



УДК 547.95:547.462.2

© 1993 г. В. В. Чупин, О. В. Остапенко,
В. Н. Клыкóв, М. В. Аникин, Г. А. Серебренникова

ОБРАЗОВАНИЕ СТРУКТУРНОГО ИЗОМЕРА ФАКТОРА АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ АЦЕТИЛИРОВАНИИ 1-АЛКИЛ-*sn*-ГЛИЦЕРО-3-ФОСФОХОЛИНА

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

Изучена ключевая стадия синтеза фактора активации тромбоцитов (ФАТ) — ацетилирование 1-алкил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (лизо-ФАТ) уксусным ангидридом. Показано образование в качестве побочного продукта структурного изомера ФАТ — 1-алкил-3-ацетил-*sn*-глицеро-2-фосфохолина — при проведении реакции в присутствии оснований (триэтиламин, 4-диметиламинопиридин). Ацетилирование в условиях кислотного катализа давало изомерно чистый ФАТ. Обсуждается механизм реакции, приводящей к образованию изомера ФАТ.

Открытие липидного фактора активации тромбоцитов — 1-алкил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (ФАТ) [1, 2] и установление его биологической роли [3, 4] стимулировало развитие ряда работ по синтезу молекулярных типов ФАТ [5—16]. Методы получения ФАТ включают в себя традиционные для химии фосфолипидов подходы, основанные либо на фосфорилировании 1-алкил-2-ацетил-*sn*-глицеринов [7, 8, 16], либо на ацетилировании 1-алкил-*sn*-глицеро-3-фосфохолинов (лизо-ФАТ) [5, 6, 9—16]. Существенным недостатком первого варианта является легкая миграция ацетильной группы, что может приводить к образованию структурного изомера ФАТ. При реализации второго подхода лизо-ФАТ природной конфигурации получали как полным химическим синтезом, исходя из оптически активного сырья [5, 6, 12—16], так и стереоспецифическим гидролизом рацемических фосфатидилхолинов с использованием фосфолипазы A_2 [9, 10, 11].

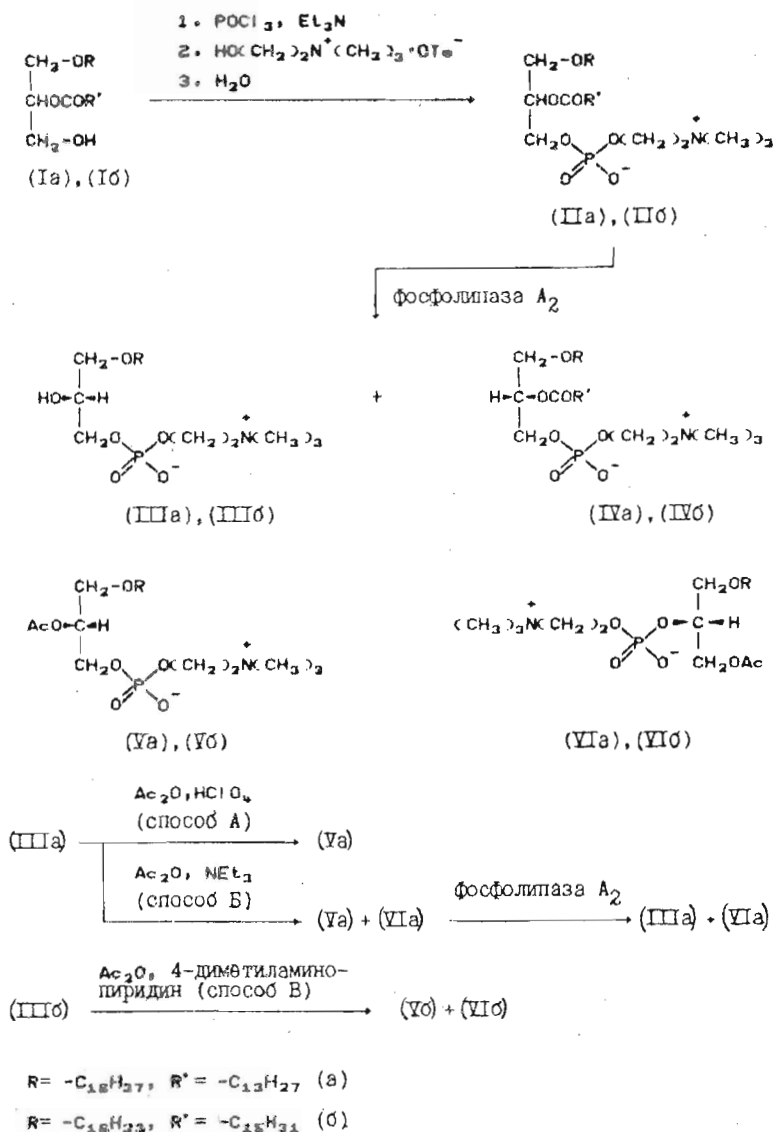
Нами применен метод синтеза молекулярных типов ФАТ, основанный на ацетилировании лизо-ФАТ, полученного гидролизом рацемических 1-алкил-2-ацетилглицеро-3-фосфохолинов фосфолипазой A_2 [11]. Однако полученные препараты ФАТ характеризовались значительно меньшими величинами угла вращения плоскости поляризованного света $[\alpha]$ по сравнению с данными [5, 8, 14]. Низкие значения $[\alpha]$ приведены также для ФАТ, полученного из лизо-ФАТ ацетилированием уксусным ангидридом в присутствии 4-диметиламинопиридина [16].

В связи с этим мы предприняли попытку объяснить причины столь значительных расхождений в характеристиках препаратов ФАТ. Поскольку удельная оптическая активность синтезированных нами препаратов лизо-ФАТ удовлетворительно соответствовала приведенной в литературе, представлялось целесообразным более детально исследовать реакцию ацетилирования лизо-ФАТ в различных условиях.

Исходные лизо-ФАТ (IIIa) и (IIIb) природной конфигурации были получены гидролизом фосфолипазой A_2 рацемических фосфолипидов (IIa) и (IIb), синтезированных фосфорилированием соответствующих *rac*-1-алкил-2-ацетилглицеринов

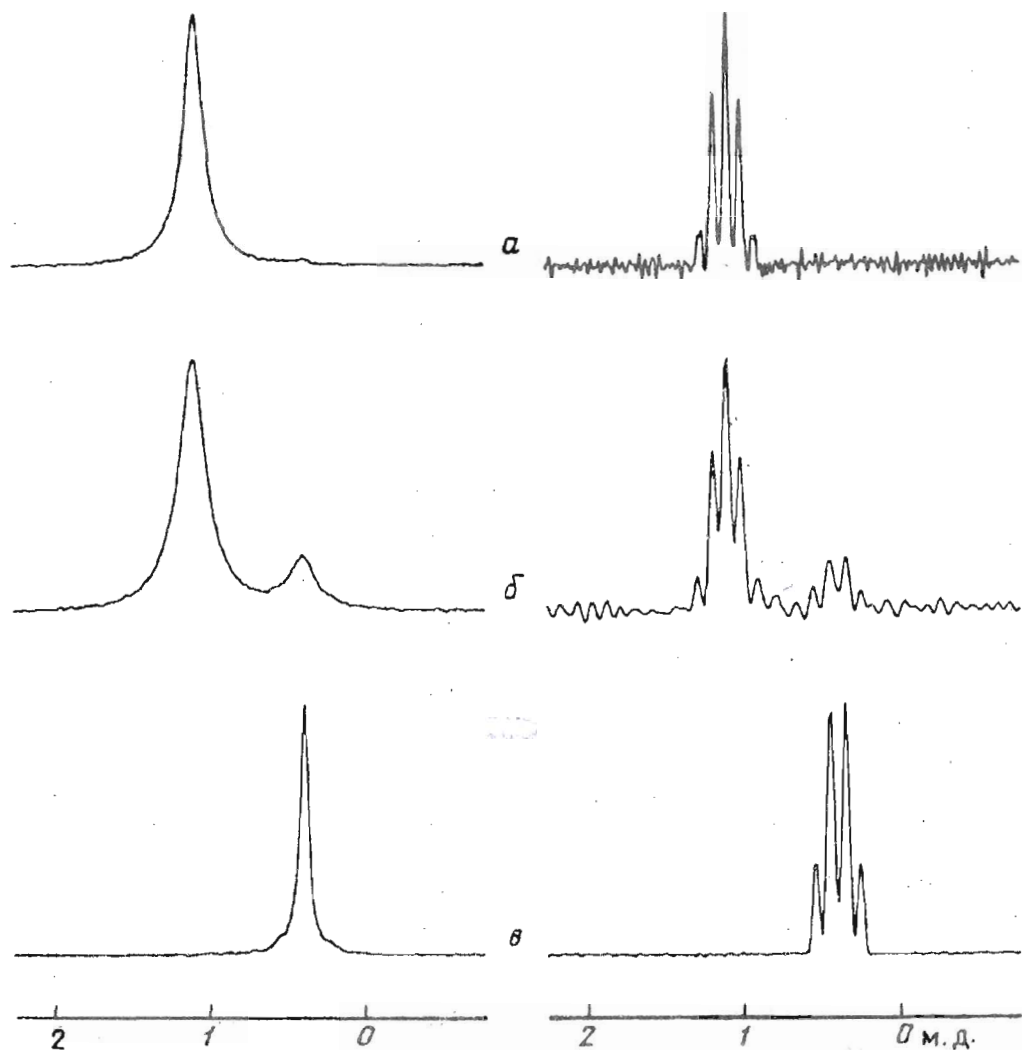
(Ia, б) по методу Брокерхофа [17] (схема 1). Образующиеся в результате гидролиза смеси соединений (IIIa + IVa) и (IIIб + IVб) были разделены с помощью колоночной хроматографии.

Схема 1



Известно, что фосфохолиновая группа лизофосфатидилхолинов проявляет достаточно высокую склонность к миграции [18, 19]. Вероятно, поэтому коммерчески доступные препараты лизо-ФАТ могут содержать примеси структурного изомера, в котором фосфохолиновая группа присоединена по С2-атому глицерина [19]. В связи с этим перед проведением реакции ацетилирования мы контролировали изомерную чистоту лизо-ФАТ (IIIa) и (IIIб) методом спектроскопии ³¹P-ЯМР [18], данные которой показали, что синтезированные нами лизо-ФАТ (IIIa) и (IIIб) представляли собой индивидуальные соединения.

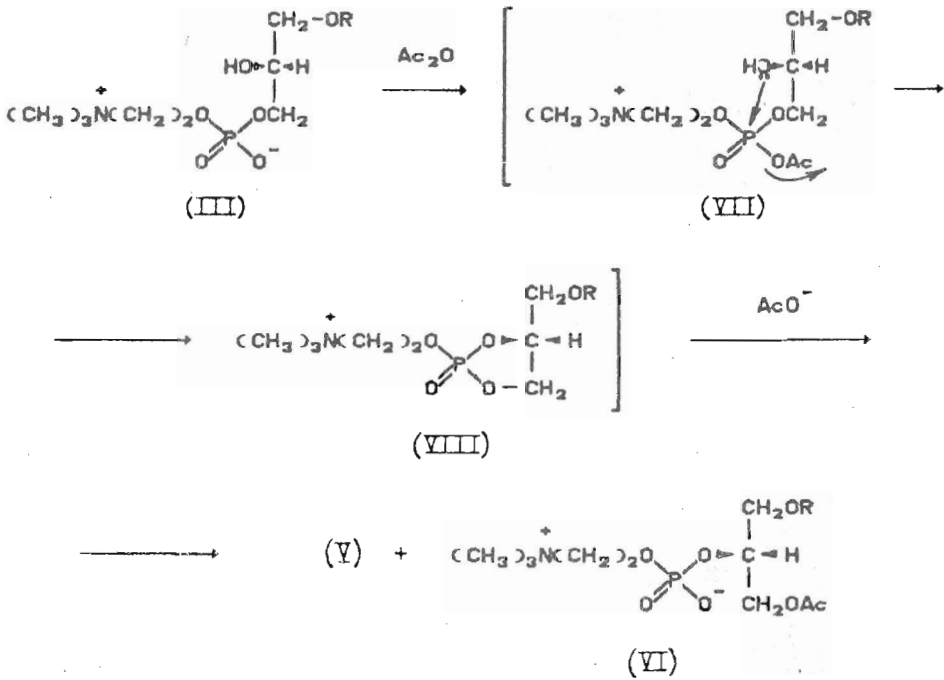
Лизо-ФАТ ацетилировали уксусным ангидридом в присутствии хлорной кислоты [20] (способ А) или органических оснований [15, 16] (способы Б, В).



Спектры ^{31}P -ЯМР препаратов ФАТ-С₁₈, полученных методами А (а), Б (б), и структурного изомера ФАТ (IX) (в) в условиях развязки от протонов (слева) и без развязки от протонов (справа)

Кислотокатализируемое ацетилирование лизо-ФАТ (IIIa) приводило к ФАТ (Va) с выходом 88%. Из рис. 1а видно, что в спектре ^{31}P -ЯМР полученного препарата ФАТ присутствует единственный сигнал, мультиплетность которого за счет спин-спинового взаимодействия с протонами соответствует фосфодиэфирной связи $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{OO}^-)-\text{O}-\text{CH}_2-$.

При ацетилировании лизо-ФАТ (IIIa) в присутствии триэтиламина (схема 1, метод Б) выход ФАТ был несколько ниже по сравнению с кислотокатализируемой реакцией (75%). В спектре ^{31}P -ЯМР полученного препарата ФАТ присутствуют два сигнала (рис. 1б). Химический сдвиг и мультиплетность более интенсивного сигнала соответствовали химическому сдвигу и мультиплетности ФАТ (Va). Мультиплетность менее интенсивного сигнала за счет спин-спинового взаимодействия с протонами (квартет) указывала на то, что фосфохолиновая группа в данном случае находится при С2 глициринового остатка, откуда следует, что синтезированный нами препарат ФАТ кроме соединения (Va) содержит примесь изомера положения фосфохолиновой группы (Via). Это подтверждается тем, что

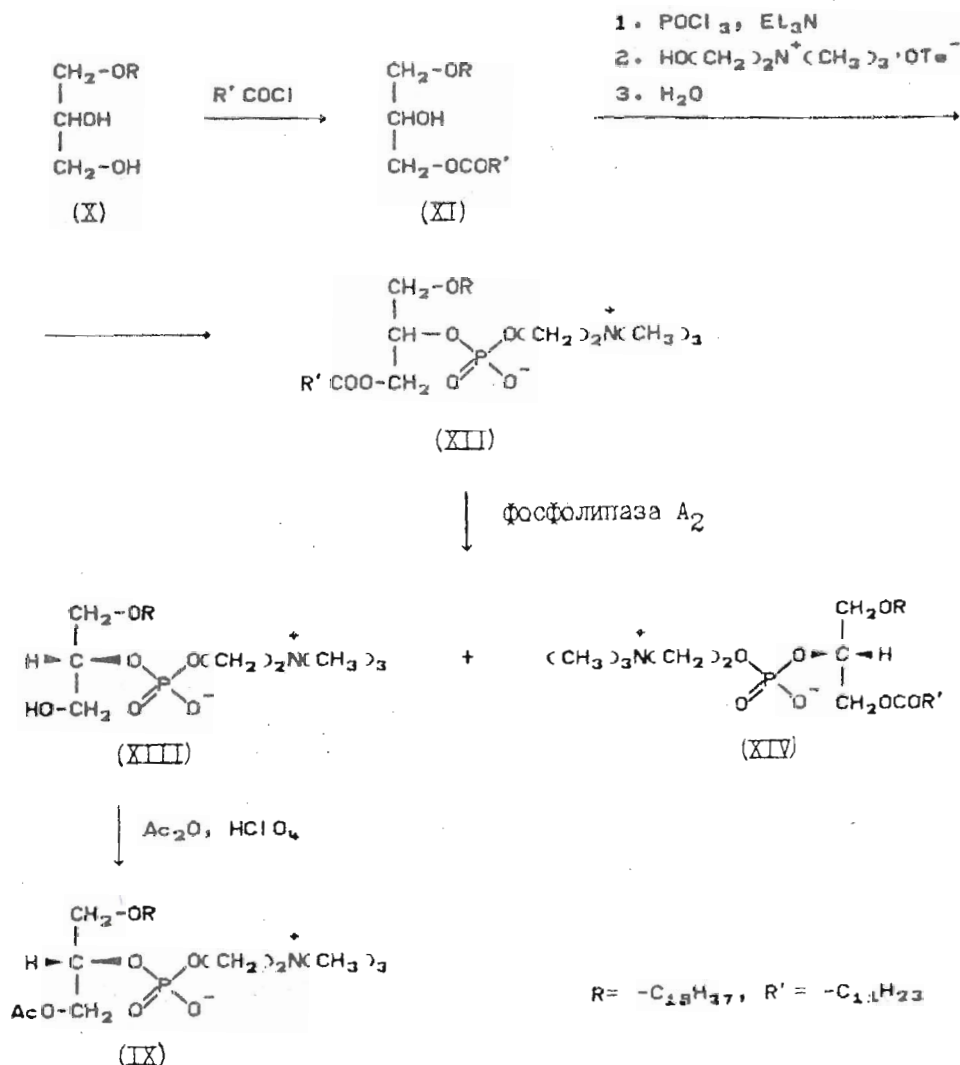


в спектре ^{31}P -ЯМР продуктов щелочного дезацетилирования данного препарата наблюдалось два сигнала с отношением интенсивностей, равным отношению интенсивностей сигналов в спектре исходного ФАТ.

Ацетилированием лизо-ФАТ (IIIб) уксусным ангидридом в присутствии 4-диметиламинопиридина (метод В) был синтезирован с выходом 95% ФАТ, содержащий, как и препарат, полученный методом Б, изомер положения (VIб).

Смесь полученных методами Б и В изомеров (соответственно Va + VIa; Vб + VIб) нам не удалось разделить ни тонкослойной хроматографией, ни на открытых колонках с силикагелем, ни ВЭЖХ на силикагеле с использованием в качестве подвижной фазы смесей хлороформ — метанол — вода или в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ на сорбентах С-18 и С-8 с использованием смесей ацетонитрил — вода.

Мы полагаем, что изомер (VI) в условиях реакции ацетилирования лизо-ФАТ в присутствии органических оснований может образовываться в соответствии со схемой 2. В присутствии значительного избытка уксусного ангидрида наряду с реакцией ацетилирования гидроксильной группы происходит образование смешанного ангидрида (VII). Внутримолекулярное нуклеофильное замещение при атоме фосфора ацетат-аниона приводит к фосфолану (VIII). Известно [21], что фосфоланы легко взаимодействуют с нуклеофилами с раскрытием циклофосфатного кольца. По-видимому, накапливающийся в результате развития реакции ацетилирования ацетат-анион выполняет роль нуклеофила и его действие на фосфолан (VIII) может приводить к образованию наряду с ФАТ (V) изомера (VI). Следует отметить, что аналогичная миграция фосфолиновой группы наблюдалась и ранее при ацилировании *sn*-глицеро-3-фосфохолина ангидридами высших жирных кислот в присутствии органических оснований и солей жирных кислот [22].



Очевидно, что если предложенная нами схема верна, то конфигурация хирального центра изомера (VI) должна совпадать с конфигурацией центра в соответствующей молекуле ФАТ (Va) или (Vб). Абсолютную конфигурацию соединения (VI) можно определить с помощью фосфолипазы A₂ при условии сохранения ее стереоспецифичности по отношению к алкилацильным фосфатидилхолинам, содержащим фосфохолиновую группу при C2-атоме глицерина. Известно, что гидролиз 1,3-диацил-глицеро-2-фосфохолинов фосфолипазой A₂ проходит стереоселективно; так, из 1,3-дистеарилглицеро-2-фосфохолина образуется оптически активный лизофосфатидилхолин — 3-стеароил-*sn*-глицеро-2-фосфохолин [23].

Стереоспецифичность фосфолипазы A₂ по отношению к структурным изомерам алкилацильных фосфолипидов была нами показана в ходе синтеза изомера положения ФАТ (IX) (схема 3). Моноацилирование октадецилглицерина (X) лауроилхлоридом в присутствии пиридина приводило к диэфиру (XI), который фосфорилировался хлорсидом фосфора с последующей конденсацией с *n*-толуолсульфонатом холина [17]. В результате ферментативного гидролиза полученного алкилацильного фосфатидилхолина (XII) фосфолипазой A₂ была получена смесь

Величины углов оптического вращения препаратов ФАТ

Препарат	Способ получения	$[\alpha]_D$, град (хлороформ)
ФАТ-С ₁₂	А	-1,20 (с 1,50)
	В	-2,00 (с 0,55)
	[5]	-4,00 (с 0,71)
	[8]	-3,38 (с 1,0)
	[14]	-4,10 (с 1,0)
ФАТ-С ₁₆	В	-1,79 (с 1,50)
	[5]	-3,66 (с 0,53)
	[14]	-3,70 (с 1,00)
1-Ацетил-3-октадецил- <i>sn</i> -глицеро-2-фосфохолин (IX)	Схема 3	+8,40 (с 1,47)
	[16]	+9,10 (с 1,50) *
1-Октадецил-3-ацетил- <i>sn</i> -глицеро-2-фосфохолин (VIa)	[16]	+10,0 (с 5) *
	[16]	-9,96 (с 5) *

* Хлороформ — метанол, 1 : 1.

соединений (XIII) и (XIV), которую разделяли колоночной хроматографией на силикагеле. Соединение (XIII) проявляло оптическую активность, что указывает на стереоселективность гидролиза фосфолипида (XII) под действием фосфолипазы А₂. Ацетилирование лизопроизводного (XIII) уксусным ангидридом в присутствии хлорной кислоты давало изомер положения ФАТ (IX). Характеристики оптической активности ($[\alpha]_D$) соединения (IX) и 1-ацетил-3-октадецил-*sn*-глицеро-2-фосфохолина, полученного в работе [16] стереонаправленным синтезом, практически совпадают (см. таблицу).

Как видно из рис 1в, химический сдвиг и мультиплетность сигнала в ³¹P-ЯМР спектре соединения (IX) совпадают с параметрами сигнала, приписанного нами изомеру положения ФАТ (VIa). Этот факт подтверждает правомерность отнесения сильно-полюсного сигнала на рис. 1б к 1-алкил-3-ацетил-*sn*-глицеро-2-фосфохолину (VIa).

Для определения абсолютной конфигурации соединения (VI) был проведен ферментативный гидролиз препарата ФАТ-С₁₂, полученного ацетилированием лизо-ФАТ (IIIa) в присутствии триэтиламина (метод Б) и содержащего примесь структурного изомера (VIa). После проведения ферментативного гидролиза (схема 1) лиз. -ФАТ (IIIa) и негидролизуемый фосфолипазой А₂ изомер ФАТ (VIa) были разделены с помощью колоночной хроматографии. По данным ³¹P-ЯМР, лизо-ФАТ представлял собой индивидуальный изомер, в котором фосфохолиновая группа присоединена к положению *sn*-3 (соединение IIIa), т. е. обработка фосфолипазой А₂ смеси изомеров положения ФАТ (Va) и (VIa) приводила к гидролизу лишь одного (основного) изомера положения, 1-октадецил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (Va), в то время как другой изомер (VIa) оставался интактным. На основании данных о стереоспецифичности фосфолипазы А₂ по отношению к фосфолипидам, содержащим фосфохолиновую группу при С2 глицеринового остатка, и того факта, что изомер ФАТ, полученный в результате ацетилирования лизо-ФАТ (IIIa) по методу Б, не гидролизуется фосфолипазой А₂, его абсолютная конфигурация была определена как 3-ацетил-1-октадецил-*sn*-глицеро-2-фосфохолин (соединение VIa).

Очевидно, образование структурного изомера ФАТ (VI) при ацетилировании лизо-ФАТ влияет на величину $[\alpha]$ препаратов ФАТ. Согласно литературным [16] и нашим данным, удельное вращение изомеров положения ФАТ (IX, VIa), имеющих фосфохолиновую группу при С2 глицеринового остатка, значительно

выше, чем у природных ФАТ, и для изомера (VIa) имеет тот же знак (см. таблицу). Поэтому присутствие даже незначительных количеств изомера положения ФАТ (VI) приводит к существенному увеличению наблюдаемого угла вращения. На основании сопоставления величин удельного вращения индивидуального ФАТ и его изомера положения можно оценить содержание последнего в препаратах ФАТ. Нами была проведена такая оценка для препарата ФАТ, полученного методом Б. Из величин $[\alpha]_D$ следовало, что препарат ФАТ содержал около 10% изомера положения (VIa), что совпадало с отношением интегральных интенсивностей сигналов этих соединений в ^{31}P -ЯМР-спектре (рис. 1б).

Экспериментальная часть

В работе использованы октадецилбромид, лауриновая кислота, дифенилметилхлорсилан, хлорокислоты фосфора, уксусный ангидрид отечественного производства. Хлорокислоты фосфора, уксусный ангидрид очищали перегонкой. Пиридин и триэтиламин перегоняли над оксидом бария, октадецилбромид и дифенилметилхлорсилан перегоняли в вакууме. Хлороформ для реакций фосфорилирования и ацилирования промывали концентрированной серной кислотой и затем перегоняли над P_2O_5 . *rac*-1-Октадецилглицерин синтезирован алкилированием *rac*-1,2-изопропилденглицерина октадецилбромидом с последующим удалением изопропилденной защитной группы [24]. Лауроилхлорид получен действием хлористого тионила на лауриновую кислоту с последующей перегонкой в вакууме.

Для получения *rac*-1-гексадецил-2-пальмитойлглицерина (1б) использовали ранее описанный метод [25]. *rac*-1-Октадецил-2-миристоилглицерин (1а) был получен по методу [26], вместо трифенилхлорсилана для избирательной защиты первичной гидроксильной группы использовали дифенилметилхлорсилан. *n*-Толуолсульфонат холина был синтезирован по методу [27].

Для ферментативного гидролиза фосфолипидов использовали яд эфы (*Echis multiscus amatus*). Гидролиз проводили в 50 мМ трис-НСI (рН 8), содержащем 25 мМ CaCl_2 . Ферментативный гидролиз препарата ФАТ, полученного методом Б (70 мг), проводили в условиях получения (IIa, б) (20 мг яда эфы, 20 ч).

ТСХ осуществляли на силуфоле UV-254 (Kavalier, ЧСФР) в системах хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (А), гексан — эфир, 1 : 1 (Б). Хроматографическую очистку соединений проводили на колонках с силикагелем L 40/100 (Сhemapol, ЧСФР). При ТСХ пятна обнаруживали прокаливанием, пятна фосфорсодержащих соединений обнаруживали молибденовым синим.

Углы оптического вращения определяли на спектрополяриметре Perkin — Elmer 241 MC (США) при 20° С. Спектры ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР получены на импульсном фурье-спектрометре Bruker MSL 200 (ФРГ); рабочие частоты 200, 13, 50, 32, 81, 01 МГц соответственно. Анализируемые вещества растворяли в смеси C^2HCl_3 — $\text{C}^2\text{H}_5\text{O}^2\text{H}$ — $^2\text{H}_2\text{O}$, 1 : 1 : 0,15. Химические сдвиги в спектрах ^{13}C -ЯМР указаны относительно внутреннего стандарта (сигнал C^2HCl_3 , δ 77,7 м. д.), в спектрах ^{31}P -ЯМР — относительно внешнего стандарта (85% ортофосфорная кислота). При получении спектров ^{31}P -ЯМР без подавления спин-спинового взаимодействия с протонами спад свободной индукции подвергался экспоненциальному умножению, соответствующему уменьшению ширины линии на 10—15 Гц.

Для всех соединений данные элементного анализа соответствовали расчетным. *rac*-1-Октадецил-2-миристоилглицеро-3-фосфохолин (IIa). К раствору 0,59 мл (6,44 ммоль) хлороксида фосфора в 5 мл хлороформа добавляли при перемешивании (20 мин) раствор 2,86 г (5,15 ммоль) *rac*-1-октадецил-2-миристоилглицерина (1а) в 20 мл хлороформа и 0,89 мл (6,44 ммоль) триэтиламина. Через 30 мин к реакционной массе добавляли 3,10 г (11,27 ммоль) *n*-толуолсульфоната холина и 3 мл пиридина. Массу перемешивали 4 ч при комнатной температуре, добавляли 3 мл воды, продолжали перемешивание еще 20 мин. После этого реакционную массу разбавляли хлороформом (100 мл), полученный раствор промывали 3%

Na₂CO₃ (50 мл), 5% HCl (50 мл), водой (50 мл). Органический слой упаривали в вакууме, остаток хроматографировали на силикагеле, вещество элюировали смесью хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4. Выход 2,72 г (73%). R_f 0,32 (A). ¹³C-ЯМР: 14,3 (CH₂CH₃); 23,1, 25,4, 26,4, 29,5, 29,7, 29,9, 30,1, 32,3 ((CH₂)₁₆CH₃ и (CH₂)₁₁CH₃); 34,8 (COCH₂); 54,5 (J_{C,N} 3,3, N(CH₃)₃); 59,4 (J_{C,P} 4,5, POCH₂CH₂); 64,6 (J_{C,P} 5,3, C3 Gro); 67,0 (CH₂N); 69,7 (C1 Gro); 72,2 (OCH₂CH₂); 72,4 (J_{C,P} 8,4, C2 Gro); 174,4 (CO).

rac-1-Гексадецил-2-пальмитоилглицеро-3-фосфохолин (IIб). Соединение (IIб) (5,39 г, 64%) получали аналогично фосфатиду (IIа) фосфорилированием 6,50 г (11,7 ммоль) *rac*-1-гексадецил-2-пальмитоилглицерина (Iб) 1,30 мл (14,2 ммоль) хлороксида фосфора в присутствии 1,75 мл (12,6 ммоль) триэтиламина с последующей конденсацией с 4,65 г (16,9 ммоль) *n*-толуолсульфоната холина. R_f 0,32 (A). ¹³C-ЯМР-спектры соединений (IIб) и (IIа) аналогичны.

1-Октадецил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (IIIа). К раствору 2,72 г *rac*-1-октадецил-2-миристоилглицеро-3-фосфохолина (IIа) в 70 мл хлороформа добавляли раствор 105 мг яда эфы в 45 мл трис-HCl-буфера, смесь перемешивали 3 ч при 35° С, экстрагировали смесью хлороформ — метанол, 2 : 1 (300 мл), экстракт упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на силикагеле, элюируя соединение (IIIа) смесью хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4. Выход 0,91 г (95%). R_f 0,15 (A). [α]_D²⁰ -5,2° (с 1,05; хлороформ — метанол, 1 : 1). ¹³C-ЯМР: 14,2 (CH₂CH₃); 23,0, 26,4, 29,7, 29,9, 30,0, 32,3 ((CH₂)₁₆CH₃); 54,5 (J_{C,N} 3,0, N(CH₃)₃); 59,7 (J_{C,P} 5,1, POCH₂CH₂); 66,9 (CH₂N); 67,9 (J_{C,P} 5,9, C3 Gro); 70,1 (J_{C,P} 7,0, C2 Gro); 72,0 и 72,3 (CH₂OCH₂). ¹H-ЯМР: 0,86 (3H, м, CH₂CH₃); 1,26 (30H, с, (CH₂)₁₅CH₃); 1,55 (2H, м, OCH₂CH₂); 3,21 (9H, с, N(CH₃)₃); 3,42—3,52 (4H, м, CH₂OCH₂CH₂); 3,62 (2H, м, CH₂N); 3,77—4,01 (3H, м, CH(OH)CH₂OP); 4,27 (2H, м, POCH₂CH₂).

1-Гексадецил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (IIIб). Лизо-ФАТ (IIIб) получали аналогично лизосоединению (IIIа) обработкой 1,25 г *rac*-1-гексадецил-2-пальмитоилглицеро-3-фосфохолина (IIб) 63 мг яда эфы (4 м). Выход 0,388 г (92%). R_f 0,15 (A). [α]_D²⁰ -5,95° (с 2; хлороформ — метанол, 1 : 1). ¹³C-, ¹H-ЯМР-спектры соединений (IIIб) и (IIIа) аналогичны.

1-Октадецил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (Va). Метод А. К 98 мг (0,19 ммоль) 1-октадецил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (IIIа) в 3 мл хлороформа добавляли при перемешивании 0,6 мл (6,4 ммоль) уксусного ангидрида, а затем по каплям 0,3 мл 57% хлорной кислоты. Реакционную массу перемешивали 1 мин при комнатной температуре, затем охлаждали до 0° С, добавляли 10,8 мл ледяной воды, 11,7 мл хлороформа и 12 мл метанола. Органический слой промывали смесью метанол — вода, 10 : 9 (2×10 мл), удаляли растворители в вакууме, остаток хроматографировали на силикагеле, вещество элюировали системой хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 3. Выход 93 мг (88%). R_f 0,23 (A). ¹³C-ЯМР: 14,2 (CH₂CH₃); 21,2 (COCH₃); 23,2, 26,7, 29,7, 29,9, 30,1, 32,2 ((CH₂)₁₆CH₃); 54,5 (J_{C,N} 3,7, N(CH₃)₃); 59,6 (J_{C,P} 4,5, POCH₂CH₂); 64,6 (J_{C,P} 5,3, CH₂OP); 66,9 (CH₂N); 69,6 (C1 Gro); 72,2 (OCH₂CH₂); 72,7 (J_{C,P} 8,3, C2 Gro); 172,0 (CO). ¹H-ЯМР: 0,86 (3H, м, CH₂CH₃); 1,26 (30H, с, (CH₂)₁₅CH₃); 1,55 (2H, м, OCH₂CH₂); 2,08 (3H, с, COCH₃); 3,20 (9H, с, N(CH₃)₃); 3,41 (1H, дт, J_d 9,9, J_e 6,8) и 3,45 (1H, дт, J_d 9,9, J_e 6,8) (OCH₂CH₂); 3,58 (2H, д, J 5,0, CH₂-OCH₂CH₂); 3,59 (2H, м, CH₂N); 3,95 (2H, м, CH₂OPCH₂CH₂); 4,22 (2H, м, POCH₂CH₂); 5,11 (1H, м, CH(OH)CH₂).

Метод Б. К 387 мг (0,76 ммоль) лизо-ФАТ (IIIа) добавляли 20 мл хлороформа, 2,6 мл (19 ммоль) триэтиламина и 0,71 мл (7,5 ммоль) уксусного ангидрида. Реакционную массу кипятили при перемешивании 8 ч, добавляли 100 мл хлороформа и промывали 50 мл воды. Органический слой упаривали в вакууме, остаток хроматографировали на силикагеле, элюируя вещество смесью хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 3. Выход 316 мг (75%). R_f 0,23 (A).

1-Гексадецил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (Vб, метод B). К смеси 0,290 г (0,60 ммоль) 1-гексадецил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (IIIб), 10 мл безводного бензола, 7 мл безводного ацетонитрила и 35 мг (0,29 ммоль) 4-диметиламинопиридина прибавляли 0,66 мл (7 ммоль) уксусного ангидрида, выдерживали смесь при 70° С, периодически перемешивая до растворения исходного лизо-ФАТ (IIIб) (15 мин). Растворители и уксусный ангидрид отгоняли в вакууме, 4-диметиламинопиридин удаляли возгонкой (1 гПа, 60° С, 1 ч). Остаток хроматографировали на силикагеле, ФАТ (Vб) элюировали смесью хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4. Выход 0,303 г (95%). R_f 0,23 (A).

гас-1-Октадецил-3-лауроилглицерин (XI). К раствору 4 г (11,6 ммоль) гас-1-октадецилглицерина в 90 мл хлороформа и 15 мл пиридина при охлаждении (5° С) и перемешивании по каплям за 1,5 ч добавляли раствор 3,24 г (14,8 ммоль) лауроилхлорида в 30 мл хлороформа, перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Затем растворитель удаляли в вакууме, к остатку добавляли 50 мл безводного CCl_4 , перемешивали 15 мин, фильтровали через слой окиси алюминия, осадок и слой сорбента промывали 50 мл CCl_4 , фильтрат упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на силикагеле, диэфир (XI) элюировали смесью бензол — эфир, 98 : 2, и перекристаллизовывали дважды из этанола. Выход 2,5 г (41%). R_f 0,43 (B). 1H -ЯМР (C^2HCl_3): 0,86 (6H, м, $2CH_2CH_3$); 1,24 (46H, с, $(CH_2)_{15}CH_3$ и $(CH_2)_8CH_3$); 1,58 (4H, м, OCH_2CH_2 и $OSOCH_2CH_2$); 2,33 (2H, т, J 7,5, $OSOCH_2$); 2,50 (1H, д, J 4,5 OH); 3,40 (1H, дд, J 6,0 и 9,8, $CH_AH_BOCH_2CH_2$); 3,44 (2H, т, J 6,8, OCH_2CH_2); 3,48 (1H, дд, J 4,1 и 9,8, $CH_AH_BOCH_2CH_2$); 3,98 (1H, дддд, J 4,1, 4,5, 4,8, 5,5, 6,0, $CHOH$); 4,10 (1H, дд, J 5,5 и 11,5) и 4,16 (1H, дд, J 4,8 и 11,5) (CH_2OSOCH_2).

гас-1-Октадецил-3-лауроилглицеро-2-фосфохолин (XII) синтезирован в условиях получения фосфатидилхолина (IIa) фосфорилированием 1,31 г (2,5 ммоль) гас-1-октадецил-3-лауроилглицерина (XI) 0,28 мл (3,1 ммоль) хлороксида фосфора в присутствии 0,43 мл (3,1 ммоль) триэтиламина с последующей конденсацией с 1,5 г (5,5 ммоль) *n*-толуолсульфоната холина. Выход 1,72 г (55%). R_f 0,31 (A). ^{13}C -ЯМР: 14,3 (CH_2CH_3); 23,1, 25,4, 26,8, 29,6, 29,7, 29,9, 30,1, 32,3 ($(CH_2)_{16}CH_3$ и $(CH_2)_9CH_3$); 34,6 ($COCH_2$); 54,6 ($J_{C,N}$ 3,3, $N(CH_3)_3$); 59,7 ($J_{C,P}$ 4,6, $POCH_2CH_2$); 63,8 ($J_{C,P}$ 4,2, $C3$ Gro); 67,0 (CH_2N); 70,2 ($J_{C,P}$ 4,6, $C1$ Gro); 72,3 (OCH_2CH_2); 72,6 ($J_{C,P}$ 5,5, $C2$ Gro); 174,8 (CO). 1H -ЯМР: 0,86 (6H, м, $2CH_2CH_3$); 1,24 (46H, с, $(CH_2)_{15}CH_3$ и $(CH_2)_8CH_3$); 1,54 (4H, м, OCH_2CH_2 и $OSOCH_2CH_2$); 2,31 (2H, т, J 7,5, $OSOCH_2$); 3,18 (9H, с, $N(CH_3)_3$); 3,44 (2H, т, J 6,6, $CH_2OCH_2CH_2$); 3,55—3,62 (4H, м, $CH_2OCH_2CH_2$ и CH_2N); 4,17—4,44 (5H, м, $CHOPOCH_2$ и CH_2OSO).

3-Октадецил-*sn*-глицеро-2-фосфохолин (XIII). 940 мг фосфолипида (XII) гидролизовали 100 мг яда эфы (15 ч) в условиях получения лизо-ФАТ (IIIa, б). Выход 306 мг (88%). R_f 0,15 (A). $[\alpha]_D^{20} +3,9^\circ$ (с 1; хлороформ — метанол, 1 : 1). ^{13}C -ЯМР: 14,2 (CH_2CH_3); 23,0, 26,4, 29,7, 30,0, 32,3 ($(CH_2)_{16}CH_3$); 54,4 ($J_{C,N}$ 2,9, $N(CH_3)_3$); 59,6 ($J_{C,P}$ 5,2, $POCH_2CH_2$); 63,3 ($J_{C,P}$ 3,5, $C3$ Gro); 66,9 (CH_2N); 70,9 ($J_{C,P}$ 5,1, $C1$ Gro); 72,2 (OCH_2CH_2); 76,3 ($J_{C,P}$ 6,3, $C2$ Gro). 1H -ЯМР: 0,86 (3H, м, CH_2CH_3); 1,26 (30H, с, $(CH_2)_{15}CH_3$); 1,55 (2H, м, OCH_2CH_2); 3,20 (9H, с, $N(CH_3)_3$); 3,46 (2H, т, J 6,8, $CH_2OCH_2CH_2$); 3,52—3,65 (4H, м, $CH_2OCH_2CH_2$ и CH_2N); 3,66 (1H, дд, J 6,0 и 12,0), 3,74 (1H, ддд, J 1,0 (H—P), 3,8 и 12,0) (CH_2OH); 4,17—4,36 (3H, м, $CHOPOCH_2$).

1-Ацетил-3-октадецил-*sn*-глицеро-2-фосфохолин (IX) получен ацетилированием 98 мг (0,19 ммоль) 3-октадецил-*sn*-глицеро-2-фосфохолина (XIII) 0,6 мл (6,4 ммоль) уксусного ангидрида в присутствии 0,3 мл 57% хлорной кислоты в условиях синтеза ФАТ (Va, метод A). Выход 92 мг (87%). R_f 0,23 (A). ^{13}C -ЯМР: 14,1 (CH_2CH_3); 20,7 ($COCH_3$); 23,0, 26,4, 29,7, 29,9, 30,0, 32,3 ($(CH_2)_{16}CH_3$); 54,5 ($J_{C,N}$ 3,2, $N(CH_3)_3$); 59,6 ($J_{C,P}$ 4,6, $POCH_2CH_2$); 64,5 ($J_{C,P}$ 4,3, $C3$ Gro); 66,9

(CH₂N); 70,4 (J_{C, P} 4,4, C1 Gro); 72,2 (OCH₂CH₂); 72,9 (J_{C, P} 5,5, C2 Gro); 172,2 (CO). ¹H-ЯМР: 0,86 (3H, м, CH₂CH₃); 1,24 (30H, с, (CH₂)₁₅CH₃); 1,54 (2H, м, OCH₂CH₂); 2,06 (3H, с, COCH₃); 3,20 (9H, с, N(CH₃)₃); 3,45 (2H, т, J 6,6, CH₂OCH₂CH₂); 3,56—3,63 (4H, м, CH₂OCH₂CH₂ и CH₂N); 4,13—4,51 (5H, м, CH₂OCH₂ и CH₂OCOCH₃).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Henson P. M. // J. Exp. Med. 1970. V. 131. № 2. P. 287—306.
2. Benveniste J., Henson P. M., Cochrane C. G. // J. Exp. Med. 1972. V. 136. № 6. P. 1356—1377.
3. Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators / Ed. F. Snyder. N. Y.: Plenum Press, 1987.
4. Braquet P., Touqui L., Shen T. Y., Vargaftig B. B. // Pharmacol. Rev. 1987. V. 39. № 2. P. 97—145.
5. Ohno M., Fujita K., Nakai H., Kobayashi S., Inoue K., Nojima S. // Chem. Pharm. Bull. 1985. V. 33. № 2. P. 572—582.
6. Fujita K., Nakai H., Kobayashi S., Inoue K., Nojima S., Ohno M. // Tetrahedron Lett. 1982. V. 23. № 34. P. 3507—3510.
7. Van Boeckel C. A. A., van der Marel G. A., Westerduin P., van Boom J. H. // Synthesis. 1982. № 5. P. 399—402.
8. Godfroid J.-J., Heymans F., Michel E., Redeuilh C., Steiner E., Benveniste J. // FEBS Lett. 1980. V. 116. № 2. P. 161—164.
9. Kertscher H.-P., Ostermann G. // Pharmazie. 1986. V. 41. № 7. S. 596.
10. Paltauf E. // Biochim. et biophys. acta. 1972. V. 260. № 3. P. 352—364.
11. Murari M. P., Murari R., Parthasarathy S., Guy C. A., Kumar V. V., Malewicz B. // Lipids. 1990. V. 25. № 10. P. 606—612.
12. Tsuru T., Kamata S. // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. № 42. P. 5195—5198.
13. Guivisdalsky P. N., Bittman R. // J. Org. Chem. 1989. V. 54. № 19. P. 4643—4648.
14. Nakamura N., Miyazaki H., Ohkawa N., Oshima T., Koike H. // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 5. P. 699—702.
15. Heymans F., Michel E., Borrel M.-C., Wichrowski B., Godfroid J.-J., Convert O., Coeffier E., Tence M., Benveniste J. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 666. № 2. P. 230—237.
16. Hirth G., Barner R. // Helv. chim. acta. 1982. V. 65. № 3. P. 1059—1084.
17. Brockerhoff H., Ayengar N. K. N. // Lipids. 1979. V. 14. № 1. P. 88—89.
18. Pluckthun A., Dennis E. A. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 8. P. 1743—1750.
19. Tence M., Coeffier E., Polonsky J., Benveniste J. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 755. № 3. P. 526—530.
20. Kumar R., Weintraub S. T., McManus L. M., Pinckard R. N., Hanahan D. J. // J. Lipid Res. 1984. V. 25. № 2. P. 198—208.
21. Чупин В. В., Малина Е. В., Ревенко И. В., Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 7. С. 970—974.
22. Lammers J. G., Liefkens T. J., Bus J., van der Meer J. // Chem. Phys. Lipids. 1978. V. 22. № 4. P. 293—305.
23. Van Deenen L. L. M., de Haas G. H. // Biochim. et biophys. acta. 1963. V. 70. № 5. P. 538—553.
24. Чувилин А. Н., Трусов В. Г., Серебренникова Г. А. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 6. С. 862—870.
25. Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. // Биоорган. химия. 1975. Т. 1. № 1. С. 56—60.
26. Морозова Н. Г., Кривойченко И. И., Аникин М. В., Серебренникова Г. А. // Журн. орган. химии. 1991. Т. 27. № 12. С. 2584—2588.
27. Rosenthal A. F. // J. Lipid Res. 1966. V. 7. № 4. P. 779—785.

Поступила в редакцию
5.III.1993

V. V. Chupin, O. V. Ostapenko, V. N. Klykov,
M. V. Anikin, G. A. Serebrennikova

FORMATION OF A STRUCTURAL ISOMER OF PLATELET
ACTIVATING FACTOR DURING
1-ALKYL-*sn*-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE ACETYLATION

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

In studying acetylation of 1-alkyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (lyso PAF) with acetic anhydride, a key step of the platelet activating factor (PAF) synthesis, we have found that in the presence of triethylamine or 4-dimethylaminopyridine some 1-alkyl-3-acetyl-*sn*-glycero-2-phosphocholine as an admixture to PAF formed, whereas the acid catalysed reaction resulted in isomerically pure PAF. The mechanism of the reaction leading to the PAF structural isomer is discussed.