



УДК 547.915.5+547.953.2.04+541.145

**ИЗУЧЕНИЕ ЛИПИД-ЛИПИДНЫХ И ЛИПИД-БЕЛКОВЫХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В МЕМБРАНАХ С ПРИМЕНЕНИЕМ
ФОСФОЛИПИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФОТОРЕАКТИВНЫЕ
ГРУППИРОВКИ****I. ОБРАЗОВАНИЕ КОВАЛЕНТНЫХ ЛИПИД-ЛИПИДНЫХ СВЯЗЕЙ ПРИ
ОБЛУЧЕНИИ УФ-СВЕТОМ МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАН****Вавер В. А., Ушаков А. Н., Циренкина М. Л.***Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

С помощью методов газовой хроматографии и масс-спектрометрии впервые показано образование ковалентных связей между молекулами липидов при облучении УФ-светом липосом, содержащих лецитин с азидоформильной группой в цепи жирной кислоты.

Последнее время для структурных исследований биомембран все чаще применяются соединения с фотореактивными группами [1—7]. Наиболее интересный вариант такого подхода предложен в работах [8, 9]. Биомембрану подвергают разборке, белковую фракцию отделяют от липидов и рекомбинируют с синтетическими липидами, максимально близкими по своей природе к нативным, но несущими в алифатических цепях фотореактивные группировки. Облучение УФ-светом рекомбинированных таким образом липопротеинов приводит к образованию радикалов, способных внедряться в С—Н-связи элементов полипептидной цепи в местах наиболее тесных липид-белковых контактов. При последующей деструкции мембраны образованные ковалентные связи сохраняются, что в принципе позволяет выделить и идентифицировать фрагменты шивок.

Для реализации этой схемы рядом авторов были синтезированы лецитины и кефалины, содержащие в цепях жирных кислот 4-азидо-2-нитрофенильные [8, 10], этил-2-диазомалонильные [8], 3,3,3-трифтор-2-диазопропильные [10], азидофенильные [10], диазиринофенильные [10] и азидные [8—12] группы. Используемые в этих работах фотореактивные группировки генерируют при фотолитическом разложении либо нитрены (азиды), либо карбены (диазосоединения). Однако выход продуктов межмолекулярных шивок при фотолизе, как правило, очень низок, так как основная часть возникающих радикалов стабилизируется за счет внутримолекулярных перегруппировок [13, 14]. Поэтому для оценки результатов эксперимента необходимо использовать очень чувствительные методы, главный из которых основан на применении радиоактивных радикалов. Образование ковалентной связи между липидом и белком доказывается измерением радиоактивности белковой фракции. Однако метод радиоак-

тивной индикации имеет существенный недостаток, связанный с трудностью проведения полной очистки продукта сшивки от большого избытка «нековалентной» радиоактивности. При этом небольшая методическая неточность может привести к сильным искажениям при оценке результатов эксперимента [15].

В связи с этим возникает необходимость поиска новых подходов к решению проблемы идентификации продуктов межмолекулярной сшивки. Так, Корана и соотр. [8] предполагают использовать для этой цели масс-спектрометрию, а в работе Бейли и Ноуелса [16] количественная оценка продуктов внедрения липофильного фотозонда в лецитиновые липосомы производится с помощью методов ГЖХ и масс-спектрометрии. Последний подход к интерпретации результатов фотолиза представляется перспективным, так как не только позволяет с достоверностью констатировать факт сшивки, но и открывает большие возможности для идентификации продуктов фотолиза после их частичной деструкции. Хромато-масс-спектрометрический анализ фрагментов сшивки позволит определять места липид-белковых контактов и судить о взаимном расположении липидных и белковых молекул в исследуемой биомембране.

Однако этот вариант анализа требует большего в сравнении с изотопным методом количества определяемого вещества и, следовательно, связан с необходимостью использования фотореактивных группировок с выраженной склонностью к внедрению в С—Н-связи соседних молекул. Выбор таких групп на основе классических работ по фотохимии затруднен. Это связано с отсутствием корреляции между условиями биохимических и фотохимических исследований. Вероятно, поэтому ни в работах по структурным исследованиям биомембран методом фотозонда [1—7], ни в работах по синтезу модифицированных липидов [8—12] выбор фотометок не аргументирован и основан на традиции их использования в других областях биохимии [17].

Таким образом, синтез фотомеченых фосфолипидов, необходимых для реализации упомянутой выше схемы [8, 9] структурных исследований биомембран с хромато-масс-спектрометрическим ее завершением, следует предварить разработкой удобного метода тестирования способности фотореактивных групп к реакциям внедрения в С—Н-связи молекул ближайшего окружения. Нами предложен такой метод, основанный на количественном газохроматографическом анализе продуктов фотолиза модифицированных высших жирных кислот в углеводородных растворителях. С помощью этого метода мы осуществили оценку способности к реакциям внедрения радикалов, генерируемых при фотолизе N_3 -, $C_2H_5OCOCN_2COO$ - и N_3OCO -группами, встроенными в молекулу метилового эфира рицинолевой кислоты.

Азидная группировка была включена в число тестируемых, так как она чаще других фотореактивных групп использовалась для синтеза фотомеченых фосфолипидов [8—12]. Кроме того, азидсодержащие лецитин и сфингомиелин уже использовались при изучении рекомбинированного природного липопротеина [9].

Этилдиазомалонильная группа представляет интерес в связи с тем, что образующийся при ее фотолизе карбеновый центр не имеет соседних протонов при β -углеродных атомах и, следовательно, его возможности к внутримолекулярной стабилизации за счет перегруппировки типа $RCN_2CH_2 \rightarrow R-CH=CN_2$ ограничены [13].

Тестирование азидоформата нам представлялось полезным, поскольку в некоторых работах [18, 19] имеются данные о хорошем выходе продуктов межмолекулярного внедрения соответствующего радикала при термоллизе и фотолизе.

Метилловый эфир 12-азидоолеиновой кислоты был получен обработкой азидом натрия соответствующего мезилата [8]. Метилловый эфир 12-О-(этил-2-дiazомалонил)рицинолевой кислоты получен ацилированием ме-

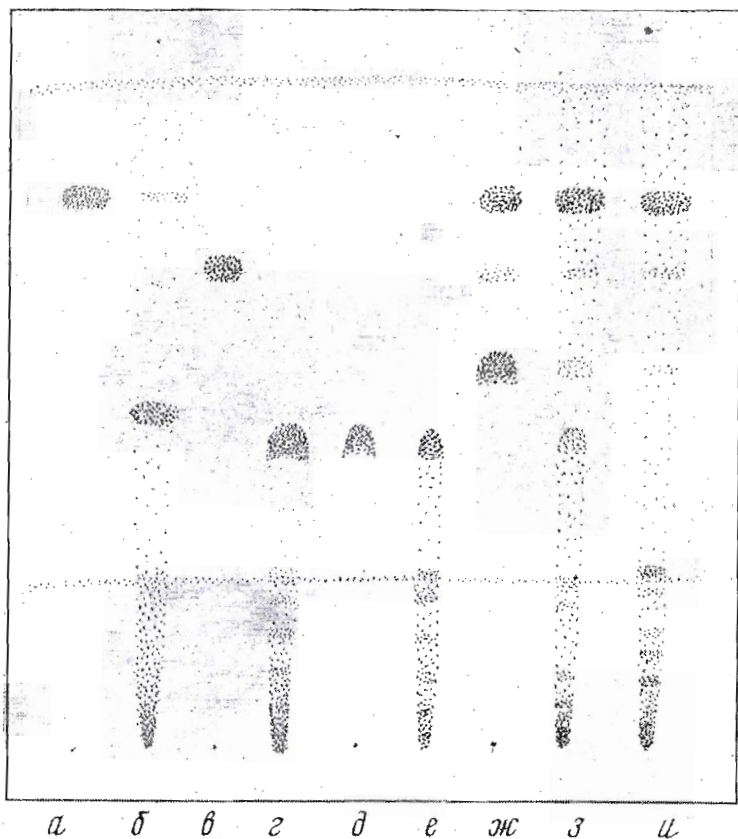


Рис. 1. ТСХ продуктов фотоллиза производных рицинолевой кислоты в системе гексан – эфир – уксусная кислота, 85:15:1, при обнаружении пятен серной кислотой: а – метиловый эфир 12-азидоолеиновой кислоты; б – то же после фотоллиза в *n*-гексане; в – метиловый эфир 12-О-(азидоформил)рицинолевой кислоты; г – то же после фотоллиза в *n*-гексане, д – метиловый эфир 12-О-(*N*-*n*-гексилкарбамил)рицинолевой кислоты; е – метиловый эфир 12-О-(азидоформил)рицинолевой кислоты после фотоллиза в бензоле; ж – продукты дезацилирования азидоформилсодержащего лецитина; з – продукты дезацилирования азидоформилсодержащего лецитина после его фотоллиза в бензоле; и – продукты дезацилирования азидоформилсодержащего лецитина, облученного УФ-светом в виде липосом

тилового эфира оксикислоты хлорангидридом этилдиазомалоновой кислоты [8]. Метиловый эфир 12-О-(азидоформил)рицинолевой кислоты синтезирован обработкой метилового эфира оксикислоты фосгеном с последующей заменой хлора на азид действием азидата натрия.

Продукты фотоллиза гексановых растворов указанных выше эфиров исследовали с помощью ТСХ и ГЖХ. По данным ТСХ, продукты фотоллиза метилового эфира 12-азидоолеиновой кислоты (рис. 1, б) содержали три фракции: непрореагировавший исходный азид (R_f 0,85), фракцию с R_f 0,5 и стартовую зону, дающую положительную реакцию на шингидрин. Все три зоны были выделены препаративной ТСХ и далее исследованы с помощью ГЖХ. Стартовая зона регистрировалась на хроматограмме пиком, близким по объему удерживания октадециламину. Фракция с R_f 0,5 элюировалась в виде группы пиков с удерживаемыми объемами, меньшими, чем у исходного азидата, и, по-видимому, представляла собой продукты внутримолекулярных перегруппировок соответствующего нитрена. В масс-спектрах перечисленных хроматографических зон отсутствовали ионы с массой, превышающей молекулярный вес исходного азидата.

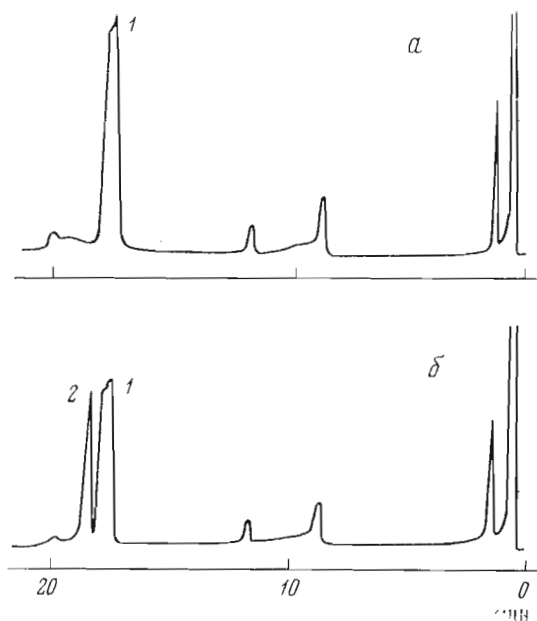


Рис. 2. ГЖХ продуктов фотоллиза: *a* – метилового эфира 12-О-(азидоформил)рицинолевой кислоты в растворе *n*-гексана; *б* – то же в присутствии метилового эфира 12-О-(*N*-*n*-гексилкарбамил)рицинолевой кислоты. 1 – продукт сшивки с *n*-гексаном; 2 – метиловый эфир 12-О-(*N*-*n*-гексилкарбамил)рицинолевой кислоты. Условия хроматографии см. «Экспериментальную часть»

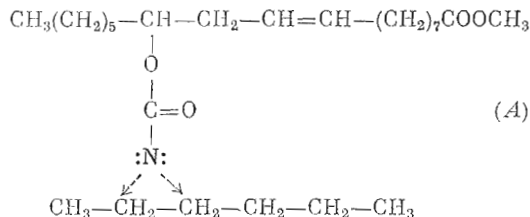
Продукты фотоллиза метилового эфира диазомалонилрицинолевой кислоты разделяли препаративной ТСХ на три фракции с R_f 0,75; 0,65 и 0,5. Фракция с R_f 0,75, представлявшая собой остаток исходного продукта, и фракция с R_f 0,65 не выдерживают условий газохроматографического анализа и разлагаются на колонке. Зона с R_f 0,50 регистрировалась на хроматограмме одним пиком; время удерживания этого вещества и его подвижность при ТСХ не изменялись после кислотного или щелочного метанолиза. Согласно данным масс-спектрометрического анализа, это вещество представляет собой продукт перегруппировки соответствующего карбена. Таким образом, и в случае фотоллиза диазомалонильного производного количество продукта межмолекулярной сшивки было настолько мало, что заметить его с помощью хроматографических методов не удалось.

Метиловый эфир азидоформилрицинолевой кислоты при фотоллизе претерпевал полное превращение (рис. 1, *з*). Пик 1 при ГЖХ продуктов фотоллиза (рис. 2*а*) соответствовал фракции с R_f 0,5 при ТСХ (рис. 1, *з*), в масс-спектре которой в области молекулярного иона имелись ионы с m/e 439 и 440. Молекулярный вес метилового эфира 12-О-(*N*-гексилкарбамил)рицинолевой кислоты, наличие которого в продуктах фотоллиза свидетельствовало бы о ковалентной сшивке нитрена с гексаном, составляет 439. С целью идентификации исследуемой фракции нами синтезирован метиловый эфир 12-О-(*N*-*n*-гексилкарбамил)рицинолевой кислоты. Несмотря на то что последнее соединение и продукты, выделенные в результате фотоллиза, имели идентичную подвижность при ТСХ, их времена удерживания несколько различались (рис. 2*б*). Объяснение этому обстоятельству дало сравнение масс-спектров обоих веществ (см. таблицу). При этом было установлено, что максимальную интенсивность имеют ионы $[M^+ - \text{OCO} - \text{NHC}_6\text{H}_{13}]$ с m/e 294, представляющие собой остаток

**Масс-спектры продукта фотоллиза метилового эфира
азидоформилрицинолевой кислоты в *n*-гексана и метилового эфира
12-О-(*N*-*n*-гексилкарбамил)рицинолевой кислоты**

<i>m/e</i>	Интенсивность, %		<i>m/e</i>	Интенсивность, %	
	линейный изомер	продукт фотоллиза		линейный изомер	продукт фотоллиза
146	16	29	338	—	2,4
166	55	47	352	—	2,8
198	35	29	366	1,0	3,6
262	13	22	382	—	1,6
263	7	23	396	—	1,4
294	100	100	408	1,5	1,2
295	23	33	410	0,5	1,6
310	2	1,6	439	3,8	1,4
325	—	1,6	440	1,5	0,4
331	3,5	—			

метилового эфира рицинолевой кислоты, а также молекулярные ионы $[M^+]$ и $[M^++1]$ с m/e 439 и 440 соответственно и ионы $[M^+-OCH_3]$ с m/e 408, характерные для метиловых эфиров жирных кислот. Однако в масс-спектре продукта фотоллиза имеются ионы с m/e 410, 396 и 382, отсутствующие в спектре метилового эфира 12-О-(*N*-*n*-гексилкарбамил)-рицинолевой кислоты. Их образование можно объяснить отщеплением CH_3CH_2- , $CH_3CH_2CH_2-$ и $CH_3CH_2CH_2CH_2-$ фрагментов из гексильной цепи замещенной аминогруппы. Таким образом, при фотоллизе нитреновый центр атакует преимущественно вторичные углеродные атомы молекулы *n*-гексана, т. е. образуются изомеры, различающиеся положением связи C—N в гексильной цепи:



Линейный изомер в продуктах фотоллиза практически отсутствует (см. рис. 2а, б). Кроме того, об образовании изомеров при фотоллизе в растворе гексана можно судить также по форме соответствующего пика *I* на хроматограмме (рис. 2а).

Количественную оценку способности нитренового радикала (А) к реакциям внедрения в C—H-связи соседних молекул осуществляли с помощью ГЖХ. С этой целью фотоллиз метилового эфира азидоформилрицинолевой кислоты проводили в бензоле, применение которого исключало возможность образования изомерных продуктов и облегчало расчет хроматограмм. Выход продукта внедрения составил около 30% от исходного количества азидоформиата. Продукт сшивки остатка азидоформилрицинолевой кислоты с бензолом был предварительно идентифицирован с помощью ТСХ (рис. 1, е) и масс-спектрометрии (см. «Экспериментальную часть»).

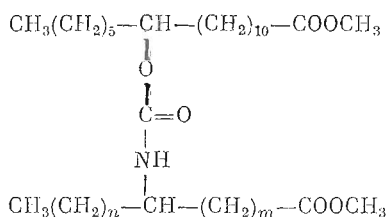
Высокий выход продуктов внедрения азидоформиата в молекулы углеводородных растворителей показал целесообразность использования этой группировки для синтеза фотомеченых фосфолипидов. Поэтому следующим этапом нашей работы был синтез азидоформилсодержащего лецитина и исследование его поведения при освещении УФ-светом. С этой целью лизолецитин, полученный из яичного лецитина действием фосфо-

липазы A_2 , ацилировали хлорангидридом 12-О-(азидоформил)стеариновой кислоты*.

Полученный таким образом лецитин подвергали фотолизу в бензольном растворе. В продуктах дезацилирования с помощью ТСХ (рис. 1, ж, з), ГЖХ и масс-спектрометрии идентифицировано соединение, соответствующее продукту сшивки остатка 12-О-(азидоформил)стеариновой кислоты с бензолом. Масс-спектр этого вещества содержал интенсивный пик молекулярного иона с m/e 433 (см. «Экспериментальную часть») и был идентичен масс-спектру продукта фотолиза метилового эфира 12-О-(азидоформил)оксистеариновой кислоты в бензоле. Количество этого соединения составляло около 15% от теоретически возможного.

Следующим этапом нашей работы явилось изучение продуктов фотолиза азидоформилсодержащего лецитина, диспергированного в водной фазе в виде липосом. Липосомы после облучения УФ-светом экстрагировали смесью хлороформа с метанолом. Облученный лецитин имел одинаковую с исходным образом подвижность на пластинке с силикагелем, но обнаруживался более размытым пятном. Хлороформный слой упаривали, остаток выдерживали в условиях мягкого щелочного дезацилирования. Липофильные продукты дезацилирования исследовали методом ГЖХ.

Предварительно было установлено, что сложноэфирная связь карбамильной группы 12-О-(*N*-*n*-гексилкарбамил)рицинолевой кислоты в условиях дезацилирования не разрушается. Поэтому фрагмент сшивки после дезацилирования должен представлять собой две жирнокислотные цепи, связанные между собой группировкой $O-CO-NH-$:



где $(n+m)=13$ в случае пальмитиновой кислоты и 15 — в случае стеариновой. При этом фрагмент сшивки с пальмитиновой кислотой должен иметь M 625, а со стеариновой — 653.

Такое соединение должно удерживаться газохроматографической колонкой примерно как диглицерид. Действительно, в условиях диглицеридного анализа на хроматограмме продуктов дезацилирования облученного лецитина имеются два пика (рис. 3а). Соответствующая этим пикам хроматографическая зона с R_f 0,27 (рис. 1, и) была выделена препаративной ТСХ. Фрагментация выделенных веществ под электронным ударом представлена на рис. 4а. Как видно из приведенного рисунка, масс-спектр содержит две группы пиков с m/e 624, 625 и m/e 652 и 653. Ионы с m/e 625 и 653, по-видимому, являются молекулярными ионами продуктов сшивки остатка оксистеариновой кислоты с пальмитиновой и стеариновой кислотами соответственно. Соотношение интенсивностей ионов с m/e 625 и 653 совпадает с молярным соотношением пальмитиновой и стеариновой кислот (3:1) первого положения фотомеченого лецитина. Для подтверждения предполагаемого строения исследуемого продукта облученные липосомы были обработаны по приведенной выше схеме и дезацилированы 0,1 н. КОН в C^2H_5OH . Масс-спектр соответствующей зоны, выделенной препаративной ТСХ, приведен на рис. 4б. Из сравнения спектров, представленных на рис. 4а, б, видно, что ионы спектра 4а с m/e больше 498 оказываются в спектре 4б сдвинутыми на 6 единиц вправо, т. е. принадлежат фрагментам сшивки двух остатков жирных кислот, карбоксиль-

* Подробное описание синтеза лецитина, содержащего азидоформильную группировку, будет помещено в следующей публикации этой серии.

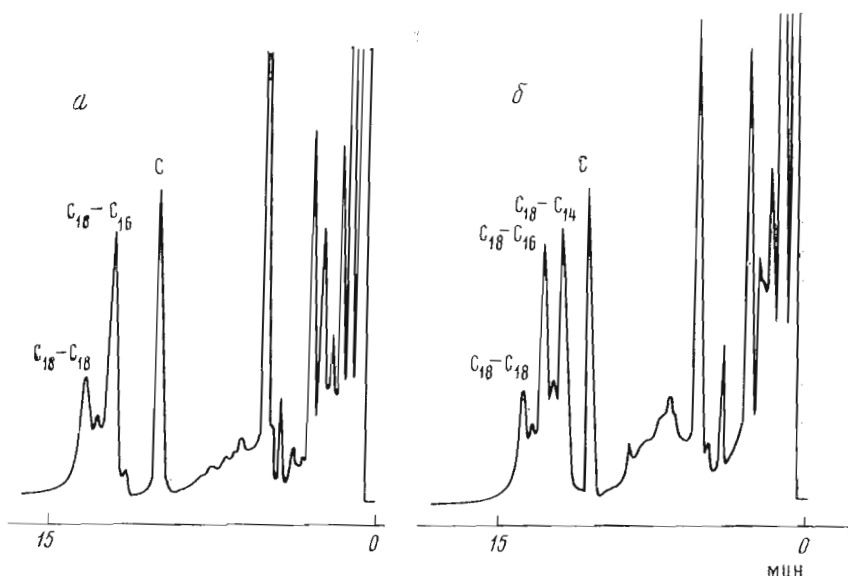


Рис. 3. ГЖХ фрагментов сшивки между молекулами фосфолипидов, освобождающихся при деацилировании продуктов облучения УФ-светом липосом, приготовленных из: *a* – азидоформилсодержащего лецитина; *б* – эквимольной смеси азидоформилсодержащего лецитина с димиристоиллецитином. С – внутренний стандарт, дипальмитат этиленгликоля. Условия разделения см. «Экспериментальную часть»

ные группы которых этерифицированы C^2H_5OH . Ион этой серии с минимальным значением m/e несет информацию о порядковом номере углеродного атома цепи «пришитой» жирной кислоты, связанного с атомом азота. Другой обширной группе ионов в масс-спектре 4а с m/e от 384 до 510 в спектре дейтерированного образца соответствуют ионы с m/e от 387 до 513, т. е. эти ионы принадлежат фрагментам с одной карбоксильной группой*.

Для решения вопроса, является ли продукт сшивки в лецитиновых липосомах внутри- или межмолекулярным, был проведен фотолиз липосом, приготовленных из эквимольной смеси фотомеченого лецитина и димиристоиллецитина. Как видно из хроматограммы на рис. 3б, в продуктах деацилирования облученных УФ-светом смешанных липосом появляется вещество, параметры удерживания которого соответствуют продукту сшивки остатка оксистеариновой кислоты с миристиновой кислотой. Судя по отношению площади этого пика ($C_{18}-C_{14}$) к сумме площадей пиков, соответствующих продуктам сшивки чистого азидоформилсодержащего лецитина [$(C_{18}-C_{18}) + (C_{18}-C_{18})$], межмолекулярная сшивка при фотолизе липосом составляет по меньшей мере половину суммарного продукта сшивки. Общее количество продуктов сшивки в липосомах определяли методом ГЖХ с применением в качестве внутреннего стандарта дипальмитата этиленгликоля. Оно составило около 5% от теоретически возможного.

Полученные результаты по сшивке лецитина в липосомах показали, что обсуждаемая схема исследования биомембран с хромато-масс-спектрометрическим ее завершением вполне реализуема (по крайней мере в ее аналитическом аспекте).

* Обсуждению закономерностей фрагментации N-замещенных эфиров карбаминной кислоты в зависимости от природы заместителя будет посвящено отдельное сообщение.

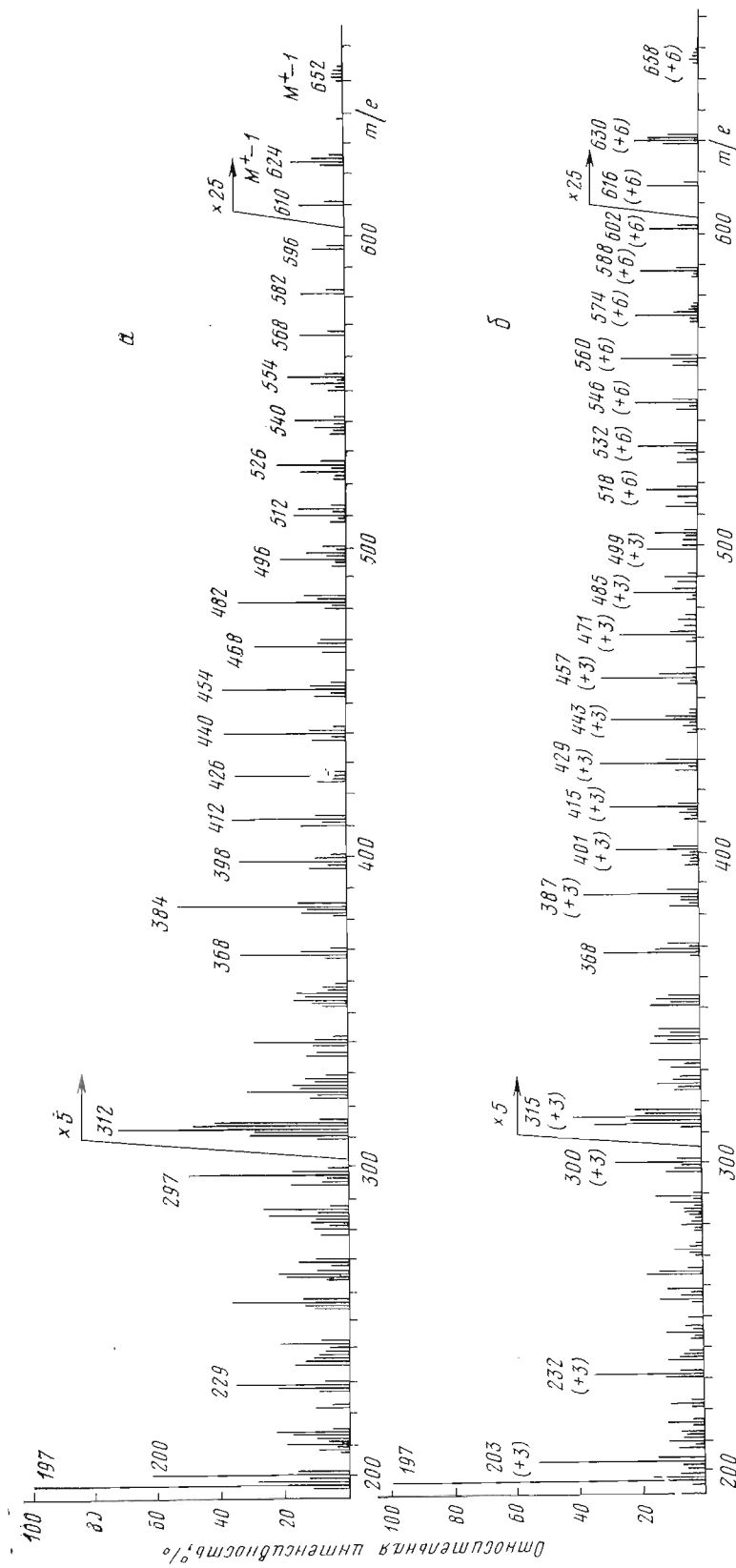


Рис. 4. Масс-спектры ковалентно-связанных жирнокислотных остатков, освобождающихся при: *a* — щелочном дезашировании азиформилсо-держанного ледянина, облученного УФ-светом в виде липосом; *b* — обработке того же продукта КОН в C^2H_5OH ; цифры в скобках в масс-спектре «*b*» означают величины сдвига в массовых числах ионов по сравнению с массами аналогичных ионов в масс-спектре «*a*»

Экспериментальная часть

Фотолиз проводили в кварцевой цилиндрической кювете с двойными стенками. Зазор между стенками около 1 мм. В качестве источника УФ-света использовали ртутную лампу низкого давления БУВ-15 (λ 254 нм), размещенную коаксиально внутри кюветы. Концентрация вещества с фотореактивной группой в каждом опыте составляла 1 мг/мл. Объем раствора, вводимого в кювету, 7 мл. Длительность фотолиза 45 мин при 20°С в атмосфере аргона.

При приготовлении липосом эфирный раствор 8,5 мг чистого фотомеченого лецитина или его эквивалентной смеси с димристоиллецитином упаривали досуха. К остатку добавляли 7 мл 0,05 М трис-НСl-буфера (рН 7,9), перемешивали 20 мин при 60°С, при той же температуре обрабатывали ультразвуком (прибор УЗДН-1) 5 мин и охлаждали до 20°С.

Лецитиновые липосомы после фотолиза разрушали, добавляя к водной суспензии 24 мл смеси хлороформ — метанол, 2 : 1. Хлороформный слой упаривали досуха, остаток обрабатывали 1 мл 0,1 н. КОН в 98% водном метаноле при 40°С 30 мин. Реакционную смесь нейтрализовали 0,1 мл этилформиата и распределяли в системе хлороформ — метанол — вода, 4 : 2 : 1,5. Хлороформный слой анализировали методами ТСХ, ГЖХ и масс-спектрометрии.

Продукты фотолиза производных рицинолевой кислоты анализировали на хроматографе фирмы Pye-Uniscam, серия 104, модель 64 (Англия), на стеклянных колонках 1500×4 мм, заполненных 3% SE-30 на хромосорбе W, HP, 100—120 меш. Температуру термостата повышали со скоростью 2°/мин от 190 до 250°С.

Продукты дезацилирования облученного лецитина анализировали на колонках 500×4 мм с 2% JXR на хромосорбе W, HP, 100—120 меш при повышении температуры со скоростью 5°/мин от 180 до 280°С.

Определение количества продукта межмолекулярной сшивки при фотолизе метилового эфира азидоформилрицинолевой кислоты в бензоле осуществляли методом ГЖХ на колонке 500×4 мм с 2% JXR. Весовой поправочный коэффициент (K_v) определяли по хроматограммам смеси навесок стандарта (дипальмитата этиленгликоля) и продукта сшивки с бензолом, выделенного препаративной ТСХ. Величина K_v была равна 1,9. Это же значение поправочного коэффициента было использовано при расчете хроматограмм фрагментов липид-липидных сшивок, снятых с применением того же внутреннего стандарта. Метилловые эфиры производных рицинолевой кислоты анализировали на колонке с 7% полиэтиленгликольсукцината, 1500×4 мм, при 170°С, определяя V_R по отношению к метилстеарату.

Масс-спектры продуктов сшивки метилового эфира азидоформилрицинолевой кислоты с растворителями снимали на хромато-масс-спектрометре LKB-9000 (Швеция) с использованием колоночки 1000×2 мм с 2% JXR или без нее с прямым вводом в источник. Температура молекулярного сепаратора 260°С. Энергия ионизирующих электронов 70 эВ.

Масс-спектр продукта сшивки бензола с метиловым эфиром азидоформилрицинолевой кислоты содержал ионы с m/e 166 (100), 198 (27), 245 (4,5), 263 (13,5), 294 (8), 295 (3), 387 (2,5), 431 (2).

Масс-спектр продукта сшивки метилового эфира азидоформилоксистеариновой кислоты с бензолом содержал ионы с m/e 197 (100), 200 (46), 207 (18), 229 (28), 265 (15), 281 (8,5), 297 (6), 389 (8), 433 (7,5).

Метилловый эфир рицинолевой кислоты (2 г) выделен с помощью колоночной хроматографии на силикагеле L, 40/100 мкм (ЧССР) (50 г) из продуктов кислотного метанолиза касторового масла (2,5% HCl в сухом метаноле при 2-ч кипячении). Колонку промывали смесью гексан — эфир, 85 : 15, с постепенным увеличением содержания эфира в системе до 1 : 1.

Метилловый эфир 12-азидоолеиновой кислоты получали по методике [8] обработкой метилового эфира рицинолевой кислоты (5 ммоль) раствором метансульфохлаорида (5,2 ммоль) в пиридине в течение 3 ч при 20° С. Метилловый эфир (2 ммоль) растворяли в смеси 23 мл диметилформамида и 2 мл воды, добавляли 10 ммоль азидата натрия, выдерживали 48 ч при 20° С, упаривали, экстрагировали эфиром, промывали водой, сушили над безводным сульфатом магния и хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя вещество смесью гексан — эфир, 9 : 1. Выход 600 мг (85%). ИК: 2100 см⁻¹ (азид.) V_R 1,5.

Метилловый эфир 12-О-(этил-2-диазомалонил)рицинолевой кислоты получали ацилированием метилового эфира рицинолевой кислоты (1 ммоль) этилдиазомалонилхлоридом (5 ммоль) в пиридине за 5 ч по методике [8]. Промытый водой и высушенный эфирный экстракт упаренной досуха реакционной смеси разделяли препаративной ТСХ в системе бензол — гептан — этилацетат — уксусная кислота, 100 : 10 : 6 : 1, собирая зону с R_f 0,81. Его выход составил 25%. ИК (ν, см⁻¹): 1730 (сложный эфир), 2125 (диазогруппа). Вещество не выдерживает условий газохроматографического анализа.

Метилловый эфир 12-О-(азидоформил)рицинолевой кислоты получали обработкой метилового эфира рицинолевой кислоты (1 ммоль), растворенного в 5 мл бензола, трехкратным избытком жидкого фосгена при 5° С [18]. Через 15 ч (20° С) избыток фосгена удалили при 10 мм рт. ст., остаток растворяли в 10 мл хлороформа, добавляли 1,5 мл водного раствора азидата натрия (3 ммоль) и выдерживали при 50° С при перемешивании в течение 8 ч. Слои разделяли и из хлороформного слоя после стандартной обработки и колоночной хроматографии на силикагеле в системе гексан — эфир, 85 : 15, азидоформиат выделяли с выходом 84%. ИК (ν, см⁻¹): 2120 и 2180 (—OCON₃). В условиях газохроматографического анализа вещество разлагается.

Метилловый эфир 12-О-(N-н-гексилкарбамил)рицинолевой кислоты. Метилрицинолеат (170 мг) обрабатывали фосгеном, как описано выше, продукт растворяли в 2 мл пиридина и при 0° С и перемешивании добавляли раствор 0,1 мл *n*-гексилamina в 2 мл пиридина за 15 мин. Реакционную смесь через 6 ч (20° С) разделяли препаративной ТСХ в системе гексан — эфир — уксусная кислота, 85 : 15 : 1, собирая зону с R_f 0,45. Масс-спектр приведен в таблице. По данным ГЖХ, чистота продукта не ниже 98%.

Димиристоиллецитин синтезировали по методу [10] обработкой кадмиевого комплекса глицерилфосфорилхолина ангидридом миристиновой кислоты в присутствии 4-диметиламинопиридина и выделяли препаративной ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Staros J. V., Richards F. M. (1974) *Biochemistry*, **13**, 2720—2726.
2. Klip A., Gitler C. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1155—1162.
3. Staros J. V., Haley B. E., Richards F. M. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 5004—5008.
4. Staros J. V., Richards F. M., Haley B. E. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 8174—8178.
5. Karlsh S. J. D., Jorgensen P. L., Gitler C. (1977) *Nature*, **269**, 715—717.
6. Bercovici T., Gitler C. (1978) *Biochemistry*, **17**, 1484—1489.
7. Mohiuddin G., Pomer D. M., Thomas E. W. (1976) *FEBS Lett.*, **70**, 85—86.
8. Chakrabarti P., Khorana G. (1975) *Biochemistry*, **14**, 5021—5033.
9. Stoffel W., Darr W., Salm K. P. (1977) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 453—462.
10. Gupta C. M., Radhakrishnan R., Khorana H. G. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 4315—4319.
11. Stoffel W., Salm K. P., Korkemeier U. (1976) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 917—924.
12. Greenberg C. K., Chakrabarty P., Khorana H. G. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 86—90.
13. Курмсе В. (1966) *Химия карбенов*, с. 68—81, «Мир», М.
14. Lewis F. D., Saunders W. H., Jr. (1970) in: *Nitrenes* (Lwowski W., ed.), pp. 53—59,

Interscience Publishers, N. Y.— Sydney — Toronto.

15. Bayley H., Knowles J. R. (1978) *Biochemistry*, **17**, 2414—2419.
16. Bayley H., Knowles J. R. (1978) *Biochemistry*, **17**, 2420—2423.
17. Bayley H., Knowles J. R. (1977) in: *Methods in Enzymology*, v. 46, pp. 69—114, Acad. Press, N. Y.— London.
18. Breslow D. S., Prosser T. J., Marcantonio A. F., Genge C. A. (1967) *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 2384—2390.
19. Lwowski W., Mattingly T. W. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 1947—1958.

Поступила в редакцию
5.IV.1979

**A STUDY OF THE LIPID-LIPID AND LIPID-PROTEIN INTERACTIONS
IN MEMBRANES USING PHOSPHOLIPIDS CONTAINING PHOTOACTIVABLE
GROUPS. I. FORMATION OF COVALENT LIPID-LIPID BONDS UPON UV-IRRADIATION
OF LIPOSOMES**

[V A V E R V. A.], U S H A K O V A. N., T S Y R E N I N A M. L.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

For the first time, with the aid of gas chromatography and mass spectrometry, the photoinduced intermolecular crosslinking of lipids was demonstrated in the liposomes containing lecithin with azidoformyl group in the fatty acid moiety.
