



УДК 547.953'11*2.057

УДОБНЫЙ СПОСОБ СИНТЕЗА ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ

© 1998 г. Н. А. Брагина[#], Е. Ю. Курочкина, А. В. Аникин, В. В. ЧупинМосковская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,
117571, Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 18.07.97 г. Принята к печати 25.08.97 г.

Предложен удобный способ получения фосфатидилхолинов, основанный на фосфорилировании диглицеридов хлорокислотой фосфора и последующем взаимодействии образующихся дихлорфосфатов с тетрафенилборатными солями холина. Синтез проводится без выделения промежуточных продуктов и позволяет получать фосфатидилхолины с выходом более 60%. Указанным способом синтезированы два новых фосфатидилхолина с простой и сложной эфирной связью, содержащих дейтериевые метки в гидрофильной части молекулы – *rac*-1,2-дигексадецилглицеро-3-фосфо(²H₁₃)холин и *rac*-1,2-дипальмитоилглицеро-3-фосфо(²H₁₃)холин.

Ключевые слова: дейтеромеченые липиды, фосфатидилхолин, фосфорилирование, тетрафенилборат холина.

Исследование структуры и функций биологических мембран продолжает оставаться актуальной задачей современной молекулярной биологии. Для изучения структуры и динамики мембранных процессов в настоящее время широко используются методы дифракции нейтронов [1] и ²H-ЯМР-спектроскопии [2, 3]. Необходимым условием использования данных методов является наличие дейтериевых меток в составе компонентов мембран. Фосфатидилхолины – наиболее распространенные фосфолипиды в составе биологических мембран млекопитающих. Было показано, что квадрупольное расщепление в спектрах ²H-ЯМР сигналов от дейтериевых меток в составе холина чрезвычайно чувствительно к изменению электрического потенциала липидного бислоя [4]. К сожалению, методы дифракции нейтронов и ²H-ЯМР-спектроскопии относительно малочувствительны и требуют значительного расхода дейтеромеченых липидов (10–100 мг/эксперимент). Поэтому разработка и усовершенствование методов синтеза дейтеромеченых липидов представляют практический интерес.

Ранее [5] был предложен эффективный метод получения фосфатидилхолинов с набором различных дейтеромеченых холинов. Этот метод состоит во взаимодействии фосфатидной кислоты с тетрафенилборатной солью холина в присутствии конденсирующего агента [5].

Использование тетрафенилборатной соли холина в синтезе имеет несколько преимуществ по сравнению с ранее применявшимся ацетатом [6],

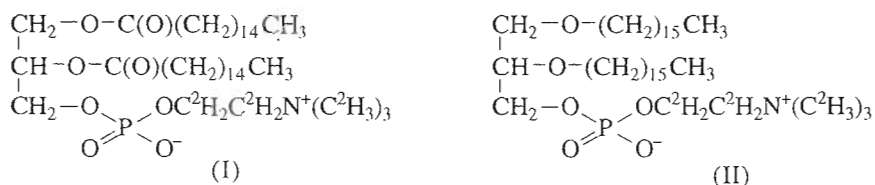
йодидом [7] и *n*-толуолсульфонатом холина [8]. Во-первых, тетрафенилборат холина практически нерастворим в воде, что позволяет полностью осаждать холин из водных реакционных смесей. Во-вторых, эта соль легко кристаллизуется и негигроскопична, что значительно упрощает подготовку к синтезу. В-третьих, тетрафенилборат холина хорошо растворим в некоторых органических растворителях, например в пиридине. Все это позволило проводить фосфорилирование тетрафенилборатных солей холина фосфатидной кислотой в присутствии конденсирующего агента [5].

Однако фосфатидная кислота – относительно дорогой реагент. Кроме того, для структурных исследований зачастую требуются фосфолипиды, имеющие в своем составе малодоступные, например модифицированные или меченные стабильными изотопами, гидрофобные заместители.

Мы предлагаем удобный способ синтеза фосфатидилхолинов, заключающийся в фосфорилировании диглицерида хлорокислотой фосфора и последующем взаимодействии образующегося дихлорфосфата с тетрафенилборатом холина. Синтез проводится без выделения промежуточных продуктов и позволяет получать фосфатидилхолины с выходом более 60%.

Таким способом нами были синтезированы фосфатидилхолины диацильного и диалкильного типа, имеющие гидрофобные заместители с одинаковой длиной цепи, но различающиеся по способу присоединения к глицерину, и полностью дейтерированные холиновые остатки – *rac*-1,2-дипальмитоилглицеро-3-фосфо(²H₁₃)холин (I) и *rac*-1,2-дигексадецилглицеро-3-фосфо(²H₁₃)холин (II):

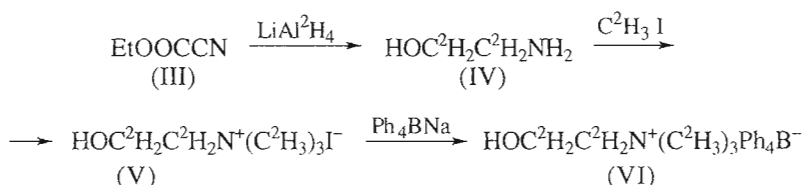
[#] Автор для переписки (тел.: 434-85-44).



Полностью дейтерированный холин в виде тетрафенилборатной соли (VI) был получен по несколько модифицированному методу [5]. Исчерпывающее восстановление этилцианформиата (III) алюмодейтеридом лития с последующим ал-

килированием амино(1,2- $^2\text{H}_4$)этанола (IV) избытком ($^2\text{H}_3$)метилиодида приводило к иодиду ($^2\text{H}_3$)холина (V), который осаждали из водного раствора в виде тетрафенилборатной соли (VI) (схема 1).

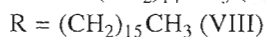
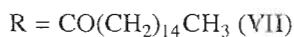
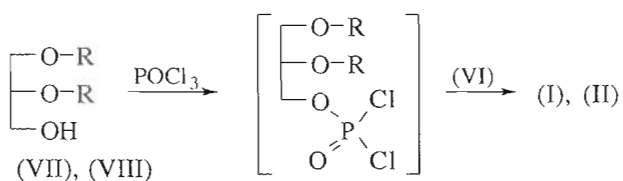
Схема 1



В масс-спектре соединения (VI) наряду с пиками молекулярного иона, соответствующими полностью дейтерированному холиновому катиону, присутствовали пики метилового эфира ($^2\text{H}_3$)холина. При этом содержание последнего повышалось с увеличением времени метилирования. Чтобы снизить образование побочного продукта, мы использовали умеренный избыток метилирующего агента и сокращали время проведения реакции по сравнению с описанным [5]. Это позволило достичь выхода 35–40%. Побочный продукт полностью отделяли от тетрафенилбората ($^2\text{H}_3$)холина перекристаллизацией из ацетонитрила.

Фосфатидилхолины (I) и (II) были получены путем фосфорилирования диглицеридов (VII) и (VIII) хлорокислотой фосфора в присутствии триэтиламина в качестве основания и последующего взаимодействия образующегося дихлорфосфата с тетрафенилборатом ($^2\text{H}_3$)холина (VI) без выделения промежуточных продуктов (схема 2).

Схема 2



В работе [9] сообщалось, что дихлорфосфаты 1,2-дизамещенных глицеринов можно получать с

количественным выходом при использовании 50% избытка фосфорилирующего агента – хлороксида фосфора и такого же избытка основания – триэтиламина. В качестве растворителя использовали гексан, осадок (хлоргидрат триэтиламина) отфильтровывали, а избыток фосфорилирующего агента отгоняли в вакууме с толуолом. Мы установили, что фосфорилирование 1,2-дизамещенных глицеринов (VII) и (VIII) 10%-ным избытком хлороксида фосфора в присутствии триэтиламина в качестве основания также протекает с количественным выходом. Получение дихлорфосфатов осуществляли в четыреххлористом углероде, с тем чтобы облегчить растворение тетрафенилборатной соли холина. Дальнейшее добавление холинового компонента и избытка пиридина приводило к образованию фосфатидилхолинов (I) и (II) с выходом более 60%. Тетрафенилборатные соли из реакционной массы удаляли с помощью смеси катионо- и анионообменной смол, липиды очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле. В спектрах ^1H -ЯМР фосфатидилхолинов (I) и (II) наблюдались сигналы, соответствующие протонам глицерина и гидрофобных заместителей, а сигналы, отвечающие протонам холинового остатка, полностью отсутствовали.

Мы считаем, что предлагаемый способ синтеза удобен, так как не требует предварительного получения фосфатидной кислоты, осуществляется без выделения промежуточных продуктов и позволяет получать в одну стадию с высоким выходом дейтеромеченые фосфатидилхолины с

необходимым набором гидрофобных и гидрофильных заместителей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали триэтиламин, перегнанный над гидридом кальция, перегнанный хлороксид фосфора. Также применяли этиловый эфир цианусной кислоты (Aldrich); алюмогидрид лития, алюмодейтерид лития (Fluka); тетрафенилборат натрия (Sigma); ($^2\text{H}_3$)метилюидид ("Изотоп", Россия).

1,2-Дипальмитоилглицерин (VII) и 1,2-дигексадецилглицерин (VIII) синтезировали в соответствии с методикой [10] и очищали перекристаллизацией из этанола.

Спектры ^1H -ЯМР получали на импульсном фурье-спектрометре Bruker MSL-200 (ФРГ) для растворов веществ в $\text{C}^2\text{HCl}_3 - \text{C}^2\text{H}_5\text{O}^3\text{H} - ^2\text{H}_2\text{O}$ (1 : 1 : 0.15). Рабочая частота ^1H 200 МГц. Приведены химические сдвиги в миллионных долях и константы спин-спинового взаимодействия в герцах. Масс-спектры записывали на времяпролетном масс-спектрометре МСБХ (SELMI, Украина), ионизация вызывалась продуктами распада ^{252}Cf .

Хроматографию в тонком слое осуществляли на пластинках Silufol (Kavalier). Хроматографическую очистку липидов проводили на колонках с силикагелем L100/160 (Chemapol). Приведены объемные соотношения растворителей.

Тетрафенилборат ($^2\text{H}_{13}$)холина (VI). К раствору 2.0 г (48 ммоль) LiAl^2H_4 в 100 мл безводного тетрагидрофурана при перемешивании и охлаждении добавляли по каплям за 20 мин раствор 3.17 г (32 ммоль) этилцианформиата (III) в 50 мл безводного тетрагидрофурана, затем перемешивали 4–5 ч при кипячении и охлаждали до комнатной температуры. После осторожного разложения избытка LiAl^2H_4 10 мл воды добавляли последовательно 50 мл 10% раствора NaOH и 16.2 г (112 ммоль) ($^2\text{H}_3$)метилюидида и оставляли перемешиваться на 12 ч. Органический растворитель отгоняли в вакууме, добавляли 75 мл воды, осадок отделяли центрифугированием, раствор промывали 100 мл эфира и прибавляли к нему раствор 13.7 г NaBPh_4 в 150 мл воды. Выпавший осадок целевого вещества (VI) отфильтровывали, промывали 150 мл воды, сушили в вакууме и кристаллизовали из ацетонитрила. Выход 5.0 г (37%). Масс-спектр: M^+ 117 ($\text{HOC}^2\text{H}_2\text{C}^2\text{H}_2\text{N}^+(\text{C}^2\text{H}_3)_3$), M^- 319 (Ph_4B^-).

Получение дейтерированных фосфатидилхолинов (I), (II)

гас-1,2-Дипальмитоилглицеро-3-фосфо($^2\text{H}_{13}$)холин (I). К раствору 0.062 мл (0.660 ммоль) свежеперегнанного хлороксида фосфора в 7 мл безводного CCl_4 при перемешивании добавляли по каплям за 20 мин раствор 0.342 г (0.600 ммоль) дигли-

цирида (VII) в 25 мл безводного CCl_4 и 0.092 мл (0.660 ммоль) безводного Et_3N . Раствор перемешивали 1 ч при комнатной температуре, затем приливали раствор 0.719 г (1.650 ммоль) тетрафенилбората ($^2\text{H}_{13}$)холина (VI) в 30 мл безводного пиридина и перемешивали реакционную массу 4 ч при 60°C . После этого смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли 1.5 мл воды и перемешивали еще 30 мин. Пиридин отгоняли в вакууме. Остаток растворяли в 75 мл хлороформа, раствор промывали 3% водным раствором Na_2CO_3 (2×35 мл), 5% HCl (2×35 мл), водой (2×35 мл) и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 15 мл смеси хлороформ – метанол – вода, 15 : 10 : 2 (A) и пропускали через колонку со смесью амберлитов IRC-50(H^+) и IRA-68(OH^-) (50 г, предварительно промыты 100 мл метанола и 100 мл элюирующей смеси A) и элюировали 150 мл раствора A. Растворитель упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (L100/160, 20 г), примеси элюировали хлороформом, фосфолипид вымывали смесью хлороформ – метанол – вода (65 : 25 : 4). Фракции, содержащие фосфолипид, упаривали, остаток растворяли в 3 мл хлороформа, к нему добавляли 20 мл ацетона, осадок отфильтровывали, высушивали в вакууме над P_2O_5 . Выход 300 мг (64%). R_f 0.33 (хлороформ – метанол – вода, 65 : 25 : 4). ^1H -ЯМР-спектр: 0.86 (6H, т, J 7, CH_2CH_3), 1.25 (48H, уш.с, $2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$), 1.60 (4H, м, COCH_2CH_2), 2.35 и 2.38 (2H, т, J 7, COCH_2CH_2), 3.96 (2H, дд, J₁ 6, J₂ 7, $\text{CH}_2\text{ORO}_3\text{C}^2\text{H}_2\text{C}^2\text{H}_2$), 4.17 (1H, дд, J₁ 7, J₂ 12) и 4.40 (1H, дд, J₁ 3.5, J₂ 12, CH_2OCO), 5.21 (1H, м, CHOCO).

гас-1,2-Дигексадецил-3-фосфо($^2\text{H}_{13}$)холин (II) получали по той же методике, что и фосфолипид (I), с использованием 0.336 г (0.622 ммоль) диглицерида (VIII), 0.064 мл (0.684 ммоль) хлороксида фосфора, 0.095 мл (0.684 ммоль) триэтиламина и 0.745 г (1.71 ммоль) тетрафенилбората ($^2\text{H}_{13}$)холина (VI). Выход 0.276 г (62%). R_f 0.34 (хлороформ – метанол – вода, 65:25:4). ^1H -ЯМР-спектр: 0.86 (6H, т, J 7, $2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$), 1.25 (52H, уш.с, $2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$), 1.58 (4H, м, COCH_2CH_2), 3.4–3.7 (7H, м, протоны при простой эфирной связи), 3.85 (2H, дд, J₁ 6, J₂ 7, $\text{CH}_2\text{ORO}_3\text{C}^2\text{H}_2\text{C}^2\text{H}_2$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marx J.L. // Science. 1977. V. 198. P. 481–483.
2. Smith R.L., Oldfield E. // Science. 1984. V. 225. P. 280–288.
3. Davis J.H. // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V. 737. P. 117–171.
4. Seelig J., Macdonald P.M., Scherer P.G. // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 7535–7541.

5. Harbison G.S., Griffin R.G. // *J. Lipid Res.* 1984. V. 25. P. 1140–1142.
6. Aneja R., Chadha J.S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1971. V. 248. P. 455–457.
7. Kingsley P.B., Feigenson G.W. // *Chem. Phys. Lipids.* 1979. V. 24. P. 135–147.
8. Brockerhoff H., Ayengar N. K. N. // *Lipids.* 1979. V. 14. P. 88–89.
9. Eibl H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978. V. 75. P. 4074–4077.
10. Чудинов М.В., Аникин М.В., Аникин А.В., Брагина Н.А., Чупин В.В., Серебренникова Г.А. // *Био-орган. химия.* 1993. Т. 19. С. 250–261.

A Convenient Method for the Synthesis of Phosphatidylcholines

N. A. Bragina, E. Yu. Kurochkina, A. V. Anikin, and V. V. Chupin

Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

A convenient method for the preparation of phosphatidylcholines is proposed, which is based upon phosphorylation of diglycerides with phosphorus oxychloride followed by a reaction of the resulting dichlorophosphates with choline tetraphenylborates. This requires no isolation of intermediates and affords phosphatidylcholines with >60% yields. By its use, two novel ester and ether phosphatidylcholines with deuterium labels in the hydrophilic moiety, *rac*-1,2-dihexadecylglycero-3-phospho($^2\text{H}_{13}$)choline and *rac*-1,2-dipalmitoylglycero-3-phospho($^2\text{H}_{13}$)choline, were synthesized.

Key words: deuterium-labeled lipids, phosphatidylcholine, phosphorylation, choline tetraphenylborate