



УДК 547.426.2.07

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФОСФОЛИПИДОВ

*Евстратова Н. Г., Василенко И. А., Попова Т. П.,
Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. И.*

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

Описан синтез *rac*-1-О-(2-оксигексадецил)-, *rac*-1-О-(2-сукцинил оксигексадецил)- и *rac*-1-О-(8-карбоксооктил)-2-ацилглицеро-3-фосфохолинов, модифицированных фосфолипидов с простой эфирной связью, которые могут быть использованы в качестве лигандов в биоспецифической хроматографии для выделения мембранных белков.

Для выделения различных мембранных белков может быть использована биоспецифическая хроматография с иммобилизованными липидами, ковалентно связанными с сорбентом [1].

Для этой цели пригодны в качестве лигандов фосфолипиды, содержащие в гидрофобной части молекулы такие функциональные группировки, как гидроксильная, карбоксильная и др.

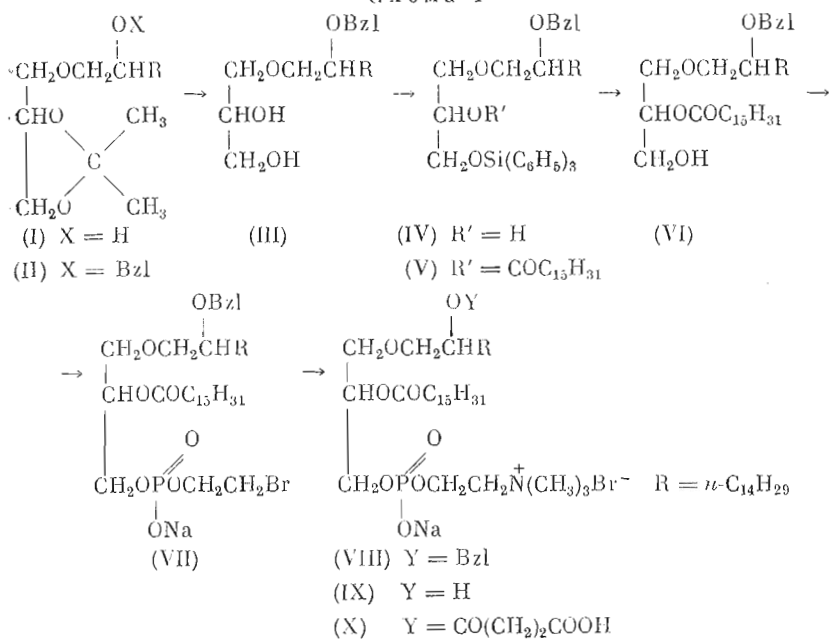
В данном сообщении нами описан синтез *rac*-1-О-(2-оксигексадецил)-, *rac*-1-О-(2-сукцинил оксигексадецил)- и *rac*-1-О-(8-карбоксооктил)-2-ацилглицеро-3-фосфохолинов (IX, X, XVI), фосфолипидов с простой эфирной связью, которые в отличие от фосфолипидов со сложноэфирной связью расщепляются с меньшей скоростью.

Исходным соединением для синтеза фосфолипидов (IX, X) служил *rac*-1-О-(2-оксигексадецил)-2,3-изопропилиденглицерин (I), полученный по ранее разработанному методу на основе катализируемой щелочью конденсации высших 1,2-эпоксидов и 2,3-изопропилиденглицерина [2] (схема 1). Соединение (I) далее превратили в соответствующий бензиловый эфир (II) и после удаления изопропилиденовой защиты в условиях кислотного гидролиза был получен *rac*-1-О-(2-бензилоксигексадецил)глицерин (III). Для синтеза соответствующего алкилацилглицерина (VI) применен метод избирательного блокирования первичного гидроксила в соединении (IV) с помощью трифенилсилильной защитной группы, с успехом использованной нами ранее при получении различных типов диглицеридов [3, 4].

С этой целью 1-О-(2-бензилоксигексадецил)глицерин (III) вводили во взаимодействие с трифенилхлорсиланом и полученное силильное производное (IV) без выделения ацилировали хлорангидридом пальмитиновой кислоты.

Последующее удаление трифенилсилильной защитной группы было достигнуто действием кислого фтористого аммония на раствор соединения (V) в смеси вода — ацетон — пиридин. *rac*-1-О-(2-Бензилоксигексадецил)-2-пальмитилглицерин (VI) был получен с выходом 84% в расчете на исходный диол (III). Последний фосфорилировали β-бромэтилдихлорфосфа-

Схема 1



том и полученный *rac*-1-О-(2-бензилоксигексадецил)-2-пальмитоилглицеро-3-(β-бромэтил)фосфат был выделен в виде натриевой соли (VII) с выходом 79%. Последующее взаимодействие фосфата (VII) с триметиламином осуществляли при нагревании в бензоле, что привело к соединению (VIII) с выходом 88,5%. Бензильную защиту с фосфодиэфира (VIII) удаляли каталитическим гидрированием в присутствии палладиевой черни, и модифицированный фосфатидилхолин (IX) был получен с почти количественным выходом.

Ацилирование фосфолипида (IX) ангидридом янтарной кислоты в присутствии пиридина в смеси хлороформ — диметилсульфоксид дало *rac*-1-О-(2-сукцинилосигексадецил)-2-пальмитоилглицеро-3-фосфохолин (X) с выходом 75%.

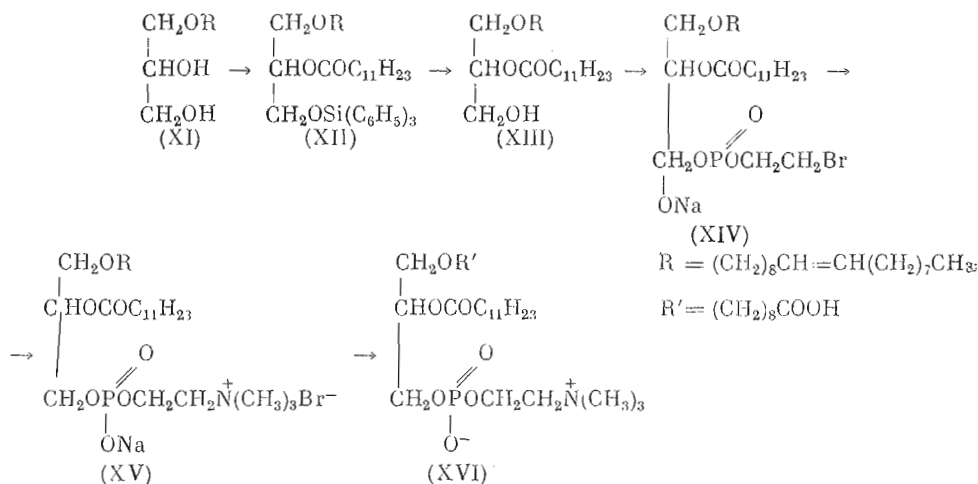
Получение *rac*-1-О-(8-карбоксоктил)-2-лауроилглицеро-3-фосфохолина (XVI) достигалось окислением *rac*-*cis*-1-О-(9-октадеценил)-2-лауроилглицеро-3-фосфохолина (XV) (схема 2) [5]. Для получения данного фосфолипида *rac*-*cis*-1-О-(9-октадеценил)глицерин [3] описанным методом с использованием трифенилсилильной защиты переводили в *rac*-*cis*-1-О-(9-октадеценил)-2-лауроилглицерин (XIII). Последний через стадии фосфорилирования β-бромэтилдихлорфосфатом [6] и последующей кватернизации фосфодиэфира (XIV) превращали в фосфолипид (XV) с выходом 81%. Дальнейшее окисление фосфатидилхолина (XV) смесью перманганата калия и периодата натрия в уксусной кислоте приводило с выходом 76% к фосфолипиду (XVI).

Строение всех промежуточных соединений и фосфолипидов (IX, X, XVI) установлено с помощью ИК- и ПМР-спектрометрии.

Синтезированные фосфолипиды (IX, X) подвергались расщеплению фосфолипазой A₂ [7], выделенной из змеиного яда*. При этом показано, что *rac*-1-О-(2-оксигексадецил)-2-пальмитоилглицеро-3-фосфохолин (IX) расщеплялся с начальной скоростью 0,07 ед. рН/мг/мин, тогда как фосфа-

* Ферментативный гидролиз проводился в ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР в лаборатории химии белка.

С х е м а 2



тидихолин, выделенный из яичного желтка, — со скоростью 0,125 ед. рН/мг/мин. *rac*-1-О-(2-сукцинилосигексадецил)-2-пальмитоилглицеро-3-фосфохолин (X) фосфолипазой A₂ не расщеплялся.

Экспериментальная часть

ТСХ проводили на силуфоле UV 254 в системах: петролейный эфир — эфир, 1:1 (А), хлороформ — метанол — ацетон — 25% аммиак, 15:5:5:1 (Б), хлороформ — метанол — вода, 65:25:4 (В); на окиси алюминия фирмы Reanal (II ст. акт. по Брокману) в системе петролейный эфир — эфир — метанол, 5:5:1 (Г). Фосфорные эфиры обнаруживали молибденовым синим. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Л 100/160 м (Chemapol). ИК-спектры снимали на спектрофотометре Perkin-Elmer 257 (Англия) в пленке для соединений (I — III, VI, XIII) и в вазелиновом масле для веществ (VII—X, XIV—XVI). Спектры ПМР снимали на спектрометре Bruker WP 60 (ФРГ), в импульсном режиме с фурье-преобразованием, в CDCl₃ и в CCl₄. Данные элементного анализа для всех синтезированных соединений удовлетворительно совпадали с вычисленными.

rac-1-О-(2-Бензилоксигексадецил)-2,3-изопропилиденглицерин (II). К раствору 2,0 г 1-О-(2-оксигексадецил)-2,3-изопропилиденглицерина (I) в 25 мл бензола прибавляли 0,4 г порошкообразной КОН и 2,56 мл хлористого бензола, смесь кипятили с одновременным удалением воды азеотропной отгонкой. Затем растворитель удаляли в вакууме, остаток разбавляли 50 мл хлороформа, промывали водой (3×20 мл), сушили Na₂SO₄. После удаления растворителя вещество очищали хроматографически, элюируя его петролейным эфиром. Выход 2,1 г (84%). R_f 0,8 (А). ИК-спектр (см⁻¹): 3100—3000 (C₆H₅); 2940 (CH), 2875 (CH); 1620, 1500 (C₆H₅); 1475, 1380 (CH); 1220 (CH₂C₆H₅); 1100 (C—O—C); 850, 740, 710 (C₆H₅). Спектр ПМР (δ, м.д.): 0,95 (CH₃, т, 6 H); 1,0 (C(CH₃)₂, с); 1,1—1,5 (CH₂ цепи, м); 3,7 (CH₂O глицерина, м); 4,48 (CH₂C₆H₅, с)*.

rac-1-О-(2-Бензилоксигексадецил)глицерин (III). Раствор 2,1 г *rac*-1-О-(2-бензилоксигексадецил)-2,3-изопропилиденглицерина (II) в 50 мл конц. соляной кислоты и 50 мл хлороформа интенсивно перемешивали 30 мин. Затем растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в 50 мл хлороформа, промывали водой (3×20 мл), сушили Na₂SO₄. Остаток после удаления растворителя очищали хроматографированием, малополярные примеси элюировали смесью петролейный эфир — эфир (7:3), вещество

* т — триплет, м — мультиплет, с — синглет, д — дублет.

(III) — эфиром. Выход 1,8 г (95%). R_f 0,3 (Г); 0,5 (А). ИК-спектр (см^{-1}): 3450 (ОН); 3100—3000 (C_6H_5); 2970, 2875 (СН); 1600, 1500 (C_6H_5); 1220 (C_6H_5); 1100 (С—О—С); 850, 740, 710 (C_6H_5). Спектр ПМР (δ , м. д.): 0,96 (CH_3 , т, J 6 Гц); 1,1—1,5 (CH_2 цепи, м); 2,43 (CH_2OH , с); 3,15 (CH_2O глицерина, м); 4,5 ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, с).

гас-1-О-(2-Бензилоксигексадецил)-2-пальмитоилглицерин (VI). К раствору 2,2 г *гас-1-О-(2-бензилоксигексадецил)глицерина* (III) в 15 мл сухого CCl_4 и 1,5 мл сухого пиридина прибавляли по каплям при перемешивании (25 мин) раствор 1,74 г трифенилхлорсилана в 5 мл сухого CCl_4 . Затем к реакционной смеси приливали 2 мл пиридина и добавляли по каплям (10 мин) при перемешивании раствор 4,0 г хлорангидрида пальмитиновой кислоты в 10 мл сухого CCl_4 . Реакционную массу выдерживали 3 ч при 60° С, фильтровали через слой окиси алюминия, сорбент промывали CCl_4 . Соединенный фильтрат упаривали, к остатку добавляли 5 мл ацетона, 2 мл пиридина, 1 мл воды и 2,0 г кислого фтористого аммония. Смесь кипятили 15 мин, охлаждали, выливали в воду (20 мл) и экстрагировали хлороформом. Хлороформный слой сушили Na_2SO_4 , растворитель отгоняли в вакууме. Остаток очищали с помощью хроматографии, вещество элюировали смесью петролейный эфир — эфир, 7 : 3. Выход 2,1 г (84%). R_f 0,6 (А). ИК-спектр (см^{-1}): 3450 (ОН); 3100—3000 (C_6H_5); 2940, 2870 (СН); 1750 (СОО); 1600, 1500 (C_6H_5); 1470, 1380 (СН); 1200 (C_6H_5); 1120 (С—О—С); 850, 750, 710 (C_6H_5). Спектр ПМР (δ , м. д.): 0,92 (CH_3 , т, J 6 Гц); 1,1—1,5 (CH_2 цепи, м); 2,27 ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$, т, J 6 Гц); 2,5 (CH_2OH , с); 3,3 (CH_2O глицерина, м); 4,5 ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, с).

гас-цис-1-О-(9-Октадеценил)-2-лауроилглицерин (XIII) получали аналогично действием 2,45 г трифенилхлорсилана на 2,5 г *гас-цис-1-О-(9-октадеценил)глицерина* (XI) с последующим ацилированием сильного производного (XII) 2,5 г хлорангидрида лауриновой кислоты. Вещество очищали хроматографированием, элюируя смесью петролейный эфир — эфир, 3 : 1. Выход 2,5 г (65,8%). R_f 0,5 (А). ИК-спектр (см^{-1}): 3450 (ОН); 3020 (С=СН); 2940, 2870 (СН); 1740 (СОО); 1470, 1320 (СН); 1120 (С—О—С).

Натриевая соль гас-1-О-(2-бензилоксигексадецил)-2-пальмитоилглицеро-3-(β-бромэтил)фосфата (VII). К раствору 2,12 г β-бромэтилдихлорфосфата [6] в 10 мл сухого хлороформа при −20° С и перемешивании прибавляли по каплям (20 мин) раствор 1,45 г *гас-1-О-(2-бензилоксигексадецил)-2-пальмитоилглицерина* (VI) в 10 мл сухого хлороформа и 2,2 мл пиридина. Реакционную массу перемешивали 3 ч при 20° С, выдерживали 48 ч при 18—20° С. К реакционной смеси добавляли водный раствор Na_2CO_3 , перемешивали 2 ч, затем упаривали в вакууме досуха. Остаток хроматографировали, вещество (VII) элюировали хлороформом с 15% метанола. Выход 1,5 г (79%). R_f 0,5 (Б). ИК-спектр (см^{-1}): 3100—3000 (C_6H_5); 2940, 2860 (СН); 1750 (СОО); 1600, 1500 (C_6H_5); 1470, 1380 (СН); 1280 (Р—О); 1100 (С—О—С); 1060 (Р—О—С); 850, 770, 710 (C_6H_5); спектр ПМР (δ , м. д.): 0,91 (CH_3 , т, J 6 Гц); 1,2 (CH_2 цепи, м); 2,25 ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$, т, J 6 Гц); 3,3 (CH_2O глицерина, м); 4,0 ($\text{CH}_2\text{O}-\text{P}$, плечо); 4,32 ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, с).

Натриевая соль гас-1-О-(9-октадеценил)-2-лауроилглицеро-3-(β-бромэтил)фосфата (XIV) была получена из 1,2 г соединения (XIII) и 1,9 г β-бромэтилдихлорфосфата [6] в условиях синтеза фосфата (VII). Вещество очищали хроматографированием, элюируя смесью хлороформ — метанол, 19 : 1. Выход 0,8 г (47%). R_f 0,45 (Б).

Натриевая соль гас-1-О-(2-бензилоксигексадецил)-2-пальмитоилглицеро-3-фосфохолина (VIII). К раствору 1,5 г натривой соли (VII) в бензоле добавляли 6 мл триметиламина при −5° С и реакционную массу перемешивали 10 ч при 50° С. Затем упаривали в вакууме и остаток хроматографировали, вещество (VIII) элюировали смесью хлороформ — метанол, 1 : 1.

Выход 1,5 г (88,5%). R_f 0,1 (Б); 0,5 (В). ИК-спектр (см^{-1}): 3100–3000 (C_6H_5); 2940, 2870 (СН); 1750 (СОО); 1600, 1500 (C_6H_5); 1480, 1400 (СН); 1240 (Р–О); 1100 (С–О–С); 1060 (Р–О–С); 850, 750, 710 (C_6H_5). Спектр ПМР (δ , м.д.): 0,92 (CH_3 , т, J 6 Гц); 1,1–1,52 (CH_2 цепи, м); 2,15 (CH_2COO , т, J 6 Гц); 3,5 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$, с); 3,9 (CH_2O глицерина, м); 4,3 (CH_2O –Р, плечо); 4,5 ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, с).

*Натриевая соль *гас-цис-1-О-(9-октадеценил)-2-лауроилглицеро-3-фосфохолина* (XV)* была получена аналогично при реакции раствора 0,8 г соединения (XIV) в 15 мл сухого хлороформа с 3 мл триметиламина. Вещество хроматографировали, элюирование проводили смесью хлороформ–метанол, 1:1. Выход 0,69 г (81%). R_f 0,3 (В). ИК-спектр (см^{-1}): 3020 (СН=СН); 2940, 2870 (СН); 1740 (СОО); 1470, 1380 (СН); 1240 (Р–О); 1100 (С–О–С); 1050 (Р–О–С); 970 (С–С–N). Спектр ПМР (δ , м.д.): 0,93 (CH_3 , т, J 6 Гц); 1,4 (CH_2 цепи, м); 2,5 (CH_2COO , т, J 6 Гц); 3,8 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$, с); 4,0 (CH_2O глицерина, м); 4,2 (CH_2O –Р, плечо); 5,7 (СН=СН, т, J 6,5 Гц).

*Натриевая соль *гас-1-О-(2-оксигексадецил)-2-пальмитоилглицеро-3-фосфохолина* (IX)*. 1,0 г соединения (VIII) в 5 мл безводного этанола гидрировали (760 мм рт.ст., 20°С) в присутствии палладиевой черни (24 ч). Затем отфильтровывали катализатор, промывали его этанолом, фильтрат упаривали. Вещество перекристаллизовывали из ацетона. Выход 0,89 г (99%). R_f 0,4 (В); 0,2 (Б). Т. пл. 68–70°С. ИК-спектр (см^{-1}): 3600 (ОН); 2940, 2870 (СН); 1730 (СОО); 1470, 1380 (СН); 1230 (Р–О); 1110 (С–О–С); 1080 (Р–О–С); 950 (С–С–N). Спектр ПМР (δ , м.д.): 0,92 (CH_3 , т, J 6 Гц); 1,3 (CH_2 цепи, м); 2,15 (CH_2 –С–О, т, J 6 Гц); 3,3 (CH_2O глицерина, м); 3,6 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$, с); 4,0 (CH_2O –Р, плечо).

*Натриевая соль *гас-1-О-(2-суццинил-оксигексадецил)-2-пальмитоилглицеро-3-фосфохолина* (X)*. К раствору 0,5 г соединения (IX) в 10 мл сухого хлороформа добавляли раствор 2,0 г янтарного ангидрида в 10 мл ДМСО, затем 2 мл пиридина. Смесь выдерживали 12 ч при 50°С, охлаждали и обрабатывали водой и смесью хлороформ–метанол, 1:1. Органический слой отделяли, сушили Na_2SO_4 , упаривали в вакууме. Соединение (X) очищали с помощью хроматографии, элюируя смесью хлороформ–метанол, 1:4. Дополнительная очистка достигалась перекристаллизацией из ацетона. Выход 0,42 г (75%). R_f 0,1 (Б). ИК-спектр (см^{-1}): 3600 (ОН); 2940, 2860 (СН); 1730 (СОО); 1470, 1380 (СН); 1230 (Р–О); 1110 (С–О–С); 1050 (Р–О–С); 950 (С–С–N). Спектр ПМР (δ , м.д.): 0,93 (CH_3 , т, J 6 Гц); 1,28 (CH_2 цепи, м); 2,1 (CH_2COO , т, J 6 Гц); 3,24 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$, с); 3,5 (CH_2O глицерина, м); 4,0 (CH_2 –О–Р, плечо); 10,95 (CH_2COOH , с).

гас-1-О-(8-Карбоксиоктил)-2-лауроилглицеро-3-фосфохолин (XVI). К 300 мг фосфатидилхолина (XV) в 90 мл 90% уксусной кислоты приливали при перемешивании раствор окислителя, содержащий 0,024 М KMnO_4 и 0,02 М NaIO_4 (~90 мл), пока окраска раствора не переставала изменяться. Реакционную массу обесцвечивали 20% раствором $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Вещество экстрагировали смесью хлороформ–метанол, 2:1. Хлороформный слой сушили Na_2SO_4 и упаривали. Остаток хроматографировали. Малополярные примеси элюировали смесью хлороформ–метанол (1:1), вещество – смесью хлороформ–метанол (1:4). Полученную соль *гас-1-О-(8-карбоксиоктил)-2-лауроилглицеро-3-фосфохолина* пропускали последовательно через ионообменные смолы IR-40 и IRC-50, элюируя вещество (XVI) смесью метанол–вода, 10:1. Выход 200 мг (76%). R_f 0,3 (В). Спектр ПМР (δ , м.д.): 0,93 (CH_3 , т, J 6 Гц); 1,4 (CH_2 цепи, м); 2,5 (CH_2COO , т, J 6 Гц); 3,3 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$, с); 3,7 (CH_2O глицерина, м); 4,0 (CH_2 –О–Р, плечо); 11,22 (CH_2COOH , с).

ЛИТЕРАТУРА

1. Rock C. O., Snyder F. (1975) *J. Biol. Chem.*, **25**, 6564-6566.
2. Серебренникова Г. А., Парфенов Э. А., Перлова Н. А., Преображенский Н. А. (1966) *Ж. общ. химии*, **2**, 1580-1583.
3. Розинг А. Э., Гудкова С. Ф., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1975) *Ж. общ. химии*, **41**, 2308-2311.
4. Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1975) *Биоорганич. химия*, **1**, 1307-1312.
5. Kates M. (1974) *J. Lipid Res.*, **15**, 525-527.
6. Weltzien H. U., Westphal O. (1967) *Ann. Chem.*, **709**, 240-243.
7. Ансалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. (1977) *Биоорганич. химия*, **3**, 1553-1559.

Поступила в редакцию
12.XII.1978

SYNTHESIS OF MODIFIED PHOSPHOLIPIDS

EVSTRATOVA N. G., VASILENKO I. A., POPOVA T. P.,
SEREBRENNIKOVA G. A., EVSTIGNEEVA R. P.

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

The synthesis of *rac*-1-O-(2-hydroxyhexadecyl)-, 1-O-(2-succinyloxyhexadecyl)- and 1-O-(8-carboxyocetyl)-2-acylglycero-3-phosphocholines is described. These modified phospholipids having ether bond can be used as ligands for biospecific chromatography of membrane proteins.
