



УДК 577.07:535.372

## УДОБНЫЙ СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ АНАЛОГОВ ЦЕРАМИД-1-ФОСФАТА

© 2013 г. И. А. Болдырев\*, Р. Э. Браун\*\*, Ю. Г. Молотковский\*.<sup>#</sup>\*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
117997 ГСП-7, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\*Институт им. Хормеля, Университет Миннесоты, MN 55912 Остин, США

Поступила в редакцию 10.04.2013 г. Принята к печати 22.04.2013 г.

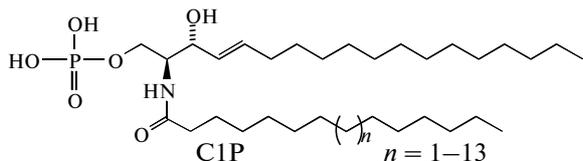
Описан синтез новых флуоресцентно-меченных аналогов церамид-1-фосфата, содержащих антрилвинильный (AV) или 4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ильный (Me<sub>4</sub>-BODIPY) флуорофор в ω-положении жирнокислотного остатка. Ключевая стадия синтеза – гидролиз соответствующих сфингомиелинов с помощью фосфолипазы D из *Streptomyces chromofuscus*; благодаря введению органического растворителя в среду ферментализации выход при этом удалось увеличить до 50–70%.

**Ключевые слова:** флуоресцентные липидные зонды, церамид-1-фосфат, BODIPY, антрилвинил, синтез, фосфолипаза D.

DOI: 10.7868/S0132342313050047

### ВВЕДЕНИЕ

Церамид-1-фосфат (C1P), как показали два десятилетия со времени его открытия в клетках животных [1], представляет собой один из важнейших биоактивных сфинголипидов. Действительно, к настоящему времени известно, что C1P активирует некоторые ферменты (например, фосфолипазу A<sub>2</sub>), блокирует действие других (например, каспаз), регулирует биосинтез эйкозаноидов, участвует в слипании мембран и в ряде других жизненно важных процессов – см. обзоры [2–4].



Продолжающееся активное изучение роли этого сфинголипида в регулировании клеточных функций предполагает необходимость получения различных молекулярных видов C1P (в клетках животных он представлен видами с жирнокислотными остатками от C14 до C26 [4]), а также его раз-

личного типа аналогов – радиоактивно-, флуоресцентно-меченных и т.п. К настоящему времени известно несколько ферментативных методов получения C1P и целый ряд химических синтезов (которые правильнее именовать полусинтезами – исходными соединениями для них служат природные сфингозин или церамиды).

Бьюн и др. [5] осуществили “классический” путь липидной химии – в несколько стадий и по ряду вариантов, с применением ряда защитных групп и специфических реагентов. Шульц и др. разработали упрощенный синтез, используя возможность фосфорилировать первичную НО-группу церамида (или *N*-Вос-сфингозина) в присутствии вторичной [6], однако довольно жесткие условия деблокирования диметилфосфатной группировки по завершении синтеза ставят под вопрос его применимость для получения аналогов C1P с лабильными метками. Нусбоймер и соотр. [7] предложили совсем простой путь получения C1P с различными *N*-ацильными заместителями – путем ацилирования сфингозин-1-фосфата; последний коммерчески доступен, но весьма дорог. Ссылки на другие варианты химического синтеза C1P можно найти в работах [6, 7].

В противоположность органическим синтезам, опробованные к настоящему времени способы ферментативного синтеза C1P сводятся к двум вариантам – фосфорилированию церамида церамидкиназой с АТР, а также гидролитическому расщеплению сфингомиелина (SM) фосфолипа-

Сокращения: AV – 9-антрилвинил; BOP – (бензотриазол-1-илокси)-трис(диметиламино)-фосфоний; C1P – церамид-1-фосфат; Me<sub>4</sub>-BODIPY – 4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил; PLD – фосфолипаза D; DIPEA – диизопропилэтиламин; SM – сфингомиелин.

<sup>#</sup> Автор для связи (тел. и факс: +7 (495) 330-66-01; эл. почта: jgmol@ibch.ru).



жирные кислоты и диэтиловый эфир активируют гидролиз, а SDS, напротив, ингибирует [16, 17]. Особенность PLD из *S. chromofuscus*, отличающая его от других известных PLD, — наличие в молекуле гидрофобного участка, необходимого для связывания липидного субстрата [16].

Наши попытки применить для гидролиза сфингомиелинов (IIa–c) описанную в работах [16, 17] методику в системе, содержащей Triton X-100 и CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0 (такой же состав рекомендует и фирма-поставщик Sigma-Aldrich [http://www.sigmaaldrich.com]), были малопродуктивны: в должном направлении реакция, по данным ТСХ, протекала медленно, накапливались побочные неидентифицированные продукты, выход аналогов С1Р (IIIa–c) не превышал 15% (подробно данные здесь не приводятся).

Существенное улучшение скорости и результатов ферментализации было достигнуто нами заменой в системе детергента на органический растворитель. При этом наилучший эффект был получен при использовании хлористого метилена; выходы аналогов С1Р (IIIa–c) составили 54–71%. Их спектральные характеристики (<sup>1</sup>H-ЯМР, УФ, флуоресцентные) соответствуют таковым других фосфолипидных зондов, несущих AV- или Me<sub>4</sub>-BODIPY-флуорофор (см. экспериментальную часть).

Судить о причинах столь существенного увеличения эффективности ферментного гидролиза меченых сфингомиелинов при замене среды реакции пока что затруднительно. Имамура и Хорюти, описывая усиление диэтиловым эфиром активности PLD, относят этот эффект к влиянию растворителя на конформацию фермента [16]. Однако ЭльКират и др., изучавшие ферментализацию фосфолипазой D из *S. chromofuscus* ряда фосфолипидов, SM в том числе, в монослоях, пришли к выводу о решающем влиянии на гидролитический процесс поверхностного давления на разделе фаз [21]. Хирхе и Ульбрих-Хофман исследовали воздействие органических растворителей на скорость гидролиза фосфатидилхолина при действии PLD из капусты и из *Streptomyces*: худшим активатором оказался изооктан, наилучшим — эфир, разница была в 300 раз [22]. Сравнивая влияние различных растворителей на критическую концентрацию мицеллообразования, величину агрегатов субстрата, содержание воды в органической фазе и межфазное натяжение, авторы соотнесли степень такого воздействия с межфазным натяжением на разделе фаз водная система/растворитель и установили, что активность PLD зависит от плотности упаковки фосфатидилхолиновых агрегатов [22].

Возможно, указанные соображения применимы и к полученным нами данным, но мы также

считаем немаловажным фактором и растворимость субстрата в органическом растворителе. По нашим наблюдениям, хлористый метилен, насыщенный водой, — хороший растворитель для сфингомиелинов, в том числе флуоресцентно-меченных. Установлено, что в системе, содержащей детергент, например Triton X-100, PLD взаимодействует с субстратом, включенным в мицеллы, если же вместо детергента применен органический растворитель, субстрат в нем растворен [18]. В таком случае растворимость последнего — значимый фактор, влияющий на скорость ферментализации, что, возможно, и позволило нам добиться приемлемых выходов конечных соединений (IIIa–c).

В целом, мы полагаем, что модифицированный нами и описанный здесь путь синтеза аналогов С1Р представляет собой еще одну альтернативную возможность получения такого рода зондов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Масс-спектры снимали на ESI-спектрометре Agilent 6224 TOF LC/MS (США), а также на ESI-времетрающем спектрометре MX-5311 (ИАП РАН, СПб, Россия). Электронные спектры веществ регистрировали на спектрофотометре СФ-256УВИ (ЛОМО Фотоника, СПб, Россия) в этаноле; Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР (δ, м.д. относительно Me<sub>4</sub>Si, КССВ, Гц) записаны на спектрометре Bruker AVANCE II (Германия) при 700 МГц в смеси CDCl<sub>3</sub>–CD<sub>3</sub>OD, 3 : 1; спектры флуоресценции (в этаноле) — на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 (Япония), ширина щели на возбуждении и испускании 3 нм.

Использовали DCC, DMSO (Merck, Германия), диизопропилэтиламин (DIPEA) и фосфолипазу D из *S. chromofuscus* (Sigma-Aldrich, США), остальные реактивы производства Реахим (Россия). DIPEA перегоняли над нингидрином, затем над порошкообразным КОН; хлороформ и хлористый метилен — над пятиокисью фосфора. Остальные растворители использовали после обычной очистки. Для колоночной хроматографии применяли силикагель Kieselgel 60 (Merck, Германия), для ТСХ — пластинки с флуоресцентным индикатором — Kieselgel 60 F<sub>254</sub> и без индикатора — Kieselgel 60 (Merck). Обнаружение при ТСХ: фосфорномолибденовой кислотой, нингидрином и УФ-облучением.

15-(4,4-Дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3a, 4a-диаза-s-индацен-8-ил)пентадекановая кислота [23], сфингозин-1-фосфохолин (I) [24], N-[12-(9-антрил)-11E-додеценоил]сфингозин-1-фосфохолин (IIa) [19] и N-[7-(4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3a,4a-диаза-s-индацен-8-ил)гептаноил]-D-эрипто-сфингозин-1-фосфохолин (IIb) [20], были синтезированы, как описано. Упарива-

ние в вакууме проводили при 8–12 мм рт. ст. и температуре <math>40^{\circ}\text{C}</math>.

***N*-[15-(4,4-Дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а, 4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)пентадеcanoил]-*D*-эритро-сфингозин-1-фосфохолин (IIc).** Раствор 16 мг (33 мкмоль) 15-(Me<sub>4</sub>-BODIPY)пентадекановой кислоты и 12 мкл (68 мкмоль) DIPEA в 1 мл сухого CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> прибавляли к раствору 15 мг (31 мкмоль) сфингозин-1-фосфохолина (I) в 0.5 мл сухого DMSO, затем 30 мкл 50% раствора DCC (~70 мкмоль) в хлороформе и перемешивали 12 ч. Из смеси хроматографией в градиентной системе хлороформ против метанола с 5% 7 М NH<sub>4</sub>OH (10 → 25%) выделяли 23 мг (76%) сфингомиелина (IIc) в виде темно-оранжевой смолы, *R*<sub>f</sub> 0.48 в системе хлороформ–метанол–7 М NH<sub>4</sub>OH, 65 : 35 : 8. УФ/видимый, λ<sub>max</sub>, нм (ε, М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>): 495 (7.8 × 10<sup>4</sup>). MS, *m/z*: вычислено для C<sub>51</sub>H<sub>91</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>P [M + H]<sup>+</sup> 935.6737, найдено 935.672. <sup>1</sup>H-ЯМР: 6.06 (2 H, с, ar), 5.68 (1 H, дт, J<sub>1</sub> 14.8, J<sub>2</sub> 7.2, =CHCH<sub>2</sub>), 5.42 (1 H, дт, J<sub>1</sub> 14.8, J<sub>2</sub> 6.6, CH(OH)CH=), 3.59 (2 H м, CH<sub>2</sub>N), 3.20 (9H, с, NMe<sub>3</sub>), 2.95 (2 H, т, J 7.7, arCH<sub>2</sub>), 2.47 и 2.42 (12 H, два с, arCH<sub>3</sub>), 2.15 (2 H, т, J 7.4, CH<sub>2</sub>CO), 1.99 (2 H, м, =CHCH<sub>2</sub>), 1.62 (2 H, м, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.30–1.20 (40 H, уш. м, CH<sub>2</sub>), 0.86 (3H, т, J 7.0, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Флуоресценция: λ<sub>ex</sub> 496 нм (λ<sub>em</sub> 420 нм), λ<sub>em</sub> 504 нм (λ<sub>ex</sub> 480 нм).

**Ферментализ сфингомиелин → церамид-1-фосфат (общая методика).** Фирменный препарат PLD из *S. chromofuscus* (раствор в смеси глицерин/вода, 53435 ед. акт./мл) разбавляли бидистиллатом до концентрации ~500 ед. акт./мл. Исходный сфингомиелин (II) (10–12 мг, 10–15 мкмоль) добавляли к среде, составленной из 2 мл хлористого метилена, 1.5 мл 50 мМ Na-боратного буфера, рН 8.0, содержащего 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1.5 мл бидистиллата и 40 мкл 0.1 М CaCl<sub>2</sub>, смесь обрабатывали 1–2 мин на маломощной ультразвуковой бане. Затем к смеси добавляли 40 мкл раствора PLD (~20 ед. акт.), свободный объем в колбе заполняли аргоном, колбу закрывали и интенсивно перемешивали при 32°C, через каждые 30 мин анализируя ход ферментализа в системе хлороформ–метанол–7 М NH<sub>4</sub>OH, 65 : 35 : 8 (SM: *R*<sub>f</sub> ~0.5; С1Р: *R*<sub>f</sub> ~0.2). Когда содержание исходного SM становилось незначительным (обычно 2–4 ч), добавляли 0.5 мл AcOH, смесь выпаривали в вакууме и высушивали при ~20 Па. Остаток экстрагировали смесью хлороформ–метанол, 2 : 1 (3 × 15 мл), отделяя осадок центрифугированием. Экстракт немедленно фильтровали через кизельгур и выпаривали. Аналог С1Р (III) из остатка выделяли последовательными хроматографией на силикагеле (1 г, колонка 5 × 100 мм) в ступенчатом градиенте хлороформ–метанол–7 М NH<sub>4</sub>OH, 90 : 10 : 0.5 → 70 : 27 : 3, и гель-фильтрацией на сефадексе

LH-20 (колонка 10 × 330 мм) в системе хлороформ–метанол, 1 : 1.

***N*-[12-(9-Антрил)-11*E*-додецеаноил]сфингозин-1-фосфат (IIIa).** Желтоватый воск, *R*<sub>f</sub> 0.25, УФ, λ<sub>max</sub>, нм (ε, М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>): 255 (1.2 × 10<sup>5</sup>), 349 (5900), 367 (7800) и 385 (7000). MS, *m/z*: вычислено для C<sub>44</sub>H<sub>67</sub>NO<sub>6</sub>P [M + H]<sup>+</sup> 736.4706, найдено 736.4712. <sup>1</sup>H-ЯМР: 8.35 (1 H, с, ar H10), 8.27–8.31 (2 H, м, ar), 8.13 (2H, м, ar), 7.96 (2 H, м, ar), 7.41 (2 H, м, ar), 6.92 (1 H, д, J 11.3, arCH=CH), 6.20 (1 H, дд, J<sub>1</sub> 11.3, J<sub>2</sub> 7.3, arCH=CH), 5.65 и 5.41 (2 H, два м, CH=CH), 4.11 (1H, м, CHOH), 3.85 (1 H, м, CHNH), 2.28 (2 H, т, J 7.3, CH<sub>2</sub>CO), 2.25 (2 H, дт, J<sub>1</sub> 7.3, J<sub>2</sub> 6.9, arCH=CHCH<sub>2</sub>), 2.09 (2H, т, J 7.2, CH<sub>2</sub>CO) 1.96 (2 H, м, =CHCH<sub>2</sub>) 1.62 (2 H, м, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 1.33–1.15 (34 H, уш. м, CH<sub>2</sub>), 0.84 (3 H, т, J 6.5, CH<sub>3</sub>). Флуоресценция: λ<sub>ex</sub> 256, 350, 368 и 387 нм (λ<sub>em</sub> 430 нм), λ<sub>em</sub> 420 нм (λ<sub>ex</sub> 370 нм).

***N*-[7-(4,4-Дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)гептааноил]-*D*-эритро-сфингозин-1-фосфат (IIIb).** Красный воск, *R*<sub>f</sub> 0.22. УФ/видимый, λ<sub>max</sub>, нм (ε, М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>): 495 (7.8 × 10<sup>4</sup>). MS, *m/z*: вычислено для C<sub>38</sub>H<sub>63</sub>BFN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>P [M – F]<sup>+</sup> 718.4532, найдено 718.4525. <sup>1</sup>H-ЯМР: 6.04 (2 H, с, ar), 5.68 (1 H, дт, J<sub>1</sub> 13.5, J<sub>2</sub> 6.5 =CHCH<sub>2</sub>), 5.42 (1 H, дд, J<sub>1</sub> 13.5, J<sub>2</sub> 6.2, CH(OH)CH=), 2.93 (2 H, т, J 7.8, arCH<sub>2</sub>), 2.46 и 2.39 (12 H, два с, arCH<sub>3</sub>), 2.15 (2 H, т, J 7.3, CH<sub>2</sub>CO) 1.97 (2 H, м, =CHCH<sub>2</sub>), 1.60 (2 H, м, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.28–1.17 (24 H, уш. м, CH<sub>2</sub>), 0.85 (3 H, т, J 7.1, CH<sub>3</sub>). Флуоресценция: λ<sub>ex</sub> 496 нм (λ<sub>em</sub> 420 нм), λ<sub>em</sub> 503 нм (λ<sub>ex</sub> 480 нм).

***N*-[15-(4,4-Дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил)пентадеcanoил]-*D*-эритро-сфингозин-1-фосфат (IIIc).** Красный воск, *R*<sub>f</sub> 0.24. УФ/видимый, λ<sub>max</sub>, нм (ε, М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>): 495 (7.7 × 10<sup>4</sup>). MS, *m/z*: вычислено для C<sub>46</sub>H<sub>79</sub>BFN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>P [M – F]<sup>+</sup> 830.5784, найдено 830.5804. <sup>1</sup>H-ЯМР: 6.01 (2 H, с, ar), 5.67 (1 H, дт, J<sub>1</sub> 13.9, J<sub>2</sub> 6.6 =CHCH<sub>2</sub>), 5.43 (1 H, дд, J<sub>1</sub> 13.9, J<sub>2</sub> 6.6, CH(OH)CH=), 2.89 (2 H, м, arCH<sub>2</sub>), 2.45 и 2.36 (12 H, два с, arCH<sub>3</sub>), 2.13 (2 H, т, J 7.4, CH<sub>2</sub>CO), 1.98 (2 H, м, =CHCH<sub>2</sub>), 1.58 (2 H, м, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.30–1.19 (40 H, уш. м, CH<sub>2</sub>), 0.85 (3 H, т, J 7.3, CH<sub>3</sub>). Флуоресценция: λ<sub>ex</sub> 496 нм (λ<sub>em</sub> 420 нм), λ<sub>em</sub> 505 нм (λ<sub>ex</sub> 480 нм).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность К.В. Антонову и И.Д. Константиновой (ИБХ РАН) за съемку масс-спектров. Работа поддержана грантом 12-04-00168 Российского фонда фундаментальных исследований, а также Фондом USPHS NIH-GM45928 и Хормелевским фондом (США).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bajjalieh S.M., Martin T.F.J., Floor E.* // *J. Biol. Chem.* V. 1989. 264. P. 14 354–14 360.
2. *Gómez-Muñoz A.* // *FEBS Letters.* 2004. V. 562. P. 5–10.
3. *Fyrst H., Saba J.D.* // *Nat. Chem. Biol.* 2010. V. 6. P. 489–497.
4. *Bornancin F.* // *Cell. Signal.* 2011. V. 23. P. 999–1008.
5. *Byun H.-S., Erukulla R.K., Bittman R.* // *J. Org. Chem.* 1994. V. 59. P. 6495–6498.
6. *Szulec Z.M., Hannun Y.A., Bielawska A.* // *Tetrahedron Lett.* 2000. V. 41. P. 7821–7824.
7. *Nussbaumer P., Hornillos V., Ghobrial M., Ullrich T.* // *Chem. Phys. Lipids.* 2008. V. 151. P. 125–128.
8. *Schneider E.G., Kennedy E.P.* // *J. Biol. Chem.* 1973. V. 248. P. 3739–3741.
9. *Preiss J., Loomis C.R., Bishop W.R., Stein R., Niedel J.E., Bell R.M.* // *J. Biol. Chem.* V. 261. P. 8597–8600.
10. *Don A.S., Rosen H.* // *Anal. Biochem.* 2008. V. 375. P. 265–271.
11. *Gómez-Muñoz A., Frago L.M., Alvarez, L., Varela-Nieto I.* // *Biochem. J.* 1997. V. 325. P. 435–440.
12. *Tauzin L., Graf C., Sun, M., Rovina P., Bouveyron N., Jaritz M., Winiski A., Hartmann N., Staedtler F., Billich A., Baumruker T., Zhang M., Bornancin F.* // *J. Lipid Res.* 2007. V. 48. P. 66–76.
13. *Heller M.* // *Adv. Lipid Res.* 1978. V. 16. P. 267–326.
14. *Davidson F.M., Long C.* // *Biochem. J.* 1958. V. 69. P. 458–466.
15. *Selvy P.E., Lavieri R.R., Lindsley C.W., Brown H.A.* // *Chem. Rev.* 2011. V. 111. P. 6064–6119.
16. *Imamura S., Horiuti Y.* // *J. Biochem.* 1979. V. 85. P. 79–95.
17. *Estrada R., Stelowich N., Yappert M.C.* // *Anal. Biochem.* 2008. V. 380. P. 41–50.
18. *Uesugi Y., Hatanaka T.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1791. P. 962–969.
19. *Molotkovsky J.G., Manevich Y.M., Babak V.I., Bergelson L.D.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V. 778. P. 281–288.
20. *Boldyrev I.A., Molotkovsky J.G.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2006. V. 32. P. 78–83.
21. *El Kirat K., Prigent A.F., Chauvet J.P., Roux B., Besson F.* // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. P. 4523–4530.
22. *Hirche F., Ulbrich-Hofmann R.* // *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1999. 1436. P. 383–389.
23. *Sachl R., Boldyrev I., Johansson L.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010. V. 12. P. 6027–6034.
24. *Bittman R., Verbicky C.A.* // *J. Lipid Res.* 2000. V. 41. P. 2089–2093.

## An Expedient Synthesis of Fluorescent Labeled Ceramide-1-phosphate analogues

I. A. Boldyrev<sup>a</sup>, R. E. Brown<sup>b</sup>, and J. G. Molotkovsky<sup>a, #</sup><sup>#</sup> Phone, fax: 7 (495) 330-66-01; e-mail: jgmol@ibch.ru<sup>a</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia<sup>b</sup> Hormel Institute, University of Minnesota, MN 55912 Austin, USA

A synthesis for fluorescent analogs of ceramide-1-phosphate bearing 9-anthrylvinyl or 4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indacene-8-yl (Me<sub>4</sub>-BODIPY) fluorophore at ω-position of fatty acid residue was carried out. The key stage of the synthesis is hydrolysis of corresponding sphingomyelins catalyzed by phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus*; the enzymatic yield has been raised to 50–70% by appliance of organic solvent in the incubation medium.

*Keywords:* fluorescent lipid probes, ceramide-1-phosphate, BODIPY, anthrylvinyl, synthesis, phospholipase D