



УДК 577.352.336

СИНТЕЗ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЧЕННЫХ ДЕЙТЕРИЕМ ГЛИКОЗИЛДИГЛИЦЕРИДОВ В  $^2\text{H}$ -ЯМР-ИССЛЕДОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ ЛИПИДОВСорокоумова Г. М., Гусев Д. Г., Василенко И. А.,  
Канлун А. П., Швеу В. И.

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

Галактозил- и глюкозилдиглицериды, меченные дейтерием в различных положениях гидрофобной области, были получены полным химическим синтезом с использованием подходов, ранее разработанных при синтезе гликозилдиглицеридов. Методом  $^2\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии проведено изучение динамики и обратимости полиморфных превращений водных дисперсий, состоящих из гликозилдиглицеридов, а также их смесей с фосфатидилглицерином. Обнаружено, что полностью насыщенные галактозилдиглицериды претерпевают быстро обратимый термотропный фазовый переход бислойная фаза — гексагональная фаза, а глюкозилдиглицериды в широком интервале температур (25–80°С) образуют гексагональную ( $\text{H}_{11}$ ) фазу. Показано, что добавление фосфатидилглицерина к гликозилдиглицеридам стабилизирует бислойную организацию липидов, а введение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в смесь гликозилдиглицерид — фосфатидилглицерин при увеличении температуры стимулирует разрушение бислойа.

Большое число работ, опубликованных в последнее десятилетие, посвящено изучению взаимосвязи полиморфных превращений липидов в модельных и биологических мембранах с функциональной активностью мембран [1–3]. Полиморфные превращения в мембранах связывают с наличием в них липидов, неспособных формировать бислой. Основными представителями такого типа липидов являются ненасыщенный фосфатидилэтаноламин [4], кардиолипин в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  [5], моноглюкозилдиглицерид из *Acholeplasma laidlawii* A [6] и моногалактозилдиглицериды из растительных источников [3]. Модельные мембраны, содержащие фосфатидилэтаноламин или кардиолипин, изучены более подробно, чем системы, содержащие моногликозилдиглицериды. При изучении полиморфизма фосфатидилэтанолamina и кардиолипина широко использовалась спектроскопия  $^{31}\text{P}$ -ЯМР широких линий, поскольку форма липид в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР может быть четко связана с полиморфным состоянием фосфолипидной дисперсии [1].

При изучении полиморфного поведения гликозилдиглицеридов можно использовать спектроскопию ЯМР на ядрах дейтерия, что требует наличия меченных дейтерием липидов. Использование спектроскопии  $^2\text{H}$ -ЯМР основано на том, что если молекула липида подвержена анизотропному движению (во временной шкале ЯМР), то в спектрах  $^2\text{H}$ -ЯМР проявляется квадрупольное расщепление, величина которого связана с полиморфным состоянием мембранной системы [7].

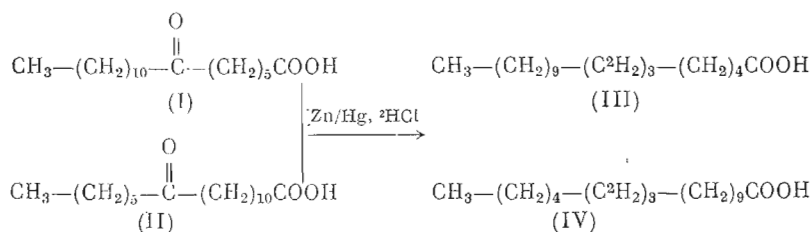
Введение дейтерия может быть осуществлено либо биосинтетическим, либо химическим путем. Химический синтез меченных дейтерием гликозилдиглицеридов в литературе не описан. Таким образом, целью данной работы явилось: синтез меченных дейтерием гликозилдиглицеридов и использование их при изучении полиморфизма модельных мембран, содержащих индивидуальные гликозилдиглицериды и их смеси с фосфатидил-

Сокращения: 1,2-дистеароил(6,6,7,7,8,8- $^2\text{H}_6$ )-3-О-( $\beta$ -D-галактопиранозил)-глицерин — 6,7,8- $d_6$ -DSGalG; 1,2-дистеароил(11,11,12,12,13,13- $^2\text{H}_6$ )-3-О-( $\beta$ -D-галактопиранозил)-глицерин — 11,12,13- $d_6$ -DSGalG; 1-стеароил(11,11,12,12,13,13- $^2\text{H}_6$ )-2-олеоил-3-О-( $\beta$ -D-галактопиранозил)-глицерин — 11,12,13- $d_6$ -SOGalG; 1,2-дистеароил(6,6,7,7,8,8- $^2\text{H}_6$ )-3-О-( $\beta$ -D-глюкопиранозил)-глицерин — 6,7,8- $d_6$ -DSGluG; 1,2-дистеароил(11,11,12,12,13,13- $^2\text{H}_6$ )-3-О-( $\beta$ -D-глюкопиранозил)-глицерин — 11,12,13- $d_6$ -DSGluG; 1-стеароил(11,11,12,12,13,13- $^2\text{H}_6$ )-2-олеоил-3-О-( $\beta$ -D-глюкопиранозил)-глицерин — 11,12,13- $d_6$ -SO-GluG; гликозилдиглицериды (гликолипиды) — GL; фосфатидилглицерин — PG.

глицерином, а также в исследовании кинетики и обратимости фазовых превращений этих систем с использованием спектроскопии  $^2\text{H}$ -ЯМР.

Необходимым этапом работы явилось получение гликозилдиглицеридов, меченных дейтерием в гидрофобной области. Существуют различные способы полного и селективного дейтерирования жирных кислот [8]. В данной работе дейтерированные жирные кислоты (III), (IV) (схема 1) получали восстановлением по Клемменсену [9] соответствующей кетокислоты (I, II, схема 1). При обработке кетокислот амальгамой цинка в дейтерированной соляной кислоте паряду с восстановлением кетогруппы, очевидно, происходит и обмен на дейтерий протонов, находящихся при атомах углерода в  $\alpha$ -положении к ней, т. е. образуются соединения, содержащие 6 атомов дейтерия при трех соседних атомах углерода, что было доказано масс-спектрометрией.

Схема 1



Липиды, в том числе и гликозилдиглицериды, содержащие дейтерий в гидрофобной области молекулы, могут быть получены ацилированием соответствующих производных глицерина дейтерированными жирными кислотами.

Мы получали гликозиды путём гликозилирования по Кенигсу — Кнорру [10] 1,2-изопропилиден-*rac*-глицерина (VII) (схема 2, путь А) и 1-(11,11,12,12,13,13 - гексадейтеростеароил)-2 - олеоил-*rac*-глицерина (VIII) (схема 2, путь Б). Гликозилирование проводилось ацетобромгалактазой (V) (схема 2) и ацетобромглюкозой (VI) (схема 2) в хлороформе в присутствии окиси серебра и драйерита. Во всех случаях образовывались почти исключительно 1,2-*trans*-гликозиды (XV) — (XVII), (XXI), (XXII) (схема 2).

Путь А включает в себя гликозилирование соединения (VII), удаление изопропилиденовой защитной группы соляной кислотой в этаноле и ацилирование 1,2-*trans*-гликозилглицеринов (IX), (X) хлораггидридами меченных дейтерием кислот. Последующее удаление ацетильных защит гидразингидратом приводит к получению гликозилдиглицеридов (XV) — (XVIII).

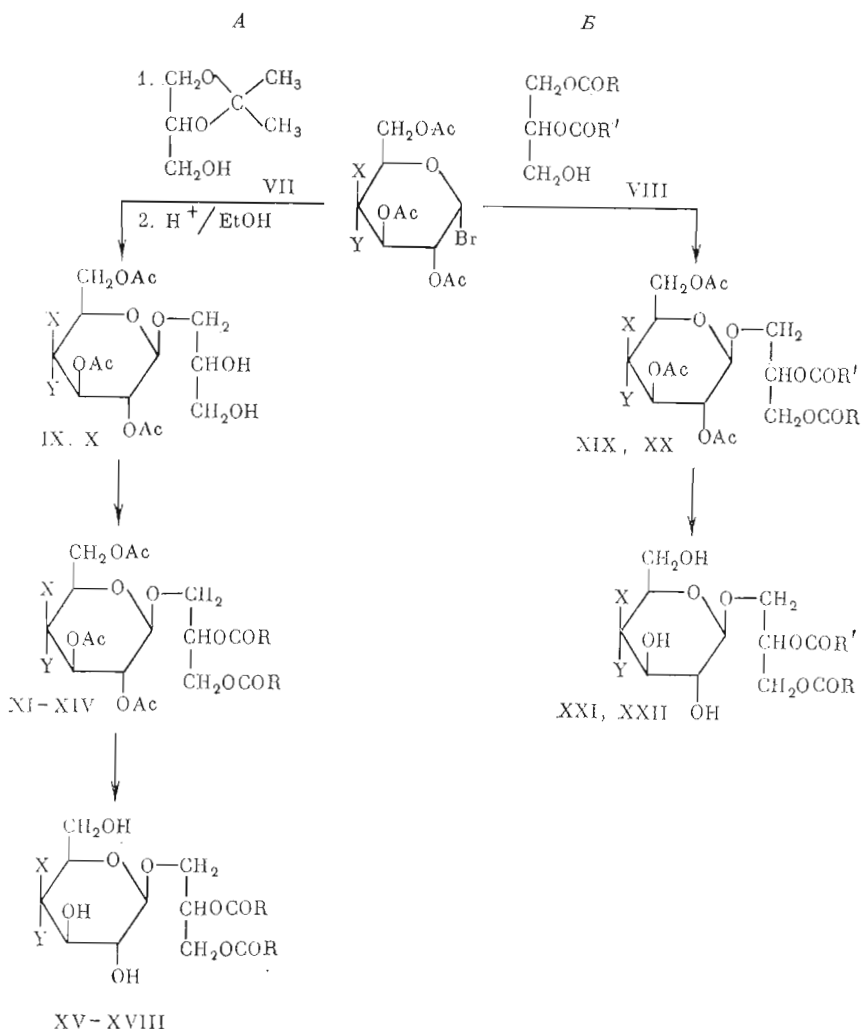
Путь Б состоит в гликозилировании диацилглицеринов (VIII) и удалении ацетильных защит, в результате чего получают соединения (XXI), (XXII). Структура и индивидуальность синтезированных гликозилдиглицеридов была доказана различными физико-химическими методами.

Синтезированные галактозил- и глюкозилдиглицериды были использованы при исследовании полиморфизма индивидуальных гликозилдиглицеридов и их смесей с фосфолипидами методом  $^2\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии.

Метод  $^2\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии основан [7, 11] на том, что взаимодействие квадрупольного момента дейтерия (спин 1) с электрическим полем окружающих ядро электронов приводит (во внешнем магнитном поле) к появлению возможности двух резонансных переходов между энергетическими уровнями со спиновыми квантовыми числами  $1 \rightarrow 0$ ,  $0 \rightarrow -1$ . Таким образом, в теоретическом спектре  $^2\text{H}$ -ЯМР наблюдаются два сигнала резонанса.

Величина квадрупольного расщепления для дейтерия в гидрофобной области липидного бислоя определяется главным образом вращением липидной молекулы. В случае идеально упорядоченного бислоя угол между связью  $\text{C}-^2\text{H}$  и осью вращения молекулы  $\psi = 90^\circ$ , а рассчитанное значение квадрупольного расщепления 62 кГц. В гексагональной фазе появ-

Схема 2



V, IX, XI, XIII, XIX: X=OAc, Y=H

VI, X, XII, XIV, XX: X=H, Y=OAc

XV, XVII, XXI: X=OH, Y=H

XVI, XVIII, XXII: X=H, Y=OH

R =  $-(\text{CH}_2)_4-(\text{C}^2\text{H}_2)_3-(\text{CH}_2)_9-\text{CH}_3$  (XI, XII, XV, XVI)

$-(\text{CH}_2)_9-(\text{C}^2\text{H}_2)_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$  (VIII, XIII, XIV, XVII, XVIII, XIX-XXII)

R' =  $(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$  (VIII, IX-XXII)

ляется дополнительное динамическое усреднение, вызванное вращением липидной молекулы вокруг оси симметрии цилиндра ( $\psi_2=90^\circ$ ), и квадрупольное расщепление уменьшается еще вдвое. В реальных липидных агрегатах (выше температуры фазового перехода гель — жидкий кристалл) квадрупольное расщепление меньше теоретических значений, что, естественно, связано с более богатой динамикой в их гидрофобной области. Так, значение квадрупольного расщепления в водных дисперсиях, где липиды находятся в ламеллярной фазе (выше температуры фазового перехода гель — жидкий кристалл), может изменяться в широких пределах: от 35 до 1 кГц в зависимости от положения дейтериевой метки в молекуле [12]. Структурам с изотропным движением липидов в спектре  $^2\text{H}$ -ЯМР соответствует единичный узкий сигнал [11, 13].

Чувствительная зависимость величины квадрупольного расщепления в спектрах  $^2\text{H}$ -ЯМР от модели анизотропного движения дейтерия позволяет надежно детектировать в липидных агрегатах фазовые переходы, связанные с изменением их структурных и динамических параметров.

В данной работе методом  $^2\text{H}$ -ЯМР исследовали полиморфные превращения гликозилдиглициридов, меченных дейтерием в различных положениях жирнокислотных цепей.

При изучении полиморфизма водных дисперсий 6,7,8- $d_6$ -DSGalG было обнаружено, что величина квадрупольного расщепления уменьшается

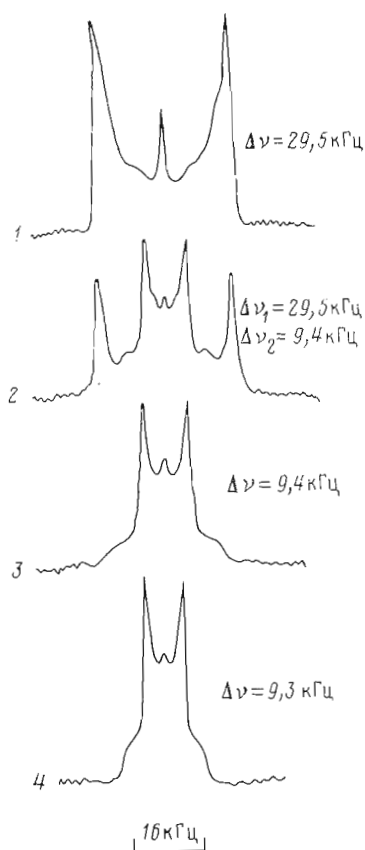


Рис. 1. Спектры  $^2\text{H}$ -ЯМР водной дисперсии 6,7,8- $d_6$ -DSGalG при 70 (1), 72 (2), 75 (3) и 80° С (4)

с 29,5 до 9,4 кГц в интервале температур 65–75° С (выше температуры фазового перехода гель — жидкий кристалл). При температуре 70° С в спектре  $^2\text{H}$ -ЯМР наблюдаются два квадрупольных расщепления, величина которых равна соответственно 29,3 и 9,4 кГц (рис. 1). Для водных дисперсий, состоящих из 11,12,13- $d_6$ -DSGalG, при повышении температуры с 65 до 75° С происходит изменение величины квадрупольного расщепления с 25,2 до 5,5 кГц, а при 69° С наблюдаются два квадрупольных расщепления (25,2 и 5,9 кГц) одновременно (рис. 2). Таким образом, для полностью насыщенных галактозилдиглициридов фазовый переход бислойная фаза — гексагональная фаза наблюдается в районе температур 69–71° С.

При замене одного жирнокислотного остатка стеариновой кислоты на олеиновую в галактозилдиглицириде 11,12,13- $d_6$ -SOGalG при 35° С наблюдается разрушение бислой (рис. 2). Изучение фазового состояния водной дисперсии 6,7,8- $d_6$ -DSGluG и 11,12,13- $d_6$ -DSGluG показало, что квадрупольное расщепление в интервале температур от 55 до 80° С изменяется с 7,0 до 5,5 кГц (рис. 2), что соответствует гексагональной организации липидов в агрегатах в этом интервале температур. Замена же одного жирнокислотного остатка стеариновой кислоты на олеиновую приводит только к понижению температуры фазового перехода гель — жидкий кристалл (для DSGluG температура перехода ~55° С, а для SOGluG <19° С), а гексагональная упаковка липидов в агрегатах сохраняется.

Таким образом, при изучении температурной зависимости квадрупольного расщепления синтезированных соединений 6,7,8- $d_6$ -DSGalG, 11,12,13- $d_6$ -DSGalG, 11,12,13- $d_6$ -SOGalG и 6,7,8- $d_6$ -DSGluG, 11,12,13- $d_6$ -DSGluG, 11,12,13- $d_6$ -SOGluG необходимо учитывать, что при температуре выше фазового перехода гель — жидкий кристалл (65° С для DSGalG и 25° С для SOGalG) эти соединения находятся в ламеллярной фазе и при увеличении температуры претерпевают переход в гексагональную фазу ( $\text{H}_{11}$ ), а гликозилдиглицириды образуют только гексагональную фазу и существование ламеллярной фазы для данного типа соединений методом  $^2\text{H}$ -ЯМР не обнаружено. Такое различие в полиморфном поведении этих липидов можно объяснить, вероятно, различием степени их гидратации, что отмечалось ранее в работах [6, 14].

Сравнивая полиморфное поведение галактозилдиглициридов, различающихся жирнокислотным составом, мы обнаружили, что переход бислойная фаза — небислойная фаза существенно зависит от жирнокислотного состава (рис. 2), как уже было показано ранее для фосфатидилэтанолamina и кардиолина [4, 5], т. е. можно сделать вывод, что явление зависимости температуры фазового перехода бислойная фаза — гекса-

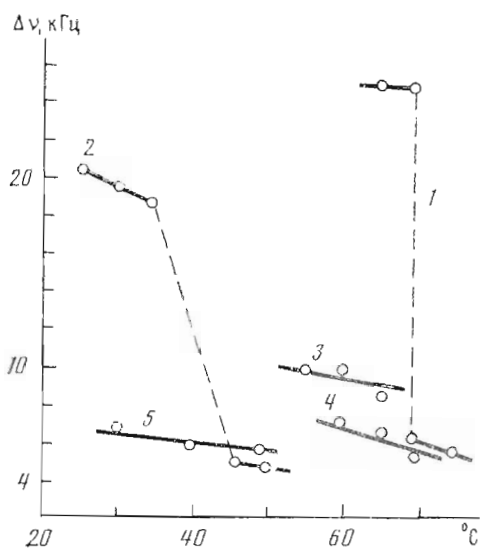


Рис. 2

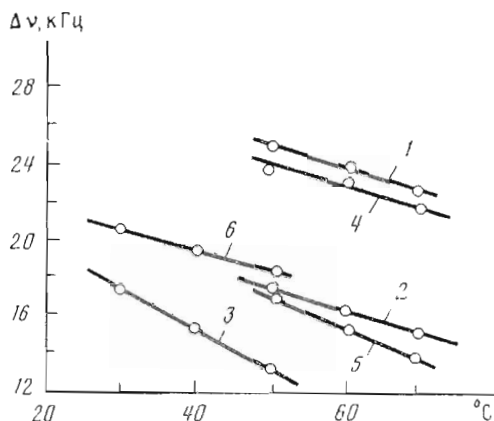


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость величины квадрупольного расщепления от температуры для водных дисперсий 11,12,13- $d_6$ -DSGalG (1), 11,12,13- $d_6$ -SOGalG (2), 6,7,8- $d_6$ -DSGluG (3), 11,12,13- $d_6$ -DSGluG (4), 11,12,13- $d_6$ -SOGluG (5)

Рис. 3. Зависимость величины квадрупольного расщепления от температуры для водных дисперсий смесей 6,7,8- $d_6$ -DSGalG/PG (1), 11,12,13- $d_6$ -DSGalG/PG (2), 11,12,13- $d_6$ -SOGalG/PG (3), 6,7,8- $d_6$ -DSGluG/PG (4), 11,12,13- $d_6$ -DSGluG/PG (5), 11,12,13- $d_6$ -SOGluG/PG (6) при мольном соотношении липидов 2 : 1

гопальная фаза от жирнокислого состава — общее свойство для «небислойных липидов». Важно отметить тот факт, что указанный переход для водных дисперсий, содержащих только ненасыщенные галактозилдиглицериды, полностью обратим и время перехода в прямом (при нагревании) и обратном (при охлаждении) направлении мало (в нашем эксперименте 10–15 мин).

Ранее [15] нами при изучении полиморфизма водных дисперсий смесей гликозилдиглицеридов с фосфатидилглицерином было показано, что добавление последнего к гликозилдиглицеридам приводит к стабилизации бислойной упаковки липидов. Это было подтверждено методом  $^2\text{H}$ -ЯМР для смесей всех вышеописанных гликозилдиглицеридов с фосфатидилглицерином в мольном соотношении гликозилдиглицерид — фосфатидилглицерин 2 : 1. Так, в интервале температур 50–80°С для полностью насыщенных гликозилдиглицеридов и 25–55°С для стеароил-олеоилгликозилдиглицеридов наблюдается величина квадрупольного расщепления, характерная для бислойной структуры водной дисперсии липидов (рис. 3).

При добавлении ионов  $\text{Ca}^{2+}$  к смеси 11,12,13- $d_6$ -SOGalG/PG в соотношении PG/ $\text{Ca}^{2+}$ =1 при 40°С наблюдается разрушение бислойной структуры, о чем можно судить по уширенному в основании «изотропному» сигналу. Дальнейшее нагревание смеси до 45°С вызывает полное разрушение бислой и образование агрегатов с изотропным движением молекул липидов. Последующее постепенное охлаждение до 20°С не приводит к изменению характера движения липидных молекул, и только более сильное и длительное охлаждение (2°С, 12 ч) возвращает систему к первоначальному состоянию бислоя (рис. 4).

Эти данные соответствуют результатам, полученным нами для смесей GL/PG+ $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Mg}^{2+}$ ) методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. Однако следует отметить, что переход гексагональная фаза — бислойная фаза для смеси дипальмитоилгалактозилдиглицерид — PG в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  при постепенном охлаждении от 50 до 25°С происходит не сразу. Как и в предыдущем случае, система возвращается в первоначальное бислойное состояние только при более сильном и еще более длительном охлаждении (2°С, 10 сут).

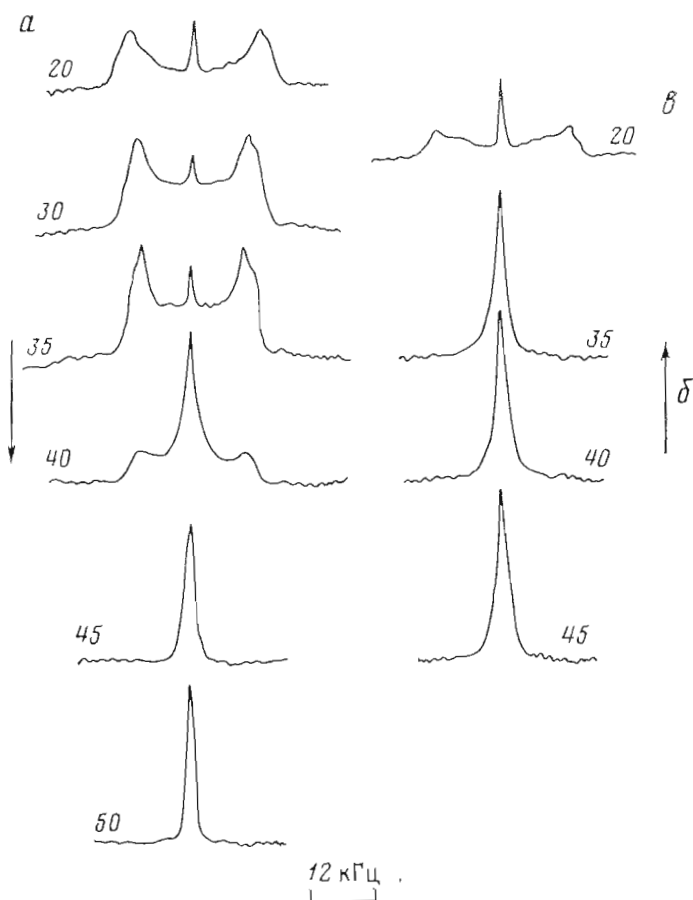


Рис. 4. Спектры  $^2\text{H}$ -ЯМР водной дисперсии смеси 11,12,13- $d_6$ -SOGalG/PG (мольное соотношение липидов 2:1) в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (PG :  $\text{Ca}^{2+}$  = 1) при повышении (а) и понижении (б) температуры, после выдерживания при  $2^\circ\text{C}$  в течение 12 ч (в). Цифры соответствуют температуре съемки

Из этого следует, что на время фазового перехода небислойные структуры — бислой оказывают влияние длина жирнокислотных остатков в молекуле галактолипидов (данные  $^31\text{P}$ -ЯМР будут представлены в следующей работе).

Кроме фазового перехода (бислойная фаза —  $\text{H}_{\text{II}}$ -фаза) при исследовании методом  $^2\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии поведения водных дисперсий гликозилдиглицеридов, меченных дейтерием в различных положениях жирнокислотных цепей, и их смесей с фосфатидилглицерином мы наблюдаем (рис. 2 и 3) зависимость величины квадрупольного расщепления от положения дейтериевой метки в цепи, что связано с различной анизотропией движения фрагментов жирнокислотной цепи. Вместе с тем наблюдается и плавное уменьшение величины квадрупольного расщепления с увеличением температуры (если липиды не претерпевают фазовый переход бислойная — гексагональная фаза). Такое явление отражает увеличение подвижности всей жирнокислотной цепи с ростом температуры [12].

Таким образом, анализ полученных экспериментальных данных позволяет заключить, что: 1) насыщенные галактозилдиглицериды претерпевают быстро обратимый термотропный фазовый переход бислойная фаза — гексагональная фаза, а глюкозилдиглицериды в широком интервале температур образуют гексагональную фазу; 2) добавление фосфатидилглицерина к гликозилдиглицеридам стабилизирует бислойную организацию липидов в модельных мембранах; 3) введение  $\text{Ca}^{2+}$  в смеси

глицозилдиглицерид — фосфатидилглицерин стимулирует разрушение бислоя при увеличении температуры с 20 до 50° С, причем время возвращения этой смеси в первоначальное состояние составляет не менее 12 ч.

### Экспериментальная часть

ИК-спектры снимали на спектрометре Shimadzu (Япония) в вазелиновом масле, спектры <sup>1</sup>H- и <sup>2</sup>H-ЯМР были получены на импульсном фурье-спектрометре Bruker WM-250 (ФРГ) с рабочей частотой 250,1 и 38,4 МГц соответственно.

Для съемки <sup>2</sup>H-ЯМР-спектров во всех случаях использовалась импульсная последовательность «квадрупольное эхо» [11]. Величина импульса 90° составила 10 мкс, что позволило наблюдать спектры шириной до 100 кГц. Полученные спектры, как правило, содержали 1024 точки, а спад индуцированного сигнала подвергался экспоненциальному умножению для улучшения соотношения сигнал/шум, что привело к уширению линий на середине высоты на 50–100 Гц. В ряде случаев для устранения искажений формы линии и улучшения соотношения сигнал/шум в 2 раза спектры были подвергнуты симметризации относительно несущей частоты [12].

Температура образца в ходе экспериментов устанавливалась и контролировалась с помощью блока регулировки температур спектрометра с точностью 0,5° С.

Масс-спектры снимали на приборе Varian CH-5 (США); ионизация электронным ударом (70 эВ) при температуре ионизационной камеры 250–270° С. Углы вращения измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 241 MC (Швеция) в хлороформе. ГЖХ проводили на приборе Chrom-4 (ЧССР), детектор ионизационно-пламенный, скорость газа-носителя (N<sub>2</sub>) 5 мл/мин, колонка (2500×14 мм) с 10% полиэтиленгликольадипината, температура колонки 190° С, испарителя 260° С. ТСХ проводили на силикагеле в системах растворителей: гексан — эфир, 1 : 1 (А); хлороформ — ацетон — метанол, 8 : 1 : 1 (Б); хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (В). Для всех вновь полученных веществ был получен удовлетворительный элементный анализ.

*1,2-Изопропилден-г-глицерин (VII, n<sub>D</sub> 1,4345 [16]) и 1-(11,11,12,12,13,13-гексадейтеростеариол)-2-олеил-г-глицерин (VIII) (воскообразное вещество, R<sub>f</sub> 0,56 (А) [17]) синтезировали как описано ранее.*

*3-О-(2,3,4,6-Тетра-О-ацетил-β-D-галактопиранозил)-г-глицерин (IX) и 3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)-г-глицерин (X) получали по методу [18].*

*6,6,7,7,8,8-Гексадейтеростеариновая кислота (III). К 6,6 г цинковой пыли добавляли 1 мл <sup>2</sup>HCl и 5 мл <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, затем прибавляли 1,65 г ртути, встряхиванием получали мелкие гранулы амальгамы цинка. В ту же колбу добавляли 2 г 7-кетостеариновой кислоты [19] (I, т. пл. 74–76° С), затем 10 мл диоксиана и 10 мл <sup>2</sup>HCl. Реакционную массу нагревали до 70° С и активно перемешивали при этой температуре в течение 3 ч, затем добавляли еще 5 мл <sup>2</sup>HCl. Реакционную массу нагревали до 70° С, выдерживали 24 ч при перемешивании и охлаждали. Выкристаллизовавшуюся массу отделяли от остатков амальгамы цинка и перекристаллизовывали из петролейного эфира. Получали 1,65 г (83,7%) кристаллов, т. пл. 70–71° С, R<sub>f</sub> 0,88 (А). Масс-спектр (m/z): 290 (M<sup>+</sup>).*

*11,11,12,12,13,13-Гексадейтеростеариновая кислота (IV) была получена по методике, описанной для соединения (III), восстановлением 12-кетостеариновой кислоты [20] (II, т. пл. 75° С). Выход 1,65 г (84%), т. пл. 70–71° С, R<sub>f</sub> 0,88 (А). Масс-спектр (m/z): 290 (M<sup>+</sup>).*

*1,2-Ди-(6,6,7,7,8,8-гексадейтеростеариол) - 3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-галактозил)-г-глицерин (XI). К смеси 1,5 г 3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-галактопиранозил)-г-глицерина (IX) и 12 мл пиридина в 45 мл толуола прибавляли 2,3 г хлорангидрида 6,6,7,7,8,8-гексадейтеростеариновой кислоты и энергично перемешивали 2 ч при 0° С, затем кипятили с перемешиванием в течение 6 ч. После этого отделяли выпавший осадок, фильтрат упаривали. Остаток кристаллизовали из метилового спирта. Выход 3,13 г (91,2%), т. пл. 61–62° С, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –0,74° (с 0,5), R<sub>f</sub> 0,59 (А). ИК-спектры (см<sup>-1</sup>): 1740 (C=O), 1215 (C–O–C), 920 (пиранозное кольцо), 900 (C–H у аномерного атома).*

*1,2-Ди-11,11,12,12,13,13-гексадейтеростеариол-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-галактопиранозил)-г-глицерин (XIII) получен по методике, описанной для соединения (XI). Выход 3,10 г (90,4%), т. пл. 61–62° С, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –0,72° (с 0,5), R<sub>f</sub> 0,59 (А). ИК-спектр аналогичен спектру соединения (XI).*

*1,2-Ди-(6,6,7,7,8,8-гексадейтеростеариол)-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)-г-глицерин (XII) и 1,2-ди-11,11,12,12,13,13-гексадейтеростеариол-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)-г-глицерин (XIV) синтезировали по методу, приведенному для соединения (XI), выходы 1,86 г (90,6%) и 1,84 г (90,4%) соответственно. Оба вещества имели одинаковые физико-химические константы: т. пл. 92–93° С, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –8,5° (с 0,6), R<sub>f</sub> 0,59 (А). ИК-спектр (см<sup>-1</sup>): 1750 (C=O), 1170 (C–O у аномерного атома), 1070, 1050, 1020 (C–O–C), 910 (пиранозное кольцо), 890 (C–H у аномерного атома).*

*1,2-Ди-(6,6,7,7,8,8-гексадейтеростеариол)-3-О-(β-D-галактопиранозил) - г-глицерин (XV). К 3,13 г соединения (XI) в 50 мл метанола прибавляли 1,8 мл гидразингидрата и кипятили 1,5 ч. Затем реакционную смесь нейтрализовали 85% муравьиной кислотой. Метанол упаривали, остаток растворяли в хлороформе, промывали водой и упаривали. Маслообразный остаток хроматографировали на колонке с силикагелем,*

элюировали хлороформом, а затем смесью хлороформ — метанол, 98 : 2. Кристаллизировали из метанола. Выход (69,8%), т. пл. 148–150° С,  $[\alpha]_D^{20}$  –5,6 (с 0,5),  $R_f$  0,48 (Б) и 0,67 (В). ИК-спектр (см<sup>-1</sup>): 3600–3100 (ОН), 1750 (С=О), 1260, 1230 (С–О), 1170 (С–О у аномерного атома), 910 (пиранозное кольцо), 890 (С–Н у аномерного атома). <sup>1</sup>Н-ЯМР (δ, м.д.): ряд сигналов в областях 5,40–4,80 и 4,32–3,50 (11Н, Н<sup>2</sup>, Н<sup>3</sup>, Н<sup>4</sup>, Н<sup>5</sup>, Н<sup>6</sup> в галактозе, СН<sub>2</sub>О, СНО в глицерине), 4,56 (Н<sup>1</sup>,  $J_{1,2}$  = 7,0 Гц), 2,2–0,8 (СН<sub>2</sub>, СН<sub>3</sub> в ОСОР).

*1,2-Ди-(11,11,12,12,13,13-гексадейтеростеароил)-3-О-(β-D-галактопиранозил)-гас-глицерин (XVII)* получен по методике, приведенной для соединения (XV). Выход 1,75 г (68,3%), т. пл. 148–150° С,  $R_f$  0,67 (В). ИК- и ЯМР-спектры аналогичны спектрам галактозида (XV).

*1,2-Ди-(6,6,7,7,8,8 - гексадейтеростеароил)-3-О-(β-D-глюкопиранозил)-гас-глицерин (XVI) и 1,2-ди-(11,11,12,12,13,13-гексадейтеростеароил)-3-О-(β-D-глюкопиранозил)-гас-глицерин (XVIII)* синтезировали по методу, приведенному для соединения (XVII). Выходы 1,06 г (69,3%), 1,04 г (69,4%) соответственно. Оба вещества имели одинаковые физико-химические константы: т. пл. 152–154° С,  $[\alpha]_D^{20}$  –11,8° (с 0,5),  $R_f$  0,67 (В). ИК-спектры (см<sup>-1</sup>): 3600–3100 (ОН), 1740, 1720 (С=О), 1170 (С–О у аномерного атома), 910 (пиранозное кольцо), 890 (С–Н у аномерного атома). <sup>1</sup>Н-ЯМР (δ, м.д.): ряд сигналов в областях 5,40–4,80 и 4,32–3,50 (11Н, Н<sup>2</sup>, Н<sup>3</sup>, Н<sup>4</sup>, Н<sup>5</sup>, Н<sup>6</sup> в глюкозе, СН<sub>2</sub>О, СНО в глицерине), 4,56 (1Н, Н<sup>1</sup>,  $J_{1,2}$  = 7,0 Гц), 2,2–0,8 (СН<sub>2</sub>, СН<sub>3</sub> в ОСОР).

*1-(11,11,12,12,13,13-Гексадейтеростеароил)-2-олеоил-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-галактопиранозил)-гас-глицерин (XIX)*. Смесь 1 г диглицерида (VIII), 2 г свежеприготовленного оксида серебра, 8 г драйерита и 30 мл хлороформа перемешивали 2ч при 20–25° С в темноте. Затем к реакционной массе добавляли 30 мг вода и по каплям прибавляли за 30 мин раствор 1,2 г 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-α-D-галактозилпиранозилбромид [21] (V, т. пл. 82–83° С,  $[\alpha]_D^{20}$  +215° (хлороформ)) в 15 мл хлороформа, реакционную массу перемешивали 3 сут. После отделения осадка хлороформный раствор упаривали и остаток очищали на колонке с силикагелем, элюируя системой петролейный эфир — эфир, 1 : 1. Выход галактозида (XIX), 1,03 г (68,6%), маслообразное вещество,  $[\alpha]_D^{20}$  +0,6° (с 0,5),  $R_f$  0,48 (А). ИК-спектр (см<sup>-1</sup>): 3020 (СН=СН), 1740 (С=О), 1235, 1215 (С=О в ОСОР), 920 (пиранозное кольцо), 900 (С–О у аномерного атома).

*1-(11,11,12,12,13,13-Гексадейтеростеароил)-2-олеоил-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)-гас-глицерин (XX)*. Из 1,0 г диглицерида (VIII) и 1,2 г 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-α-D-глюкозилпиранозилбромид [21] (VI, т. пл. 88–89° С,  $[\alpha]_D^{20}$  +198° (хлороформ)) в присутствии 2 г оксида серебра и 8 г драйерита по методике, описанной для галактозида (XIX), получили 1,01 г (67,3%) соединения (XX),  $[\alpha]_D^{20}$  –7,2° (с 0,5),  $R_f$  0,48 (А). ИК-спектр (см<sup>-1</sup>): 1750 (С=О), 1220 (С–О в ОСОР), 1170 (С–О у аномерного атома), 1070, 1050, 1020 (С–О в СОС), 910 (пиранозное кольцо).

*1-(11,11,12,12,13,13-Гексадейтеростеароил)-2-олеоил-3-О-(β-D-галактопиранозил)-гас-глицерин (XXI)* получали по методике, приведенной для соединения (XV). Выход 0,605 г (74,2%), маслообразное вещество,  $[\alpha]_D^{20}$  –5,6° (с 0,5),  $R_f$  0,67 (В); 0,48 (Б). ИК-спектр (см<sup>-1</sup>): 3600–3100 (ОН), 3020 (СН=СН), 1750 (С=О), 1170 (С–О у аномерного атома), 1070, 1050, 1020 (СОС), 915 (пиранозное кольцо), 900 (С–Н у аномерного атома). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (δ, м.д.): ряд сигналов в областях 5,40–4,80 и 4,32–3,50 (11Н, Н<sup>2</sup>, Н<sup>3</sup>, Н<sup>4</sup>, Н<sup>5</sup>, Н<sup>6</sup> в галактозе, СН<sub>2</sub>О, СНО в глицерине), 4,58 (1Н, Н<sup>1</sup>,  $J_{1,2}$  = 7,2 Гц), 2,2–0,8 (СН<sub>2</sub>, СН<sub>3</sub> в ОСОР), 5,28 (цис-СН=СН, триплет,  $J$  = 4,5 Гц).

*1-(11,11,12,12,13,13-Гексадейтеростеароил)-2-олеоил-3-О-(β-D-глюкопиранозил)-гас-глицерин (XXII)* получали по методике, приведенной для соединения (XV). Выход 0,605 г (74,2%), маслообразное вещество,  $[\alpha]_D^{20}$  –7,4° (с 0,5),  $R_f$  0,48 (Б), 0,67 (В). ИК-спектр (см<sup>-1</sup>): 3600–3100 (ОН), 3020 (СН=СН), 1750 (С=О), 1260 (С–О в ОСОР), 1172 (С–О у аномерного атома), 1070, 1050, 1030 (СОС), 910 (пиранозное кольцо), 890 (С–Н у аномерного атома). Спектр <sup>1</sup>Н-ЯМР (δ, м.д.): ряд сигналов в областях 5,42–4,80 и 4,32–3,52 (11Н, Н<sup>2</sup>, Н<sup>3</sup>, Н<sup>4</sup>, Н<sup>5</sup>, Н<sup>6</sup> в глюкозе, СН<sub>2</sub>О, СНО в глицерине), 4,56 (1Н, Н<sup>1</sup>,  $J$  = 6,8 Гц), 2,2–0,8 (СН<sub>2</sub>, СН<sub>3</sub> в ОСОР), 5,28 (триплет, цис-СН=СН,  $J$  = 4,5).

Фосфатидилглицерин получали трансфосфатидилированием яичного фосфатидилхолина в присутствии фосфолипазы D, выделенной из капусты [22, 23].

Для исследования полиморфных превращений липидов методом <sup>2</sup>Н-ЯМР водные дисперсии липидов получали следующим образом: растворы 50–70 мг липидов в хлороформе упаривали, высушивали 3 ч в вакууме, к ним добавляли 0,3 мл Н<sub>2</sub>О (перегнанной 2 раза), ампулы с образцами, подвергающимися нагреванию до 80° С, запаивали и выдерживали для гидратации 24 ч при 20° С. Водные дисперсии состояли из глицозидилглицеридов, а также из смесей глицозидилглицеридов с фосфатидилглицерином в мольном соотношении 2 : 1. В дисперсии добавляли СаCl<sub>2</sub> до отношения фосфатидилглицерин — Са<sup>2+</sup>, равного 1.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cullis P. R., De Kruijff B. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 559. № 3. P. 399–420.
2. De Kruijff B., Morris G. A., Cullis P. R. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 598. № 2. P. 206–210.



3. Quinn P. J., Williams W. P. // *Biochim. et biophys. acta*. 1983. V. 737. № 2. P. 223–266.
4. Seelig J., Gally H. // *Biochemistry*. 1976. V. 15. № 33. P. 5199–5205.
5. Боровягин В. Л., Василенко И. А. // *Биол. мембраны*. 1984. Т. 1. № 6. С. 614–628.
6. Wieslander A., Ulmius J., Lindblom G., Fontell K. // *Biochim. et biophys. acta*. 1978. V. 512. № 1. P. 241–253.
7. Лёков В. Г., Берестовский Г. Н. // *Липидный бислой биологических мембран*. М.: Наука, 1982. С. 152–160.
8. Tulloch A. P. // *Lipids*. 1979. V. 24. № 2. P. 391–406.
9. Sun K. K., Hayes H. W., Holman R. T. // *Org. Mass. Spectrom.* 1970. V. 3. № 8. P. 1035–1042.
10. Каплун А. П., Швец В. И., Евстигнеева Р. П. // *Биоорганическая химия*. 1977. Т. 3. № 2. С. 222–231.
11. Davis J. H. // *Biochim. et biophys. acta*. 1983. V. 737. № 2. P. 117–171.
12. Davis J. H., Seffrey K. R., Bloom M., Valic M. I., Higgs T. P. // *Chem. Phys. Lett.* 1976. V. 42. № 3. P. 390–393.
13. Rance M., Jeffrey K. R., Tulloch A. P., Butter K. W., Smith J. C. P. // *Biochim. et biophys. acta*. 1980. V. 600. № 2. P. 245–262.
14. Iwamoto K., Sunamoto J., Inoue K., Endo T., Nojima S. // *Biochim. et biophys. acta*. 1982. V. 691. № 1. P. 44–51.
15. Сорокоумова Г. М., Василенко И. А., Тараховский Ю. С., Боровягин В. Л., Швец В. И. // *Биол. мембраны*. 1985. Т. 2. № 6. С. 649–655.
16. Baer E., Fisher H. // *J. Biol. Chem.* 1939. V. 128. № 3. P. 463.
17. Buchnea D. // *Lipids*. 1971. V. 6. № 10. P. 734–739.
18. Барраков С. Г., Ильина Е. Ф., Паносян А. Г. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1976. № 3. С. 643–649.
19. Stork G., Brizzolar A., Landsman H., Szmuszkowicz J., Terrell R. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1963. V. 85. № 2. P. 207–222.
20. Freedman B. // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1965. V. 42. № 4. P. 340–344.
21. Методы химии углеводов/Ред. Кочетков И. К. М.: Мир, 1967. С. 123–126.
22. Dawson R. M. C. // *Biochem. J.* 1967. V. 102. № 1. P. 205–210.
23. Yang S. F. // *Meth. Enzymol.* 1969. V. 14. P. 208–211.

Поступила в редакцию  
23.VI.1986  
После доработки  
12.II.1987

## SYNTHESIS AND USE OF DEUTERIUM-LABELLED GLYCOSYLDIGLYCERIDES IN <sup>2</sup>H NMR STUDIES OF POLYMORPHISM OF AQUEOUS DISPERSION OF LIPIDS

SOROKOUMOVA G. M., GUSEV D. G., VASILENKO I. A.,  
KAPLUN A. P., SHVETS V. I.

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

The total chemical synthesis of deuterium-labelled galactosyl- and glucosyldiglycerides have been carried out. These substances were used in study, by means of <sup>2</sup>H NMR, of kinetics and reversibility of polymorphic conversions of the glycosyldiglycerides and their mixtures with phosphatidylglycerol in aqueous dispersions. It was found that fully saturated galactosyldiglycerides undergo the fast reversible thermotropic lamellar/hexagonal (H<sub>II</sub>) phase transition, whereas glucosyldiglycerides form only hexagonal phase. Addition of phosphatidylglycerol to glucosyldiglycerides stabilizes lamellar organization of lipids. Calcium ions induce polymorphic transition in the mixture of glycosyldiglycerid/phosphatidylglycerol at elevated temperatures.