 1152 ($\nu_{\text{C-O}}$); полосы поглощения HO-групп отсутствовали.

Спектр ПМР (δ , м. д.): 0,87 (12 H, триплет, J 6 Гц, CH_3 -группы жирноацильных остатков), 1,26 (CH_2 -группы в середине цепей жирнокислотных остатков), 2,12—2,40 (6 H, мультиплет, CH_2CO жирноацильных остатков), 2,51 (4 H, синглет, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3,25; 3,30; 3,49; 3,57 (по 3H, синглеты, C—O— CH_3), 3,64 (3H, синглет, COOCH_3).

Метанолит пер-О-метилпроизводного (IX). Смесь 12 мг метилпроизводного (IX) и 1 мл 3% раствора сухого HCl в MeOH кипятили 36 ч. По охлаждении смесь нейтрализовали дауэксом 1 (HO^-), упаривали досуха, остаток в 1 мл CHCl_3 наносили на колонку с 5 г силикагеля. Колонку промывали 25 мл CHCl_3 , после чего 15 мл смеси CHCl_3 — MeOH (20 : 1) элюировали 3,4,6-три-О-метилметил-*D*-глюкопиранозид (X); R_f 0,63 (CHCl_3 — MeOH , 9 : 1), затем 20 мл смеси тех же растворителей (9 : 1) вымывали 4-О-метилметил-*D*-глюкопиранозид (XI); R_f 0,26 (CHCl_3 — MeOH , 9 : 1).

Дейтерометилирование метилглюкозидов (X) и (XI). Метилглюкозид (X) кипятили 6 ч в 0,5 мл CD_3I с избытком Ag_2O . По охлаждении смесь фильтровали, после упаривания фильтрата получали 2-О-тридейтерометил-3,4,6-три-О-метилметил-*D*-глюкопиранозид (XII), идентичный при ТСХ в системе растворителей бензол — этилацетат (2 : 1) пента-О-метил- α -*D*-глюкопиранозе (R_f 0,75).

Аналогично из метилглюкозида (XI) получали 2,3,6-три-О-тридейтерометил-4-О-метилметил-*D*-глюкопиранозид (XIII), идентичный при ТСХ в той же системе растворителей метилглюкозиду (XII) и пента-О-метил- α -*D*-глюкопиранозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ледерер Э. (1971) Ж. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 16, 180—196.
2. Goren M. B. (1972) Bacteriol. Revs, 36, 33—64.
3. Lederer E., Adam A., Ciorbaru R., Petit J.-F., Wietzerbin J. (1975) Mol. and Cell. Biochem., 7, 87—104.
4. Lederer E. (1976) Chem. and Phys. Lipids, 16, 91—106.
5. Bekierkunst A., Wang L., Toubiana R., Lederer E. (1974) Infect. Immunity, 10, 1044—1050.
6. Okazaki H., Sugino H., Kanzaki T., Fukuda H. (1969) Agr. Biol. Chem., 33, 764—770.
7. Suzuki T., Tanaka K., Matsubara I., Kinoshita S. (1969) Agr. Biol. Chem., 33, 1619—1627.
8. Vilkas E., Rojas A. (1964) Bull. Soc. chim. biol., 46, 689—701.
9. Vilkas E., Adam A., Senn M. (1968) Chem. and Phys. Lipids, 2, 11—16.

10. Asselineau C. P., Montrozier H. L., Promé J. C., Savagnac A. M., Welby M. (1972) Eur. J. Biochem., 28, 102—109.
11. Goren M. B. (1970) Biochim. et biophys. acta, 210, 116—126.
12. Красильников Н. А., Коронелли Т. В., Дуда В. И. (1972) Микробиология, 41, 313—319.
13. Eichberg J. J., Whittaker V. P., Dawson R. M. C. (1964) Biochem. J., 92, 91—100.
14. Jatzkewitz H., Mehl E. (1960) Z. Physiol. Chem., 320, 251—259.
15. Rouser G., Kritchevsky G., Heller D., Lieber E. (1963) J. Amer. Oil Chem. Soc., 40, 425—454.
16. Shaw N. (1968) Biochim. et biophys. acta, 164, 435—436.
17. Hintze Y., Röper H., Gercken G. (1973) J. Chromatogr., 87, 481—489.
18. Adam A., Senn M., Vilkas E., Lederer E. (1967) Eur. J. Biochem., 2, 460—468.
19. Senn M., Ioneda T., Pudles J., Lederer E. (1967) Eur. J. Biochem., 1, 353—356.
20. Ryhage R., Stenhagen E. (1963) Mass Spectrometry of Organic Ions (McLafferty F. W., ed.), p. 399—452, Academic Press, New York — London.
21. Kochetkov N. K., Chizhov O. S. (1966) Advances Carbohydr. Chem., 21, 39—93.
22. Коронелли Т. В. (1968) Микробиология, 37, 984—987.
23. Batrakov S. G., Panosyan A. G., Konova I. V., Bergelson L. D. (1974) Biochim. et biophys. acta, 337, 29—40.
24. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. (1972) J. Chromatogr., 67, 376—378.
25. DeJongh D. C., Radford T., Hribar J. D., Hanessian S., Bieber M., Dawson G., Sweeley C. C. (1969) J. Amer. Chem. Soc., 91, 1728—1740.

Поступила в редакцию
14.VI.1976

THE LIPIDS OF MYCOBACTERIA. I. UNUSUAL TREHALOSE DERIVATIVE FROM *MYCOBACTERIUM PARAFFINICUM*

BATRAKOV S. G., ROSYNOV B. V., KORONELLI T. V.,
KOZHUHOVA R. A., BERGELSON L. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow; Biological Department
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

An unusual acidic glycolipid has been isolated from the total lipids of *Mycobacterium paraffinicum* by means of silica gel and DEAE cellulose chromatography. It has been identified as 2-O-octanoyl-2',3-di-O-decanoyl-6-O-succinoyl- α , α -D-trehalose basing on the IR, ¹H-NMR and high resolution mass spectra, as well as on the degradation of its per-O-methyl derivative.