



УДК 547.953'11*2.057

© 1993 г. М. В. Чудинов, М. В. Аникин, А. В. Аникин,
Н. А. Брагина, В. В. Чупин, Г. А. Серебренникова

СИНТЕЗ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ, СЕЛЕКТИВНО МЕЧЕННЫХ ДЕЙТЕРИЕМ

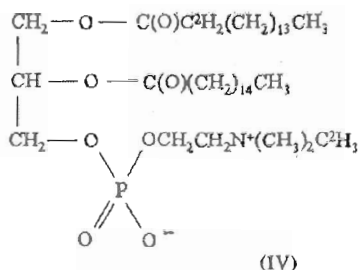
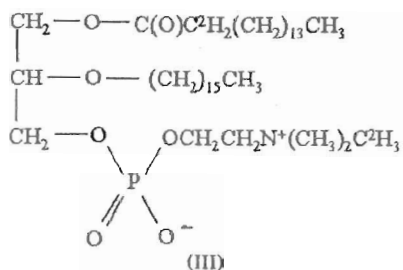
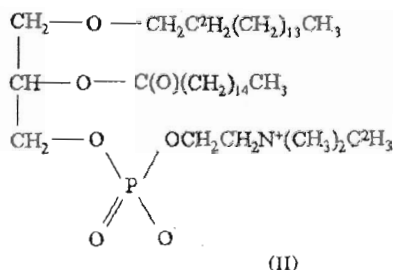
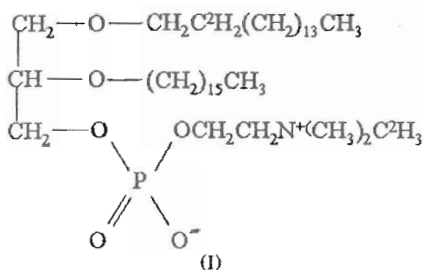
Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Разработаны методы региоселективного введения дейтериевой метки в молекулу фосфолипидов. Синтезирован ряд новых фосфатидилхолинов с простой и сложной эфирной связью — *rac*-1-(2-²H₂)гексадецил-2-гексадецилглицеро-3-фосфо(γ-²H₃)холин, *rac*-1-(2-²H₂)гексадецил-2-пальмитоилглицеро-3-фосфо(γ-²H₃)холин, *rac*-1-(2-²H₂)пальмитоил-2-гексадецилглицеро-3-фосфо(γ-²H₃)холин и *rac*-1-(2-²H₂)пальмитоил-2-пальмитоилглицеро-3-фосфо(γ-²H₃)холин, — содержащих дейтериевые метки в гидрофильной и гидрофобной частях молекулы.

Исследования структурной организации и принципов функционирования биологических мембран — актуальная задача современной молекулярной биологии. Для изучения структуры и динамики мембран в последнее время широко используются методы дифракции нейтронов [1] и ²H-ЯМР-спектроскопии [2]. При использовании этих методов необходимо наличие в мембране дейтеромеченных компонентов.

В данной работе нами представлены результаты по синтезу дейтеромеченных фосфатидилхолинов с простой и сложной эфирной связью. Известно, что липиды с простой эфирной связью («ether lipids», липиды алкильного типа) обладают иммуномодулирующей [3] и противоопухолевой [4] активностью, являются биогенетическими предшественниками таких высокоактивных медиаторов, как эйкозаноиды [5] и фактор активации тромбоцитов [6]. Возможно, что механизм реализации биологических функций липидами с простой эфирной связью обусловлен их влиянием на структуру и динамику мембран. Наиболее существенные различия в структурной организации мембран для липидов с простой и сложной эфирной связью были обнаружены у насыщенных фосфатидилхолинов. Фосфатидилхолины диалкильного [7, 8] и алкилацильного [9] типов при температурах ниже фазового перехода образуют бислои с взаимным проникновением цепей. Полагают, что особенности в структурообразовании липидов с простой эфирной связью обусловлены отсутствием карбонильных групп в составе липидных молекул.

Для изучения структуры мембран из фосфатидилхолинов с простой и сложной эфирной связью методами дифракции нейтронов и ²H-ЯМР-спектроскопии нами разработаны методы синтеза и получены все четыре возможных типа фосфатидилхолинов, у которых гидрофобные заместители в 1-м и 2-м положениях глицерина присоединены за счет сложноэфирной или простой эфирной связи:



Фосфатидилхолины (I)–(IV) содержат дейтериевые метки в структурно эквивалентных положениях как в гидрофильной, так и в гидрофобной частях молекулы, что позволяет использовать их для сравнительного изучения структуры и динамики мембран.

Для синтеза фосфатидилхолинов был выбран удобный в препаративном отношении метод [10], основанный на фосфорилировании диглицеридов хлороксидом фосфора и взаимодействии образующегося дихлорфосфата с растворимым в хлороформе *n*-толуолсульфонатом холина. Для реализации этой схемы были получены дейтеромеченые диглицериды и *n*-толуолсульфонат холина.

1. Получение дейтеромеченых синтонов

а. *n*-Толуолсульфонат (γ - $^2\text{H}_3$)холина

Построение дейтеромеченого *n*-толуолсульфоната холина осуществлялось по двум способам (схема 1а), исходя из коммерчески доступных иодистого ($^2\text{H}_3$)метила (способ А) и ($^2\text{H}_3$)метанола (способ Б).

Алкилирование *N,N*-диметиламиноэтанола (V) иодистым ($^2\text{H}_3$)метилом приводит к образованию иодида ($^2\text{H}_3$)холина (VI). Иодид (γ - $^2\text{H}_3$)холина переводили в ацетат (VII) действием диацетата свинца и далее в *n*-толуолсульфонат (VIII) реакцией с *n*-толуолсульфокислотой в ацетоне. Из-за невозможности прямого обмена иодид-иона на тозилат приходится получать промежуточное соединение (VII), что делает этот метод не совсем удобным в препаративном отношении.

По способу Б, ранее описанному в литературе для получения недеитерированного тозилата холина [11], взаимодействие ($^2\text{H}_3$)метанола с *n*-толуолсульфохлоридом дает ($^2\text{H}_3$)метилловый эфир *n*-толуолсульфокислоты (IX). Алкилируя им *N,N*-диметиламиноэтанол, получали тозилат (γ - $^2\text{H}_3$)холина (VIII).

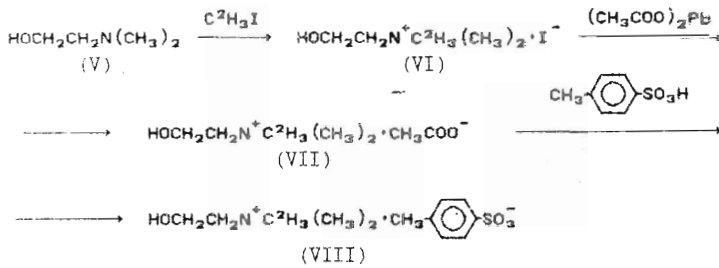
б. $^2\text{H}_2$ -Меченые гидрофобные заместители

Построение $^2\text{H}_2$ -меченых гидрофобных синтонов осуществляли исходя из ($^2\text{H}_2$)пальмитиновой кислоты (XII), полученной по схеме 1б двумя способами: в результате малонового синтеза [12] (способ А) или реакцией изотопного обмена из метилового эфира пальмитиновой кислоты и (^2H)метилового спирта (способ Б).

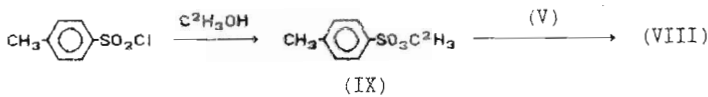
Получение дейтеромеченых синтонов

а) Синтез *n*-толуолсульфоната (γ - $^2\text{H}_3$)холина

Способ А

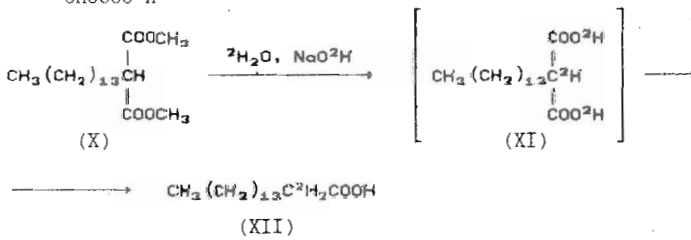


Способ Б

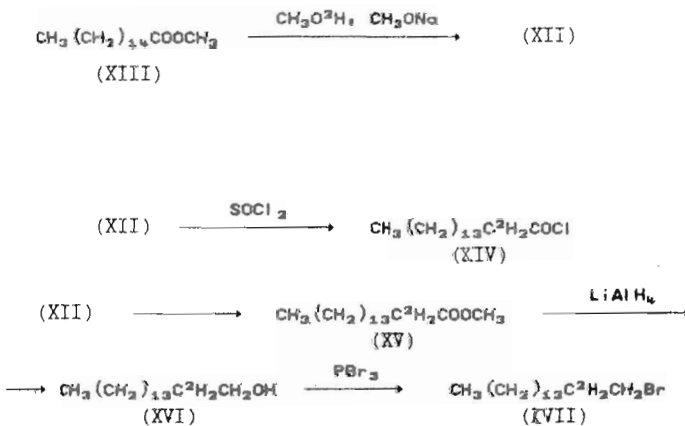


б) Синтез $^2\text{H}_2$ -меченых гидрофобных реагентов

Способ А



Способ Б



Способ Б удобнее в препаративном отношении и позволяет использовать в качестве исходного продукта пальмитиновую кислоту. Прямой изотопный обмен α -метиленовых протонов пальмитиновой кислоты протекает в довольно жестких условиях ($\text{NaO}^2\text{H}/^2\text{H}_2\text{O}$, 200°C) [13]. Кислотность протонов α -метиленового сегмента, находящегося при сложноэфирной группе, выше, поэтому для проведения дейтериевого обмена по способу Б пальмитиновую кислоту переводили в метиловый эфир (XIII).

Кипячение метилпальмитата (XIII) в (^2H)метаноле в течение нескольких часов в присутствии 10% метилата натрия дает ($2\text{-}^2\text{H}_2$)пальмитиновую кислоту с изотопной чистотой, определяемой равновесными условиями, т. е. соотношением (^2H)метанола и метилпальмитата (XIII) в реакционной смеси. Для оптимального использования (^2H)метанола процедуру обмена осуществляли в две стадии, контролируя ход реакции по исчезновению в спектрах ^1H -ЯМР триплета α -метиленовых протонов (δ 2 м.д.). При обработке реакционной массы происходит омыление ($2\text{-}^2\text{H}_2$)метилпальмитата в соответствующую кислоту (XII).

Для введения в липидные молекулы дейтерированных ацильных остатков кислоту (XII) переводили действием хлористого тионила в хлорангидрид (XIV).

Восстановлением метилового эфира ($2\text{-}^2\text{H}_2$)пальмитиновой кислоты (XV) алюмогидридом лития был получен ($2\text{-}^2\text{H}_2$)гексадециловый спирт (XVI). Для введения в молекулы фосфолипидов дейтеромеченых алкильных заместителей использовали ($2\text{-}^2\text{H}_2$)гексадецилбромид (XVII). Для получения этого агента соединение (XVI) подвергали действию трехбромистого фосфора.

2. Получение 1,2-дизамещенных глицеринов

Синтез 1,2-дизамещенных глицеринов осуществляли исходя из изопропилиденглицерина (XVIII) в случае соединений (XXII) и (XXVa, б) или из 1,3-бензилиденглицерина (XXVI) для соединения (XXVIII), содержащего алкильный заместитель во 2-м положении глицеринового фрагмента (схема 2).

Алкилирование (ацилирование) изопропилиденглицерина (XVIII) соединениями (XIV) или (XVII) с последующим удалением защитной группировки приводит к 1-монозамещенным глицеринам (XIXa, б).

Использование на следующем этапе синтеза различных защитных группировок — дифенилметилсилильной для диацильного и алкилацильного диэфиров или трифенилметильной (тритильной) для диалкильного производного — связано с возможностью ацильной миграции при удалении тритильной защитной группы. В то же время высокая лабильность дифенилметилсилиловых эфиров не позволяет использовать эту защитную группу в условиях реакции алкилирования.

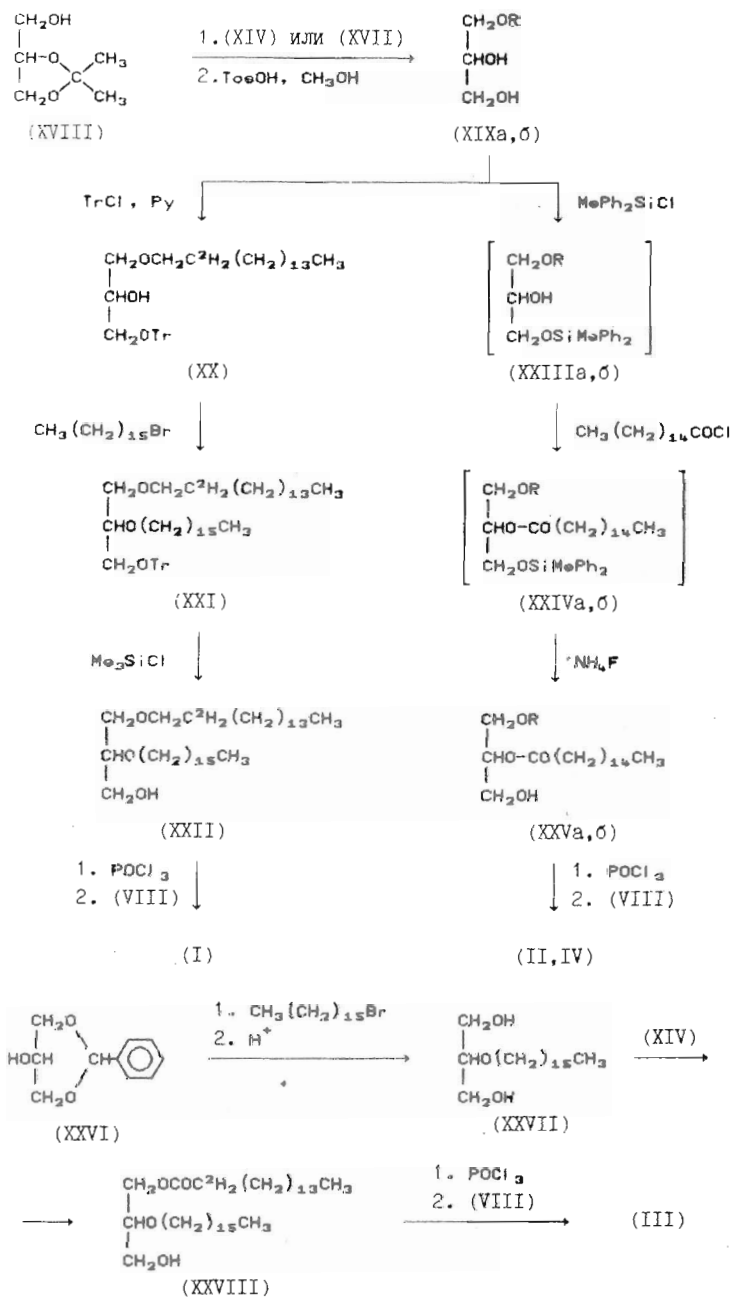
После введения дифенилметилсилильной защиты производные (XXIIIa, б) без выделения ацилировали избытком хлорангидрида пальмитиновой кислоты, затем защитную группировку удаляли в присутствии фторида аммония. Первичную гидроксильную группу 1-($2\text{-}^2\text{H}_2$)гексадецилглицерина (XIXa) блокировали тритильной защитой и после алкилирования соединения (XX) гексадецилбромидов и удаления защитной группы получали диэфир (XXII).

Для получения ацилалкильного производного (XXVIII) 1,3-бензилиденглицерин (XXVI) алкилировали гексадецилбромидом и удаляли защитную группу в кислой среде. 2-Гексадецилглицерин (XXVII) ацилировали в условиях недостатка хлорангидрида ($2\text{-}^2\text{H}_2$)пальмитиновой кислоты (XIV), что приводило к замещению только одного из свободных положений глицеринового фрагмента.

3. Синтез $^2\text{H}_5$ -меченых фосфатидилхолинов

Получение фосфатидилхолинов с дейтериевыми метками в гидрофильных и гидрофобных частях молекулы проводили по методу [10], обрабатывая 1,2-дизамещенные глицерины (XXII), (XXVa, б) и (XXVIII) хлорксидом фосфора и

Синтез 2H_5 -фосфатидилхолинов



- a) R = -CH₂C²H₂(CH₂)₁₃CH₃
 б) R = -C(O)C²H₂(CH₂)₁₃CH₃

n-толуолсульфонатом (γ - $^2\text{H}_3$)холина без выделения промежуточных продуктов (схема 2). После экстракции и хроматографической очистки липиды кристаллизовали из ацетона.

Экспериментальная часть

В работе использовали пальмитиновую кислоту, *n*-толуолсульфохлорид, *n*-толуолсульфокислоту, дифенилметилхлорсилан, триметилхлорсилан, *N,N*-диметиламиноэтанол, хлороксид фосфора отечественного производства. Также применяли трифенилхлорметан (Fluka, Швейцария).

Тяжелая вода, ($^2\text{H}_1$)метанол, ($^2\text{H}_3$)метанол и ($^2\text{H}_3$)метилюид были поставлены ВО «Изотоп» (Россия).

rac-1,2-Изопропилиденглицерин [14], *rac*-1,3-бензилиденглицерин [15], диметиловый эфир тетрадецилмалоновой кислоты [12] синтезировали по известным методикам. Пальмитоилхлорид получали действием хлористого тионила на пальмитиновую кислоту, гексадецилбромид — в результате взаимодействия гексадеканола с бромистым водородом [16], метиловый эфир (2 - $^2\text{H}_2$)пальмитиновой кислоты (XV) — этерификацией (2 - $^2\text{H}_2$)пальмитиновой кислоты (XII) метанолом в кислой среде, хлорангидрид (2 - $^2\text{H}_2$)пальмитиновой кислоты (XIV) — аналогично пальмитоилхлориду.

ИК-спектры записывали на спектрофотометре Shimadzu IR-435 (Япония), спектры ЯМР получали на импульсном фурье-спектрометре Bruker MSL-200 (ФРГ). Рабочая частота для ^1H 200 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях, константы спин-спинового взаимодействия — в герцах.

Тонкослойную хроматографию осуществляли на пластинках Silufol UV-254 (Kavaliar). Хроматографическую очистку соединений проводили на колонках с силикагелем L 40/100 (Chemapol). Соотношения растворителей объемные.

1. Получение дейтерированных синтонов

а. *n*-Толуолсульфонат (γ - $^2\text{H}_3$)холина (VIII)

Способ А

Иодид (γ - $^2\text{H}_3$)холина (VI). К раствору 2,35 мл (2,08 г, 23,4 ммоль) *N,N*-диметиламиноэтанола (V) в 15 мл этанола при перемешивании при комнатной температуре по каплям добавляли 1,48 мл (3,4 г, 23,4 ммоль) ($^2\text{H}_3$)метилюида в 15 мл этанола, перемешивали 2 ч при комнатной температуре, затем охлаждали до 0° С. Выпавший осадок отфильтровывали, сушили при комнатной температуре (130 Па, 1 ч). Выход 5,1 г (93%). ИК-спектр (пленка с вазелиновым маслом), ν (см^{-1}): 3300 (O—H), 3022, 3000 (C—H *N*-метильных групп), 2245, 2069 (C— ^2H), 1480, 1403 (C—H *N*-метильных групп). ^1H -ЯМР-спектр ($^2\text{H}_2\text{O}$, δ): 2,98 (6H, с, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3,30 (2H, м, CH_2N), 3,83 (2H, м, CH_2OH).

Ацетат (γ - $^2\text{H}_3$)холина (VII). К раствору 4 г (17,2 ммоль) иодида (γ - $^2\text{H}_3$)холина (VI) в 25 мл воды при перемешивании добавляли раствор 3,3 г (8,6 ммоль) диацетата свинца в 25 мл воды, перемешивали 15 мин при комнатной температуре. Образовавшийся осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме. Остаток сушили при комнатной температуре (130 Па, 5 ч). Выход 2,78 г (97%).

n-Толуолсульфонат (γ - $^2\text{H}_3$)холина (VIII). К раствору 2,78 г (16,7 ммоль) ацетата (γ - $^2\text{H}_3$)холина (VII) в 20 мл ацетона добавляли 3,5 г (16,7 ммоль) *n*-толуолсульфокислоты, массу перемешивали при комнатной температуре 1 ч. Образовавшийся осадок отфильтровывали, высушивали в вакууме (130 Па, 50° С, 3 ч). Выход 2,4 г (52%). ИК-спектр (пленка с вазелиновым маслом), ν (см^{-1}): 3306 (O—H), 3076, 3030 (C—H *N*-метильных групп), 2245, 2069 (C— ^2H), 1595 (C=C), 1200—1180 (S=O), 1035, 1010 (C—H ароматич.). ^1H -ЯМР-спектр ($^2\text{H}_2\text{O}$, δ): 2,14 (3H, с, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 2,94 (6H, с, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3,24 (2H, м, CH_2N), 3,74 (2H, м, CH_2OH), 7,08 (2H, м) и 7,39 (2H, м) (ароматич. протоны).

Способ Б

($^2\text{H}_3$)Метиловый эфир *n*-толуолсульфокислоты (IX). К раствору 1,42 мл (1,26 г, 39,4 ммоль) ($^2\text{H}_3$)метанола и 6,65 г (39,5 ммоль) *n*-толуолсульфохлорида в 20 мл диоксана при интенсивном перемешивании и охлаждении (10—15° С) по каплям добавляли раствор 3 г (53,6 ммоль) едкого кали в 4 мл воды, перемешивали 8 ч при комнатной температуре. После разделения эмульсии на фазы верхний слой отделяли, высушивали над безводным сульфатом натрия, упаривали в вакууме. Остаток перегоняли. Выход 3,69 г (57%). Т. кип. 122—125° С (130 Па), т. пл. 27—28° С (для недегидрированного аналога [17]: т. кип. 144—145° С (0,7 кПа), т. пл. 28° С. ИК-спектр (пленка с вазелиновым маслом), ν (см $^{-1}$): 3045 (=C—H), 2920, 2912, 2860 (C—H в CH $_3$), 2247, 2080 (C— ^2H), 1592, 1487 (C=C), 1356, 1187, 1175 (S=O), 1076 (C— ^2H), 811 (=C—H), 735, 653, 549. ^1H -ЯМР-спектр (C $^2\text{HCl}_3$, δ): 2,44 (3H, с, CH $_3$), 7,35 (2H, м) и 7,79 (2H, м) (ароматич. протоны).

n-Толуолсульфонат (γ - $^2\text{H}_3$)холина (VIII). Раствор 1,97 мл (1,74 г, 19,5 ммоль) *N,N*-диметиламиноэтанола (V) и 3,69 г (19,5 ммоль) ($^2\text{H}_3$)метилового эфира *n*-толуолсульфокислоты (IX) в 10 мл безводного ацетонитрила кипятили 1 ч. Затем растворитель удаляли в вакууме, остаток высушивали (130 Па, 50° С, 4 ч). Выход 5,33 г (98%). ИК- и ^1H -ЯМР-спектры были идентичны спектрам препарата, полученного методом А.

б. $^2\text{H}_2$ -Меченые гидрофобные заместители

Способ А

(2 - $^2\text{H}_2$)Пальмитиновая кислота (XII). 280 мг (12,2 ммоль) металлического натрия растворяли в 5 мл $^2\text{H}_2\text{O}$, раствор добавляли к смеси 2 г (6,1 ммоль) диметилового эфира тетрадецилмалоновой кислоты (X) и 20 мл $^2\text{H}_2\text{O}$, кипятили без доступа влаги 5 сут. Затем добавляли при комнатной температуре 1,23 мл (1,33 г, 13 ммоль) уксусного ангидрида, свободного от воды и уксусной кислоты, перемешивали 20 ч при 50—60° С и охлаждали до 10° С. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 5 мл $^2\text{H}_2\text{O}$ и выдерживали 1 ч при 150—160° С в вакууме (2—2,5 кПа). После этого вещество растворяли в 5 мл гексана и хроматографировали на колонке с силикагелем. Целевое вещество элюировали смесью гексан — хлороформ, 3:1. Выход 1,39 г (88%). ^1H -ЯМР-спектр (C $^2\text{HCl}_3$, δ): 0,88 (3H, т, J 6,5, CH $_2$ CH $_3$), 1,26 (24H, уш. с, (CH $_2$) $_{12}$ CH $_3$), 1,62 (2H, уш. т, J 6,0, C $^2\text{H}_2$ CH $_2$), 2,31 (0,16 H, м, остаточные протоны НОС(О)C ^2H Н).

Способ Б

(2 - $^2\text{H}_2$)Пальмитиновая кислота (XII). 0,51 г (22,2 ммоль) металлического натрия растворяли в 10 мл CH $_3\text{O}^2\text{H}$. В полученный раствор при перемешивании добавляли 1,22 г (4,5 ммоль) метилового эфира пальмитиновой кислоты (XIII) и кипятили 5 ч. Реакционную массу охлаждали и разбавляли 10% HCl до pH 3, экстрагировали хлороформом (2×30 мл), экстракт выпаривали в вакууме. Остаток растворяли в 20 мл метанола, добавляли 0,5 мл хлористого тионила, перемешивали 1 ч, добавляли 2 г безводного Na $_2$ CO $_3$, перемешивали и отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме. Описанную процедуру изотопного обмена повторяли еще раз, перед экстракцией к реакционной массе добавляли 10 мл $^2\text{H}_2\text{O}$. (2 - $^2\text{H}_2$)Пальмитиновую кислоту кристаллизовали из гексана. Выход 1,08 г (90%). По данным спектра ^1H -ЯМР, степень изотопного замещения превышает 90%.

(2 - $^2\text{H}_2$)Гексадециловый спирт (XVI). В 100 мл безводного эфира растворяли 0,22 г (5,8 ммоль) алюмогидрида лития и, охладив до 0° С, при перемешивании по каплям добавляли раствор 2,74 г (10 ммоль) (2 - $^2\text{H}_2$)метилпальмитата (XV) в 30 мл безводного эфира. Раствор перемешивали при охлаждении 1 ч, затем нагревали и перемешивали еще 1 ч при слабом кипении. По каплям добавляли 10 мл этилацетата, затем 5 мл ледяной воды. Реакционную массу перемешивали

еще 0,5 ч, добавляли 10%-ную HCl до растворения осадка, экстрагировали гексаном (2×100 мл). Органическую фазу упаривали в вакууме, остаток растворяли в 5 мл гексана и хроматографировали на колонке с силикагелем. Выход 2,02 г (82%). Величины R_f и т. пл. аналогичны соответствующим характеристикам гексадецилового спирта.

(2-²H₂)Гексадецилбромид (XVII). 2 г (8,1 ммоль) (2-²H₂)гексадецилового спирта (XVI) растворяли в 50 мл безводного эфира. Раствор охлаждали до 0° С и по каплям в течение 0,5 ч добавляли при перемешивании раствор 1,1 г (4 ммоль) свежеперегнанного PBr₃ в 20 мл безводного эфира. После завершения бурной реакции массу кипятили 15 ч. При охлаждении осторожно добавляли 10%-ный водный раствор карбоната натрия до pH 7. Смесь экстрагировали эфиром (2×100 мл), объединенную органическую фазу высушивали над безводным Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Хроматографией остатка на колонке в гексане выделяли 1,62 г (65%) бромид (XVII). Величины R_f и т. пл. соединения равны соответствующим характеристикам гексадецилбромида.

2. Получение дейтерированных фосфатидилхолинов

rac-1-(2-²H₂)Гексадецилглицерин (XIXa). Смесь 0,96 г (1 мл, 7,2 ммоль) *rac-2,3-изопропилиденглицерина* (XVIII), 2 г (36 ммоль) порошка едкого кали и 50 мл толуола кипятили 6 ч при интенсивном перемешивании с насадкой Дина-Старка. Добавляли 1,77 г (5,8 ммоль) (2-²H₂)гексадецилбромида (XVII) и продолжали кипячение при перемешивании еще 4 ч. Реакционную массу охлаждали, упаривали в вакууме. К остатку добавляли 100 мл эфира и 50 мл воды, эфирный слой отделяли и промывали водой (2×50 мл). Водный слой экстрагировали эфиром (2×50). Соединенный эфирный экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 30 мл метанола, добавляли 50 мг *n*-толуолсульфокислоты и перемешивали 30 мин при 40–50° С. Растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в 20 мл хлороформа, фильтровали через слой окиси алюминия, затем хроматографировали на силикагеле, элюируя системой хлороформ — эфир, 1 : 1. Выход 1,47 г (80%), т. пл. 63–64° С. R_f 0,37 (хлороформ — эфир, 1 : 4). ИК-спектр (пленка с вазелиновым маслом), ν (см⁻¹): 3340 (O—H), 1325, 1251, 1239 (O—H), 1120 (C—O—C), 1060 (C—OH и C—O—C), 934, 717 ((CH₂)_x).

rac-1-(2-²H₂)Пальмитоилглицерин (XIXб). К раствору 2,4 г (2,5 мл, 18 ммоль) *rac-2,3-изопропилиденглицерина* (XVIII) и 5 мл пиридина в 50 мл безводного CCl₄ добавляли 5,49 г (18 ммоль) (2-²H₂)пальмитоилхлорида (XIV), перемешивали 2 ч при комнатной температуре, фильтровали, фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 30 мл метанола и перемешивали с 50 мг *n*-толуолсульфокислоты 30 мин при 40–50° С. Смесь упаривали в вакууме, остаток в 20 мл хлороформа фильтровали через окись алюминия, раствор упаривали. Остаток кристаллизовали из эфира, затем из гексана, высушивали в вакууме (130 Па, 20° С, 2 ч). Выход 4,05 г (75%). Т. пл. 76–77° С. R_f 0,34 (хлороформ — эфир, 1 : 4). ИК-спектр (пленка с вазелиновым маслом), ν (см⁻¹): 3300–3220 (O—H), 1736, 1728 (C=O), 1180, 1103, 1060, 1045 (C—OH и C—O—C), 719 ((CH₂)_x).

rac-1-(2-²H₂)Гексадецил-3-тримилглицерин (XX). Раствор 3,0 г (9,5 ммоль) эфира (XIXa) в 50 мл абс. хлороформа с 5 мл безводного пиридина охлаждали до 5° С, при перемешивании добавляли 2,9 г (10,5 ммоль) трифенилхлорметана. Смесь перемешивали 4 ч при 5° С, разбавляли 50 мл хлороформа, промывали водой (2×100 мл), высушивали Na₂SO₄, упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя системой толуол — эфир (9 : 1). Выход 4,55 г (86%). R_f 0,72 (хлороформ — эфир, 1 : 4). ИК-спектр (пленка с

вазелиновым маслом), ν (см^{-1}): 3340 (O—H), 3060, 3020 (ароматич. C—H), 1591, 1485 (C=C), 1374, 1089 (C—O—C), 773, 763, 743, 717 ($(\text{CH}_2)_x$), 696 (ароматич. C—H).

гас-1-(2-²H₂)Гексадецил-2-гексадецил-3-тримилглицерин (XXI). Смесь 3 г (5,37 ммоль) диэфира (XX), 1,5 г (27 ммоль) порошка КОН и 50 мл бензола кипятили 2,5 ч, отгоняя воду. Затем добавляли 2,46 г (8,07 ммоль) гексадецилбромид и кипятили 12 ч. Смесь фильтровали, добавляли 100 мл бензола, промывали водой (2×150 мл), высушивали Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке, элюируя системой гексан — эфир (19 : 1). Выход 3,2 г (76%). R_f 0,65 (хлороформ). ИК-спектр (пленка с вазелиновым маслом), ν (см^{-1}): 3060, 3020 (ароматич. C—H), 1591, 1485 (C=C), 1374, 1089 (C—O—C), 773, 763, 743, 717 ($(\text{CH}_2)_x$), 696 (ароматич. C—H).

гас-1-(2-²H₂)Гексадецил-2-гексадецилглицерин (XXII). К раствору 3 г (3,83 ммоль) триэфира (XXI) в 50 мл абс. хлороформа добавляли 12 г активированного (120° С, 4 ч) силикагеля, охлаждали до 0° С, добавляли по каплям охлажденный до -10° С раствор 5 мл триметилхлорсилана в 25 мл безводного хлороформа, перемешивали 40 мин при 0° С. Затем смесь фильтровали в раствор 100 мл пиридина в 200 мл воды, силикагель на фильтре промывали 100 мл хлороформа. Органический слой отделяли, промывали водой (3×50 мл); общий водный слой экстрагировали 100 мл хлороформа. Экстракт упаривали в вакууме, остаток хроматографировали на силикагеле, элюируя диэфир (XXII) системой толуол — эфир (9 : 1). Выход 1,97 г (94%). Т. пл. 58—59° С. R_f 0,47 (гексан — эфир, 1 : 1). ИК-спектр (пленка с вазелиновым маслом), ν (см^{-1}): 3436 (O—H), 1226 (O—H), 1120, 1110, 1078 (C—O—C и C—OH), 717 ($(\text{CH}_2)_x$). ¹H-ЯМР-спектр (C²HCl₃, δ): 0,85 (6H, т, J 7, 2CH₂CH₃), 1,25 (52H, уш. с, 2(CH₂)₁₃CH₃), 1,54 (2H, м, ОСН₂CH₂), 3,30—3,75 (9H, м, протоны глицеринового фрагмента и α -протоны алкильных цепей).

гас-1-(2-²H₂)Гексадецил-2-пальмитоилглицерин (XXVa). К раствору 3,5 г (11 ммоль) эфира (XIXa) в 100 мл безводного толуола и 8,9 мл безводного пиридина при охлаждении (-10° С) и перемешивании по каплям за 1 ч добавляли раствор 2,7 г (11,6 ммоль) дифенилметилхлорсилана в 30 мл безводного толуола, перемешивали 1 ч. Затем при перемешивании и охлаждении (-10° С) по каплям за 1 ч добавляли раствор 3,03 г (11 ммоль) пальмитоилхлорида в 20 мл безводного толуола. Через 3 ч реакционную массу фильтровали, фильтрат промывали водой (4×200 мл), высушивали Na₂SO₄, упаривали в вакууме. К остатку добавляли 100 мл хлороформа, 20 мл метанола, 3 мл воды и 0,2 г фторида аммония, перемешивали 30 мин при комнатной температуре, добавляли 100 мл хлороформа, промывали водой (4×200 мл) и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью петролейный эфир — эфир (3 : 1 — 1 : 1). Выход 4,31 г (70,3%). Т. пл. 65—66° С. R_f 0,48 (гексан — эфир, 1 : 1). ИК-спектр (пленка с вазелиновым маслом), ν (см^{-1}): 3438 (O—H), 1732 (C=O), 1167 (C—O—C сложноэфирной связи), 1104 (C—O—C простой эфирной связи), 1048 (C—OH), 718 ($(\text{CH}_2)_x$). ¹H-ЯМР-спектр (C²HCl₃, δ): 0,85 (6H, т, J 7, 2CH₂CH₃), 1,25 (5OH, уш. с, (CH₂)₁₃CH₃ и (CH₂)₁₂CH₃), 1,53 (2H, м, С(O)CH₂CH₂), 2,20 (1H, уш. с, OH), 2,35 (2H, т, J 6,5, С(O)CH₂), 3,42 (2H, уш. м, ОСН₂C²H₂), 3,57 (1H, дд, J₁ 9,0; J₂ 4,3) и 3,64 (1H, дд, J₁ 9,0, J₂ 4,2) — СН₂ОСН₂СН₂, 3,80 (2H, уш. д, J 5, СН₂OH), 4,85 (1H, м, СНОСO).

гас-1-(2-²H₂)Пальмитоил-2-пальмитоилглицерин (XXVb). Получен по методике, аналогичной предыдущей. 3 г (10 ммоль) 1-(2-²H₂)пальмитоилглицерина (XIXb) силилировали 2,37 г (10,2 ммоль) дифенилметилхлорсилана в 100 мл безводного толуола в присутствии 10 мл пиридина. Затем добавляли 2,77 г (10,1 ммоль) пальмитоилхлорида. Выход 4,24 г (75%), т. пл. 62—63° С, R_f 0,45 (гексан — эфир, 1 : 1). ИК-спектр (пленка с вазелиновым маслом), ν (см^{-1}): 3476 (O—H), 1728, 1705 (C=O), 1286 (O—H), 1120, 1105, 1089 (C—O—C), 1065 (C—OH), 718 ($(\text{CH}_2)_x$). ¹H-ЯМР-спектр (C²HCl₃, δ): 0,86 (6H, т, J 6,7, 2CH₂CH₃),

1,28 (4Н, уш. с, $2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$), 1,58 (4Н, м, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2$ и $\text{C}(\text{O})\text{C}^2\text{H}_2\text{CH}_2$), 2,30 (2Н, т, J 7,5, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$), 3,73 (2Н, уш. д, J 5, CH_2OH), 4,28 (1Н, дд, J_1 7,5, J_2 12) и 4,50 (1Н, дд, J_1 3,5, J_2 12) — CH_2OSO , 5,22 (1Н, м, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$).

2-Гексадецилглицерин (XXVII). 1,81 г (10 ммоль) 1,3-бензилиденглицерина (XXVI) и 2,24 г (40 ммоль) порошка едкого кали кипятили 6 ч в 50 мл толуола при интенсивном перемешивании, отделяя воду насадкой Дина-Старка. Добавляли 1,77 г (5,8 ммоль) гексадецилбромид и продолжали кипячение при перемешивании еще 4 ч. Реакционную массу охлаждали, упаривали в вакууме. К остатку добавляли 100 мл эфира и 50 мл воды. Эфирный слой отделяли и промывали водой (2×50 мл), водный экстрагировали эфиром (2×50 мл). Соединенный эфирный экстракт высушивали Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 30 мл метанола и перемешивали с 50 мг *n*-толуолсульфокислоты 30 мин при 40—50° С. Затем смесь упаривали в вакууме, остаток в хлороформе фильтровали через окись алюминия и хроматографировали на силикагеле, элюируя системой хлороформ — эфир (1 : 1). Выход 1,45 г (56%). Т. пл. 61—62° С. R_f 0,37 (хлороформ — эфир, 1 : 4). ИК-спектр (пленка с вазелиновым маслом), ν (см^{-1}): 3340 (О—Н), 1325, 1251, 1239 (О—Н), 1120 (С—О—С), 1060 (С—ОН и С—О—С), 934, 717 ($(\text{CH}_2)_x$).

гас-1-(2-²H₂)Пальмитоил-2-гексадецилглицерин (XXVIII). К раствору 3,5 г (11 ммоль) 2-гексадецилглицерина (XXVII) в 100 мл безводного хлороформа и 3 мл безводного пиридина при —10° С и перемешивании по каплям за 1 ч добавляли раствор 2,4 г (8,7 ммоль) (2-²H₂)пальмитоилхлорида (XIV) в 20 мл безводного хлороформа. Через 3 ч смесь фильтровали, промывали водой (4×200 мл), высушивали Na_2SO_4 , упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью гептан — эфир (3 : 1). Выход 3,05 г (63%). R_f 0,48 (гексан — эфир, 1 : 1). ИК-спектр (пленка с вазелиновым маслом), ν (см^{-1}): 3438 (О—Н), 1732 (С=О), 1167 (С—О—С сложной эфирной связи), 1104 (С—О—С простой эфирной связи), 1048 (С—ОН), 718 ($(\text{CH}_2)_x$). ¹Н-ЯМР-спектр (C^2HCl_3 , δ): 0,87 (6Н, т, J 7, CH_2CH_3), 1,24 (50Н, уш. с, $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ и $(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$), 1,60 (4Н, м, OCH_2CH_2 и $\text{OC}^2\text{H}_2\text{CH}_2$), 2,05 (1Н, уш. с, ОН), 3,44—3,74 (5Н, м, CH_2OH и CHOC_2H_5), 4,16 (2Н, д, J 5, CH_2OSO).

гас-1-(2-²H₂)Гексадецил-2-гексадецилглицеро-3-фосфо(γ -²H₃)холин (I). К раствору 0,60 мл (0,98 г, 6,5 ммоль) свежеперегнанного хлороксида фосфора в 3 мл абс. хлороформа при перемешивании добавляли по каплям за 20 мин раствор 2,8 г (5,2 ммоль) диэфира (XXII) в 50 мл хлороформа и 0,9 мл безводного триэтиламина. Раствор перемешивали 1 ч при 35—40° С, охлаждали до комнатной температуры и добавляли 3,15 г (11,5 ммоль) *n*-толуолсульфоната (γ -²H₃)холина и 4 мл пиридина. Массу перемешивали 8 ч при комнатной температуре, добавляли 1,5 мл воды и перемешивали еще 30 мин. После этого к реакционной массе добавляли 100 мл хлороформа, раствор промывали 3% водным Na_2CO_3 (2×50 мл), 5% HCl (2×50 мл), водой (2×50 мл) и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (75 г), примеси элюировали хлороформом, фосфолипид вымывали смесью хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4). К раствору последнего в 20 мл хлороформа добавляли 150 мл ацетона, осадок отфильтровывали, высушивали над P_2O_5 (20 ч при 130 Па). Выход 3,1 г (84,8%). R_f 0,38 (хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4). ¹Н-ЯМР-спектр (C^2HCl_3 — $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}$ — $^2\text{H}_2\text{O}$, 1 : 1 : 0,15; δ): 0,87 (6Н, т, J 7, $(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$), 1,25 (52Н, уш. с, $2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$), 1,58 (2Н, м, COCH_2CH_2), 3,20 (6Н, с, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3,59 (2Н, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,40—3,70 (7Н, м, протоны при простой эфирной связи), 3,88 (2Н, дд, J_1 5,5, J_2 7, $\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 4,20 (2Н, м, ROCH_2CH_2).

гас-1-(2-²H₂)Гексадецил-2-пальмитоилглицеро-3-фосфо(γ -²H₃)холин (II). Получали по той же методике фосфорилированием 2,15 г (3,88 ммоль) диэфира (XXVa) 0,74 г (0,45 мл, 4,83 ммоль) хлороксида фосфора и последующей конденсацией с 2,33 г (8,5 ммоль) *n*-толуолсульфоната (γ -²H₃)холина (VIII). Выход 1,8 г (65%). R_f 0,37 (хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4). ¹Н-ЯМР-

спектр ($C^2HCl_3-C^2H_3O^2H-^2H_2O$, 1:1:0,15; δ): 0,87 (6H, т, J 7, CH_2CH_3), 1,25 (50H, уш. с, $(CH_2)_{13}CH_3$ и $(CH_2)_{12}CH_3$), 1,58 (2H, м, $C(O)CH_2CH_2$), 2,35 (2H, т, J 7,5, $C(O)CH_2$), 3,20 (6H, с, $N(CH_3)_2$), 3,41 (2H, м, $OCH_2C^2H_2$), 3,54 (1H, дд, J₁ 11, J₂ 5,0) и 3,62 (1H, дд, J₁ 11, J₂ 4,0) — $CH_2OCH_2CH_2$, 3,59 (2H, м, CH_2CH_2N), 3,86 (2H, дд, J₁ 5,5, J₂ 5,5, $CH_2OPO_3CH_2CH_2$), 4,20 (2H, м, $POCH_2CH_2$), 5,2 (1H, м, $CHOCO$).

гас-1-(2-²H₂)Пальмитоил-2-гексадецилглицеро-3-фосфо(γ -²H₃)холин (III).
Получали по той же методике фосфорилированием 2,15 г (3,88 ммоль) диэфира (XXVIII) 0,74 г (0,45 мл, 4,83 ммоль) хлороксида фосфора и последующей конденсацией с 2,33 г (8,5 ммоль) *n*-толуолсульфоната (γ -²H₃)холина (VIII). Выход 1,71 г (62%). *R_f* 0,38 (хлороформ — метанол — вода, 65:25:4). ¹H-ЯМР-спектр ($C^2HCl_3-C^2H_3O^2H-^2H_2O$, 1:1:0,15; δ): 0,87 (6H, т, J 7, CH_2CH_3), 1,25 (50H, уш. с, 50H, уш. с, $(CH_2)_{13}CH_3$ и $(CH_2)_{12}CH_3$), 1,58 (4H, м, $C(O)C^2H_2CH_2$ и OCH_2CH_2), 3,20 (6H, с, $N(CH_3)_2$), 3,51 (1H, дд, J₁ 10, J₂ 6,5, $OCH_2CH_2CH_2$), 3,55—3,60 (3H, м, $CHOCO$ и CH_2CH_2N), 3,61 (1H, дд, J₁ 10, J₂ 3,5, $OCH_2CH_2CH_2$), 3,87 (1H, ддд, J₁ 5,5, J₂ 5,5, J₃ 10,5) и 3,91 (1H, ддд, J 5,5, J 5,5, J 10,5) — $CH_2OPO_3CH_2CH_2$, 4,10 (1H, дд, J₁ 6,5, J₂ 12,0, $CH_2CH_2CH_2$), 4,22 (2H, м, $POCH_2CH_2$), 4,26 (1H, дд, J₁ 3,0, J₂ 12,0, $CH_2CH_2CH_2$).

гас-1-(2-²H₂)Пальмитоил-2-пальмитоилглицеро-3-фосфо(γ -²H₃)холин (IV).
Получали по той же методике фосфорилированием 1,5 г (2,50 ммоль) диглицерида (XXVб) 0,49 г (0,3 мл, 3,22 ммоль) хлороксида фосфора и последующей конденсацией с 1,53 г (5,5 ммоль) *n*-толуолсульфоната (γ -²H₃)холина (VIII). Выход 1,0 г (52%). *R_f* 0,38 (хлороформ — метанол — вода, 65:25:4). ¹H-ЯМР-спектр ($C^2HCl_3-C^2H_3O^2H-^2H_2O$, 1:1:0,15; δ): 0,84 (6H, т, J 7, CH_2CH_3), 1,25 (48H, м, 2 $(CH_2)_{12}CH_3$), 1,59 (4H, м, $C(O)CH_2CH_2$ и $C(O)C^2H_2CH_2$), 2,35 (2H, т, J 7,5, $C(O)CH_2$), 3,20 (6H, с, $N(CH_3)_2$), 3,58 (2H, м, CH_2CH_2N), 3,98 (2H, дд, J₁ 5,0, J₂ 7,0, $CH_2OPO_3CH_2CH_2$), 4,12 (1H, дд, J₁ 7,5, J₂ 12) и 4,40 (1H, дд, J₁ 3,5, J₂ 12) — CH_2OCO , 4,20 (2H, м, $POCH_2CH_2$), 5,20 (1H, м, $CHOCO$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Worchester D.*//Biological Membranes/Eds Chapman D., Wallach D. I. H. London: Acad. Press, 1976. V. 3. № 1. P. 1—46.
2. *Smith R. L., Oldfield E.*//Science. 1984. V. 225. № 4659. P. 280—288.
3. *Andresen R., Munder P. G.*//Platelet Activating Factor and Cell Immunology. New Trends in Lipid Mediator Research/Ed. Braquet P. Basel: Karger, 1988. V. 2. № 1. P. 16—29.
4. *Berdel W. E., Munder P. G.*//Platelet Activating Factor and Related Ether Lipid Mediators/Ed. Snyder F. N. Y.: Plenum Press, 1987. № 3. P. 449—467.
5. *Nakagawa Y., Siguira T., Waku K.*//Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 833. № 2. P. 323—329.
6. *Vargaftig B. B., Braquet P. G.*//Brit. Med. Bull. 1987. V. 41. № 2. P. 312—335.
7. *Ruocco M. J., Siminovich D. J., Griffin R. G.*//Biochemistry. 1985. V. 24. № 10. P. 2406—2411.
8. *Kim I. T., Mattai J., Shipley G. G.*//Biochemistry. 1987. V. 26. № 18. P. 6592—6598.
9. *Haas N. S., Spirada P. K., Shipley G. G.*//Biophys. J. 1990. V. 57. № 2. P. 117—124.
10. *Brockerhoff H., Ayengar N. K. N.*//Lipids. 1979. V. 14. № 1. P. 88—89.
11. *Rosenthal A. F.*//J. Lipid Res. 1966. V. 7. № 4. P. 779.
12. *Nguyen D.-N.*//Ark. kemi. 1964. V. 22. № 13. P. 151—167.
13. *Tulloch A. P.*//Lipids. 1979. V. 12. № 1. P. 92—98.
14. *Hessel L. W., Lohuizen O. E., Verkade P. E.*//Recueil trav. chim. 1954. V. 73. № 9—10. P. 842—848.
15. *Martin G.*//J. Amer. Chem. Soc. 1953. V. 75. № 22. P. 5482—5483.
16. *Bayliss M.*//J. Infect. Dis. 1936. V. 59. № 2. P. 131—136.
17. Свойства органических соединений. Справочник/Ред. Потехин А. А. Л.: Химия, 1984. С. 222.

Поступила в редакцию
29.VII.1992

После доработки
22.IX.1992

*M. V. Chudinov, M. V. Anikin, A. V. Anikin,
N. A. Bragina, V. V. Chupin, G. A. Serebrennikova*

SYNTHESIS OF PHOSPHATIDYLCHOLINES WITH SELECTIVE DEUTERIUM LABELS

M. V. Lomonosov Moscow Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

Methods of the site-specific introduction of deuterium labels in the phospholipid molecule were developed. A number of new ester and ether phosphatidylcholines *rac*-1-(2-²H₂)hexadecyl-2-hexadecylglycero-3-phospho(γ -²H₃)choline, *rac*-1-(2-²H₂)hexadecyl-2-palmitoylglycero-3-phospho(γ -²H₃)choline, *rac*-1-(2-²H₂)palmitoyl-2-hexadecylglycero-3-phospho(γ -²H₃)choline, *rac*-1-(2-²H₂)palmitoyl-2-palmitoylglycero-3-phospho(γ -²H₃)choline with deuterium labels in hydrophobic and hydrophilic sites of the molecules were synthesized.