



УДК 547.915.5 + 576.852.2

ЛИПИДЫ МИКОБАКТЕРИЙ

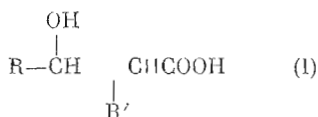
II. «КОРД-ФАКТОР» И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКОЛОВЫХ КИСЛОТ *Mycobacterium paraffinicum*

*Батраков С. Г., Садвская В. Л., Розынов Б. В.,
Коронелли Т. В., Бергельсон Л. Д.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва;
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
биологический факультет*

Осуществлено выделение в индивидуальном состоянии основного клеточного гликолипида парафинокисляющей бактерии *Mycobacterium paraffinicum*, который охарактеризован как 6,6'-ди-О-миколат α , α -D-трегалозы («корд-фактор»). Миколовые кислоты анализировали в виде метиловых эфиров соответствующих 3-О-метилпроизводных методами масс-спектрометрии с ионизацией электронным ударом и ионизацией полем, а также методом ГЖХ-масс-спектрометрии. Найдено, что различные липидные фракции микроорганизма содержат практически одинаковый набор миколовых кислот, включающий насыщенные и моноеновые соединения с числом углеродных атомов у доминирующих компонентов — 34, 36, 38 и 36, 38, 40, 42, 44 соответственно. Отмечены различия в масс-спектрометрическом поведении производных насыщенных и моноеновых кислот. Показано, что при анализе нативных смесей миколовых кислот целесообразно применять масс-спектрометрию с ионизацией полем.

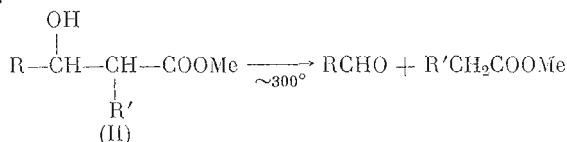
Основными ацильными компонентами липидов клеточной стенки микобактерий и родственных организмов являются высокомолекулярные α -разветвленные β -оксикислоты (I) — миколовые кислоты (см. обзоры [2—4]). Число углеродных атомов в молекулах этих



соединений варьирует у различных микроорганизмов в широких пределах — от 28 до 90 и более. При этом наблюдается определенная специфичность. Так, в липидах патогенных и условно патогенных микобактерий содержатся C_{60} — C_{90} -кислоты (собственно миколовые кислоты), для большинства нокардий характерны кислоты C_{46} — C_{60} (нокардомиколовые). Почвенные микобактерии (именуемые также сапрофитными), коринебактерии и некоторые нокардии содержат миколовые кислоты с 32—48 углеродными атомами (коринемиколовые). Миколовые кислоты, а также липиды, построенные с их участием, образуют особую структуру клеточных стенок микобактерий, которая, по-видимому, обуславливает такие свойства этих организмов, как устойчивость к неблагоприятным воздействиям и способность усваивать гидрофобные субстраты, труднодоступные для других микроорганизмов.

* Сообщение I см. [1].

Для идентификации миколовых кислот предложен ряд методов. Наиболее простой из них [5] заключается в газохроматографическом анализе продуктов пиролиза соответствующих метиловых эфиров (II), протекающего по схеме:

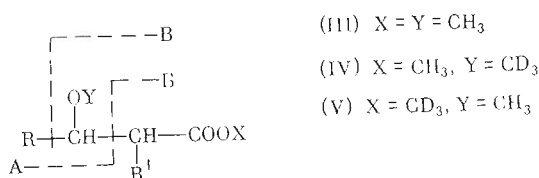


Более детальную информацию о структуре дает масс-спектрометрический метод (см., например, [6—12]). Большинство авторов использует для масс-спектрометрии метиловые эфиры кислот со свободной гидроксильной группой. Но, как показали Йонеда с соавт. [13], 3-О-метилпроизводные метиловых эфиров (МПМЭ) (III) предпочтительнее, поскольку специфический характер фрагментации их молекулярных ионов обеспечивает большую информативность масс-спектров. По этой причине для анализа состава миколовых кислот парафинокисляющей бактерии *Mycobacterium paraffinicum* * мы использовали МПМЭ. В ходе анализа были детально изучены основные направления фрагментации молекулярных ионов указанных производных под электронным ударом и при ионизации полем. Полученные данные о структуре миколовых кислот *M. paraffinicum* позволили полностью охарактеризовать доминирующий клеточный гликолипид этого микроорганизма — 6,6'-димиколат трегалозы («корд-фактор»). Ниже описываются результаты этих исследований.

В клетках *M. paraffinicum* миколовые кислоты присутствуют в свободном состоянии, а также входят в состав 6,6'-димиколата трегалозы («корд-фактора»), некоторых минорных гликолипидных фракций, пептидолипидов и «неэкстрагируемых» липидов — липопептидогликана клеточной стенки. Состав кислот в перечисленных липидных фракциях оказался практически одинаковым, поэтому ниже будут рассмотрены результаты анализа свободных миколовых кислот. Эта фракция была выделена в хроматографически индивидуальном состоянии хроматографированием суммарных липидов микроорганизма на колонке с силикагелем и превращена в смесь метиловых эфиров (II) действием диазометана. Последующее 3-О-метилирование осуществлялось либо обработкой гидридом натрия и иодистым метилом в диметилформамиде [13], либо кипячением с иодистым метилом в присутствии окиси серебра. При ТСХ на силикагеле, импрегнированном азотнокислым серебром, полученная смесь МПМЭ (III) мигрировала в виде двух зон, из которых более подвижная, по данным спектра ПМР (см. «Экспериментальную часть»), представляла собой субфракцию насыщенных, а менее подвижная — субфракцию моноеновых соединений. Количественное содержание субфракций было приблизительно равным.

Изучение масс-спектров обеих субфракций показало, что распад под электронным ударом молекулярных ионов насыщенных и моноеновых МПМЭ протекает по одним и тем же основным направлениям, которые представлены ниже (схема 1) и ранее уже отмечались [13]. Однако оказа-

Схема 1



* Ранее были опубликованы предварительные результаты анализа суммарных миколовых кислот этого организма [14, 15].

Основные пики в масс-спектре МПМЭ насыщенных миколовых кислот

Тип иона	m/e	Относительная интенсивность, %	Брутто-формула	m/e в масс-спектрах дейтеропродуктов	
				(IV)	(V)
$M - Me^+$	537	0,1		537	540
	565	0,1		565	568
	593	0,1		593	596
$M - MeO^+$	521	0,5	$C_{35}H_{69}O_2$	524	521
	549	0,7	$C_{37}H_{73}O_2$	552	549
	577	0,4	$C_{39}H_{77}O_2$	580	577
$M - MeOH$	520	1,4	$C_{35}H_{68}O_2$	520	523
	548	2,3	$C_{37}H_{72}O_2$	548	551
	576	1,3	$C_{39}H_{76}O_2$	576	579
$M - 2MeOH$	488	0,1		488	488
	516	0,2		516	516
	544	0,2		544	544
А	311	24,6	$C_{21}H_{43}O$	314	311
	339	100,0	$C_{23}H_{47}O$	342	339
	367	62,0	$C_{25}H_{51}O$	370	367
	395	14,8	$C_{27}H_{55}O$	398	395
Б	214	9,6	$C_{13}H_{26}O_2$	214	217
	242	4,4	$C_{15}H_{30}O_2$	242	245
В	257	19,1	$C_{15}H_{29}O_3$	260	260
	285	10,1	$C_{17}H_{33}O_3$	288	288
$B - MeOH$	225	7,7	$C_{14}H_{25}O_2$	{ 225	{ 225
				{ 228	{ 228
	253	4,5	$C_{16}H_{29}O_2$	{ 253	{ 253
				{ 256	{ 256

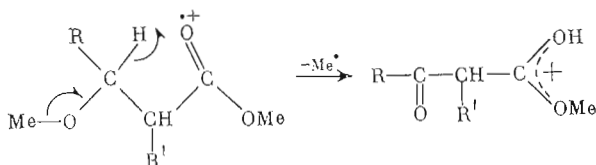
лось, что интенсивности пиков ряда основных однотипных фрагментов в случае насыщенных и ненасыщенных МПМЭ различаются настолько, что масс-спектрометрический анализ смеси этих соединений может привести к ошибочным выводам о структуре компонентов и дать искаженное представление о количественном соотношении насыщенных и ненасыщенных кислот.

Наиболее интенсивные пики в масс-спектре насыщенной субфракции (табл. 1) отвечали гомологичным ионам А с m/e 311, 339, 367 и 395, возникающим при разрыве связи $C_{(2)}-C_{(3)}$ основной углеродной цепи. Отнесение указанных пиков подтверждено измерением точных значений их массовых чисел, а также сдвигом этих пиков на 3 массовые единицы в спектре дейтероаналогов (IV). В масс-спектре дейтерометилловых эфиров (V) указанные пики сохраняли свое положение. На основании приведенных значений m/e можно сделать вывод, что основные углеродные цепи доминирующих насыщенных кислот построены из 22, 24, 26 и 28 углеродных атомов, т. е. $R = C_{19}H_{39}$, $C_{21}H_{43}$, $C_{23}H_{47}$ и $C_{25}H_{51}$. Разрыв той же связи при локализации заряда на карбонилсодержащем фрагменте, происходящий с миграцией к последнему H-атому, приводит к ионам Б с m/e 214 и 242. Таким образом, боковые цепи (R') доминирующих компонентов насыщенной субфракции содержат 10 и 12 атомов углерода. В масс-спектре дейтерометилловых эфиров (V) пики ионов Б смещены в область больших массовых чисел на 3 единицы, но сохраняют значение m/e в спектре дейтеропродуктов (IV).

В результате элиминирования из молекулярных ионов алкильного остатка R образуются фрагменты В с m/e 257 и 285, которые в масс-спектрах дейтероаналогов (IV) и (V) имеют большие на 3 единицы массовые

числа. Теряя молекулу MeOH, эти фрагменты дают ионы с m/e 225 и 253. В случае дейтеропроизводных (IV) и (V) каждому из этих ионов отвечают по два пика равной интенсивности: с m/e 225 и 228 и с m/e 253 и 256 соответственно. Следовательно, элиминирование метоксильной группы равновероятно как от $C_{(1)}$, так и от $C_{(3)}$.

Пики молекулярных ионов в масс-спектре МПМЭ насыщенных миколовых кислот отсутствуют. Наибольшую интенсивность в области высоких массовых чисел имеют пики ионов $[M - MeOH]^+$, которые дают возможность определить молекулярные веса отдельных компонентов фракции. Доминирующие гомологичные ионы этой серии — с m/e 520, 548 и 576 — отвечают МПМЭ с молекулярным весом 552, 580 и 608, т. е. основные насыщенные миколовые кислоты микроорганизма состоят из 34, 36 и 38 углеродных атомов и содержат алкильные остатки R и R' в сочетаниях: $C_{21}H_{43} - C_{10} - H_{21}$ и $C_{19}H_{39} - C_{12}H_{25}$ (молекулярный вес 552), $C_{21}H_{43} - C_{12}H_{25}$ и $C_{23}H_{47} - C_{10}H_{21}$ (580), $C_{23}H_{47} - C_{12}H_{25}$ и $C_{25}H_{51} - C_{10}H_{21}$ (608). В той же области спектра присутствуют значительно менее интенсивные пики ионов $[M - Me]^+$, $[M - MeO]^+$ и $[M - 2MeOH]^+$, которые также могут быть использованы для определения молекулярного веса указанных компонентов. Данные масс-спектрометрии дейтероаналогов (IV) и (V) позволили сделать некоторые выводы о путях образования вышеприведенных ионов. Так, пики фрагментов $[M - Me]^+$ смещены на 3 единицы в область больших массовых чисел в спектре дейтерометилового эфира (V), но сохраняют свое положение в масс-спектре дейтеропроизводного (IV). Следовательно, потеря Me происходит исключительно из 3-О-метильной группы. Вероятно, это можно объяснить протеканием изображенной ниже реакции, приводящей к образованию иона $[M - Me]^+$ с делокализованным зарядом:



Элиминирование метоксильного радикала осуществляется практически только из карбометоксильной группировки молекулярного иона, тогда как в отщеплении первой молекулы MeOH участвует только 3-MeO-группа. Эти выводы основаны на том, что ионы $[M - MeO]^+$ сохраняют величину m/e в масс-спектре соединения (V), так же как и ионы $[M - MeOH]^+$ в случае производного (IV). Наоборот, указанные ионы имеют большие на 3 единицы массовые числа в спектрах производных (IV) и (V) соответственно. Элиминирование молекулы MeOH с участием метоксильного остатка сложноэфирной группы, таким образом, представляет собой вторичный процесс.

В случае МПМЭ моноеновой субфракции доминирующие гомологичные ионы А имеют несколько большие массовые числа, чем в случае насыщенных МПМЭ: m/e 365, 393, 421 и 449 (см. табл. 2). Отсюда следует, что основные углеродные цепи главных компонентов моноеновых миколовых кислот содержат 26, 28, 30 и 32 углеродных атома ($R = C_{23}H_{45}$, $C_{25}H_{49}$, $C_{27}H_{53}$ и $C_{29}H_{57}$). Характерной особенностью масс-спектра этой субфракции является высокая интенсивность пиков ионов $[A - MeOH]^+*$ (почти равная интенсивности пиков ионов А), которые при масс-спектрометрии насыщенных аналогов регистрируются лишь в виде следов. Массовые числа фрагментов типа Б и В оказались такими же, как и в масс-

* Образование этих ионов из фрагментов А подтверждается наличием в масс-спектре пиков соответствующих метастабильных ионов.

Основные пики в масс-спектре МПМЭ моноеновых миколовых кислот

Тип иона	m/e	Относительная интенсивность, % *	Брутто-формула	m/e в масс-спектрах дейтеропродуктов	
				(IV)	(V)
M^+	578	0,2		581	581
	606	0,5	$C_{40}H_{76}O_3$	609	609
	634	0,3	$C_{42}H_{82}O_3$	637	637
	662	0,4	$C_{44}H_{86}O_3$	665	665
	690	0,2		693	693
$M - Me^+$	563	0,1		563	566
	591	0,1		591	594
	619	0,1		619	622
	647	0,1	$C_{43}H_{83}O_3$	647	650
	675	0,1		675	678
$M - MeO^+$	547	0,6	$C_{37}H_{71}O_2$	550	547
	575	1,5	$C_{39}H_{75}O_2$	578	575
	603	0,7	$C_{41}H_{79}O_2$	606	603
	631	1,1	$C_{43}H_{83}O_2$	634	631
	659	0,8	$C_{45}H_{87}O_2$	662	659
$M - MeOH$	546	0,9	$C_{37}H_{70}O_2$	{ 546	{ 546
				{ 549	{ 549
	574	2,0	$C_{39}H_{74}O_2$	{ 574	{ 574
				{ 577	{ 577
	602	1,5	$C_{41}H_{78}O_2$	{ 602	{ 602
				{ 605	{ 605
630	2,0	$C_{43}H_{82}O_2$	{ 630	{ 630	
			{ 633	{ 633	
658	1,4	$C_{45}H_{86}O_2$	{ 658	{ 658	
			{ 661	{ 661	
$M - 2MeOH$	514	0,5	$C_{36}H_{66}O$	514	514
	542	1,2	$C_{38}H_{70}O$	542	542
	570	0,7	$C_{40}H_{74}O$	570	570
	598	1,1	$C_{42}H_{78}O$	598	598
	626	0,6	$C_{44}H_{82}O$	626	626
A	365	11,1	$C_{23}H_{49}O$	368	365
	393	16,6	$C_{27}H_{53}O$	396	393
	421	10,5	$C_{29}H_{57}O$	424	421
	449	13,6	$C_{31}H_{61}O$	452	449
A - MeOH	333	3,9	$C_{24}H_{45}$	333	333
	361	5,7	$C_{26}H_{49}$	361	361
	389	3,9	$C_{28}H_{53}$	389	389
	417	4,6	$C_{30}H_{57}$	417	417
B	214	21,7	$C_{13}H_{26}O_2$	214	217
	242	5,3	$C_{15}H_{30}O_2$	242	245
B	257	8,1	$C_{15}H_{29}O_3$	260	260
	285	2,4	$C_{17}H_{33}O_3$	288	288
B - MeOH	225	3,7	$C_{14}H_{25}O_2$	{ 225	{ 225
				{ 228	{ 228
	253	1,4	$C_{16}H_{29}O_2$	{ 253	{ 253
				{ 256	{ 256

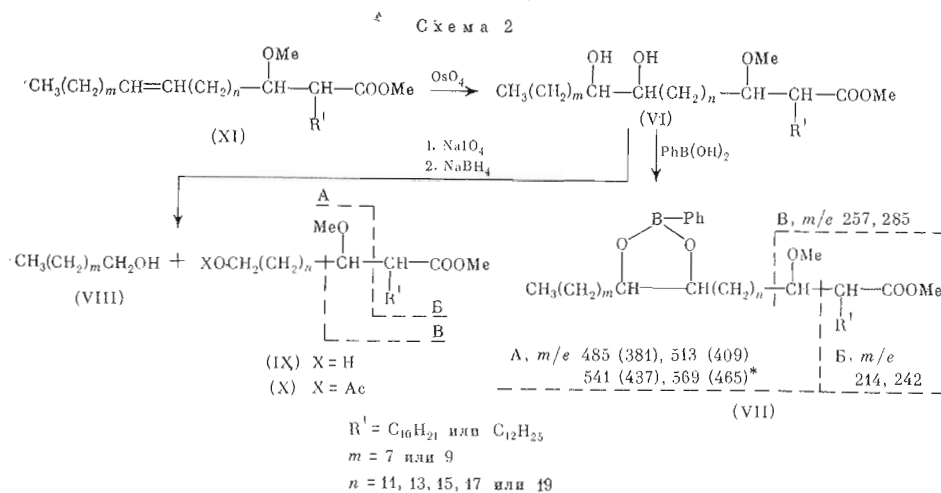
* Максимальным в спектре является пик иона $C_{26}H_{53}^+$ с m/e 83.

спектре насыщенных МПМЭ. Это означает, что боковые углеводородные цепи доминирующих компонентов той и другой субфракций идентичны. Строение фрагментов А, Б, В и $[A - MeOH]^+$ подтверждается соответствующими сдвигами их пиков в спектрах дейтеропродуктов (IV) и (V). Необходимо подчеркнуть, что вклад ионов А (и $[A - MeOH]^+$) в общий ионный ток в случае моноеновых МПМЭ сравнительно невелик — в 20—

30 раз меньше, чем у насыщенных МПМЭ, а главный вклад принадлежит углеводородным фрагментам с $m/e < 125$. Поэтому в масс-спектре смеси примерно равных количеств насыщенных и моноеновых МПМЭ интенсивность пиков фрагментов А, происходящих от ненасыщенных компонентов, во много раз ниже интенсивности пиков тех же ионов, образующихся из насыщенных соединений. Отсюда следует, что нельзя делать выводы о количественном соотношении насыщенных и ненасыщенных компонентов, основываясь на соотношении интенсивностей пиков однотипных ионов в масс-спектре суммарной фракции миколовых кислот.

Масс-спектр МПМЭ моноеновых кислот в отличие от спектра насыщенных МПМЭ содержит заметные, хотя и малоинтенсивные, пики молекулярных ионов, среди которых доминируют гомологи с m/e 578, 606, 634, 662 и 690. Таким образом, основные компоненты субфракции моноеновых миколовых кислот построены из 36, 38, 40, 42 и 44 атомов углерода и содержат алкильные цепи R и R' в сочетаниях: $C_{23}H_{45} - C_{10}H_{21}$ (молекулярный вес 578), $C_{23}H_{45} - C_{12}H_{25}$ и $C_{25}H_{49} - C_{10}H_{21}$ (606), $C_{23}H_{45} - C_{12}H_{25}$ и $C_{27}H_{53} - C_{10}H_{21}$ (634), $C_{27}H_{53} - C_{12}H_{25}$ и $C_{29}H_{57} - C_{10}H_{21}$ (662), $C_{29}H_{57} - C_{12}H_{25}$ (690). В обсуждаемом масс-спектре интенсивность пиков ионов $[M - Me]^+$ и $[M - MeO]^+$ чрезвычайно низка, более интенсивны пики ионов $[M - MeO]^+$ и $[M - 2MeOH]^+$. В случае дейтеропроизводных (IV) и (V) пики ионов $[M - CH_3OH]^+$ и $[M - CD_3OH]^+$ приблизительно равны по интенсивности, из чего можно заключить, что при элиминировании из молекулярного иона первой молекулы метанола участие метоксильных групп, связанных с атомами C₍₁₎ и C₍₃₎, равновероятно. В этом отношении ненасыщенные МПМЭ резко отличаются от насыщенных (см. выше).

Приведенные выше значения m/e для фрагментов А показывают, что двойная связь ненасыщенных миколовых кислот находится в основных алкильных цепях. Для более точного определения ее расположения субфракция моноеновых МПМЭ была подвергнута гидроксигированию действием осмиевого ангидрида [16] (схема 2). Первоначально была пред-



прията попытка установить положение гидроксильных групп в молекулах образовавшихся диоксиэфиров (VI) по масс-спектру бензолборната (VII), т. е. по методике, применяемой обычно для определения положения двойной связи в нормальных моноеновых жирных кислотах [17]. Однако масс-спектр бензолборната (VII) не содержал заметных пиков, характеризующих локализацию диоксибороланового цикла (основные пики масс-спектра отвечали ионам, возникающим в результате процессов рас-

Основные пики в масс-спектрах продуктов деградации (IX) и (X) МПМЭ моноеновых миколовых кислот

Тип иона	Спектр оксиэфира (IX)		Спектр ацетата (X)		Тип иона	Спектр оксиэфира (IX)		Спектр ацетата (X)	
	<i>m/e</i>	$I_{\text{отн.}}, \%^*$	<i>m/e</i>	$I_{\text{отн.}}, \%^*$		<i>m/e</i>	$I_{\text{отн.}}, \%^*$	<i>m/e</i>	$I_{\text{отн.}}, \%^*$
<i>M</i> - MeO*	439	0,6	481	1,1	<i>M</i> - 2MeOH	406	3,0	448	6,1
	467	0,8	509	1,4		434	3,4	476	8,0
	495	0,6	537	1,0		462	2,0	504	5,7
	523	0,4	565	0,6		490	0,8	532	3,2
<i>M</i> - MeOH	438	0,4	480	1,2	A	229	31,0	271	25,0
	466	0,5	508	1,4		257	67,4**	299	82,6
	494	0,4	536	1,1		285	50,2**	327	100,0
	522	0,2	564	0,6		313	18,6	355	60,8
<i>M</i> - MeO* - MeOH	407	2,0	449	4,2	B	341	6,2	383	28,3
	435	2,0	477	4,7		214	6,2	214	4,7
	463	1,2	505	3,3	B	242	2,6	242	1,9
	491	0,4	533	1,8		257	67,4**	257	21,7
					B - MeOH	285	50,2**	285	9,5
						225	25,4	225	16,5
					253	18,1	253	10,8	

* Максимальную интенсивность в масс-спектре имеет пик иона с *m/e* 69.

** Пик отвечает ионам двух типов — А и В, указана суммарная интенсивность.

пада, изображенных на схеме 1). Аналогичные результаты были получены при масс-спектрометрии ацетильных, триметилсилильных и *O*-метильных производных диоксиэфиров (VI). Поэтому мы подвергли продукты гидроксилирования (VI) окислению периодатом с последующим восстановлением боргидридом натрия. В результате образовалась фракция жирных спиртов (VIII), представляющая собой по данным ГЖХ-масс-спектрометрии, смесь нонанола и ундеканола (5 : 1), и фракция оксиэфиров (IX). В масс-спектре последней (табл. 3) среди наиболее интенсивных были пики гомологичных ионов типа А с *m/e* 229, 257, 285, 313 и 341, образующихся при разрыве связи C₍₂₎—C₍₃₎ основной (гидроксилсодержащей) углеводородной цепи. В спектре соответствующих ацетильных производных (X) аналогичные ионы имели на 42 единицы более высокие массовые числа. Перечисленные значения *m/e* показывают, что углеродные цепи рассматриваемых ионов состоят из 13, 15, 17, 19 и 21 C-атомов, откуда следует, что двойная связь в молекулах доминирующих компонентов субфракции моноеновых миколовых кислот находится при атомах C₍₁₅₎, C₍₁₇₎, C₍₁₉₎, C₍₂₁₎ и C₍₂₃₎. С другой стороны, приведенные выше результаты анализа спиртов (VIII) говорят о том, что эта связь расположена главным образом при девятом C-атоме от метильного конца основной углеводородной цепи. Таким образом, строение доминирующих компонентов субфракции может быть представлено формулой (XI) (см. схему 2).

На основании изложенного можно сделать вывод, что масс-спектры, полученные методом ионизации электронным ударом, как для насыщенных, так и для моноеновых МПМЭ миколовых кислот дают полное представление о структуре этих веществ. Однако вследствие рассмотренных выше различий в масс-спектрометрическом поведении указанных типов соединений значительно осложняется интерпретация масс-спектров МПМЭ нативных смесей миколовых кислот, содержащих обычно и насыщенные и ненасыщенные компоненты. Дополнительные трудности могут возникнуть при идентификации пиков в области высоких массовых чисел спектра, характеризующих молекулярные веса отдельных гомологов, по

причине совпадения величин m/e ионов различной природы. Поэтому для серийного анализа миколовых кислот метод масс-спектрометрии с ионизацией электронным ударом малоудобен. Предпочтительнее в этом отношении оказался метод ионизации полем. В масс-спектре МПМЭ субфракции насыщенных миколовых кислот наиболее интенсивные пики соответствовали ионам $[M + 2]^+$ с m/e 554, 582 и 610, фрагментам А с m/e 311, 339 и 367 и фрагментам В с m/e 257 и 285; интенсивность остальных пиков масс-спектра была незначительной. В спектре моноеновых МПМЭ пики осколочных ионов практически отсутствовали, а содержались только пики ионов $[M + 1]^+$ с m/e 579, 607, 635, 663 и 691 и приблизительно равные им по интенсивности пики, отвечающие ионам $[M + 2]^+$.

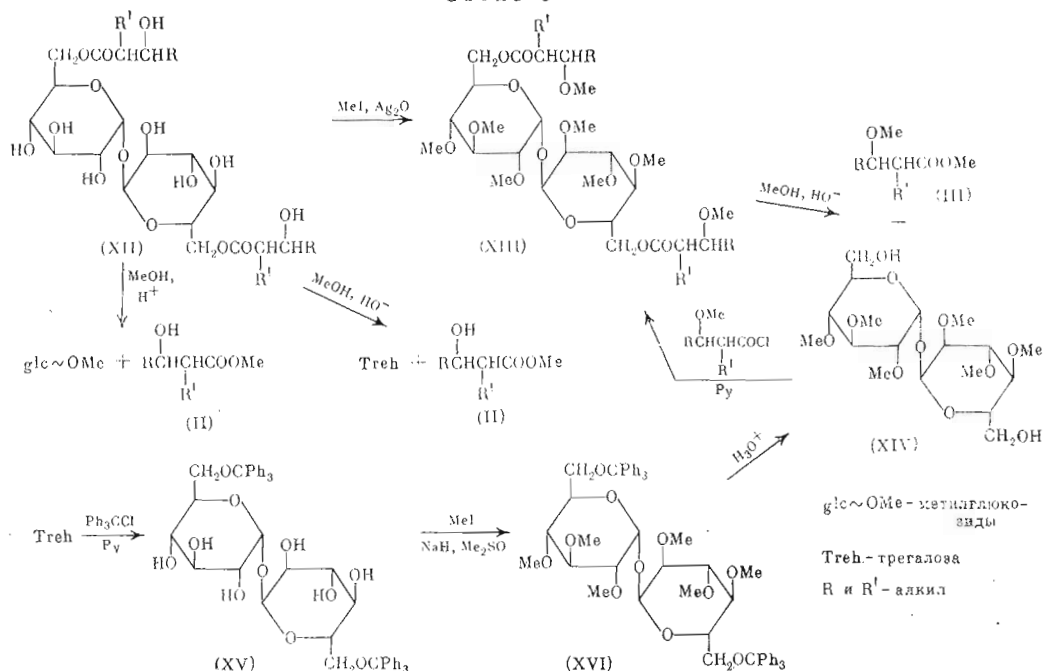
Таким образом, масс-спектр, полученный методом ионизации полем, позволяет быстро и без затруднений определить молекулярные веса доминирующих компонентов смеси МПМЭ миколовых кислот — как насыщенных, так и ненасыщенных, и в конечном итоге установить число углеродных атомов, входящих в состав тех и других. Однако выяснение таких элементов структуры, как размер основной и боковой углеводородных цепей, осуществимо только для насыщенных соединений, но невозможно для ненасыщенных компонентов из-за отсутствия в их масс-спектрах пиков осколочных ионов. Для получения такого рода информации целесообразно выделение ненасыщенной фракции и ее анализ методом масс-спектрометрии с ионизацией электронным ударом.

Нами изучалась также возможность анализа МПМЭ миколовых кислот, а также триметилсилиловых производных метиловых эфиров последних методом комбинированной ГЖХ-масс-спектрометрии (с ионизацией электронным ударом). При использовании OV-1 или JXR в качестве стационарных фаз хроматографических колонок общую смесь производных удавалось разделить лишь на группы, состоящие из компонентов с одинаковым числом С-атомов. Не наблюдалось заметного разделения насыщенных и ненасыщенных соединений, а также изомеров, различающихся длиной основной и боковой углеводородных цепей. Тем не менее этот метод анализа дает возможность определить количественное соотношение отдельных гомологов. Так, согласно полученным нами данным, фракция свободных миколовых кислот *M. paraffinicum* имеет следующий количественный состав гомологов: C_{34} (насыщенные) — 11,4%, C_{36} (насыщенные и моноеновые) — 16,5%, C_{38} (насыщенные и моноеновые) — 20,2%, C_{40} (моноеновые) — 13,7%, C_{42} (моноеновые) — 18,6%, C_{44} (моноеновые) — 11,8%, компоненты с числом С-атомов менее 34 (насыщенные) — 3,0%, компоненты с числом С-атомов более 44 (моноеновые) — 4,8%. Практически такой же состав имеют миколовые кислоты других липидных фракций, в частности рассматриваемого ниже 6,6'-ди-миколата трегалозы («корд-фактора») (XII).

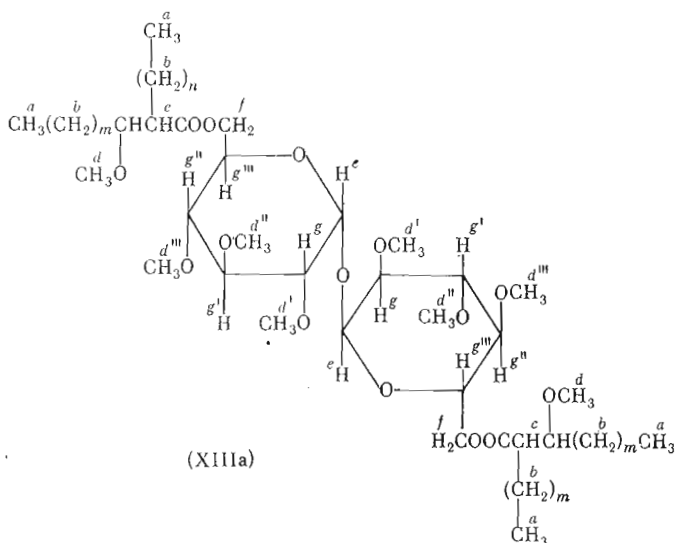
Его выделение осуществлялось одновременно с выделением свободных миколовых кислот хроматографированием суммарных клеточных липидов на колонке с силикагелем. Одна из полученных фракций содержала главным образом гликолипид (XII), но включала также описанный в предыдущем сообщении [1] сукциноильный трегалозолипид (~10%) и смеси пептидной природы (на что указывал ИК-спектр фракции). В результате дальнейшего хроматографирования этой фракции на колонке с DEAE-целлюлозой липид (XII) был выделен в хроматографически индивидуальном состоянии.

Полученное вещество давало на хроматограммах характерное для гликолипидов окрашивание с антроновым реагентом [18] и периодатом — реактивом Шиффа [19]. ИК-спектр гликолипида (XII) содержал широкую полосу валентных колебаний связи Н—О гидроксильных групп с максимумом ~3380 см^{-1} , полосу валентных колебаний карбонила сложноэфирной группы (1732 см^{-1}). В условиях щелочного метанолиза (см. схему 3) гликолипид давал единственный водорастворимый продукт — α, α -D-тре-

Схема 3



галозу — и единственный липофильный продукт, который был идентифицирован как фракция метиловых эфиров миколовых кислот (II). При кислотном метаболизме тот же липид распадался на метиловые эфиры миколовых кислот (II) и аномерные метилглюкозиды. Таким образом, исследуемое вещество должно представлять собой миколоильное производное α, α -D-трегалозы. Дополнительную информацию о структуре вещества удалось получить в результате его исчерпывающего метилирования и изучения спектра ПМР пер-О-метильного производного (XIII).



Спектр ПМР производного (XIII) содержит в области сильного поля 12-протонный триплет (δ 0,88 м. д., J 6 Гц), очевидно принадлежащий протонам (a) (см. формулу XIIIa) терминальных метильных групп алкильных цепей миколоильных остатков, и довольно узкий мультиплет

(~100 Н) от протонов (*b*) метиленовых групп тех же остатков (δ 1,26 м.д.). В области более слабого поля (δ 2,58 м.д.) присутствует двухпротонный мультиплет, отвечающий протонам (*c*), связанным с атомами $C_{(2)}$ остатков миколовых кислот. Четыре шестипротонных сигнала — δ 3,31; 3,45; 3,56 и 3,64 м.д. — говорят о наличии в молекуле пер-О-метилпроизводного (XIII) четырех пар эквивалентных метоксильных групп (*d*, *d'*, *d''*, *d'''*), причем первый из перечисленных сигналов, вероятно, принадлежит протонам О-метилюющей группы ацильного остатка (*d*) (ср. спектры ПМР МПМЭ миколовых кислот). На α, α -конфигурацию дисахаридного остатка указывает двухпротонный дублет (δ 4,99 м.д., *J* 2,5 Гц) от аномерных протонов (*e*). Существенную информацию о строении молекулы (XIII) дает присутствие в спектре четырехпротонного мультиплета при 4,09 м.д.; этот сигнал принадлежит протонам (*f*) при атомах $C_{(6)}$ моносахаридных фрагментов и свидетельствует о том, что оба этих атома связаны с миколоильными заместителями. С другой стороны, мультиплет в области 2,95—3,28 м.д. от протонов (*g*, *g'*, *g''* и *g'''*), связанных с атомами $C_{(2)}$, $C_{(3)}$, $C_{(4)}$ и $C_{(5)}$ моносахаридов, показывает, что они не несут ацильных заместителей. Кроме рассмотренных выше сигналов, спектр ПМР производного (XIII) содержит в области слабого поля характерный мультиплет (~2Н, δ 5,35 м.д.) от винильных протонов при *цис*-двойной связи (см. [20]); соответственно в области более сильного поля (δ 2,01 м.д.) находится квадруплет (~4Н) от протонов CH_2 -групп, присоединенных к ненасыщенным углеродным атомам.

Из приведенных данных можно заключить, что гликолипид (XII) представляет собой симметричный 6,6'-димиколат α, α -D-трегалозы; этот вывод полностью подтверждается данными анализа продуктов деградации пер-О-метилпроизводного (XIII). В условиях щелочного метанолиза производное (XIII) распадалось на МПМЭ миколовых кислот (III) и 2,3,4,2',3',4'-гекса-О-метил- α, α -D-трегалозу (XIV), которую мы идентифицировали путем сравнения с синтетическим образцом. Последний был получен (схема 3) путем тритилирования α, α -D-трегалозы, исчерпывающего О-метилювания дитритильного производного (XV) и последующего удаления тритильной защиты в метилпроизводном (XVI). Полученный синтетический препарат и продукт деградации (XIV) пер-О-метилпроизводного «корд-фактора» не различались по спектрам ПМР и по поведению при ТСХ. При ацилировании гекса-О-метилпроизводного (XIV) хлорангидридами 3-О-метилмиколовых кислот — продуктов деградации метилпроизводного (XIII) — образовалось вещество, не отличающееся от этого производного по подвижности при ТСХ, спектру ПМР и масс-спектру.

Известные в настоящее время 6,6'-димиколаты трегалозы, которые по традиции называют «корд-фактором»*, представляют собой высокотоксичные вещества, являющиеся одновременно мощными иммуностимуляторами (см., например, обзоры [2, 3, 22, 23]). В связи с этим изученная нами культура *M. paraffinicum*, которая, с одной стороны, не обладает патогенными свойствами, а с другой стороны, высокопродуктивна по «корд-фактору» (XII), может представить значительный интерес.

«Корд-факторы», содержащие остатки относительно низкомолекулярных метиловых кислот (C_{30} — C_{40}), ранее были выделены из *Corynebacterium diphtheriae* [24], *Nocardia asteroides* [43], *Nocardia rhodochrous* [43], *Brevibacterium vitarumen* [25], а также из культуры *Arthrobacter paraffinicus*, растущей на углеводородах [26]. Авторы последней работы предполагают, что одна из функций гликолипида состоит в эмульгировании углеводородов в водной среде, что, в свою очередь, способствует их быстрой ассимиляции. Возможно, такую же функцию выполняет «корд-фактор» в *M. paraffinicum* [27].

* Название «корд-фактор» для этих липидов ввел Блох [21], считавший, что они ответственны за образование «кордов» (жгутов) в культурах патогенных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*.

Экспериментальная часть

Культуру *M. parrafinicum* выращивали на среде с гексадеканом в ранее описанных условиях [28]. Применяли описанные в предыдущем сообщении [1] методы экстракции суммарных липидов, очистки их от нелипидных примесей, приготовления силикагеля для колонок, ГЖХ-производных углеводов и метод аналитической ТСХ. Для последней использовали следующие системы растворителей: 1) CHCl_3 — MeOH — вода (80 : 20 : 2); 2) CHCl_3 — MeOH — конц. NH_4OH (65 : 25 : 4); 3) CHCl_3 — MeOH — AcOH — вода (80 : 13 : 8 : 0,3); 4) гексан — эфир — AcOH (80 : 20 : 1); 5) гексан — эфир (85 : 15); 6) гексан — эфир (1 : 1); 7) CH_2Cl_2 — этилацетат (5 : 1); 8) CHCl_3 — MeOH — AcOH (100 : 7 : 0,7) после предварительного промывания пластинки смесью CHCl_3 — AcOH (2 : 1) [22]. Препаративную ТСХ осуществляли на пластинках с закрепленным слоем силикагеля G (5% гипса) (Merck, ФРГ); перед использованием пластинки активировали 1 ч при 105° .

ИК-спектры регистрировали на спектрографе UR-10 (Zeiss, ГДР) в пленке вещества, спектры ПМР — на приборе XL-100 (Varian, США) в CDCl_3 с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта при рабочей частоте 100 МГц. Оптическое вращение измеряли в CHCl_3 на спектрополяриметре Perkin-Elmer 141. Температуры плавления (не исправлены) определяли на нагревательном столике «Boëtius» (ГДР).

Масс-спектры получали на масс-спектрометре Varian MAT CN-5 DF, снабженном комбинированным источником для ионизации электронным ударом, полем и для полевой десорбции. Масс-спектрометрию с ионизацией электронным ударом осуществляли при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и ускоряющем напряжении 3 кВ. Масс-спектры с ионизацией полем измеряли при напряжении 9 кВ; применяли вольфрамовый эмиттер (диаметр 10 мкм), активированный бензонитрилом при высокой температуре. Вещества испаряли непосредственно в ионном источнике при $\sim 150^\circ$. Масс-спектры высокого разрешения получали на масс-спектрометре MS-902 (Англия) с системой обработки данных DS-30; энергия ионизирующих электронов 70 эВ, разрешающая способность 10 000. Для комбинированной ГЖХ-масс-спектрометрии производных миколовых кислот использовали хромато-масс-спектрометр LKB 9000, разделение смесей веществ проводили на колонках (400 × 4 мм) с 2% OV-1 или JXR на хромосорбе W (80—100 меш) при температурном режиме $220^\circ \rightarrow 310^\circ$ (4 град/мин); газ-носитель — гелий (25 мл/мин).

Фракционирование суммарных липидов. Выделение свободных миколовых кислот и «корд-фактора» (XII). Раствор 10 г суммарных клеточных липидов в 150 мл CHCl_3 наносили на колонку с 200 г силикагеля КСК. Колонку промывали 2 л CHCl_3 , после чего вымывание продолжали смесями CHCl_3 — MeOH (по 700—750 мл): 40 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 9 : 1, 8 : 1, , 1 : 1. Собирали элюаты объемом 15 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в системах растворителей 2—4 при элюировании двумя первыми смесями и в системах 1 и 2 при последующем вымывании. Элюаты, полученные при вымывании смесью CHCl_3 — MeOH (40 : 1), содержали 197 мг хроматографически индивидуальных свободных миколовых кислот; R_f 0,8 (в системе растворителей 1), 0,4 (2), 0,85 (3), 0,2 (4).

При вымывании смесью CHCl_3 — MeOH (9 : 1) получили элюаты, содержащие гликолипид (XII). Последние объединяли, упаривали, остаток (358 мг) наносили в 5 мл смеси CHCl — MeOH (9 : 1) на колонку с 40 г DEAE-целлюлозы (Reanal, Венгрия) в AcO^- -форме; 500 мл той же смеси растворителей элюировали 295 мг хроматографически индивидуального гликолипида (XII); R_f 0,75 (в системе растворителей 1), 0,7 (2), 0,6 (3), 0,35 (8); $[\alpha]_{539,6}^{20} +52,6^\circ$, $[\alpha]_{541,6}^{20} +69,0^\circ$, $[\alpha]_{435,8}^{20} +118^\circ$, $[\alpha]_{366,0}^{20} +193^\circ$ (с 0,5; при 22°).

ИК-спектр ($\nu_{\text{макс}}$, см^{-1}): ~ 3380 (ОН), 1729 (C=O).

МПМЭ свободных миколовых кислот (III) и дейтеропроизводное (IV). Фракцию свободных миколовых кислот (70 мг) обрабатывали при 20° избытком эфирного раствора диазометана. После упаривания реакционной смеси получили метиловые эфиры миколовых кислот (II); R_f 0,3 (в системе растворителей 5); $[\alpha]_{589,6}^{20} +2,4^\circ$, $[\alpha]_{579,1}^{20} +4,7^\circ$, $[\alpha]_{546,1}^{20} +5,8^\circ$, $[\alpha]_{435,8}^{20} +10,3^\circ$ (c 1,0; при 21°).

ИК-спектр ($\nu_{\text{макс}}$, см^{-1}): 3518 и \sim 3400 (ОН внутри- и межмолекулярно-связанный), 1740 (плечо) и 1712 (C=O свободный и внутримолекулярно-связанный), 1197, 1175, 1140 и 1068 (C—O).

Смесь 70 мг метиловых эфиров миколовых кислот (II), 250 мг свежеприготовленной сухой окиси серебра и 4 мл иодистого метила кипятили 5 ч, по охлаждении осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 3 мл гексана и раствор наносили на колонку с 10 г силикагеля КСК. Колонку промывали 50 мл смеси гексан — бензол (1 : 1), после чего 50 мл бензола элюировали 70 мг МПМЭ миколовых кислот (III); R_f 0,7 (в системе растворителей 5).

ИК-спектр ($\nu_{\text{макс}}$, см^{-1}): 1741 (C=O), 1197, 1168, 1099 (C—O); полосы поглощения НО-группы отсутствовали.

Аналогично, используя CD_3I вместо CH_3I , получали метиловые эфиры 3-О-тридейтерометилмиколовых кислот (IV), не отличающиеся при ТСХ от МПМЭ (III).

Дейтерометиловые эфиры 3-О-метилмиколовых кислот (V). Смесь 40 мг свободных миколовых кислот и 3 мл 5%-ного раствора DCl в CD_3OD кипятили 6 ч. По охлаждении смеси к ней добавляли 4 мл насыщенного раствора NaHCO_3 и продукт реакции экстрагировали CHCl_3 (4 \times 5 мл). Объединенный экстракт промывали 10 мл воды, упаривали и остаток метилировали иодистым метилом в присутствии окиси серебра по вышеописанной методике. Получили 35 мг дейтерометиловых эфиров (V), не отличающихся при ТСХ от МПМЭ (III).

Фракционирование МПМЭ миколовых кислот (III). На пластинку (20 \times 20 см) с закрепленным слоем (0,3—0,4 мм) силикагеля G, содержащего 10% азотнокислого серебра, наносили 40 мг МПМЭ свободных миколовых кислот. Хроматограмму проявляли в системе растворителей (5), сушили на воздухе 15 мин и опрыскивали 0,2% раствором роданина G в MeOH . В УФ-свете наблюдали две зоны веществ — с R_f 0,7 и 0,55, которые снимали с пластинки, а вещества элюировали с адсорбента смесью CHCl_3 — MeOH (10 : 1). Элюаты упаривали, остаток распределяли между 5 мл гексана и 5 мл воды. После упаривания гексановых фаз получали соответствующие фракции МПМЭ кислот. Из верхней зоны хроматограммы (R_f 0,7) получали 18 мг насыщенным МПМЭ.

Спектр ПМР (δ , м.д.): 0,88 (6 H) триплет, J 6 Гц, терминальные CH_3 ; 1,26, мультиплет, CH_2 углеводородных цепей; 2,48 (1 H) мультиплет, $\text{C}_{(2)}$ — H, 3,26 (3 H) синглет, $\text{C}_{(3)}$ — OCH_3 ; 3,62 (3 H) синглет, COOCH_3 .

Из нижней зоны (R_f 0,55) элюировали 17 мг МПМЭ моноеновых миколовых кислот.

Спектр ПМР (δ , м.д.): 0,88 (6 H) триплет, J 6 Гц, терминальные CH_3 ; 1,26, мультиплет, CH_2 углеводородных цепей; 2,01 (4 H) квадруплет, $=\text{CCH}_2$; 2,48 (1 H) мультиплет, $\text{C}_{(2)}$ — H; 3,28 (3 H) синглет, $\text{C}_{(3)}$ — OCH_3 ; 3,64 (3 H) синглет, COOCH_3 ; 5,29 (2 H) мультиплет, $=\text{CH}$. В ИК-спектре присутствует полоса при 3010 см^{-1} (ν_{CH} винильной группы).

Гидроксилирование МПМЭ моноеновых миколовых кислот. К раствору 13 мг МПМЭ моноеновых миколовых кислот в 1 мл диоксана добавляли раствор 50 мг OsO_4 в 1,5 мл смеси диоксан — пиридин (4 : 1). Реакционную смесь оставляли на 2 ч при 20°, после чего в нее пропускали газообразный H_2S до окончания образования осадка сульфида осмия. Осадок отделяли центрифугированием, промывали диоксаном, объединенную надосадочную жидкость упаривали досуха, остаток наносили в 1 мл CH_2Cl_2 на колонку с 5 г силикагеля КСК. Колонку промывали 25 мл CH_2Cl_2 , за-

тем 30 мл смеси CH_2Cl_2 — этилацетат (8 : 1) элюировали 11 мг диоксиэфиров (VI); R_f 0,53 (в системе 7), 0,24 (6). Вещество давало на хроматограммах положительную реакцию с периодатом — реактивом Шиффа [19].

Окисление диоксиэфиров (VI) периодатом. К раствору 7 мг диоксиэфиров (VI) в 1,5 мл диоксана добавляли при 20° при интенсивном перемешивании 0,4 мл 0,5 М раствора NaIO_4 . Смесь перемешивали 1 ч, затем к ней добавляли 20 мг NaNH_4 и перемешивание продолжали 2 ч при 20°. После этого смесь обрабатывали 5—7 каплями AsOH , 3 мл воды, продукты реакции экстрагировали эфиром (4×5 мл), объединенный экстракт промывали водой (2×5 мл) и упаривали досуха. Остаток наносили в CHCl_3 на пластинку (10×10 см) с закрепленным слоем (~0,3 мм) силикагеля G. Хроматограмму проявляли в системе растворителей 7, затем высушивали на воздухе в течение 15 мин и опрыскивали 0,2% раствором морина в MeOH . В УФ-свете наблюдали две зоны веществ — с R_f 0,75 и 0,5, которые отделяли, а вещества элюировали с адсорбента смесью CHCl_3 — MeOH (10 : 1). Из верхней зоны получали смесь жирных спиртов (VIII), R_f 0,5 (в системе растворителей 6), 0,8 (7). Из нижней зоны элюировали оксиэфиры (IX), R_f 0,3 (в системе растворителей 6), 0,6 (7). Оксиэфиры превращали в соответствующие ацетаты (X) по обычной методике действием As_2O в пиридине (20°, 5 ч).

Щелочной метанолиз гликолипида (XII). Смесь 15 мг гликолипида (XII) и 2 мл 0,3 М раствора MeONa в MeOH кипятили 5 ч, по охлаждению разбавляли 3 мл MeOH , нейтрализовали амберлитом IRC-50 (H^+) и упаривали досуха. Остаток распределяли между 3 мл гексана и 3 мл воды. Вещество из гексановой фазы идентифицировали как метиловые эфиры миколовых кислот на основании ИК-спектра (см. выше) и данных ТСХ в системах растворителей 4—6. Более детально этот продукт гидролиза анализировали в виде МПМЭ методами масс-спектрометрии и ГЖХ-масс-спектрометрии. Вещество, полученное после упаривания водной фазы, идентифицировали как α, α -D-трегалозу при помощи ГЖХ и ТСХ (см. [1]); $[\alpha]_D^{20} + 170,2^\circ$ (вода; c 0,4).

Кислотный метанолиз гликолипида (XII) проводили по методике, описанной в предыдущем сообщении [1]. Получали метиловые эфиры миколовых кислот, идентифицированные при помощи ТСХ в системах растворителей 4—6 и на основании масс-спектров (в форме МПМЭ), а также аномерные метилгликозиды, которые идентифицировали методом ГЖХ.

Исчерпывающее метилирование гликолипида (XII). O-Метилирование гликолипида (XII) (70 мг) осуществляли действием иодистого метила в присутствии окиси серебра по методике, описанной в предыдущем сообщении [1] для O-метилирования сукциноильного трегалозолипида. Неочищенный продукт реакции наносили в 1 мл CH_2Cl_2 на колонку с 15 г силикагеля КСК. Колонку промывали 150 мл CH_2Cl_2 , после чего элюирование продолжали смесью CH_2Cl_2 — этилацетат (10 : 1). Собирали фракции по 10 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в системе растворителей 7. После упаривания фракций с 5-й по 8-ю получили 60 мг хроматографически чистого пер-O-метилпроизводного (XIII); R_f 0,57 (в системе растворителей (7)); $[\alpha]_{589,6} + 52,2^\circ$, $[\alpha]_{435,8} + 100,0^\circ$, $[\alpha]_{365,6} + 143^\circ$ (c 2,5; при 20°).

ИК-спектр ($\nu_{\text{макс}}$, см^{-1}): 1738 (C=O), 1099, 1159 (C—O); полосы поглощения ПО-групп отсутствовали.

Щелочной метанолиз пер-O-метилпроизводного (XIII). Смесь 32 мг производного (XIII) и 2 мл 0,5 М раствора MeONa в MeOH кипятили 8 ч, по охлаждению разбавляли 3 мл MeOH , нейтрализовали амберлитом IRC-50 (H^+) и упаривали досуха. Остаток наносили в 1 мл CHCl_3 на колонку с 5 г силикагеля КСК; 15 мл CHCl_3 вымывали МПМЭ миколовых кислот (III), которые идентифицировали при помощи ТСХ в системах растворителей 4 и 5 и масс-спектрометрии, затем 15 мл смеси CHCl_3 — MeOH (9 : 1) элюировали 2,3,4,2',3',4'-гекса-O-метил- α, α -D-трегалозу (XIV), R_f 0,7 (в системе растворителей (1)).

6,6'-Ди-О-тримил- α,α -D-трегалоза (XV). К раствору 102 мг (0,3 ммоль) α,α -D-трегалозы в 2 мл сухого диметилформамида добавляли при 20° раствор 334 мг (1,2 ммоль) трифенилхлорметана в 2 мл сухого пиридина. Смесь оставляли на 60 ч при 20°, затем разбавляли 5 мл воды, продукт реакции экстрагировали CHCl_3 (2×10 мл). Объединенный экстракт промывали водой (2×10 мл) и упаривали досуха. Остаток растирали с 3 мл смеси гексан — CHCl_3 (5 : 1). Закристаллизовавшееся вещество отфильтровывали и промывали той же смесью растворителей. Получали 176 мг (71%) дитритильного производного (XV), т. пл. 236—238°. При ТСХ продукт реакции мигрировал в виде одного пятна с R_f 0,56 в системе растворителей (1).

2,3,4,2',3',4'-Гекса-О-метил-6,6'-ди-О-тримил- α,α -D-трегалоза (XVI). Смесь 5 мл сухого диметилсульфоксида и 300 мг NaN нагревали 1 ч при перемешивании при 55°. По охлаждении образовавшегося раствора к нему добавляли раствор 413 мг (0,5 ммоль) дитритильного производного (XV) в 1,5 мл диметилсульфоксида. Смесь перемешивали 30 мин при 20° и обрабатывали при той же температуре 3 мл MeI. Реакционную массу перемешивали 30 мин, затем к ней добавляли 10 мл воды и 20 мл CHCl_3 , нижнюю фазу отделяли, промывали водой (3×10 мл) и упаривали досуха. Остаток растирали с 2 мл гексана, закристаллизовавшийся продукт отфильтровывали и промывали гексаном. Получали 395 мг (87%) пер-О-метильного производного дитритилтрегалозы (XVI), т. пл. 147—148° (из гексана — бензола). При ТСХ вещество мигрировало в виде одного пятна с R_f 0,53 в системе 7.

2,3,4,2',3',4'-Гекса-О-метил- α,α -D-трегалоза (XIV). Смесь 273 мг (0,3 ммоль) триметильного производного (XVI), 2 мл диоксана и 1 мл 70%-ной AcOH нагревали 2 ч при 70°, по охлаждении упаривали досуха, остаток наносили в 1 мл CHCl_3 на колонку с 7 г силикагеля КСК. Колонку промывали 30 мл CHCl_3 , после чего 30 мл смеси CHCl_3 —MeOH (9 : 1) элюировали 120 мг (94%) гекса-О-метилтрегалозы (XIV) в виде вязкой жидкости, гомогенной при ТСХ, R_f 0,75 (в системе 1). Полученный продукт не отличался по спектру ПМР и по подвижности при ТСХ от продукта деградации пер-О-метилпроизводного липида (XIII).

3-О-Метилпроизводные миколовых кислот (XVII). К раствору 45 мг МПМЭ свободных миколовых кислот в 1 мл диметилсульфоксида добавляли 0,2 мл 10%-ного раствора KOH и смесь нагревали 10 ч при 65° при интенсивном перемешивании. По охлаждении к смеси добавляли 1 мл 5%-ной соляной кислоты, затем 3 мл воды и продукт реакции экстрагировали гексаном (3×5 мл). Объединенный экстракт промывали 5 мл воды, упаривали досуха, остаток наносили в 1 мл смеси гексан — эфир (5 : 1) на колонку с 10 г силикагеля КСК. Вымывали последовательно смесями гексан — эфир (по 50 мл): 5 : 1, 4 : 1, 3 : 1 и 2 : 1. Последней смесью элюировали 38 мг 3-О-метилмиколовых кислот (XVII); R_f 0,15 (в системе 4), 0,7 (гексан — эфир — AcOH , 10 : 10 : 0,2).

Ацилирование гекса-О-метилтрегалозы (XIV). Смесь 36 мг 3-О-метилмиколовых кислот, 0,5 мл сухого бензола и 0,5 мл хлористого оксалила нагревали 2 ч при 50°, после чего упаривали досуха и остаток сушили 1 ч при 35°/0,02 мм. К раствору этого остатка в 0,5 мл сухого бензола добавляли раствор 10 мг гекса-О-метилтрегалозы (XIV) в 0,3 мл пиридина. Смесь нагревали 12 ч при слабом кипении, по охлаждении разбавляли 3 мл бензола, раствор промывали 2 мл воды, 2% соляной кислотой (2×2 мл), снова 2 мл воды и упаривали досуха. Остаток наносили в CH_2Cl_2 на пластинку (10×10 см) с закрепленным слоем ($\sim 0,3$ мм) силикагеля G. Хроматограмму проявляли в системе растворителей 7, сушили на воздухе 15 мин и опрыскивали 0,2% раствором морина в MeOH. В УФ-свете наблюдали две основные зоны веществ с R_f 0,1 и 0,6. Последнюю отделяли, смесью CHCl_3 — MeOH (9 : 1) с адсорбента элюировали 16 мг вещества, не отличавшегося по спектру ПМР, масс-спектру и поведению при ТСХ

в системах 6 и 7 от пер-О-метилпроизводного гликолипида (XIII). Менее подвижное при ТСХ вещество представляло собой, по данным анализа продуктов гидролиза, 2,3,4,2',3',4'-гекса-О-метил-6-О-(3-О-метил)миколоил- α,α -D-трегалозу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Батраков С. Г., Розынов Б. В., Коронелли Т. В., Кожухова Р. А., Бергельсон Л. Д. (1977) Биорган. химия, 3, 55—67.
2. Ледерер Э. (1971) Ж. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 16, 180—196.
3. Goren M. V. (1972) Bacteriol. Revs, 36, 33—64.
4. Коронелли Т. В. (1977) Успехи микробиологии, вып. 12, с. 164—189, М., «Наука».
5. Etémedi A. H. (1967) J. Gas Chromatogr., 5, 447—456.
6. Alshamaony L., Goodfellow M., Minnikin D. E., Mordarska H. (1976) J. Gen. Microbiol., 92, 183—187.
7. Alshamaony L., Goodfellow M., Minnikin D. E. (1976) J. Gen. Microbiol., 92, 188—199.
8. Maurice M. T., Vacheron M. J., Michel G. (1971) Chem. and Phys. Lipids, 7, 9—18.
9. Красильников Н. А., Коронелли Т. В., Розынов Б. В., Калюжная Т. В. (1973) Микробиология, 42, 240—243.
10. Коронелли Т. В., Кудрина Е. С., Розынов Б. В. (1975) Микробиология, 44, 450—453.
11. Batt R. D., Hodges R., Robertson J. G. (1971) Biochim. et biophys. acta, 239, 368—373.
12. Yano I., Saito K., Furukawa Y., Kusunose M. (1972) FEBS Lett., 21, 215—219.
13. Itoneda T., Lederer E., Rozanis J. (1970) Chem. and Phys. Lipids, 4, 375—392.
14. Красильников Н. А., Коронелли Т. В., Розынов Б. В. (1971) Докл. АН СССР, 201, 1248—1251.
15. Красильников Н. А., Коронелли Т. В., Розынов Б. В. (1972) Микробиология, 41, 808—812.
16. McCloskey J. A., McClelland M. J. (1965) J. Amer. Chem. Soc., 87, 5090—5093.
17. Brooks C. J. W., Maclean I. (1971) J. Chromatogr. Sci., 9, 18—24.
18. Eichberg J. J., Whittaker V. P., Dawson R. M. C. (1964) Biochem. J., 92, 91—100.
19. Shaw N. (1968) Biochim. et biophys. acta, 164, 435—436.
20. Frost D. J., Gunstone F. D. (1975) Chem. and Phys. Lipids, 15, 53—85.
21. Bloch H. (1950) J. Exp. Med., 91, 197—217.
22. Lederer E. (1976) Chem. and Phys. Lipids, 16, 91—106.
23. Barksdale L., Kim Kwang Shin (1977) Bacteriol. Revs, 41, 217—372.
24. Itoneda T., Lenz M., Pudles J. (1963) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 13, 110—114.
25. Lanéelle M.-A., Asselineau J. (1977) Biochim. et biophys. acta, 486, 205—208.
26. Suzuki T., Tanaka K., Matsubara I., Kinoshita S. (1969) Agr. Biol. Chem., 33, 1619—1627.
27. Виноков В. И., Коронелли Т. В., Красильников Н. А., Иванов В. П., Островский Д. Н. (1972) Докл. АН СССР, 203, 467—469.
28. Коронелли Т. В. (1968) Микробиология, 37, 984—987.

Поступила в редакцию
10.X.1977

THE LIPIDS OF MYCOBACTERIA. II. «CORD FACTOR» AND MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF MYCOLIC ACIDS OF *MYCOBACTERIUM PARAFFINICUM*

BATRAKOV S. G., SADOVSKAYA V. L., ROSYNOV B. V.,
KORONELLI T. V., BERGELSON L. D.

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

The major cell glycolipid of the paraffin-oxidizing bacterium *Mycobacterium paraffinicum* has been isolated and characterized as 6,6'-di-O-mycoloyl- α,α -D-trehalose («cord factors»). Mycolic acids were analyzed as methyl ester 3-O-methyl derivatives by mass spectrometry with electron impact and field ionization, as well as by combined GLC-mass spectrometry. The lipid fractions of the mycobacterium were shown to have essentially similar mycolic acid composition including saturated and monoenic components with 34, 36, 38 and 36, 38, 40, 42, 44 carbon atoms respectively. Some differences in mass spectrometric behaviour of saturated and unsaturated mycolic acids were discussed. Field ionization mass spectrometry was demonstrated to be a preferable method for routine analysis of natural mycolic acid mixtures.