



УДК 547.96'915

## ЛИПИДЫ МИКОБАКТЕРИЙ

### V \*. ЦИКЛОТЕТРАПЕПТИД, АЦИЛИРОВАННЫЙ ЖИРНОЙ КИСЛОТОЙ, ИЗ *Mycobacterium paraffinicum*

**Батраков С. Г.\*\***, **Муратов В. Б.**, **Розынов Б. В.**,  
**Решетова О. С.**, **Бергельсон Л. Д.**

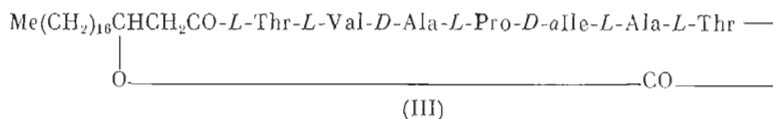
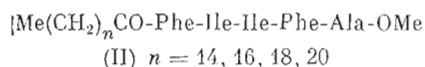
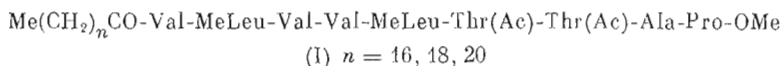
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

**Коронелли Т. В.**

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
биологический факультет*

Из клеточных липидов парафинокислящей бактерии *Mycobacterium paraffinicum* путем хроматографии на колонках с силикагелем выделен ранее неизвестный пептидолипид. На основании результатов химической деградации, а также данных масс-спектрометрического анализа нативного липида и его производных пептидолипид идентифицирован как N-ацил (C<sub>20</sub>-C<sub>26</sub>)-L-треонил-L-валил-L-валил-L-лейцилолипид.

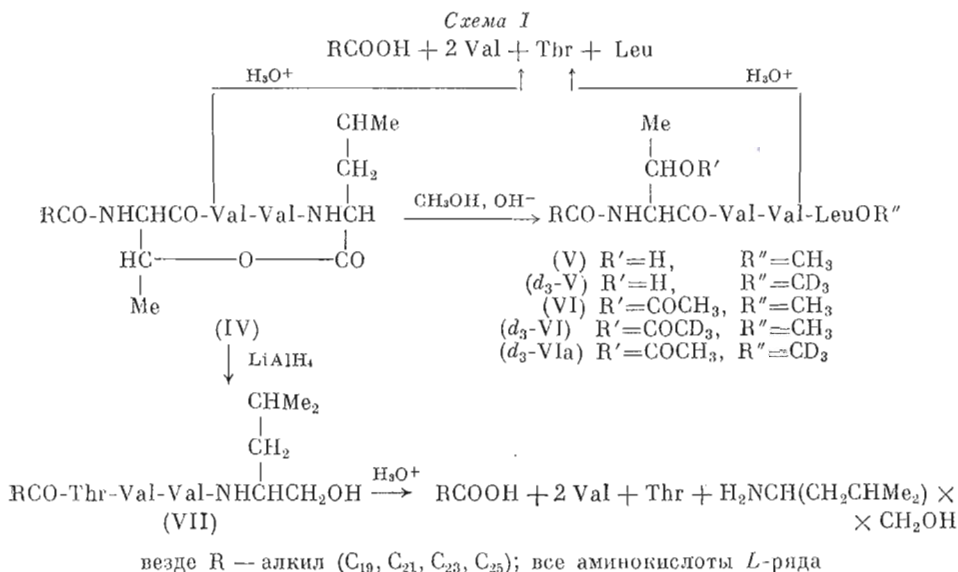
Пептидолипиды (N-жирноацильные производные пептидов), производимые микобактериями и родственными им микроорганизмами, являются малоизученным классом природных липидов (см. обзоры [2-4]). Известные в настоящее время липиды этого типа делятся на две структурные группы: собственно пептидолипиды и гликозиды пептидолипидов. Первую группу составляют фортуйтин (I), выделенный из клеток *Mycobacterium fortuitum* [5], пептидолипид (II) из *M. johney* [6], не идентифицированный окончательно пептидолипид из *M. paratuberculosis* [7] и циклопептидолипид (III), так называемый пептидолипин NA, из *Nocardia asteroides* [8].



Как можно видеть из приведенных формул (I) — (III), молекулы представителей рассматриваемой группы не имеют каких-либо общих струк-

\* Сообщение IV см. [1].

\*\* Настоящий адрес — Центральный орден Ленина институт усовершенствования врачей, Москва.



турных блоков. Напротив, в гликопептидолипидах, именуемых также микозидами С, строение пептидолипидной части может быть представлено общей формулой  $\text{RCO-D-Phe-(D-a-Thr-D-Ala)}_n\text{-X}$ , где  $n=1, 2$  или  $3$ , X — остаток N,O-диметилсерина или L-аланинола [9–15]. Углеводными компонентами молекул микозидов С обычно являются O-метилированные L-рамноза и L-талоза, часто содержащие также и O-ацетильные группы. В качестве липофильного фрагмента пептидолипиды обеих групп содержат амидносвязанные остатки жирных кислот C<sub>16</sub> — C<sub>28</sub>(R), которые в ряде случаев имеют гидроксильный или метоксильный заместитель при C<sub>(3)</sub>.

В настоящем сообщении описывается выделение и установление строения ранее неизвестного пептидолипида (IV), продуцируемого парафин-окисляющей микобактерией *M. paraffinicum* [16]. Выделение этого липида в хроматографически индивидуальном состоянии было достигнуто в результате двукратного хроматографирования на колонках с силикагелем суммарных клеточных липидов, извлеченных из лиофильно высушенных клеток смесями хлороформа с метанолом и очищенных от нелипидных примесей гель-фильтрацией на сефадексе G-25 [17].

ИК-спектр липида (IV) содержит полосы валентных колебаний N—H (3315 и 3085 см<sup>-1</sup>), сложноэфирного карбонила (1740 см<sup>-1</sup>), амидных карбониллов (1662 см<sup>-1</sup>; плечо при 1645 см<sup>-1</sup> — амид I) и связи C—O (1218 см<sup>-1</sup>), деформационных колебаний N—H (1538 см<sup>-1</sup> — амидная полоса II).

В результате жесткого кислотного гидролиза липида (IV) (см. схему 1) образуются жирные кислоты и смесь аминокислот, состоящая из L-валина, L-лейцина и L-треонина. Жирные кислоты гидролизата идентифицировали в виде метиловых эфиров методами ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии. Найденный состав жирных кислот представлен в табл. 1. Определение аминокислот осуществляли на аминокислотном анализаторе, а также методами ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии N-трифторацетильных производных соответствующих n-бутиловых эфиров [18]. Абсолютную конфигурацию аминокислот устанавливали при помощи ГЖХ N-трифторацетильных производных их изопропиловых эфиров на колонке с оптической активной неподвижной фазой. Кроме того, для контроля проводили газохроматографический анализ N-(N-трифторацетил-L-пролил)-производных метиловых эфиров аминокислот на неактивной фазе по ранее описанной методике [19, 20]. Результаты, полученные тем и другим

## Жирнокислотный состав пептидолипида (IV)

Жирные кислоты	Относительное содержание, вес. %	Жирные кислоты	Относительное содержание, вес. %
C <sub>20:0</sub>	5	C* <sub>24:1</sub>	26
C <sub>22:0</sub>	23	C* <sub>26:1</sub>	26
C <sub>24:0</sub>	20		

\* О составе фракций ненасыщенных кислот см. ниже.

методом, показали, что все содержащиеся в молекуле пептидолипида (IV) аминокислоты относятся к *L*-ряду. Молярное соотношение находящихся в гидролизате жирных кислот, *L*-валина, *L*-лейцина и *L*-треонина определено как 1 : 2 : 1 : 1. Судя по тому, что выделенный пептидолипид не изменялся в стандартных условиях окисления по Джонсу, а также при действии уксусного ангидрида в пиридине (60° С, 48 ч), его молекула не содержит свободных первичных или вторичных гидроксильных групп. При щелочном метанолизе в мягких условиях липид (IV) давал единственный продукт (V), менее подвижный, чем исходный липид при ТСХ на силикагеле; ИК-спектр вещества (V) мало отличался от ИК-спектра липида (IV). Продукт метанолиза (V) в условиях жесткого кислотного гидролиза образовывал те же продукты деградации и в том же молярном соотношении, что и нативный пептидолипид (IV). В отличие от последнего липид (V) при ацелировании уксусным ангидридом в пиридине превращался в ацетат (VI). При окислении соединения (V) по Джонсу было получено вещество, более подвижное при ТСХ, жесткий кислотный гидролиз которого привел к образованию смеси жирных кислот, *L*-валина и *L*-лейцина в молярном соотношении 1 : 2 : 1; *L*-треонин в гидролизате отсутствовал.

На основании вышесказанных данных мы предположили, что продукт щелочного метанолиза (V) природного липида (IV) представляет собой *N*-ацилтетрапептид, содержащий терминальную метоксикарбонильную группу и свободную гидроксильную группу; последняя принадлежит остатку треонина. Строение этого продукта деградации было установлено на основании его масс-спектра и масс-спектров ацетата (VI), дейтероацетата (*d*<sub>3</sub>-VI), дейтерометилового эфира (*d*<sub>3</sub>-V) и ацетата дейтерометилового эфира (*d*<sub>3</sub>-VIa). В масс-спектре липида (V) (табл. 2) пики молекулярных ионов отсутствуют, однако имеются заметные пики гомологичных ионов [M - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> с *m/z* 802, 776, 774, 748 и 720, соответствующих молекулярным видам, содержащим остатки жирных кислот, перечисленных в табл. 1. Вторая серия пиков гомологичных ионов в области высоких массовых чисел — ионы [M - 43]<sup>+</sup> с *m/z* 777, 751, 749, 723 и 695 — вероятно, обязана своим происхождением элиминированию из молекулярных ионов изопропильного радикала (от валинового остатка). Пики обеих указанных серий смещаются на 3 единицы массы в спектре дейтеропроизводного (*d*<sub>3</sub>-V).

В отличие от масс-спектра метилового эфира (V) спектр его ацетата (VI) содержит пики молекулярных ионов с *m/z* 862, 836, 834 и 808\*; массовые числа перечисленных ионов возрастали на 3 единицы массы в спектрах дейтеропроизводных (*d*<sub>3</sub>-VI) и (*d*<sub>3</sub>-VIa). В области высоких массовых чисел масс-спектра ацетата (VI) наблюдались, кроме того, пики фрагментов [M - MeOH]<sup>+</sup> с *m/z* 830, 804, 802 и 776 и ионов [M - AcOH]<sup>+</sup> с *m/z* 802, 776, 774 и 748. Пики ионов первой серии сохра-

\* Интенсивность пиков ионов M<sup>+</sup>, [M - MeOH]<sup>+</sup> и [M - AcOH]<sup>+</sup>, отвечающих мипорному компоненту липидной фракции (R=C<sub>19</sub>H<sub>39</sub>), оказалась крайне низкой.

Основные пики в масс-спектре продукта метанолиза (V) пептидолипида (IV) \*

$m/z$	$I_{\text{отн.}}, \%$ **	Тип иона	Брутто-формула	$m/z$ по масс-спектру ( $d_3$ -V)	$m/z$	$I_{\text{отн.}}, \%$ **	Тип иона	Брутто-формула	$m/z$ по масс-спектру ( $d_3$ -V)
802	1,3	$M_1-H_2O$		805	630	1,5	$D_3+H-H_2O$		630
777	2,1	$M_1-43$		780	629	1,4	$D_3-H_2O$		629
776	1,3	$M_2-H_2O$		779	621	0,2	$D_4$		621
774	1,3	$M_3-H_2O$		777	604	3,8	$D_4+H-H_2O$		604
759	0,8	$M_1-H_2O-43$		762	603	4,3	$D_4-H_2O$		603
758	0,9	$M_1-H_2O-H-43$		761	576	2,7	$C_1$		576
751	2,3	$M_2-43$		754	559	4,8	$C_1+H-H_2O$	$C_{33}H_{63}N_2O_3$	559
749	3,0	$M_3-43$		752	550	4,1	$C_2$		550
748	1,3	$M_4-H_2O$		751	548	1,0	$C_3$		548
733	0,7	$M_2-H_2O-43$		736	533	13,0	$C_2+H-H_2O$	$C_{33}H_{61}N_2O_3$	533
732	0,8	$M_2-H_2O-H-43$		735	531	10,3	$C_3+H-H_2O$	$C_{33}H_{59}N_2O_3$	531
731	0,8	$M_3-H_2O-43$		734	522	1,8	$C_4$		522
730	0,9	$M_3-H_2O-H-43$		733	505	16,1	$C_4+H-H_2O$	$C_{31}H_{57}N_2O_3$	505
723	3,1	$M_4-43$		726	477	10,6	$B_1$	$C_{30}H_{55}NO_3$	477
720	1,2	$M_5-H_2O$		723	449	2,8	$B_2$	$C_{28}H_{51}NO_3$	449
705	0,5	$M_4-H_2O-43$		708	447	1,0	$B_3$		447
704	0,5	$M_4-H_2O-H-43$		707	419	1,0	$B_4$		419
695	1,3	$M_5-43$		698	378	3,9	$A_1$	$C_{26}H_{50}O$	378
677	0,3	$M_5-H_2O-43$		680	352	2,2	$A_2$		352
676	0,5	$M_5-H_2O-H-43$		679	350	2,0	$A_3$	$C_{24}H_{46}O$	350
675	1,0	$D_1$		675	344	1,3	b		347
658	0,7	$D_1+H-H_2O$		658	324	1,1	$A_4$		324
657	0,8	$D_1-H_2O$		657	296	1,1	$A_5$		296
649	0,2	$D_2$		649	245	14,7	c	$C_{12}H_{25}N_2O_3$	248
647	0,9	$D_3$		647	211	4,2	c-MeOH-2H	$C_{11}H_{19}N_2O_2$	211
632	1,9	$D_2+H-H_2O$		632	146	13,1	d	$C_7H_{16}NO_2$	149
631	2,5	$D_2-H_2O$		631	112	5,0	d-MeOH-2H		112

\* Цифровые индексы — 1, 2, 3, 4 или 5 — при буквенных обозначениях ионов указывают структуру жирнокислотного остатка в данном ионе —  $R=C_{25}H_{49}$ ,  $C_{23}H_{47}$ ,  $C_{21}H_{45}$ ,  $C_{19}H_{43}$  или  $C_{17}H_{39}$ , соответственно.

\*\* Максимальным в спектре является пик иона  $H_2N^+=CHCHMe_2$  с  $m/z$  72, образующегося из остатка валина.

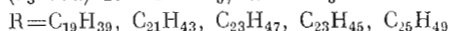
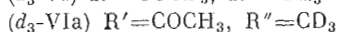
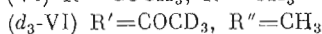
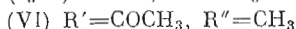
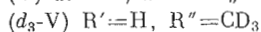
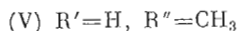
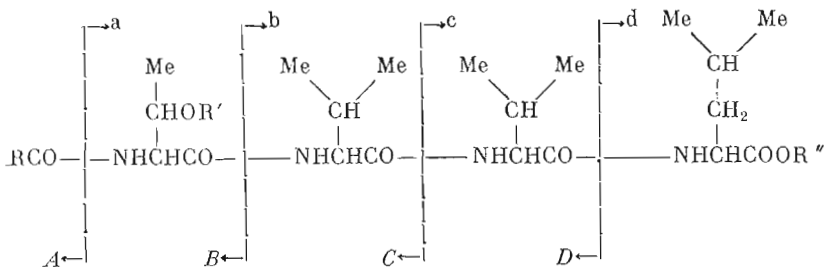
няли свое положение в масс-спектре дейтерометилового эфира ( $d_3$ -VIa), но смещались на 3 единицы в область больших массовых чисел в спектре дейтероацетата ( $d_3$ -VI); обратная закономерность имела место в случае второй серии ионов.

Изложенные результаты масс-спектрометрического анализа продукта метанолиза (V) и его производных позволили сделать окончательный вывод, что молекулы компонентов, составляющих фракцию метиловых эфиров (V), построены из одного жирнокислотного и четырех аминокислотных остатков. Последовательность расположения аминокислотных остатков была также установлена с помощью масс-спектрометрии.

Как известно (см. обзор [21]), одним из основных направлений распада под электронным ударом молекулярных ионов метиловых эфиров N-ацилпептидов является разрыв амидных связей CO-NH (аминокислотный тип фрагментации), в результате которого образуются ионы, содержащие как N-концевые, так и C-концевые аминокислоты. Пики фрагментов обоих типов — A-D и b-d (см. схему 2 и табл. 2) соответственно — присутствуют в масс-спектре продукта метанолиза (V) и позволяют однозначно установить строение последнего. Структурная идентификация гомологов, входящих в состав фракции (V), рассматривается ниже на примере компонента с  $R=C_{25}H_{49}$ .

Пик иона A с  $m/z$  378 характеризует строение жирноацильного остатка молекулы. Образование этого иона сопровождается переносом атома водорода к заряженному фрагменту. Точное измерение величины  $m/z$  иона:

Схема 2



*B* указывает на то, что непосредственно с жирноацильным остатком связан остаток треонина. Распад, приводящий к иону *B* и двум другим треонинсодержащим ионам (*C* и *D*), сопровождается потерей атома водорода заряженным фрагментом. Наличие в масс-спектре пиков ионов *C* с  $m/z$  576 и  $[\text{C}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  с  $m/z$  559 позволяет идентифицировать следующий аминокислотный остаток как валиновый. Наконец, третий, считая от N-конца пептидной цепи, аминокислотный остаток, также валиновый, определяется на основании пиков ионов *D* с  $m/z$  675 и  $[\text{D}-\text{H}_2\text{O}]^+$  с  $m/z$  657. Строение рассмотренных аминокислотных фрагментов подтверждается тем, что в масс-спектре дейтерометилового эфира ( $d_3\text{-}V$ ) их массовые числа сохраняются. Эти данные показывают, что аминокислотные остатки в молекуле липида (*V*) ( $R = \text{C}_{25}\text{H}_{49}$ ) расположены в изображенной на схеме 2 последовательности. Аналогичной последовательностью, судя по масс-спектру соединения (*V*), обладают и молекулы остальных компонентов данной фракции (см. табл. 2). Эти выводы находятся в полном соответствии с наличием в масс-спектре пиков ионов *b*, *c* и *d*, которые образуются по тому же типу фрагментации, но при локализации заряда на карбометоксилсодержащем фрагменте. Распад, приводящий к названным ионам, протекает с миграцией двух атомов водорода к заряженным фрагментам. Имеющийся в спектре интенсивный пик иона *d* с  $m/z$  146 свидетельствует о том, что C-концевой аминокислотой тетрапептидной цепи является лейцин. Пик иона *c*,  $m/z$  245, позволяет идентифицировать аминокислотный остаток, связанный с остатком лейцина, — им является остаток валина. Пик иона *b*,  $m/z$  344, характеризует третий, считая от C-конца пептидной цепи, аминокислотный остаток, которым опять-таки оказался остаток валина. Интенсивность пика фрагмента *a* ( $m/z$  445) крайне мала. В масс-спектре дейтероаналога ( $d_3\text{-}V$ ) пики ионов *b*, *c* и *d* смещены в область больших массовых чисел на 3 единицы, что в совокупности с результатами точного измерения  $m/z$  этих ионов служит доказательством их структуры. В результате элиминирования ионами *b*, *c* и *d* молекулы MeOH и двух атомов водорода возникают фрагменты с  $m/z$  112, 211 и 310 соответственно; массовые числа последних сохраняются в спектре дейтерометилового эфира ( $d_3\text{-}V$ ). Однако возможно, что непосредственными предшественниками этих фрагментов являются ионы типа  $[\text{M}-\text{MeOH}]^+$ .

Для подтверждения результатов масс-спектрометрического анализа мы осуществили определение C-концевой аминокислоты тетрапептидного остатка химическим методом. С этой целью пептидолипид (*IV*) подвергли восстановлению алюмогидридом лития в мягких условиях (ср. [8]), а затем — жесткому кислотному гидролизу (см. схему 1). Аминокислотная

Основные пики в масс-спектре пептидолипида (IV) \*

$m/z$	$I_{\text{отн.}} \%$	Тип иона	$m/z$	$I_{\text{отн.}} \%$	Тип иона
788	3,4	$M_1$	559	2,4	$C_1+H-H_2O$
762	3,5	$M_2$	551	1,6	$C_2+H$
760	5,9	$M_3$	549	2,8	$C_3+H$
745	0,5	$M_1-43$	533	8,7	$C_2+H-H_2O$
734	4,4	$M_4$	531	4,6	$C_3+H-H_2O$
719	1,3	$M_2-43$	523	1,0	$C_4+H$
717	0,7	$M_3-43$	505	16,8	$C_4+H-H_2O$
706	3,0	$M_5$	495	0,6	$C_5+H$
691	2,3	$M_4-43$	477	11,6	$B_1$
674	0,5	$D_1-H$	459	2,0	$B_1-H_2O$
663	2,6	$M_5-43$	451	1,0	$B_2$
657	0,7	$D_1-H_2O$	449	3,7	$B_3$
648	3,8	$D_2-H$	433	3,7	$B_2-H_2O$
646	0,8	$D_3-H$	431	1,8	$B_3-H_2O$
631	1,6	$D_2-H_2O$	421	1,3	$B_4$
629	0,9	$D_3-H_2O$	403	2,1	$B_4-H_2O$
620	6,1	$D_4-H$	378	6,0	$A_1$
603	1,8	$D_4-H_2O$	352	1,3	$A_2$
592	4,1	$D_5-H$	350	3,2	$A_3$
577	6,4	$C_1+H$	324	0,9	$A_4$
575	1,0	$D_5-H_2O$	183	7,0	$E$

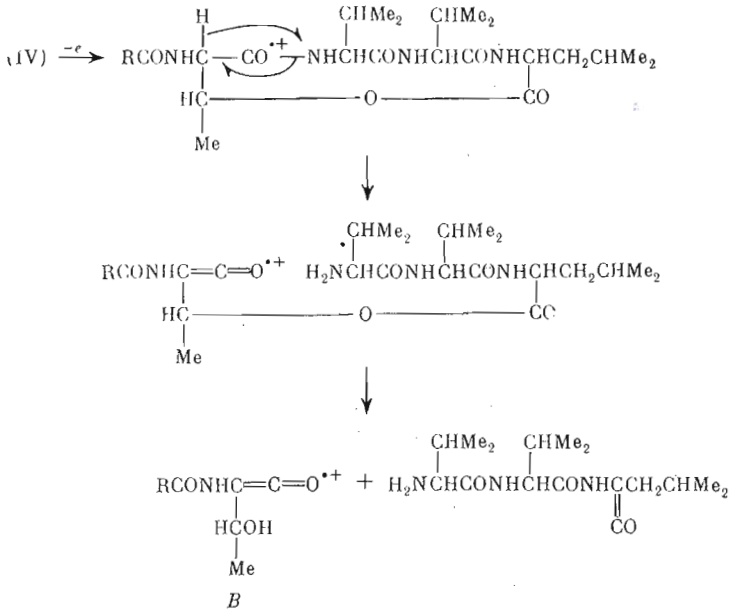
\* См. примечания к табл. 2.

фракция гидролизата состояла из валина и треонина в молярном соотношении 2 : 1, тогда как лейцин в гидролизате практически отсутствовал. После превращения гидрофильных компонентов гидролизата в N-2,4-динитрофенильные производные и последующего фильтрования смеси производных через анионит в качестве единственного продукта был получен N-2,4-динитрофениллейцинол, который был идентифицирован при помощи ТСХ и масс-спектрометрии. Этим окончательно доказывается терминальное положение лейцинового остатка в пептидной цепи продукта метанолиза (V).

Выше отмечалось, что метиловый эфир N-ацилтетрапептида (V) является единственным продуктом метанолиза нативного липида (IV) и что в отличие от последнего вещества (V) содержит свободную гидроксильную группу, принадлежащую остатку треонина. Отсюда следует, что указанная реакция приводит только к внутримолекулярным превращениям липидной молекулы. Поэтому можно считать, что в структуру нативного липида (IV) входит циклическая тетрапептидная группировка, где карбоксил C-концевой аминокислоты — L-лейцина — этерифицирован гидроксильной группой L-треонина. Этот вывод подтверждается результатами масс-спектрометрического анализа пептидолипида (IV) (табл. 3). Наличие в масс-спектре пиков гомологичных молекулярных ионов позволяет определить молекулярные веса компонентов липидной фракции — они равны 788, 762, 760, 734 и 706 и меньше молекулярных весов соответствующих компонентов фракции (V) на 32 единицы массы, что отвечает присоединению к молекулам нативных соединений в процессе метанолиза молекулы MeOH. Можно предположить, что фрагментация молекулярного иона пептидолипида (IV) происходит путем разрыва амидных связей между аминокислотными остатками с последующим элиминированием заместителя спиртовой кислородной функции треонина. Об этом свидетельствует тот факт, что масс-спектр липида (IV) содержит все пики, соответствующие ионам A—D (см. табл. 3), но в то же время пики, отвечающие аналогам фрагментов a—d, в спектре не наблюдаются. На схеме 3



С х е м а 3



описанный путь распада демонстрируется на примере образования иона *B*. Имеющийся в области низких массовых чисел относительно интенсивный пик при  $m/z$  183, по-видимому, принадлежит иону *E*:  $\text{H}_2\text{NC}(=\text{CHMe}) \cdot \text{CONHCH}(\text{CHMe}_2)\text{C}\equiv\text{O}^{\bullet+}$  (найденная брутто-формула —  $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ ), включающему остатки треонина и валина. Возможно, что указанный фрагмент возникает из ионов типа *C* в результате разрыва связи между остатками жирной кислоты и треонина и отщепления молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  из треонинового остатка.

В ходе структурного анализа пептидолипида (IV) мы изучили также строение ненасыщенных кислот  $\text{C}_{24:1}$  и  $\text{C}_{26:1}$ , остатки которых содержатся в липидной молекуле. Для определения локализации двойной связи в углеводородных цепях этих кислот метиловые эфиры суммы кислот, полученной в результате гидролиза нативного липида, были окислены осмиевым ангидридом [22]. Диоксиэфиры, образовавшиеся из ненасыщенных компонентов, отделяли препаративной ТСХ и анализировали в виде триметилсилиловых производных при помощи ГЖХ на капиллярной колонке, а также методом ГЖХ-масс-спектрометрии. Оказалось, что каждая из названных кислот не индивидуальна, а представляет собой смесь позиционных изомеров. Так, во фракции кислот  $\text{C}_{24:1}$  доминировали изомеры с положением двойной связи при  $\text{C}_{(9)}$ ,  $\text{C}_{(11)}$ ,  $\text{C}_{(13)}$ ,  $\text{C}_{(15)}$  и  $\text{C}_{(17)}$ , а в составе фракции кислот  $\text{C}_{26:1}$  помимо перечисленных присутствовал изомер  $\Delta^{19}$ . Следует отметить, что в составе восков, нейтральных глицеридов и фосфолипидов, продуцируемых тем же микроорганизмом, нами обнаружена только одна ненасыщенная жирная кислота —  $\Delta^9\text{-C}_{16:1}$ .

### Экспериментальная часть

Культуру *M. paraffinicum* выращивали на среде с гексадеканом в ранее описанных условиях [23]. Экстракцию клеточных липидов и удаление из них нелипидных примесей проводили, как это указано в работе [24].

Для хроматографии на колонках применяли силикагель «Л» (Lachema, ЧССР) с размером частиц 100–160 мкм. Перед использованием его промывали 5 объемами смеси  $\text{CHCl}_3\text{—MeOH}$  (2 : 1), затем 5 объемами  $\text{MeOH}$  и сушили на воздухе 12 ч. ТСХ проводили на готовых пластинках с за-

крепленным слоем (толщина 0,25 мм) силикагеля 60 F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ). При хроматографировании пептидолипида и его производных применяли главным образом следующие системы растворителей: бензол — этилацетат, 1:1 (система А), и СНCl<sub>3</sub> — MeOH, 40:1 (система Б). Вещества на хроматограммах обнаруживали путем опрыскивания последних: а) 50% серной кислотой с последующим нагреванием пластинок при ~200° С, б) бензидиновым реагентом [25] после инкубирования пластинок в атмосфере хлора.

Анализ аминокислот проводили тремя методами: 1) на автоматическом аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США); 2) при помощи ГЖХ N-трифторацетильных производных соответствующих *n*-бутиловых эфиров [18], для ГЖХ использовали хроматограф «Perkin-Elmer 910», снабженный пламенно-ионизационным детектором и колонкой (2100×3 мм) с 0,3% полиэтиленгликолядипата на хромосорбе G-AW (80—100 меш), температурный режим колонки: 100→210° С (3° С/мин), температура инжектора 100° С, детектора 320° С, газ-носитель — гелий (20 мл/мин); 3) методом ГЖХ-масс-спектрометрии, использовали хромато-масс-спектрометр LKB 9000 (Швеция), для ГЖХ применяли колонку (1800×3 мм) с 3% силикона SE-30 на хроматоне N-AW (90—120 меш) при температурном режиме: 80→150° С (3° С/мин), энергия ионизирующих электронов при масс-спектрометрии 70 эВ.

Абсолютную конфигурацию аминокислот определяли при помощи ГЖХ двумя методами: 1) метиловые эфиры аминокислот превращали в N-(N-трифторацетил-*L*-пролил)производные [19, 20], которые хроматографировали на приборе «Varian 2100» (США), снабженном пламенно-ионизационным детектором и колонкой (2000×2 мм) с 5% силикона SE-30 на хроматоне N-AW (75—90 меш), режим изотермический, 150° С; 2) N-трифторацетильные производные изопропиловых эфиров аминокислот хроматографировали на капиллярной колонке (35 м×0,4 мм), в качестве стационарной фазы использовали синтезированный нами N-стеаронил-*L*-валлил-*трет*-бутиламид (оптическая чистота 83%)\*. В обоих случаях в качестве стандартов применяли соответствующие производные *D*- и *L*-антиподов исследуемых аминокислот.

Жирные кислоты анализировали методами ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии в виде метиловых эфиров. ГЖХ проводили на хроматографе «Perkin-Elmer 910», снабженном пламенно-ионизационным детектором и колонкой (1800×3 мм) с 5% силикона SE-30 на хроматоне N-AW (90—120 меш), температурный режим колонки: 150→320° С (6° С/мин), температура инжектора 160° С, детектора 340° С, расход гелия 20 мл/мин. Для ГЖХ-масс-спектрометрии применяли вышеуказанный хромато-масс-спектрометр, разделение смесей на компоненты осуществляли на колонке (1500×2 мм) с 5% SE-20 на хроматоне N-AW при температурном режиме: 150→310° С (5° С/мин).

ГЖХ триметилсилиловых производных диоксиэфиров, полученных при окислении метиловых эфиров ненасыщенных жирных кислот осмиевым ангидридом, проводили на хроматографе «Pye 104», модель 24 (Англия), снабженном пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой (10 м×0,5 мм), стационарная фаза — силикон SE-30; температура колонки 250° С, расход гелия 2 мл/мин. Анализ этих веществ методом ГЖХ-масс-спектрометрии осуществляли в тех же условиях, что и анализ метиловых эфиров жирных кислот.

Масс-спектры пептидолипида (IV) и его производных получали на приборе LKB 9000 при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и ускоряющем напряжении 3,5 кВ; температура испарения образцов 140—150° С. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на масс-спектрометре «Varian MAT CH-5DF» при разрешающей способности

\* Синтез этого соединения будет описан в отдельном сообщении.



10 000. ИК-спектры получали на спектрографе UR-10 (Zeiss, ГДР) в пленках веществ, свободных от растворителя. Величины оптического вращения измеряли на спектрополяриметре «Perkin-Elmer 141» (Швеция).

Полный гидролиз пептидолипида (IV) и его производных осуществляли путем нагревания веществ (~0,5 мг) в запаянной ампуле с 0,5 мл 6 н. соляной кислоты при 105° С в течение 48 ч. По охлаждении смесь разбавляли 2 мл воды и экстрагировали  $\text{CHCl}_3$  (2×2 мл). Объединенный экстракт промывали 1 мл воды, водную фазу присоединяли к водной фазе гидролизата. Экстракт упаривали досуха, остаток обрабатывали эфирным раствором диазометана, полученные метиловые эфиры жирных кислот анализировали вышеописанными методами. Объединенную водную фазу упаривали досуха, остаток освобождали от следов соляной кислоты многократной отгошкой с водой. Полученные аминокислоты анализировали вышеописанными методами.

*Выделение пептидолипида (IV).* Раствор 2,95 г клеточных липидов *M. paraffinicum*, экстрагированных из 7 г сухой биомассы, в 10 мл смеси  $\text{CHCl}_3$ —MeOH (2 : 1) тщательно смешивали с 15 г силикагеля. Смесь сушили в вакууме на роторном испарителе при 25° С в течение 30 мин и вносили в виде суспензии в системе  $\text{CHCl}_3$ —MeOH (20 : 1) в колонку (20××3 см), заполненную силикагелем в той же системе растворителей. Колонку элюировали 350 мл смеси  $\text{CHCl}_3$ —MeOH (20 : 1). После упаривания элюата получили 960 мг вещества, которое растворяли в 5 мл смеси  $\text{CHCl}_3$ —MeOH (2 : 1). Раствор смешивали с 3 г силикагеля, смесь сушили вышеописанным образом и вносили в системе бензол—этилацетат (5 : 1) в колонку (20×3 см), заполненную силикагелем в той же системе растворителей. Вымывали смесями бензол—этилацетат в соотношениях 5 : 1 (150 мл), 4 : 1 (200 мл), 3 : 1 (300 мл) и 1 : 1 (150 мл). Элюат собирали фракциями по 10 мл, которые анализировали при помощи ТСХ в системе А. Фракции, содержащие хроматографически гомогенный пептидолипид (IV) (элюирован системой бензол—этилацетат, 3 : 1), объединяли и упаривали досуха, остаток сушили 8 ч при 25° С/0,05 мм. Получили 18,5 мг пептидолипида (IV);  $R_f$  0,55 (в системе А), 0,45 (в системе бензол—этилацетат—AcOH, 25 : 10 : 0,2);  $[\alpha]_{516}^{25} -19,5^\circ$ ,  $[\alpha]_{405} -41^\circ$ ,  $[\alpha]_{366} -146^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ —MeOH, 2 : 1, с 0,4; при 22° С).

*Щелочной метанолиз липида (IV).* К раствору 2 мг пептидолипида (IV) в 1 мл смеси  $\text{CHCl}_3$ —MeOH (2 : 1) добавляли 0,2 мл 0,3 М раствора KOH в MeOH. Смесь оставляли на 30 мин при 20° С, после чего разбавляли 3 мл MeOH, нейтрализовали дауэксом 50×8 (H<sup>+</sup>), обрабатывали эфирным раствором диазометана и упаривали досуха. Получили хроматографически гомогенный метиловый эфир (V);  $R_f$  0,25 (в системе А), 0,3 (Б). ИК-спектр ( $\nu_{\text{макс}}$ , см<sup>-1</sup>): 3278 ( $\nu_{\text{NH}}$  и  $\nu_{\text{OH}}$ ), 3090 ( $\nu_{\text{NH}}$ ), 1745 ( $\nu_{\text{C=O}}$  сложного эфира), 1632 ( $\nu_{\text{C=O}}$  амида), 1552 ( $\delta_{\text{NH}}$ ).

Ацетат (VI) и дейтероацетат ( $d_3$ -VI) получали действием смеси уксусный ангидрид—пиридин или дейтероуксусный ангидрид—пиридин (1 : 1, 20° С, 24 ч) на липид (V);  $R_f$  0,5 (в системе А), 0,55 (Б).

*Дейтерометиловый эфир ( $d_3$ -V).* К раствору 1 мг пептидолипида (IV) в 0,5 мл смеси  $\text{CHCl}_3$ — $\text{CD}_3\text{OD}$  (2 : 1) добавляли 0,4 мл 0,5% раствора  $\text{CD}_3\text{ONa}$  в  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Смесь выдерживали 30 мин при 20° С, после чего подкисляли ледяной уксусной кислотой до pH 5, упаривали до ~1/4 начального объема, остаток встряхивали со смесью 2 мл  $\text{CHCl}_3$ , 1 мл MeOH и 0,6 мл воды. Смесь оставляли до полного разделения фаз, нижнюю фазу отделяли и упаривали досуха. Получили хроматографически гомогенный дейтерометиловый эфир ( $d_3$ -V), не отличающийся по подвижности при ТСХ от метилового эфира (V).

Ацетат ( $d_3$ -VIa) получали аналогично ацетату (VI).

*Определение С-концевой аминокислоты.* К раствору 0,5 мг пептидолипида (IV) в 1 мл сухого свежеперегнанного тетрагидрофурана добавляли при -50° С и перемешивании 1 мл алюмогидрида лития. Смесь перемешивали

вали 10 мин при той же температуре, после чего обрабатывали 0,5 мл этилацетата, а затем при 0° С подкисляли 6 н. соляной кислотой до pH 3. Смесь разбавляли 3 мл тетрагидрофурана, сушили над безводным MgSO<sub>4</sub> и упаривали досуха. Остаток растворяли в 2 мл CHCl<sub>3</sub>, раствор промывали водой (2×1 мл) и упаривали досуха. Получили продукт восстановления (VII), R<sub>f</sub> 0,15 (в системе А). Последний подвергали жесткому кислотному гидролизу по вышеописанной методике. В липофильной фракции гидролизата при помощи ТСХ в системе гексан — эфир — AcOH (80 : 20 : 0,2) идентифицировали жирные кислоты; в качестве стандарта использовали бегеновую кислоту. Аликвоту водорастворимой фракции гидролизата анализировали на аминокислотном анализаторе, при этом обнаруживали валин и треонин в молярном соотношении 2 : 1. Остальную часть этой фракции упаривали досуха, остаток обрабатывали 2,4-динитрофторбензолом в водно-спиртовом растворе NaHCO<sub>3</sub> по обычной методике [25]. Продукты реакции растворяли в 0,5 мл смеси CHCl<sub>3</sub>—MeOH (9 : 1), насыщенной водой. Раствор наносили на колодку (30×8 мм), заполненную дауэксом 1×4 (НО<sup>-</sup>) в той же системе растворителей. Колодку элюировали 10 мл этой же системы, элюат упаривали, остаток идентифицировали как N-2,4-динитрофениллейцинол при помощи ТСХ в системе изооктан — изопропанол — вода (60 : 15 : 3) [25], R<sub>f</sub> 0,6, а также с помощью ТСХ соответствующего ацетильного производного (двукратное проявление в CHCl<sub>3</sub>, R<sub>f</sub> 0,6) и на основании масс-спектра. При ТСХ в качестве стандартов применяли заведомые образцы N-2,4-динитрофениллейцинола и его O-ацетата.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баграков С. Г., Мужидинова О. А., Бергельсон Л. Д., Коронелли Т. В. Липиды микобактерий. IV. Аналог «корд-фактора» с нормальными C<sub>12</sub>—C<sub>16</sub> жирными кислотами из *Mycobacterium paraffinicum*.— Биоорганич. химия, 1979, т. 5, № 10, с. 1495—1502.
2. Lederer E. Biogenese, Struktur, biologische Wirkung der Lipoide des Tuberkelbazillus.— *Angew. Chem.*, 1964, B. 76, No 6, S. 241—280.
3. Barksdale L., Kwang-Shin Kim. *Mycobacterium*.— *Bacteriol Revs*, 1977, v. 41, No 1, p. 217—372.
4. Asselineau C., Asselineau J. Lipides spécifiques des mycobactéries.— *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1978, v. 129A, No 1, p. 49—69.
5. Vilkas E., Miquel A. M., Lederer E. Sur l'isolement et la structure de la fortuitine, peptidolipide de *Mycobacterium fortuitum*.— *Biochim. et biophys. acta*, 1963, v. 70, No 2, p. 217—218.
6. Lanéelle G., Asselineau J., Wolstenholme W. A., Lederer E. Détermination de séquences d'acides aminés dans les oligopeptides par la spectrométrie de masse. III. Structure d'un peptidolipide de *Mycobacterium johnet*.— *Bull. Soc. chim. France*, 1965, No 17, p. 2133—2134.
7. Lanéelle G., Asselineau J. Isolement de peptidolipides à partir de *Mycobacterium paratuberculosis*.— *Biochim. et biophys. acta*, 1962, v. 59, No 3, p. 731—732.
8. Guinand M., Michel G. Structure d'un peptidolipide isolé de *Nocardia asteroides*, la peptidolipide NA.— *Biochim. et biophys. acta*, 1966, v. 125, No 1, p. 75—91.
9. Lanéelle G., Asselineau J., Chamoiseau G. Présens de mycosides C' (formes simplifiées de mycoside C) dans les bactéries isolées de bovins atteints du farcin.— *FEBS Lett.*, 1971, v. 19, No 2, p. 109—111.
10. Vilkas E., Lederer E. N-Methylation de peptides par la methode de Hakomori. Structure du mycoside C<sub>11</sub>.— *Tetrahedron Lett.*, 1968, No 26, p. 3089—3092.
11. Vilkas E., Gros C., Massot J.-C. Sur la structure chimique d'un mycoside C isolé de *Mycobacterium scrofulaceum*.— *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 1968, v. 266, Ser. C, No 11, p. 837—840.
12. Lanéelle G., Asselineau J. Structure d'un glycoside de peptidolipide isolé d'un mycobactérie.— *Eur. J. Biochem.*, 1968, v. 5, No 4, p. 487—491.
13. Jollés P., Bigler F., Gendre T., Lederer E. Sur la structure chimique du «mycoside C», peptidoglycolipide de *Mycobacterium avium*.— *Bull. Soc. chim. biol.*, 1961, v. 43, No 2, p. 177—192.
14. Voiland A., Bruneteau M., Michel G. Étude du mycoside C<sub>2</sub> de *Mycobacterium avium*.— Détermination de la structure.— *Eur. J. Biochem.*, 1971, v. 21, No 2, p. 285—291.
15. Chaput M., Michel G., Lederer E. Structure du mycoside C<sub>m</sub>, peptido-glycolipide de *Mycobacterium marianum*.— *Biochim. et biophys acta*, 1962, v. 63, No 3, p. 310—326.
16. Красильников Н. А., Коронелли Т. В., Дуда В. И. Поверхностные структуры ми-

- кобактерии *Mycobacterium paraffinicum*.— Микробиология, 1972, т. 41, № 2, с. 313–317.
17. Кейрс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975, с. 128–129.
  18. Gelpi E., Koenig W. A., Gilbert J., Oró J. Combined gas chromatography-mass spectrometry of amino acid derivatives.— J. Chromatogr. Sci., 1969, v. 7, No 3, p. 604–613.
  19. Halpern B., Westley J. W. High sensitivity optical resolution of *D,L*-amino acids by gas chromatography.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1965, v. 19, No 3, p. 361–363.
  20. Halpern B., Westley J. W. High sensitivity optical resolution of poly-functional amino acids by gas liquid chromatography.— Tetrahedron Lett., 1966, No 21, 2283–2286.
  21. Розынов Б. В. Масс-спектрометрия в биоорганической химии (применение в анализе аминокислот, пептидов и белков).— Итоги науки и техники. Органическая химия. М.: ВИНТИ, 1978, т. 2, гл. 3.
  22. McCloskey J. A., McClelland M. J. Mass spectra of *O*-isopropilidene derivatives of unsaturated fatty esters.— J. Amer. Chem. Soc., v. 87, No 20, p. 5090–5093.
  23. Коронелли Т. В. Образование липидов микобактериями при использовании *n*-гексадекана и глюкозы.— Микробиология, 1968, т. 37, № 6, с. 984–987.
  24. Batrakov S. G., Panosyan A. G., Konova I. V., Bergelson L. D. Diol lipids. XXXVI. Identification of a threo-butane-2,3-diol phospholipid from *Actinomyces olivaceus*.— Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 337, No 1, p. 29–40.
  25. Хайс И. М., Мацек К. Хроматография на бумаге. М.: Изд-во иностр. лит., 1962, с. 490, 777–778.

Поступила в редакцию  
15.VII.1980

#### LIPIDS OF MYCOBACTERIA. V. A CYCLOTETRAPEPTIDE ACYLATED WITH A FATTY ACID FROM *MYCOBACTERIUM PARAFFINICUM*

BATRAKOV S. G., MURATOV V. B., ROZYNOV B. V.,  
RESHETOVA O. S., BERGELSON L. D., KORONELLI T. V.

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

A hitherto unknown peptidolipid has been isolated from the cells of paraffin oxidizing bacterium *Mycobacterium paraffinicum*. The isolation of this lipid was achieved by means of two-fold chromatography of the total bacterial cell lipids on silica gel columns. On the basis of the results of mass spectrometry and chemical degradation of the native lipid and its derivatives the peptidolipid has been characterized as *N*-acyl(C<sub>20</sub>–C<sub>26</sub>)-*L*-threonyl-*L*-valyl-*L*-valyl-*L*-leucyl olide.