



УДК 576.851.151.095.383

НЕОБЫЧНЫЙ ПОЛИОЛЬНЫЙ ЛИПИД,
2-С- α -D-ТАЛОПИРАНОЗИЛ-5-АЛКИЛ(C₁₉, C₂₁)РЕЗОРЦИН,
ИЗ АЗОТФИКСИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИИ *AZOTOBACTER*
CHROOSOCUM

Ватраков С. Г.

Центральный институт усовершенствования врачей, Москва

Придачина Н. Н., Кругляк Е. Б., Новогрудская Е. Д.,
Чекакина Е. В.Всесоюзный научно-исследовательский институт микробиологических средств
защиты растений и бактериальных препаратов, Москва

Из суммарных клеточных липидов азотфиксирующей бактерии *Azotobacter chroococcum* 92 при помощи хроматографии на колонках с DEAE-целлюлозой и силикагелем выделен полиольный липид необычного типа, который на основании данных УФ- и ИК-спектроскопии, спектроскопии ПМР, КД и масс-спектрометрии охарактеризован как 2-С- α -D-талопиранозил-5-алкил-(C₁₉, C₂₁)резорцин. Обсуждаются возможные пути биосинтеза этого липида.

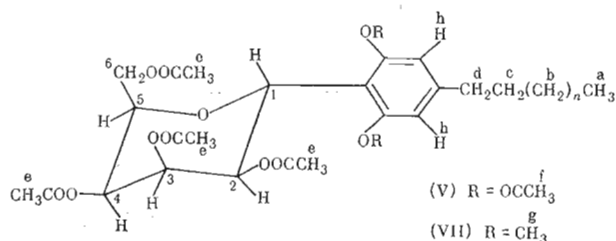
В наших предыдущих сообщениях [1, 2], посвященных липидам культуры азотфиксирующей бактерии *Azotobacter chroococcum* 92, говорилось о том, что среди липидов последней присутствует ряд веществ, содержащих фенольные и енольные гидроксильные группы. Из числа этих веществ были выделены и охарактеризованы 5-алкил (C₁₉, C₂₁)резорцины (I) [1], а также жирные 3,5-дикето- и 3,5,7-трикетокислоты C₂₆—C₃₀ (II и III соответственно) [2], причем алкилрезорцины (I) оказались одним из доминирующих видов клеточных липидов микроорганизма. В настоящем сообщении описывается выделение и установление строения четвертого липида (IV) вышеуказанного ряда.

Для выделения липида (IV) суммарные клеточные липиды *A. chroococcum* 92, экстрагированные смесями хлороформа с метанолом (2:1 и 1:1*), подвергали хроматографии на DEAE-целлюлозе. При этом системой хлороформ—метанол (9:1) элюировались воска, триглицериды, убихиноны и резорцинолипид (I); смесью тех же растворителей в соотношении 7:3 вымывались липид (IV) и фосфатидилэтаноламин, а смесью хлороформ—уксусная кислота (4:1)—кетокислоты (II и III). Приведенные факты говорят, с одной стороны, о нейтральном характере липида (IV), а с другой—о наличии в его молекуле полиольной группировки, которая обуславливает более сильную неионную сорбцию липида на DEAE-целлюлозе по сравнению с алкилрезорцином (I). Отделение липида (IV) от фосфатидилэтанолamina и его окончательную очистку проводили на колонке с силикагелем. На хроматограммах липид (IV) давал положительные реакции со специфическими реагентами на фенольные (енольные) гидроксильные группы [3]: с бис-дiazотированным бензидином, с хлорным железом—феррицианидом калия и с реактивом Шаули. Кроме того, это вещество окрашивалось периодатом—реактивом Шиффа [4], что указывает на наличие в его молекуле 1,2-гликольской группировки. В условиях кислотного и щелочного метанолиза липид (IV) не изменялся. Основную информацию о его строении мы получили при помощи спектрометрических методов.

ИК-спектр нативного липида (IV) содержит полосы валентных колебаний связей Н—О спиртовых групп (широкая полоса с максимумом при

* Здесь и далее указывается объемное соотношение растворителей.

Спектры ПМР пер-О-ацетата (V) и тетра-О-ацетата ди-О-метилпроизводного (VII)
 липида (IV)
 100 МГц; CDCl₃



Протоны	Гексаацетат (V)			Тетраацетат (VII)		
	Число протонов	Хим. сдвиг, м. д.	Структура сигнала (J, Гц)	Число протонов	Хим. сдвиг, м. д.	Структура сигнала (J, Гц)
a	3	0,89	т (6,5)	3	0,89	т (6,5)
b	30-40	1,26	м	30-40	1,26	м
c	2	1,59	м	2	1,65	м
d	2	2,62	т (6,5)	2	2,71	т (6,5)
e	—	—	—	3	1,90	с
e	6	2,05	с	3	2,05	с
e	3	2,08	с	3	2,13	с
e	3	2,16	с	3	2,16	с
f	6	2,32	с	—	—	—
g	—	—	—	6	3,88	с
h	2	6,80	с	2	6,58	с
H ¹	1	5,23	д (10)	1	5,42	д (9)
H ²	1	5,77	к (10 и 3,5)	1	6,03	к (9 и 3)
H ³	1	5,49	к (3,5 и 3,5)	1	5,68	к (3 и 4)
H ⁴	1	5,05	к (3,5 и 2)	1	5,08	к (4 и 2)
H ⁵ и H ⁶	3	4,06-4,44	м	3	4,08-4,72	м

Примечание. с — синглет, д — дублет, т — триплет, к — квадруплет, м — мультиплет.

3390 см⁻¹), одинарных связей кислородных атомов с насыщенными атомами углерода (1064 и 1028 см⁻¹), связей С—Н метильной и метиленовых групп (2958, 2921 и 2855 см⁻¹), а также полосу деформационных колебаний последних (1467 см⁻¹). Ряд полос свидетельствует о том, что в структуру липида входит фенольная группировка: полосы валентных колебаний связей С—С ароматического кольца (1631, 1588, 1518, 1450 см⁻¹) и связи С—О фенола (1340 и 1255 см⁻¹). Полосы карбонильных колебаний в спектре отсутствуют. Наличие в молекуле гидроксильных групп двух типов — связанных с ароматическим ядром и с насыщенными С-атомами — подтверждается ИК-спектром пер-О-ацетильного производного (V). В ИК-спектре ацетата (V) полосы гидроксильных групп отсутствуют, но имеются две карбонильные полосы, одна из которых принадлежит ацетату фенола (1778 см⁻¹), а другая — карбонилу ацетоксильной группы, присоединенной к насыщенному атому углерода (1745 см⁻¹). Соответственно в спектре содержатся две полосы валентных колебаний С—О (1185 и 1236 см⁻¹), относящиеся к указанным двум типам ацетоксильных групп.

О наличии в молекуле липида (IV) ароматического ядра говорит также его УФ-спектр. В области 220–320 нм в спектре обнаруживаются два максимума поглощения — при 274 и 282 нм (ε 2200 и 2300 соответственно*), отвечающие α-полосе (L_b) бензольного хромофора. Аналогичные максимумы наблюдались и в УФ-спектре алкилрезорцина (I), однако их интенсивность была значительно ниже [1].

Спектр ПМР ацетата (V) (табл. 1) содержит в области сильного поля трехпротонный триплет при δ 0,89 м.д. (J 6,5 Гц), принадлежащий про-

* При определении оптических констант липида (IV) в расчет принимался средний молекулярный вес фракции, равный 552 (см. ниже).

Основные пики в масс-спектрах пер-О-ацетильного (V)
и пер-О-тридекаацетильного (d_{13} -V) производных липида (IV)

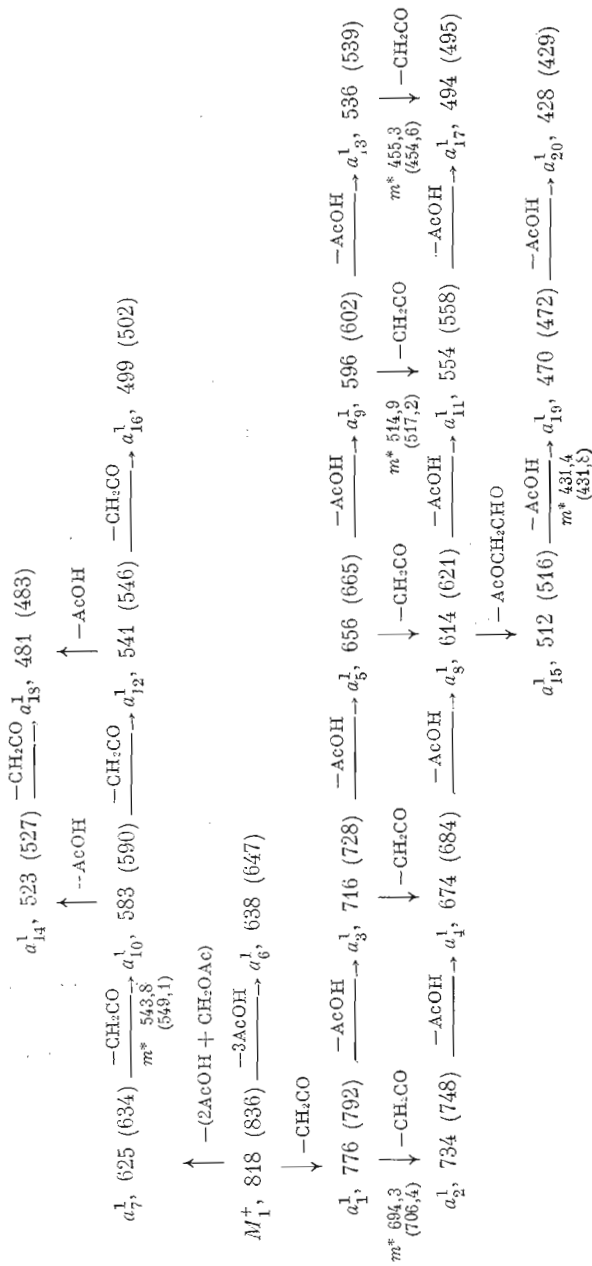
m/z по масс-спектру производного (V)	$I_{\text{отн}}, \%$	Тип пика *	Найденная брутто-формула	m/z по масс-спектру аналога (d_{13} -V)
818	0,3	M_1^+	$C_{45}H_{70}O_{13}$	836
790	0,2	M_2^+	$C_{43}H_{68}O_{13}$	808
776	22,5	a_1^1	$C_{43}H_{68}O_{12}$	792
748	16	a_1^2	$C_{41}H_{64}O_{12}$	764
734	42	a_2^1	$C_{41}H_{66}O_{11}$	748
716	5	a_3^1		728
706	31	a_2^2	$C_{39}H_{62}O_{11}$	720
688	3	a_3^2		700
674	20	a_4^1	$C_{39}H_{62}O_9$	684
656	13,5	a_5^1		665
646	11,5	a_4^2		656
638	50	a_6^1	$C_{39}H_{58}O_7$	647
628	12	a_5^2		637
625	53	a_7^1	$C_{38}H_{57}O_7$	634
614	18	a_8^1		621
610	38	a_6^2	$C_{37}H_{54}O_7$	619
597	71	a_7^2	$C_{36}H_{53}O_7$	606
596	36	a_9^1	$C_{37}H_{56}O_8$	602
586	14	a_8^2		593
583	60	a_{10}^1	$C_{36}H_{55}O_6$	590
568	26	a_9^2		574
555	65	a_{10}^2	$C_{34}H_{51}O_6$	562
554	47,5	a_{11}^1	$C_{35}H_{54}O_5$	558
541	23,5	a_{12}^1		546
536	30,5	a_{13}^1		539
526	34,5	a_{11}^2	$C_{33}H_{50}O_5$	530
523	22	a_{14}^1		527
513	47,5	a_{12}^2		518
512	82,5	a_{15}^1	$C_{33}H_{52}O_4$	516
508	19	a_{13}^2		511
499	30,5	a_{16}^1		502
495	55	a_{14}^2		499
494	82,5	a_{17}^1	$C_{32}H_{50}O_3$	495
484	62	a_{15}^2	$C_{31}H_{48}O_4$	488
481	25,5	a_{18}^1		483
471	59	a_{16}^2		474
470	100	a_{19}^1	$C_{31}H_{50}O_3$	472

m/z по масс-спектру производного (V)	$I_{\text{отн}}, \%$	Тип иона *	Найденная брутто-формула	m/z по масс-спектру аналога ($d_{18}\text{-V}$)
466	71	a_{17}^2	$\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_3$	467
453	17,5	a_{18}^2		455
442	68	a_{19}^2	$\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_3$	444
428	23,5	a_{20}^1	$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$	429
400	12,5	a_{20}^2		401
358	8	b_6'		367
357	7,5	b_6''		366
316	9	b_9'		323
315	7	b_9''		322
274	10	b_{11}'		279
273	7	b_{11}''		278
259	26	e_1	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_7$	268
232	14,5	b_{15}'		235
231	16,5	b_{15}''		234
190	19	b_{19}'		192
189	41,5	b_{19}''		191
152	28,5	b_{21}'	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	154
151	11	b_{21}''		153
148	27,5	b_{20}'	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$	149
147	35,5	b_{20}''	$\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_2$	148
139	63	e_2	$\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_3$	142
124	9,5	b_{22}'	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$	126
123	11,5	b_{22}''	$\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_2$	125
97	39	e_3	$\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_2$	98

* Однотипные ионы серий a^1 и a^2 обозначены одинаковыми подстрочными индексами; ионы серий b' и b'' имеют те же подстрочные индексы, что и соответствующие ионы — предшественники типа a ; фрагменты типа a , возможные предшественники ионов b_{21}' , b_{21}'' , b_{22}' и b_{22}'' , в таблице не приводятся ввиду весьма низкой интенсивности их пиков.

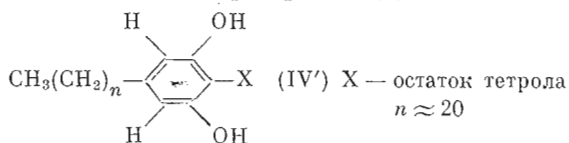
тонам терминальной метильной группы алкильного остатка, узкий мультиплет (δ 1,26 м.д.; 30—40 Н) от протонов метиленовых групп того же остатка, двухпротонный триплет (δ 2,62 м.д.; J 6,5 Гц), который, очевидно, следует приписать протонам метиленовой группы, присоединенной к ароматическому циклу. Этот триплет обнаруживает слабое расщепление ($\sim 0,5$ Гц), что может быть связано с взаимодействием протонов указанной метиленовой группы с ароматическими протонами в *орто*-положениях по отношению к алкильному заместителю. В рассматриваемой области спектра находятся также четыре синглета, отвечающие протонам шести ацетоксильных групп: при δ 2,32 (6 Н), 2,16 (6 Н), 2,08 (3 Н) и 2,05 (3 Н) м.д. Судя по величине химического сдвига, первый из них соответствует двум ацетоксильным группам, присоединенным к ароматическому ядру, остальные четыре группировки связаны с насыщенными С-атомами.

Схема 1*



* Указаны массовые числа ионов, в скобках — массовые числа по спектру дейтероацетата (d_{1-7}); соответствующие ионы серии a^2 имеют массовые числа, меньшие на 28 единиц.

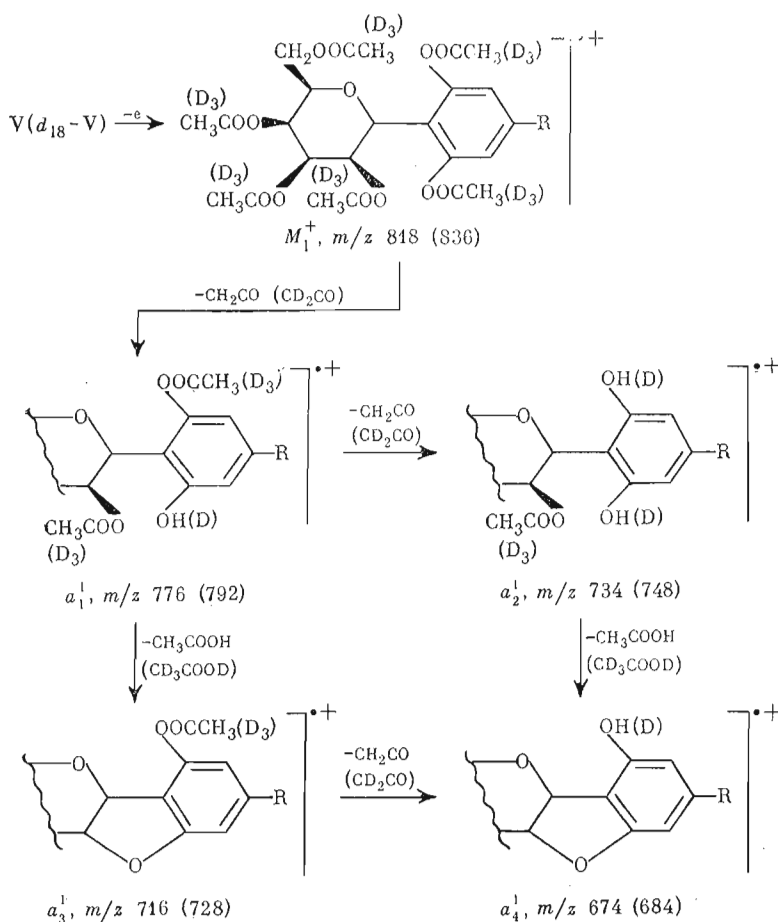
Отсутствие сигналов ацетоксильных протонов в спектре ПМР пер-О-три-дейтероацетильного производного (d_{18} -V) липида (IV) свидетельствует о том, что молекула нативного липида имеет шесть свободных гидроксильных групп, из которых две должны быть связаны с ароматическим ядром. В области слабого поля спектра ацетата (V) наблюдается двухпротонный синглет при δ 6,80 м.д. от ароматических протонов. Указанная структура сигнала говорит об эквивалентности этих протонов. Приведенные данные позволяют предварительно охарактеризовать природный липид как производное (IV') алкилрезорцина (I).



Информацию о строении тетрольного остатка X дает область δ 4–6 м.д. спектра ПМР, где расположены сигналы от семи протонов (см. табл. 1). По характеру этих сигналов можно предположить, что они принадлежат протонам гексапиранозного цикла. Если для последнего принять 1C-конформацию, то отнесение названных сигналов может быть произведено следующим образом. Однопротонный дублет при δ 5,23 м.д., очевидно, отвечает протону при $C_{(1)}$ углеводного цикла. Расщепление этого сигнала на две линии с $J_{\text{H}^1, \text{H}^2}$ 10 Гц указывает на *транс*-аксиальную ориентацию протонов при $C_{(1)}$ и $C_{(2)}$. Протону при $C_{(2)}$, вероятно, должен соответствовать однопротонный квадруплет при δ 5,77 м.д. с $J_{\text{H}^2, \text{H}^1}$ 10 Гц и $J_{\text{H}^2, \text{H}^3}$ 3,5 Гц. В таком случае, исходя из второй константы спин-спинового взаимодействия, протону при $C_{(3)}$ следует приписать экваториальное расположение, а из оставшихся двух однопротонных сигналов этому протону должен отвечать находящийся в более слабом поле квадруплет при δ 5,49 м.д. с $J_{\text{H}^3, \text{H}^2}$ и $J_{\text{H}^3, \text{H}^4}$, равными 3,5 Гц. Характер расщепления сигнала указывает на аксиальную ориентацию протона при $C_{(4)}$, об этом же свидетельствует и его химический сдвиг — δ 5,05 м.д. Сигнал от H^4 расщеплен на четыре линии с $J_{\text{H}^4, \text{H}^3}$ 3,5 Гц и $J_{\text{H}^4, \text{H}^5}$ 2 Гц, откуда следует, что названный протон взаимодействует с двумя экваториальными протонами — при $C_{(3)}$ и $C_{(5)}$. Протонам при $C_{(5)}$ и $C_{(6)}$ соответствует трехпротонный мультиплет в области δ 4,06–4,44 м.д., точная интерпретация которого без дополнительных данных не представляется возможной. Тем не менее сделанные выше отнесения позволяют охарактеризовать тетрольный остаток X липида (IV) как α -талопиранозный. Из данных спектра следует еще один важный с аналитической точки зрения вывод. Протон при $C_{(1)}$ талопиранозного остатка проявляется в более сильном поле, чем протоны при $C_{(2)}$ и $C_{(3)}$, даже несмотря на то, что он в значительной степени дезэкранирован *син*-аксиальными ацетоксильной и ацетоксиметиленовой группами при $C_{(3)}$ и $C_{(5)}$. Этот факт вполне объясним, если допустить, что атом $C_{(1)}$ пираноидного цикла связан непосредственно с ароматическим ядром, т. е. липид (IV) представляет собой С-гликозид, как это изображено в табл. 1.

Размер углеродной цепи алкильного остатка был определен при помощи масс-спектрометрического анализа гексаацетата (V) и его дейтероаналога (d_{18} -V). Одновременно было получено подтверждение структуры полиольной части липидной молекулы. Наибольшие массовые числа в спектре ацетата (V) (табл. 2) имеют ионы с m/z 818 и 790, которые охарактеризованы нами как молекулярные ионы (M_1^+ и M_2^+ соответственно) двух доминирующих гомологов фракции (V). Смещение пиков этих ионов в масс-спектре дейтероацетата (d_{18} -V) на 18 единиц массы указывает на наличие в молекулах гомологичных ацетатов (V) шести О-ацетильных групп, что совпадает с выводом, сделанным выше из данных спектра ПМР. Принимая во внимание те же данные, а также найденные брутто-формулы молекулярных ионов M_1^+ и M_2^+ (табл. 2), мы идентифицирова-

Схема 2 *



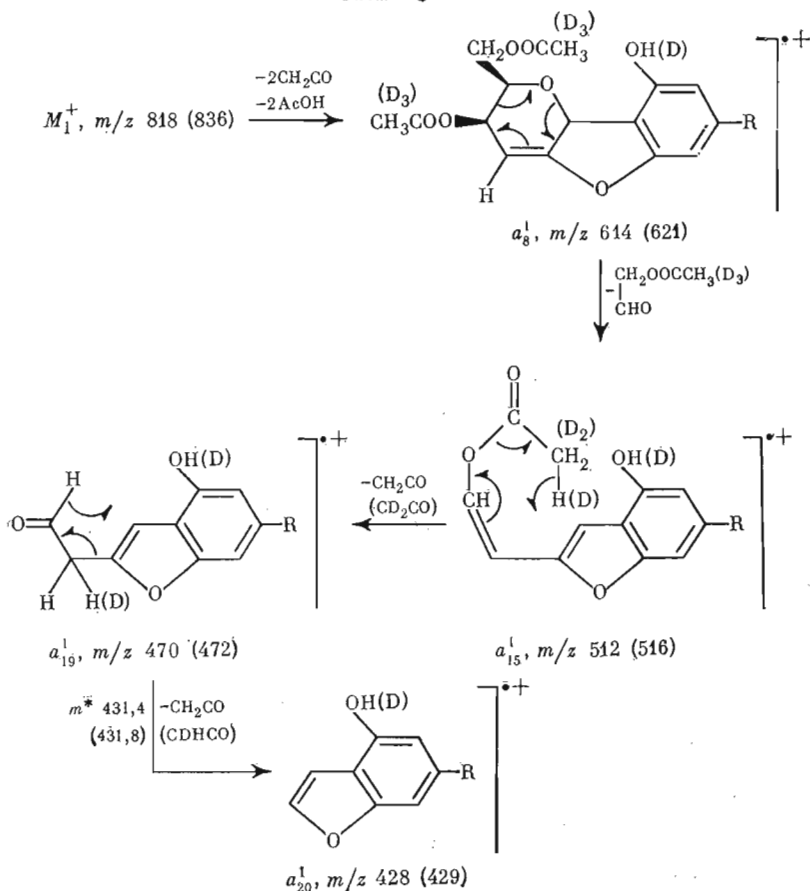
* На схемах 2–6 в скобках указаны массовые числа ионов по масс-спектру пер-О-тридейтероацетата (d_{18} -V).

ли алкильные остатки в молекулах вышеназванных гомологов как n - $C_{21}H_{43}$ и n - $C_{19}H_{39}$.

Основные пики в масс-спектре ацетата (V) относятся к ионам трех типов — a , b и v . Фрагменты a сохраняют алкиларильную часть молекулярного иона и образуются в результате потери последним молекул $AcOH$ и кетена, а также дегградации пираноидного цикла; аналогичные реакции распада наблюдаются при масс-спектрометрии пер-О-ацетатов различных арил- C -гликозидов (см., например, [5]). Ионы b не содержат C -атомов алкильного остатка, за исключением атома, непосредственно связанного с ароматическим ядром; помимо ароматического ядра в состав большинства ионов b входят атомы углерода талозного остатка. Наконец, в структурах ионов v находятся только углеводные C -атомы.

Пути образования ионов типа a демонстрирует схема 1 на примере распада молекулярного иона M_1^+ ($m/z 818$), дающего начало серии ионов a^1 ; точно так же протекает фрагментация гомологичного молекулярного иона M_2^+ с $m/z 790$, которая приводит к серии ионов a^2 . Предполагаемое строение ионов серии a^1 и a^2 находится в полном соответствии с величинами сдвигов их пиков в масс-спектре дейтероацетата (d_{18} -V) и в большинстве случаев подтверждено точным измерением массовых чисел. На происхождение ряда фрагментов указывают имеющиеся в спектре пики метастабильных ионов. Некоторые реакции, изображенные на схеме 1, целесообразно рассмотреть детально. Интенсивная потеря молекулярным ионом M_1^+ одной и двух молекул кетена, приводящая к фрагмен-

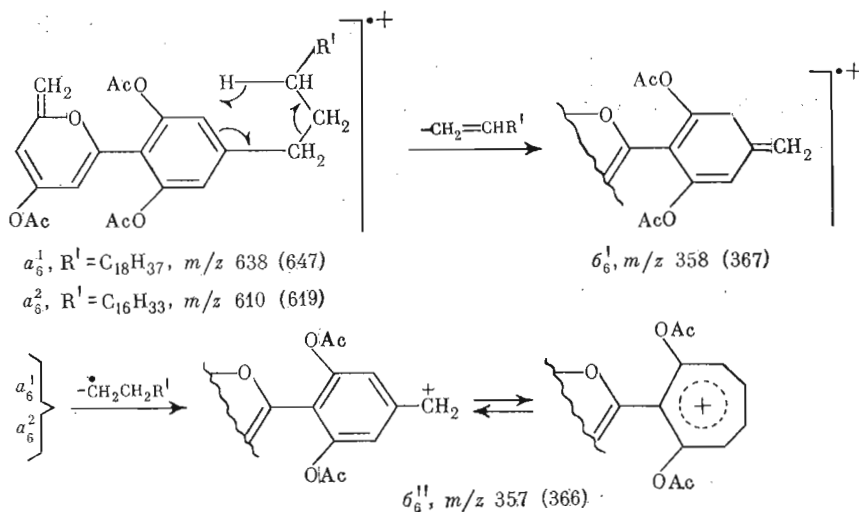
Схема 3



там a_1^4 и a_2^4 , должна происходить главным образом за счет адетоксильных групп, связанных с ненасыщенными С-атомами (ср. [6]), т. е. с С-атомами ароматического ядра. Отщепляя молекулу $AcOH$, фрагменты a_1^4 и a_2^4 дают ионы a_3^1 и a_4^1 соответственно. Оказалось, что в случае дейтероацетата (d_{18} -V) такое превращение осуществляется путем элиминирования молекулы CD_3COOD . Таким образом, обе реакции протекают с участием «освободившихся» фенольных групп HO (или DO) и сопровождаются замыканием пятичленного гетероцикла (схема 2). Отсюда следует, что в молекуле нативного липида (IV) фенольные гидроксильные группы находятся в *ortho*-положении по отношению к С-гликозидному остатку. Выше аналогичный вывод был сделан на основании спектра ПМР.

Ион a_{15}^1 с m/z 512 формально может возникать из иона a_{11}^1 с m/z 554 в результате отщепления молекулы кетена. Однако в случае дейтероацетильного производного (d_{18} -V) оба этих иона содержат по четыре атома дейтерия и поэтому не могут иметь прямой генетической связи. Предшественником фрагмента a_{15}^1 , скорее всего, является ион a_8^1 (m/z 614), который, теряя атомы $C_{(5)}$ и $C_{(6)}$ углеводного остатка, дает ион a_{13}^1 (схема 3). Отщепление последним молекулы кетена приводит к фрагменту a_{19}^1 (m/z 470), который далее превращается в ион a_{20}^1 (m/z 428) за счет элиминирования атомов $C_{(3)}$ и $C_{(4)}$ пираноидного цикла.

Фрагменты серии b , по-видимому, представляют собой продукты распада ионов a и возникают в результате разрыва β -связи алкильного остатка. Поскольку этот разрыв может происходить как с миграцией атома водорода к заряженному фрагменту, так и без такой миграции [7], как-



дый ион a дает два иона b — ион серии b' с четным массовым числом, образующийся вследствие первого процесса, ион серии b'' с массовым числом, меньшим на единицу, возникающий при простом разрыве β -связи алкильного остатка. На схеме 4 приводится пример превращения иона типа a в ионы b' и b'' .

Однако возможен и иной путь распада молекулярных ионов, приводящий к ионам b , а именно первоначальная потеря молекулярными ионами алкильного остатка и последующая деградация углеводного цикла. Пики большинства фрагментов b' и b'' малоинтенсивны, наиболее интенсивные пики указаны в табл. 2. К ионам типа b относятся, в частности, фрагменты с m/z 152 (b_{21}'), 151 (b_{21}''), 124 (b_{22}') и 123 (b_{22}''), предполагаемые структуры и пути образования которых изображены на схеме 5. Два последних иона не содержат C-атомов пираноидного цикла, а в состав ионов b_{21}' и b_{21}'' входит атом $C_{(1)}$ этого цикла. Интенсивность пиков возможных предшественников фрагментов b_{21}' и b_{21}'' , т. е. ионов a_{21}^1 и a_{21}^2 , незначительна.

В масс-спектре ацетата (V) отсутствуют пики ионов с m/z 331, 242, 157 и продуктов распада этих ионов, которые характерны для масс-спектров тетра-О-ацетилгексозидов [6, 8]. Аналогичная картина наблюдается в масс-спектрах пер-О-ацетильных производных арил-С-гексапиранозидов различного строения [5]. Наиболее интенсивные ионы типа v в обсуждаемом спектре — v_1 (m/z 259), v_2 (m/z 139) и v_3 (m/z 97) — содержат атомы $C_{(2)} - C_{(6)}$ углеводного остатка и, вероятно, образуются либо непосредственно из молекулярных ионов, либо из ионов $a_1^1, a_1^2, a_2^1, a_2^2$ (схема 6).

Необходимое для полной характеристики липида (IV) определение абсолютной конфигурации остатка талозы было сделано на основании данных спектра КД нативного липида. Кривая КД липида имеет три положительных максимума, при 208, 236 и 273 нм ($\Delta\epsilon$ 16 000, 5400 и 176 соответственно), и один отрицательный — при 289 нм ($\Delta\epsilon$ 75). Максимумы при 208 и 236 нм обусловлены p -переходом (L_a), а остальные — α -переходом (L_b) ароматического хромофора. Хотя ароматическое ядро липидной молекулы не образует жесткой системы с остатком талозы, тем не менее свободное вращение первого вокруг его связи с атомом $C_{(1)}$ пираноидного цикла ограничено вследствие стерических препятствий, создаваемых ароматическими гидроксильными группами. Поэтому для определения конфигурации углеводного остатка исходя из знака эффекта Коттона возможно применение правила октантов [9].

Схема 5

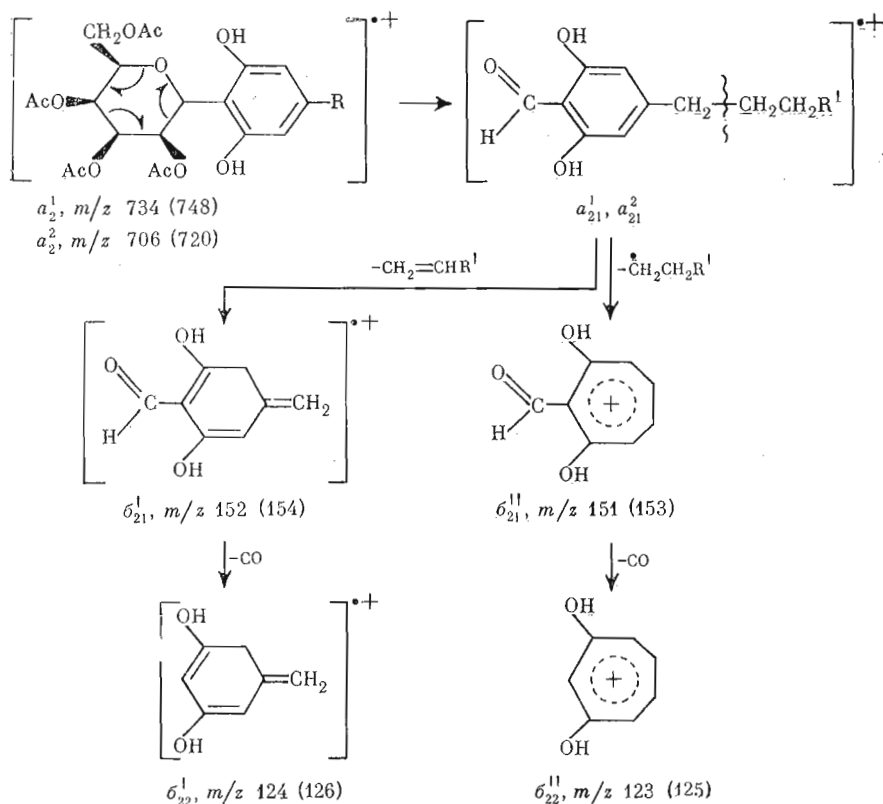
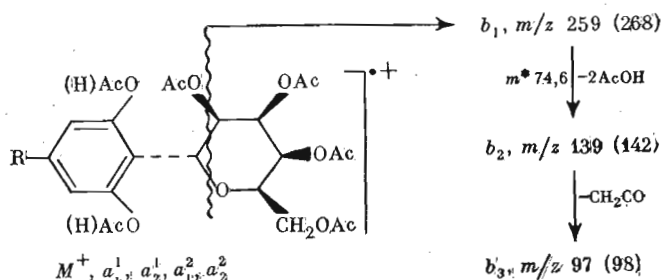


Схема 6



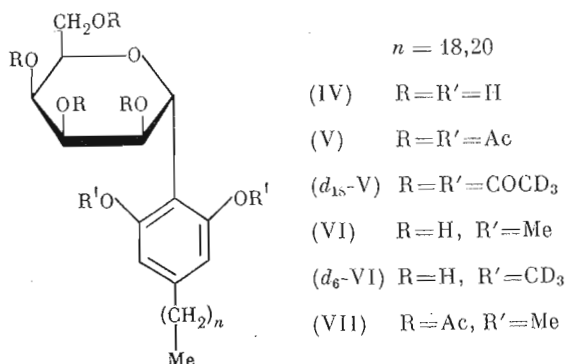
В структуре наиболее стабильного ротamera при 1C-конформации цикла талопиранозы плоскость ароматического кольца, скорее всего, располагается параллельно плоскости, в которой находятся атомы $C_{(2)}$, $C_{(3)}$ и $C_{(5)}$ углеводного остатка (схема 7). В случае C1-конформации бензольное ядро расположится параллельно плоскости, проходящей через связи $C_{(3)}-H$ и $C_{(5)}-H$. Поскольку без специального анализа трудно предсказать вероятность той или другой конформации, необходимо оценить знак эффекта Коттона и для 1C- и C1-конформации. На схеме 7 представлены проекции молекулы липида (IV) с D-конфигурацией талопиранозного остатка при рассмотрении ее в направлении, указанном стрелками. Очевидно, в обоих случаях основной вклад в эффект Коттона вносит хиральный атом $C_{(1)}$, в обоих случаях связанный с ним кислородный гетероатом цикла попадает в положительный октант. Вклады асимметрических атомов $C_{(2)}$, $C_{(3)}$ и $C_{(5)}$ должны быть намного меньше ввиду их удаленности от бензольного хромофора; эти вклады частично взаимно компенсируются, так как оксиметильная и гидроксильные группы, связанные с этими атомами, попадают в октанты противоположных знаков.

Основные пики в масс-спектре бензолборонатов (VIII) *

m/z	$I_{\text{отн.}} \%$	Тип иона	Найденная брутто-формула	m/z по масс- спектру дейтеро- аналога (d_6 -VIII)
766	18	M_3^+	$C_{47}H_{68}B_2O_7$	772
738	20	M_4^+	$C_{45}H_{64}B_2O_7$	744
460	61	e_1^1	$C_{30}H_{52}O_3$	466
445	18	e_3^1	$C_{30}H_{53}O_2$	451
432	100	e_1^2	$C_{28}H_{48}O_3$	438
432		e_2^1	$C_{29}H_{52}O_2$	438
417	20	e_3^2	$C_{28}H_{49}O_2$	423
404	44	e_2^2	$C_{27}H_{48}O_2$	410
193	32	z	$C_{11}H_{13}O_3$	199
180	83	zc_1^1	$C_{10}H_{12}O_3$	186
179	14	zc_1^2	$C_{10}H_{11}O_3$	185
165	40	zc_3^1	$C_{10}H_{13}O_2$	171
160	20	d_1	$C_9H_9BO_2$	160
159	51	d_2	$C_9H_8BO_2$	159
152	31	zc_2^1	$C_9H_{12}O_2$	158
151	34	zc_2^2	$C_9H_{11}O_2$	157
146	28	z	$C_8H_7BO_2$	146

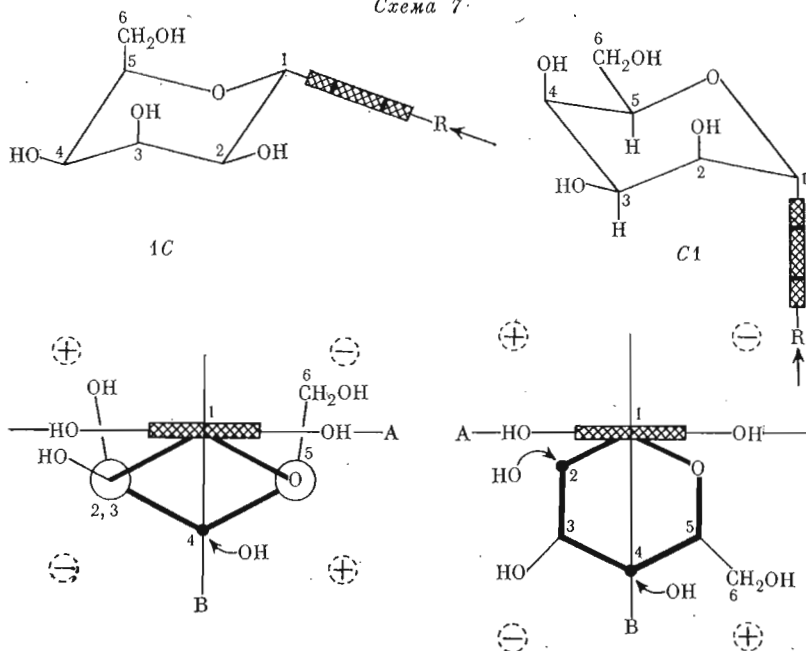
* Для борсодержащих ионов указаны только пики ионов с изотопом ^{10}B .

Следовательно, липид (IV) при D -конфигурации остатка талозы должен обнаруживать положительный эффект Коттона в области p -полосы бензольного хромофора (ср. [9]), что и наблюдалось нами. Совершенно очевидно, что для аналогичного липида с остатками L -талопиранозы наблюдался бы эффект Коттона противоположного знака. D -Конфигурация углеводного остатка подтверждается также значительным положительным оптическим вращением липида (IV) (см. «Экспериментальную часть»). Таким образом, обсуждаемый липид, выделенный нами из клеток культуры *A. chroococcum* 92, представляет собой 2- C - α - D -талопиранозил-5-алкил (n - $C_{19:0}$, n - $C_{21:0}$) резорцин (IV).



С целью подтверждения отдельных элементов структуры компонентов липидной фракции (IV) мы осуществили метилирование фенольных гид-

Схема 7.



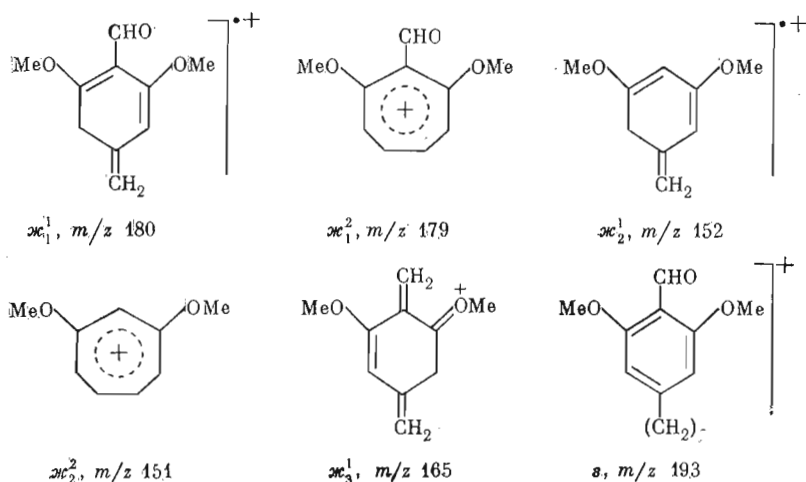
А — плоскость ароматического кольца, В — плоскость симметрии алкил-резорцинового остатка.

роксильных групп их молекул действием диазометана в хлороформ-метанольном растворе, а также тридейтерометилирование путем обработки дейтеродиазометаном раствора фракции в смеси хлороформ — тетрадейтерометанол. В результате были получены ди-О-метилпроизводные (VI) и ди-О-тридейтерометилпроизводные (d_6 -VI). В масс-спектре продукта метилирования (VI) присутствуют малоинтенсивные пики гомологичных молекулярных ионов с m/z 594 и 566 и значительно более интенсивные пики ионов $[M - H_2O]^+$ с m/z 576 ($C_{35}H_{60}O_6$) и 548 ($C_{33}H_{56}O_6$). Указанные массовые числа и брутто-формулы совпадают с таковыми, рассчитанными на основании предложенной выше структуры липида (IV). В масс-спектре дейтероаналогов (d_6 -VI) пики всех четырех ионов смещены на 6 единиц массы, откуда следует, что в молекулах гомологов (VI) содержится по две ароматические метоксигруппы, а в состав молекул нативных соединений (IV) должно входить по две фенольные гидроксильные группы. К такому же выводу приводит анализ спектра ПМР пер-О-ацетата (VII), полученного при ацетилировании диметилпроизводного (VI) (табл. 1). Следует обратить внимание на имеющиеся в спектре шестипротонный синглет от протонов двух ароматических метоксигрупп и четыре трехпротонных синглета от протонов четырех ацетоксигрупп, связанных с насыщенными углеродными атомами (ср. с данными для ацетата (V)). Структура первого сигнала говорит об эквивалентности метоксильных групп, а следовательно, об их симметричном расположении.

Дополнительные данные, подтверждающие строение углеводного остатка липида (IV), получены при изучении масс-спектра гомологичных бензолборонатов (VIII), которые образовались в результате обработки диметилпроизводного (VI) трифенилбораксолом. Так же как и в масс-спектрах пер-О-ацетата (V) и диметилпроизводного (VI), в спектре бензолборонатов (VIII) наблюдаются пики двух гомологичных молекулярных ионов

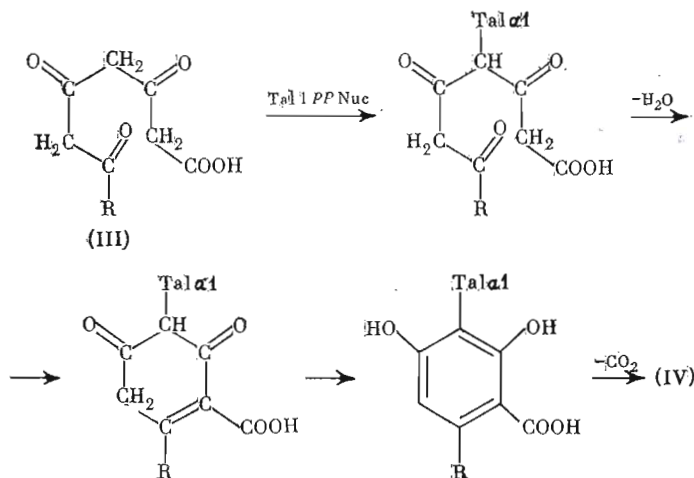
M_3^+ и M_4^+ (табл. 3). Найденные брутто-формулы этих ионов показывают, что в структурах компонентов фракции (VIII) содержится по два остатка бензолбороновой кислоты. Один из них должен образовывать циклический эфир с кислородными функциями при $C_{(4)}$ и $C_{(6)}$ углеводного остатка, другой — 1,3-диокса-2-боролановый цикл с кислородными функциями при $C_{(2)}$

ются в результате потери молекулярными ионами M_3^+ и M_4^+ атомов $C_{(2)}$ — $C_{(6)}$ остатка талозы (схема 8). Элиминирование из ионов e_1^1 и e_1^2 молекулы СО приводит к фрагментам e_2^1 (m/z 432) и e_2^2 (m/z 404). Ионы с m/z 445 (e_3^1) и 417 (e_3^2) сохраняют атом $C_{(1)}$ углеводного цикла, но лишены кислородного гетероатома последнего; образование этих ионов сопровождается миграцией атома водорода к заряженному фрагменту. Дальнейший распад ионов e аналогичен превращению фрагментов a в ионы b в случае пер-О-ацетата (V) и осуществляется путем разрыва β -связи алифатической цепи с миграцией или без миграции атома водорода. При этом из ионов e_1^1 и e_1^2 возникают ионы \varkappa_1^1 и \varkappa_1^2 с m/z 180 и 179, из ионов e_2^1 и e_2^2 — фрагменты \varkappa_2^1 и \varkappa_2^2 с m/z 152 и 151, а из ионов e_3^1 и e_3^2 — фрагмент \varkappa_3^1 с m/z 165. Кроме того, в этой области спектра присутствует интенсивный пик при m/z 193. Соответствующий ему ион z образуется за счет разрыва γ -связи алкильного остатка ионов e_1^1 и e_1^2 . В масс-спектре бензолборонатов (d_6 -VIII), полученных из ди-О-тридеутерометилпроизводных (d_6 -VI), пики фрагментов z , δ_1 и δ_2 сохраняют свое положение, пики всех остальных рассмотренных ионов смещены на 6 единиц в область больших массовых чисел.



В природе С-гликозиды встречаются главным образом в растениях в виде флавоноидов и родственных соединений [12]; известны также С-нуклеозидные антибиотики, продуцируемые микроорганизмами [13]. Липиды, содержащие С-гликозидную группировку, до настоящего времени не были обнаружены. В связи с этим представляют интерес возможные пути биосинтеза липида (IV). В предыдущем сообщении [2] мы высказали предположение о том, что биогенетическими предшественниками 5-алкилрезорцинов (I) в клетках *A. chroococcum* являются жирные 3,5,7-трикетокислоты (III), которые, претерпевая циклизацию по типу внутримолекулярной кротоновой конденсации и последующее декарбоксилирование, дают резорцинолипиды (I). Вероятно, аналогичным путем происходит синтез липида (IV) (схема 9), причем С-гликозилированию подвергается трикетокислота (III). Реакция может протекать по механизму С-алкилирования β -дикарбонильных систем, а донором талозидного остатка может служить, в частности, нуклеозиддифосфатталоза.

Схема 9



Экспериментальная часть

Культуру *A. chroococcum* 92 выращивали как описано в сообщении [1]. Применяли описанные в сообщениях [1, 2] методы экстракции и очистки клеточных липидов культуры, способ предварительной обработки силикагеля КСК, предназначенного для хроматографии на колонках, методы обнаружения веществ на хроматограммах, а также приборы и условия для УФ- и ИК-спектроскопии, спектроскопии ПМР и масс-спектрометрии. Спектры КД измеряли на спектрополяриметре «Cary 60» (США), снабженном приставкой CD-6002, в 96% этаноле при 25° С, толщина кювет 0,001–0,1 см. Для ТСХ использовали пластинки (6×9 см) с закрепленным слоем силикагеля КСК, приготовленные по методике [14].

Выделение липида (IV). На колонку (30×2,5 см), заполненную DEAE-целлюлозой (AcO⁻-форма) в смеси CHCl_3 — MeOH , 9:1, наносили раствор 1,3 г суммы клеточных липидов *A. chroococcum* 92 в 10 мл той же смеси растворителей. Колонку последовательно промывали системами: CHCl_3 — MeOH , 9:1 (600 мл) и 7:3 (700 мл), CHCl_3 — AcOH , 4:1 (500 мл), MeOH (400 мл) и CHCl_3 — MeOH , 2:1, содержащей 5% конц. водного аммиака (500 мл). Фракции, полученные при вымывании каждой системой, собирали отдельно и анализировали при помощи ТСХ в системе CHCl_3 — MeOH — вода, 80:20:2. Фракция, элюированная смесью CHCl_3 — MeOH , 7:3, содержала липид (IV), R_f 0,65, и фосфатидилэтаноламин, R_f 0,1. В других фракциях липид (IV) не обнаружен. После упаривания указанной фракции и высушивания остатка (здесь и далее сушили 8–10 ч при 35° С / 0,05 мм) получали 89 мг смеси липидов. Раствор этой смеси в 0,5 мл CHCl_3 наносили на колонку (20×2 см), заполненную силикагелем в CHCl_3 . Колонку промывали последовательно смесями CHCl_3 — MeOH (по 200 мл) — 30:1, 20:1, 15:1, 10:1, 9:1, 7:1 и 5:1. Элюат собирали фракциями объемом 10 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в вышеуказанной системе растворителей. Ряд фракций, элюированных смесью CHCl_3 — MeOH , 9:1, содержал хроматографически гомогенный липид (IV). После упаривания этих фракций и высушивания остатка получали 12 мг липида (IV). Из других фракций, элюированных той же смесью, а также системой CHCl_3 — MeOH , 7:1, получали 30 мг липида (IV), загрязненного примесями, который еще раз хроматографировали на колонке (15×1,5 см) с силикагелем; получали дополнительно 10 мг вещества. Общий выход липида (IV) 22 мг; R_f 0,35 (CHCl_3 — MeOH — вода, 80:15:1), 0,4 (CHCl_3 — MeOH — конц. водный аммиак, 80:20:2); $[\alpha]_{388}^{25} +57^\circ$, $[\alpha]_{577}^{25} +63^\circ$, $[\alpha]_{546}^{25} +90^\circ$, $[\alpha]_{435}^{25} +176^\circ$ (при 21° С; CHCl_3 — MeOH , 2:1; c 1,0).

Пер-О-ацетат липида (V). К раствору 12 мг липида (IV) в 0,5 мл безводного пиридина добавляли при 22° С 0,5 мл уксусного ангидрида. Смесь оставляли при той же температуре на 12 ч и упаривали досуха. Остаток

растворяли в 0,5 мл CH_2Cl_2 и раствор наносили на колонку ($10 \times 1,2$ см), заполненную силикагелем в CH_2Cl_2 . Колонку промывали 100 мл CH_2Cl_2 , 80 мл смеси $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CHCl}_3$, 2:1, затем 50 мл смеси $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CHCl}_3$, 1:2, элюировали 10 мг пер-О-ацетата (V); R_f 0,35 (в CHCl_3), 0,75 ($\text{CHCl}_3 - \text{этилацетат}$, 9:1). Аналогично получали пер-О-тридейтероацетильное производное (d_{18} -V).

Ди-О-метилпроизводное липида (VI). К раствору 9 мг липида (IV) в 1 мл смеси $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$, 2:1, добавляли при 20°C раствор диазометана в эфире. Смесь оставляли при той же температуре на 18 ч и упаривали досуха. Остаток растворяли в 0,3 мл CHCl_3 , раствор наносили на колонку ($10 \times 1,2$ см), заполненную силикагелем в CHCl_3 . Колонку промывали 40 мл CHCl_3 , после чего 50 мл смеси $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$, 9:1, элюировали 8 мг ди-О-метилпроизводного (VI); R_f 0,85 ($\text{CHCl}_3 - \text{MeOH} - \text{вода}$, 80:15:1), 0,5 ($\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$, 9:1).

Аналогично действием эфирного раствора дидейтеродиазометана [2] на раствор липида (IV) в смеси $\text{CHCl}_3 - \text{CD}_3\text{OD}$, 2:1, получали ди-О-тридейтеро-метилпроизводное (d_6 -VI).

В результате ацилирования диметилового эфира (VI) и очистки продукта реакции по вышеописанной методике получали пер-О-ацетат диметилового эфира (VII); R_f 0,3 (в CHCl_3), 0,7 ($\text{CHCl}_3 - \text{этилацетат}$, 9:1).

Бензолборонат диметилпроизводного липида (VIII). К раствору 1,0 мг диметилпроизводного (VI) в 1 мл безводного диоксана добавляли раствор 1,2 мг трифенилбораксола в 0,5 мл диоксана. Смесь оставляли на 1 ч при 25°C и упаривали досуха. Остаток растворяли в 3 мл диоксана и раствор упаривали досуха, эту операцию повторяли трижды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Батраков С. Г., Придачина Н. Н., Кругляк Е. Б., Новогрудская Е. Д. Химия природы. соед., 1977, № 4, с. 494-499.
2. Батраков С. Г., Придачина Н. Н., Кругляк Е. Б., Новогрудская Е. Д., Чекасина Е. В. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 574-585.
3. Курзнер Ю. Тонкослойная хроматография. М.: Мир, 1981, гл. 7.
4. Shaw N. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 164, № 2, p. 435-436.
5. Aritomi M., Komori T., Kawasaki T. Liebigs Ann. Chem., 1970, B. 734, S. 91-101.
6. Vietan K., De Jongh D. C., Schnoes H. K. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 12, p. 1763-1771.
7. Джонстон Р. Руководство по масс-спектрометрии для химиков-органиков. М.: Мир, 1975, гл. 4.
8. Vietan K., De Jongh D. C. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 15, p. 2289-2294.
9. Краббе П. Применение хироптических методов в химии. М.: Мир, 1974, с. 57-60.
10. Robinson D. S., Eagles J., Self R. Carbohydr. Res., 1973, v. 26, № 1, p. 204-207.
11. Батраков С. Г., Ильина Е. Ф., Розынов Б. В., Садовская В. Л., Бергельсон Л. Д. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 4, с. 821-828.
12. Chopin J., Bouillant M. L. In: Flavonoids / Eds Harborne J. B., Mabry T. J., Mabry H. N. Y.: Acad. Press, 1975, v. 2, p. 631-691.
13. Sakadonik R. J. Nucleoside Antibiotics. N. Y.: Wiley Interscience, 1970, p. 354, 390, 393.
14. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. J. Chromatogr., 1972, v. 67, № 2, p. 376-380.

Поступила в редакцию 17.XII.1981

UNUSUAL POLYOL LIPID, 2-C- α -D-TALOPYRANOSYL-5-ALKYL (C_{19} , C_{21}) RESORCINOL, FROM NITROGEN-FIXING BACTERIUM *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM*

BATRAKOV S. G., PRIDACHINA N. N., KRUGLYAK E. B.,
NOVOGRUDSKAYA E. D., CHEKASINA E. V.

Central Advanced Training Institute for Doctors, Moscow; All-Union
Research Institute of Microbiological Means for Plant Production
and Bacterial Preparations, Moscow

An unusual polyol lipid has been isolated from the total cell lipids of nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter chroococcum* 92 by ion-exchange chromatography on DEAE cellulose followed by silica gel column chromatography. On the basis of UV, IR PMR, CD and mass spectra, the lipid has been characterized as 2-C- α -D-talopyranosyl-5-alkyl (C_{19} , C_{21})resorcinol. A possible pathway of the lipid biosynthesis is discussed.