



УДК 547.95.057+547.395

© 1990 г.

*А. В. Аникин, В. В. Чупин, М. В. Чудимов,
Г. А. Серебrenникова, Р. П. Евстигнева*

СИНТЕЗ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ С ОСТАТКАМИ СПОСОБНЫХ К ПОЛИМЕРИЗАЦИИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

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

Исследованы пути получения сопряженных диеновых кислот из природных рицинолевой и линолевой кислот. Синтезированы способные к полимеризации фосфатидилхолины с одним и двумя остатками 9,11(10,12)-октадекадиеновой кислоты.

Фосфолипиды, содержащие группы, способные к полимеризации, находят все более широкое применение при моделировании свойств биологических мембран, получении высокостабильных липосомальных препаратов, создании молекулярных пленок для решения различных технических задач [1—3]. Способность фосфолипидов формировать бимолекулярный слой в воде или мономолекулярную пленку на границе раздела вода — воздух в сочетании с возможностью стабилизации таких слоев за счет реакции полимеризации вызвали появление ряда работ по синтезу липидов и их аналогов с полимеризующимися группами. В качестве полимеризующихся групп использовались диацетиленовые, аллильные, стирольные, метакрильные, диеновые, сульфгидрильные и другие группы. В данной работе представлены результаты по синтезу фосфатидилхолинов с остатками сопряженных диеновых кислот. Ранее диеновая группа уже использовалась для введения в жирнокислотные остатки фосфолипидов [4, 5]. При этом она располагалась в α -положении по отношению к карбонильной группе жирнокислотного остатка, т. е. на границе раздела гидрофобной и гидрофильной областей липидного бислоя. Нами предлагается получение фосфолипидов с остатками кислот, у которых диеновая группа расположена в середине углеводородной цепи, так как подобные кислоты являются более близкими структурными аналогами природных жирных кислот. Можно ожидать, что полимерный липидный бислой, построенный из фосфолипидов с остатками таких кислот, будет более точно отражать свойства мембран, состоящих из природных липидов, по сравнению с другими полимеризующимися липидами.

С целью разработки удобного в препаративном отношении метода были изучены возможности получения сопряженных диеновых кислот из природных линолевой (*цис,цис*-9,12-октадекадиеновой) и рицинолевой (*цис*-12-гидрокси-9-октадеценонной) кислот. Сопряженные диеновые кислоты уже были получены ранее дегидратацией рицинолевой и изомеризацией линолевой кислот [6—8]. Однако при дегидратации рицинолевой кислоты образуется смесь сопряженных и метиленразделенных диеновых кислот, для разделения которых необходимо использовать специальные хроматографические методы [6, 7]. При изомеризации линолевой кислоты количество остающейся метиленразделенной кислоты определяется условиями проведения реакции (температура, время). При этом необходимо учитывать, что жесткие условия проведения реакции, обеспечивающие полное превращение линолевой кислоты в сопряженную диеновую, приводят к миграции диеновой группы по углеводородной цепи [7, 8]. Наличие в составе фосфолипидов остатков метиленразделенных или сопряженных диеновых кислот, значительно различающихся положением диеновой группы в углеводородной цепи, может вызывать обрыв цепи реакции полимеризации диеновых групп в липидном бислое. В связи с этим необходи-

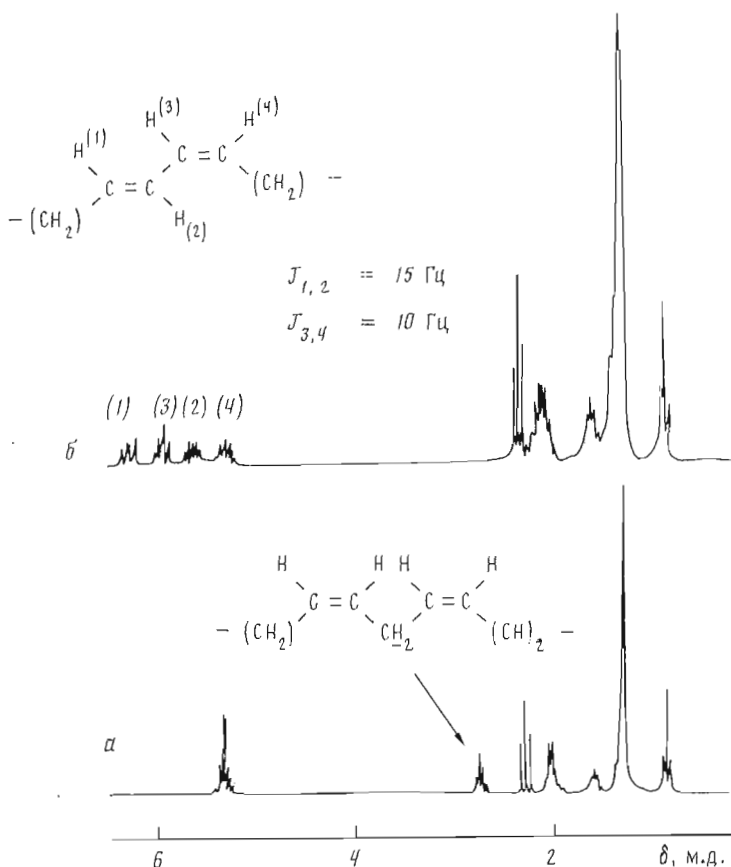
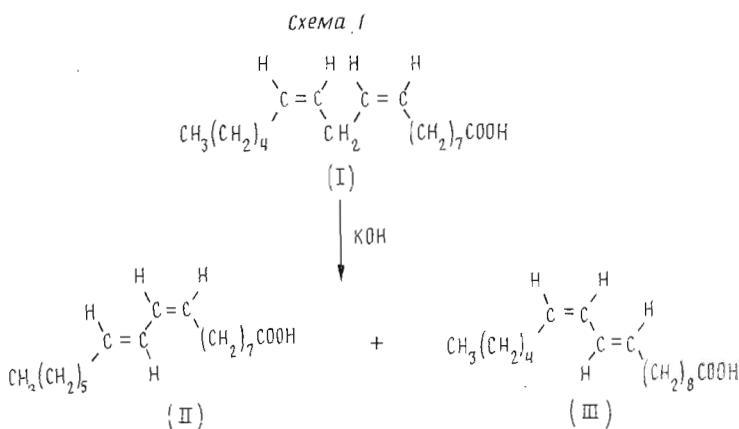


Рис. 1. Спектры ^1H -ЯМР линолевой кислоты (а) и продуктов щелочной изомеризации линолевой кислоты (б)

мо было подобрать такие условия проведения реакций, которые, с одной стороны, обеспечили бы полное превращение метиленразделенных диеновых кислот в сопряженные, а с другой — исключали бы миграцию диеновой группы по углеводородной цепи.



Щелочная изомеризация линолевой кислоты (I) под действием KOH в этиленгликоле (160°C , 1 ч) приводит к образованию смеси изомеров положения сопряженных диеновых кислот (II) и (III) за счет миграции двойной связи из 9-го в 10-е и из 12-го в 11-е положения (схема 1). Образование сопряженной диеновой системы сопровождается появлением интенсивного поглощения в ультрафиолетовой области спектра ($\lambda_{\text{max}} 231 \text{ нм}$).

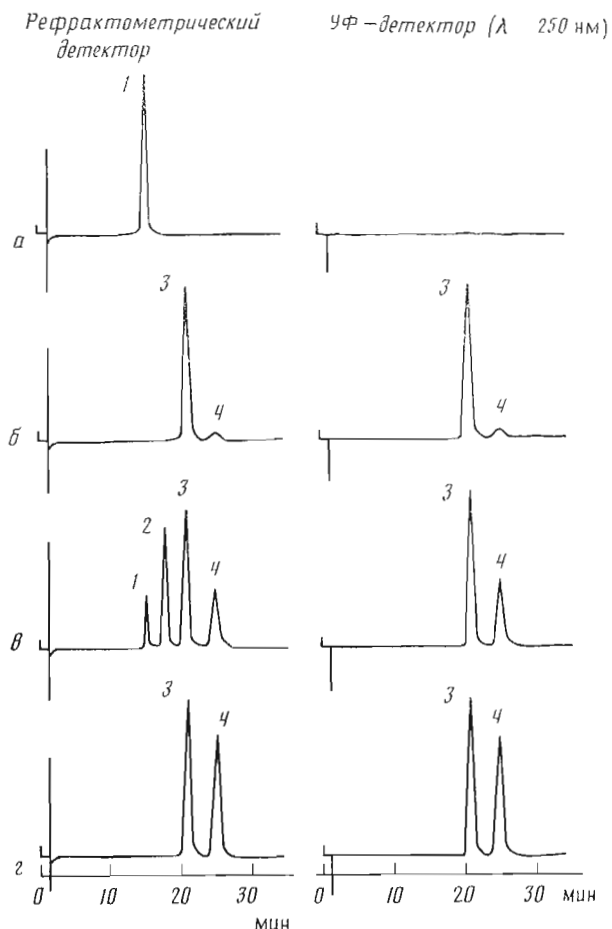


Рис. 2. Данные ВЭЖХ метиловых эфиров линолевой кислоты (а), продуктов изомеризации линолевой кислоты (б), продуктов дегидратации ричинолевой кислоты (в), продуктов изомеризации «в» (г). Пики метиловых эфиров: 1 — линолевой кислоты; 2 — *цис, транс*-9,12-октадекадиеновой кислоты; 3 — *цис, транс*-9,11(12,10)-октадекадиеновой кислоты; 4 — *транс, транс*-9,11(10,12)-октадекадиеновой кислоты

лить метиленразделенные и сопряженные диеновые кислоты, а также их геометрические изомеры в виде метиловых эфиров (рис. 2в). Изомеры положения двойных связей (II) и (III) имели при этом одинаковую хроматографическую подвижность.

По данным ВЭЖХ, в результате дегидратации метилового эфира ричинолевой кислоты происходит образование четырех изомерных диеновых кислот, а также их метиловых эфиров. Два изомера содержат сопряженную диеновую группу, о чем свидетельствует интенсивное поглощение при 250 нм. Два других изомера являются метиленразделенными диенами и обнаруживаются только с помощью рефрактометрического детектора (рис. 2в).

Щелочная обработка продуктов дегидратации ричинолевой кислоты (Va, б) и (VIa, б) в условиях, применявшихся для изомеризации линолевой кислоты, вызывает омыление метиловых эфиров диеновых кислот и изомеризацию метиленразделенных соединений в сопряженные диеновые кислоты (VIa) (схема 2). По данным ВЭЖХ (рис. 2г), сопряженный диен в этом случае представлен двумя геометрическими изомерами.

Изомеры сопряженных диеновых кислот были выделены ВЭЖХ в препаративных количествах в виде метиловых эфиров. По данным спектра $^1\text{H-NMR}$, а также данным ВЭЖХ (рис. 2б, г), структура одного из изомеров соответствует *цис, транс*-сопряженному диену, получаемому при изомеризации линолевой кислоты. В спектре $^1\text{H-NMR}$ второго изомера на-

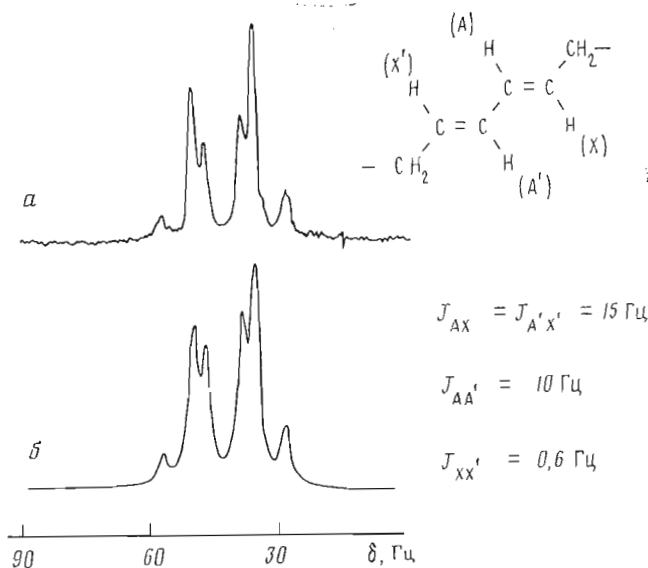


Рис. 3. AA'-часть спектра ^1H -ЯМР метилового эфира *транс,транс*-9,11-(10,12)-октадекадиеновой кислоты: а — экспериментальный, б — теоретический спектр

блюдается лишь два сигнала от протонов диеновой группы и один сигнал от α -метиленовых протонов при двойных связях, что указывает на симметричность диеновой группы, обусловленную одинаковой конфигурацией двойных связей. Однозначную информацию о геометрии двойных связей дает величина константы спин-спинового взаимодействия протонов через двойные связи. Интерпретация сигналов диеновых протонов (рис. 3а) по правилам 1-го порядка для данного изомера невозможна, так как в этом случае из-за химической эквивалентности двух пар протонов диеновая группа представляет собой спиновую систему AA'XX' [10]. Расчет констант спин-спинового взаимодействия путем проведения последовательных итераций теоретического спектра к экспериментальному с использованием в качестве критерия минимума квадрата отклонения экспериментальных данных от расчетных позволяет определить константы спин-спинового взаимодействия (рис. 3). Константа спин-спинового взаимодействия протонов через двойную связь составила 15 Гц, что указывает на *транс,транс*-конфигурацию двойных связей в диене.

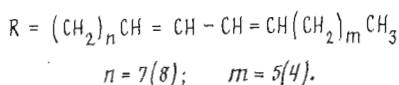
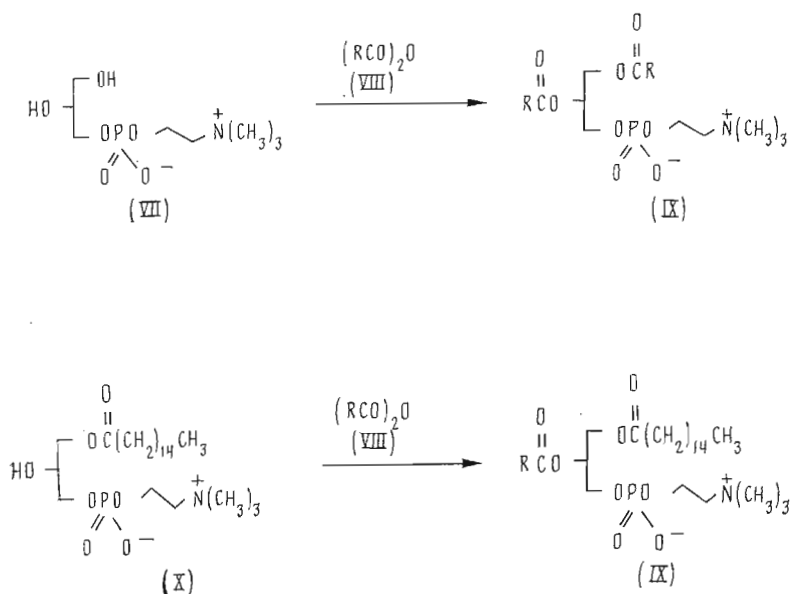
Таким образом, в результате дегидратации метилового эфира рицинолевой кислоты и последующей щелочной изомеризации получается 9,11(10,12)-октадекадиеновая кислота, представленная *цис,транс*- и *транс,транс*-изомерами, 1:1 (рис. 2г). Щелочная изомеризация линолевой кислоты приводит к *цис, транс*-9,11(10,12)-октадекадиеновой кислоте (рис. 2б).

Сопряженные диеновые кислоты, полученные из линолевой и рицинолевой кислот без разделения на индивидуальные компоненты, были использованы для синтеза фосфатидилхолинов, имеющих в своем составе одну или две способные к полимеризации группы. Синтез фосфатидилхолинов осуществляли по описанным ранее методам [11] (схема 3).

Фосфатидилхолин с двумя остатками сопряженной диеновой кислоты (IX) был получен путем ацилирования кадмиевого аддукта *sn*-глицеро-3-фосфохолина (VII) ангидридом 9,11(10,12)-октадекадиеновой кислоты (VIII) в присутствии 4-диметиламинопиридина. Фосфатидилхолин с одним остатком сопряженной диеновой кислоты (XI) синтезировали ацилированием лизофосфатидилхолина (X), который был получен селективным гидролизом 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина под действием препарата иммобилизованной фосфолипазы A_2 [12].

В отличие от природных фосфолипидов фосфатидилхолины с остатками сопряженных диеновых кислот (IX) и (XI) обладают повышенной

Схема 3



склонностью к реакциям полимеризации, и при хранении их в сухом виде при комнатной температуре уже через несколько суток наблюдалось образование значительных количеств полимера. В связи с этим после хроматографической очистки фосфатидилхолины (IX) и (XI) хранили в виде растворов в этаноле при -6°C .

Разработанные методы получения фосфатидилхолинов с остатками 9,11(10,12)-октадекадиеновых кислот удобны в препаративном отношении и позволяют получать способные к полимеризации фосфолипиды в значительных количествах.

Экспериментальная часть

Кадмиевый аддукт *sn*-глицеро-3-фосфохолина (VII) получали омылением яичного фосфатидилхолина по методу [11]. 1-Пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (X) выделяли колоночной хроматографией на силикагеле после гидролиза 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина иммобилизованной фосфолипазой A_2 из змеиного яда [12]. Линолевую кислоту (I) выделяли из подсолнечного масла и очищали в виде комплекса с мочевиной [11]. Метилловый эфир рицинолевой кислоты (IVб) получали щелочным гидролизом castoreoвого масла, последующим переводом свободных кислот в метилловые эфиры и хроматографической очисткой на колонке с силикагелем. По данным ГЖХ, метилловый эфир рицинолевой кислоты не содержал примесей других жирных кислот.

ИК-спектры записаны на спектрофотометре Shimadzu IR-435 (Япония), УФ-спектры — на приборе Shimadzu UV-240 (Япония). Спектры ЯМР получены на импульсном фурье-спектрометре Bruker MSL-200 (ФРГ), рабочая частота для ^1H — 200 МГц, для ^{13}C — 62,3 МГц. Спектры сняты в дейтерохлороформе с использованием в качестве внутреннего стандарта гексаметилдисульфоксана. Симуляцию спектров проводили по программе PANIC из стандартного программного обеспечения ЯМР-спектрометров фирмы Bruker на компьютере Aspect-3000. Химические сдвиги приведены в миллионных долях, константы спин-спинового взаимодействия — в герцах.

ВЭЖХ осуществляли на приборе Liquochrom (ВНР), снабженном рефрактометрическим детектором RIDK 101 (Ково, СССР). Колонка с Silasorb SPH C₁₈ (размер частиц 6 мкм), 4×250 мм изготовлена КНПО «Диагностикум» (Москва). В качестве подвижной фазы использовали 20 мМ раствор нитрата серебра в смеси метанол — вода (86 : 14, объемн.), скорость 1,2 мл/мин. Для проведения анализов свободные кислоты переводили в метиловые эфиры: 1 г смеси октадекадиеновых кислот растворяли в 20 мл метанола, добавляли 0,1 мл хлористого тионила, перемешивали и выдерживали 30 мин, продукт реакции фильтровали через слой оксида алюминия в CCl₄. Для анализа на колонку наносили 0,4–0,8 мг метиловых эфиров жирных кислот. Препаративное разделение проводили в тех же условиях (по 10 мг смеси метиловых эфиров жирных кислот в каждом разделении).

Изомеризация линолевой кислоты (I). В 120 мл этиленгликоля при перемешивании и 155° С растворяли 36 г (0,64 моль) КОН в атмосфере азота. К раствору добавляли 12 г (40,8 ммоль) линолевой кислоты, выдерживали 1 ч при 155–160° С, смесь охлаждали до 90° С и выливали в 400 мл 10% HCl. Экстрагировали смесь петролейным эфиром (200, затем 100 мл). Экстракт промывали водой (2×300 мл), высушивали сульфатом натрия, упаривали в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (1,5×10 см). Элюировали смесью петролейный эфир — ацетон, 20 : 1. Выход 11,2 г (98%). R_f 0,5 (силуфол; гексан — эфир, 2 : 1). Спектр ¹H-ЯМР *цис, транс*-9,11(10,2)-октадекадиеновой кислоты: 0,88 (т, J 7, 3H, CH₃), 1,31 (с, 22H, (CH₂)_n), 1,62 (тт, J 7 и 7,4, 2H, COCH₂CH₂), 2,08 (дт, J 6,5 и 7, 2H, *транс*-CH₂CH=CH), 2,15 (дт, J 6,5, 2H, *цис*-CH₂CH=CH), 2,34 (т, J 7,4, 2H, COCH₂), 5,30 (м, 1H, *цис*-CH₂CH=CH), 5,63 (дт, J 15 и 7, 1H, *транс*-CH₂CH=CH), 5,93 (дд, J 10,5 и 11, 1H, *цис*-CH=CH—CH=), 6,26 (дд, J 15 и 10, 1H, *транс*-CH=CH—CH=). УФ-спектр: λ_{max} 231 нм, ε 23 700 M⁻¹·см⁻¹ (в метаноле).

Дегидратация и последующая изомеризация метилового эфира рицинолевой кислоты (VIб). 30 г (96,2 ммоль) метилового эфира рицинолевой кислоты перегоняли с дефлегматором в вакууме (140° С, 1 мм рт. ст.) в присутствии 3 г KHSO₄. Полученный отгон (23,1 г) подвергали щелочной изомеризации, как описано для линолевой кислоты. Выход 22,1 г (82%). R_f 0,5 (силуфол; гексан — эфир, 2 : 1). Спектр ¹H-ЯМР метилового эфира *транс, транс*-9,11(10,12)-октадекадиеновой кислоты: 0,88 (т, J 7, 3H, CH₂CH₃), 1,31 (с, 22H, (CH₂)_n), 1,60 (м, 2H, COCH₂CH₂), 2,02 (тт, J 7, 4H, CH₂CH=CH), 2,28 (т, J 7, 2H, COCH₂), 3,70 (с, 3H, OCH₃), 5,58 (м, 2H, CH=CH—CH=CH), 5,97 (м, J_{AX} 15, J_{AA'} 10, J_{AX'} 0,6, 2H, CH(X)=CH(A)—CH(A')=CH(X')). УФ-спектр: λ_{max} 231 нм, ε 24 100 M⁻¹·см⁻¹ в метаноле.

Ангидрид 9,11(10,12)-октадекадиеновой кислоты (VIII). К раствору 5 г (17,9 ммоль) 9,11(10,12)-октадекадиеновой кислоты в 10 мл безводного CCl₄ при перемешивании добавляли 2,0 г (9,8 ммоль) дициклогексилкарбодимид, перемешивали еще 2 ч, осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали. Полученный остаток использовали в реакциях ацилирования. ИК-спектр, см⁻¹ (пленка в стеклах KBr): 1810, 1745 (ν C=O).

1,2 - Ди(цис, транс-9,11(10,12)-октадекадиеноил)-sn-глицеро-3-фосфохолин (IX). 1,1 г (2,5 ммоль) кадмиевого аддукта *sn*-глицеро-3-фосфохолина (VII) растворяли в 10 мл безводного хлороформа и при перемешивании добавляли раствор 0,61 г (5,0 ммоль) 4-диметиламинопиридина в 5 мл хлороформа и 3,39 г (6,25 ммоль) ангидрида диеновой кислоты в 10 мл хлороформа. Смесь перемешивали 20 ч при 20° С, упаривали в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем. Элюировали последовательно смесями хлороформ — метанол (1 : 1) и хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4). Выход 1,85 г (74%), R_f 0,33 (силуфол; хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4). ДОВ, [α]²⁰ (λ, нм) (с 1, хлороформ — метанол, 1 : 1): +4(589), +7(546), +13(435), +15(408), +20(366).

1 - Пальмитоил-2-[цис, транс-9,11(10,12)-октадекадиеноил]-sn-глицеро-3-фосфохолин (XI). 300 мг (0,61 ммоль) лизофосфатидилхолина (X) растворяли в 5 мл безводного хлороформа и добавляли 74 мг (0,61 ммоль) 4-диметиламинопиридина в 3 мл хлороформа и 546 мг (0,76 ммоль)

ангидрида диеновой кислоты в 3 мл хлороформа. Смесь перемешивали 10 ч при 20°С, упаривали в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем. Элюировали последовательно смесями хлороформ — метанол (1 : 1) и хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4). Выход 314 мг (68%), R_f 0,33 (силуфол; хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4). ДОВ, $[\alpha]^{20}$ (λ , нм) (c 1, хлороформ — метанол, 1 : 1): +5(598), +10(546), +15(435), +18(408), +23(366).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnston D. S., Sanhera S., Pons M., Chapman D. // *Biochim. et biophys. acta.* 1980, V. 602. № 1. P. 57-69.
2. Dorn K., Ringsdorf H. // *Contemp. Top. Polym. Sci.* 1984. V. 5. № 1. P. 73-100.
3. Bader H., Dorn K., Hupfer B., Ringsdorf H. // *Adv. Polym. Sci.* 1985. V. 64. P. 1-62.
4. Ohno H., Takeoka S., Tsuchida E. // *Bull. Chem. Soc. Japan.* 1987. V. 60. № 8. P. 2945-2951.
5. Ohno H., Takeoka S., Iwai H., Tsuchida E. // *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 1987. V. 25. P. 2737-2746.
6. Scholfield C. R., Jones E. P., Butterfield R. O., Dutton H. J. // *Anal. Chem.* 1963, V. 35. № 11. P. 1588-1591.
7. Emken E. A., Scholfield C. R., Davison V. L., Frankel E. M. // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1967. V. 44. № 7. P. 373-375.
8. Scholfield C. R. // *Anal. Chem.* 1975. V. 47. № 8. P. 1417-1420.
9. Баррон Д., Оллис У. Д. *Общая органическая химия.* Т. 1. М.: Химия, 1981. С. 227.
10. Эмсли Дж., Финей Дж., Сатклиф Л. *Спектроскопия ЯМР высокого разрешения.* Т. 1. М.: Мир, 1968.
11. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г., Батраков С. Г., Барсуков Л. И., Проказова Н. В. *Препаративная биохимия липидов.* М.: Наука, 1981.
12. Остапенко О. В., Чупин В. В., Серебrenникова Г. А., Евстигнеева Р. П. // *Химия природн. соединений.* 1989. № 1. С. 126-129.
13. Johnston D. S., Sanghera S., Pons M., Chapman D. // *Biochim. et biophys. acta.* 1980. V. 602. № 1. P. 57-69.

Поступила в редакцию
7.VI.1989

A. V. ANIKIN, V. V. CHUPIN, M. V. CHUDINOV, G. A. SEREBRENNIKOVA,
R. P. EVSTIGNEEVA

SYNTHESIS OF PHOSPHATIDYLCHOLINES CONTAINING POLYMERIZABLE FATTY ACIDS

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

Conjugated 9,11(10,12)-octadecadienoic acids were prepared either by alkali isomerization of linoleic acid or by dehydration of ricinoleic acid followed by isomerization. The conjugated dienoic acids obtained were used to prepare polymerizable phosphatidylcholines containing one or two residues of these acids.