



УДК 547.953.2'672.7.07

СИНТЕЗ НОВЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНОМЕЧЕННЫХ ФОСФОЛИПИДОВ  
И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ПОВЕДЕНИЯ В МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАНАХ

Молотковский Ю. Г., Дмитриев П. И.,  
Молотковская И. М., Бергельсон Л. Д.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Маневич Е. М.

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

Синтезированы флуоресцентномеченные фосфолипиды: фосфатидилхолин, содержащий в ацильной цепи *N*-дансильную группу, а также сфингомиелины с дансильной и антрильной группами. Изучено поведение этих соединений и ранее синтезированного антрилсодержащего фосфатидилхолина в искусственных фосфолипидных мембранах. Изотермы сжатия смесей димиристоилфосфатидилхолина с указанными соединениями показывают, что последние вносят лишь незначительные нарушения в структуру монослоя. На основании данных флуоресцентных измерений и спектров <sup>1</sup>H-ЯМР сделан вывод, что при введении зондов в фосфатидилхолиновые везикулы антрильная группа располагается в неполярной области бислоя, а дансильная — в зоне глицериновых остатков. Показано, что при включении в везикулы тушителя флуоресценции *N*-2,4,6-тринитрофенилглицина наблюдается трансмембранная миграция («флип-флоп») фосфатидилхолина, меченного антрилом.

В последние годы для изучения биологических мембран предложен ряд новых флуоресцентных зондов, однако ценность получаемой с их помощью информации зачастую снижается. Это связано с тем, что большинство применяемых зондов по своей структуре сильно отличается от молекул, входящих в состав нативной мембраны. Поэтому задача дальнейшего поиска флуоресцирующих веществ, максимально приближенных по структуре к компонентам мембран и, следовательно, вносящих в них минимальные возмущения, продолжает оставаться актуальной.

Ранее мы синтезировали флуоресцентные фосфатидилхолины, содержащие антрильную и антроильную группы в конце жирнокислотной цепи [1]; первый из этих флуоресцентных зондов (AnPC) был превращен ферментативным путем в флуоресцентномеченный фосфатидилэтаноламин [2].

В настоящей работе осуществлен синтез еще одного флуоресцентного фосфолипида — антрилсодержащего сфингомиелина (AnSM). Как известно, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин — основные

---

В статье приняты следующие сокращения: DnsPC — 1-ацил-2-(*N*-дансил-11-аминоундеcanoил)-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; AnPC — 1-ацил-2-[12-(9-антрил)-11-*транс*-додеcanoил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; DnsSM — 8-дансиламиноокси-2-окси-3-ациламино-4-(холинфосфоокси)масляной кислоты; AnSM — *N*-[12-(9-антрил)-11-*транс*-додеcanoил]сфингозин-1-фосфохолин; TnpGly — *N*-(2,4,6-тринитрофенил)глицин.

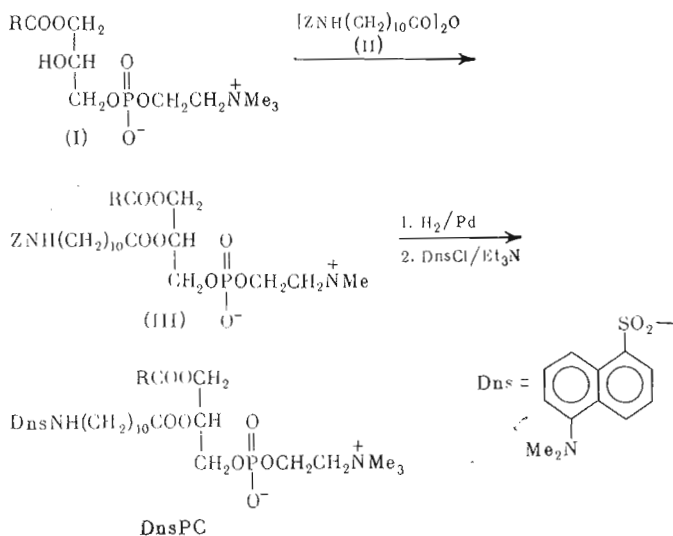
фосфолипидные компоненты всех животных тканей. Комплекс созданных нами флуоресцентных зондов позволяет производить дифференциальное изучение этих фосфолипидов в биологических мембранах.

Наряду с антрильным остатком в качестве флуорофора широко применяется дансилевая группа (5-диметиламиноафтил-1-сульфоная). В частности, известны два дансилсодержащих фосфолипида: N-дансилфосфатидилэтаноламин [3, 4] и N-дансилфосфатидилсерин [5]. Достоинство этих зондов заключается в том, что их флуоресцирующий хромофор весьма чувствителен к полярности окружения, однако их существенный недостаток связан с тем, что по заряду и геометрическим параметрам полярной группы они сильно отличаются от природных фосфолипидов. Нами синтезированы фосфатидилхолин и сфингомиелин, содержащие дансилевую группу в неполярной части молекулы.

Для дальнейшего успешного применения флуоресцентных зондов в исследованиях биологических мембран необходимо установить их локализацию в мембране и оценить степень вызываемого зондами возмущения в модельных системах. В настоящей работе описаны исследования, проведенные с целью выяснения указанных вопросов в отношении синтезированных нами флуоресцирующих фосфолипидных зондов.

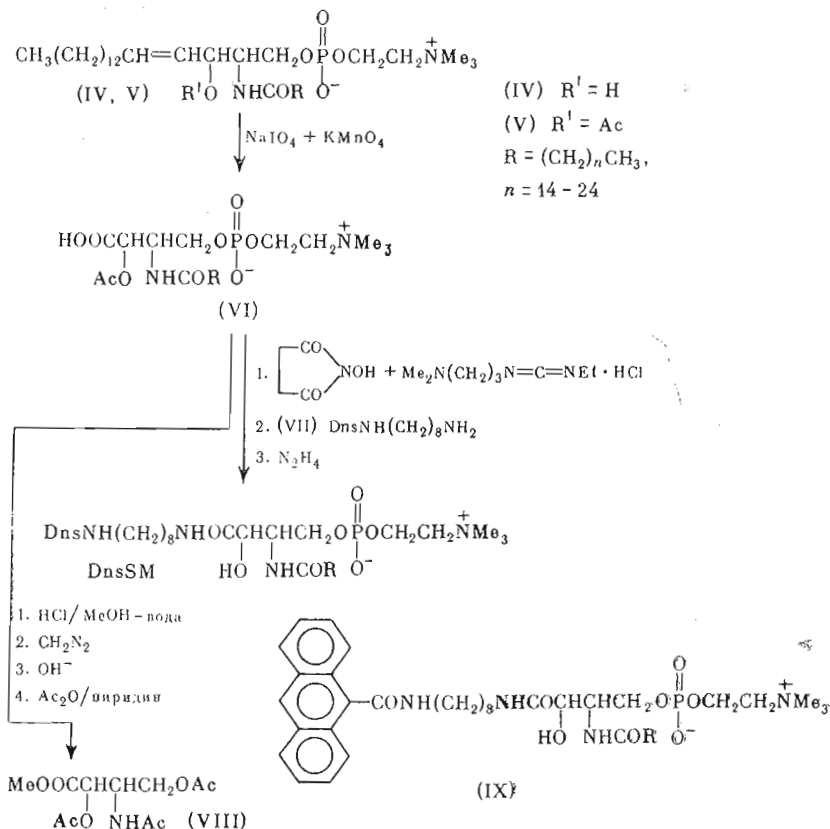
Исходным веществом в синтезе DnsPC служил лизофосфатидилхолин (I), полученный из яичного фосфатидилхолина. Его ацилировали по методу, предложенному Кораной и сотр. [6], ангидридом N-бензилдиоксикарбонил-11-аминоундекановой кислоты (II) в присутствии 4-диметиламинопиридина. Полученный фосфатидилхолин (III) подвергли гидрогенолизу, после чего свободную аминогруппу дансилевали (схема 1).

Схема 1



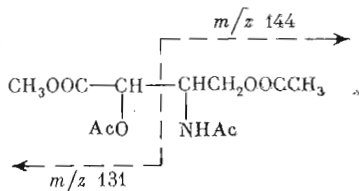
Синтез DnsSM осуществлен исходя из сфингомиелина, выделенного из мозга быка. В сфингомиелине (IV) свободную оксигруппу ацетилировали, полученный ацетат (V) окисляли периодат-перманганатной смесью по методу, ранее использованному для окисления фосфатидилхолинов [7], из смеси продуктов реакции хроматографией выделяли кислоту (VI). Для подтверждения строения этого соединения его переводили в эфир (VIII) последовательным действием соляной кислоты в водном метаноле, диазометана и уксусного ангидрида в пиридине (схема 2). Возможность, что выделенное вещество является продуктом более глубокого окисления сфингомиелина и представляет собой фосфохолиновый эфир N-ацилсерина  $\text{HOOCCH}(\text{NHCOR})\text{CH}_2\text{OP}(\text{O})(\text{O}^-)\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$ , исключает

Схема 2



ется, поскольку при ГЖХ эфир (VIII) выходит при более высокой температуре, чем метиловый эфир N,O-диацетилсерина (см. «Экспериментальную часть»).

В масс-спектре эфира (VIII) молекулярный ион отсутствует, однако присутствие двух интенсивных пиков с  $m/z$  131 и 144 свидетельствует о фрагментации по обычному для ацетатов аминокислот пути [8]:



Эти данные подтверждают правильность структуры, приписанной кислоте (VI).

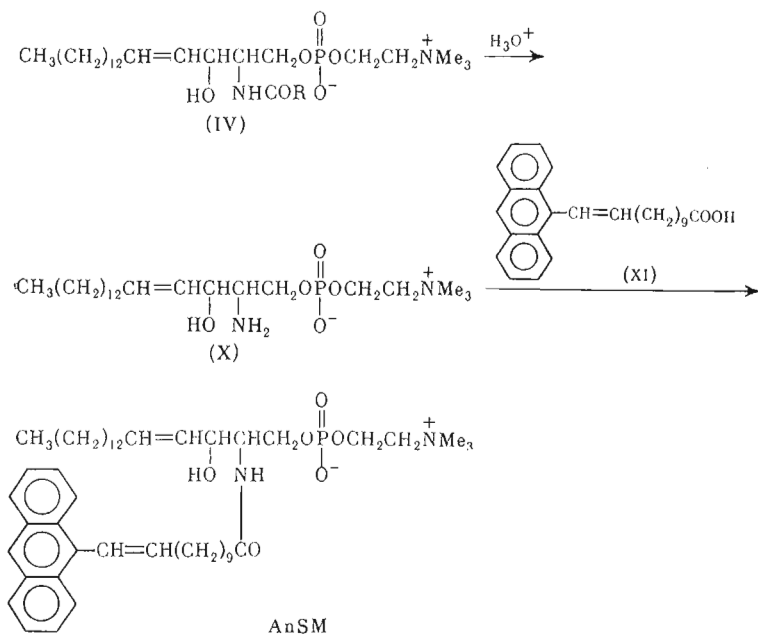
Кислоту (VI), активированную превращением в N-оксисукцинимидный эфир, конденсировали с 8-дансиламиноктиламином (VII); продукт реакции при деацетилировании образовал DnsSM.

По аналогичному пути нами был синтезирован 9-антроильный аналог сфингомиелина (IX), однако это соединение ввиду невысокого квантового выхода оказалось мало пригодным в качестве флуоресцентного зонда.

Для получения антрислсодержащего сфингомиелина (AnSM) сфингомиелин (IV) был подвергнут вначале кислотному метанолизу. Штоф-

Фель и Асман [9] показали, что при этом амидная связь расщепляется быстрее фосфоэфирной, поэтому, изменяя время реакции, можно либо полностью гидролизовать сфингомиелин до сфингозиновых оснований и жирных кислот, либо получить в качестве основного продукта реакции сфингозин-1-фосфохолин (X). Последний использовали для синтеза однокислотных сфингомиелинов [10]. Мы ацилировали фосфоэфир (X) 12-(9-антрил)-11-*транс*-додеценовой кислотой (XI) в присутствии диметилкарбодимидо (схема 3).

Схема 3



Полученный таким образом AnSM представлял собой смесь двух близких по хроматографическому поведению веществ, главного и минорного, разделяющихся при ТСХ в системах основной или нейтральной природы (см. «Экспериментальную часть»). По-видимому, именно первому соответствует структура, приведенная на схеме 3, второе же вещество является производным сфинганина, всегда присутствующего в природных сфинголипидах\*. Это подтверждается тем, что после ацетилирования AnSM или его гидрирования над платиной образуются вещества, однородные по данным ТСХ.

Чтобы оценить степень возмущений, которые могут вносить в мембраны синтезированные нами флуоресцентномеченные фосфолипиды, мы изучили сжатие монослоев из димристоилфосфатидилхолина, содержащих эти соединения. Сжатие производили при 31° С, т. е. выше температуры фазового перехода димристоилфосфатидилхолина. Ранее было показано, что при проведении изотермического сжатия при данной температуре монослой не переходит в кристаллическое состояние [11]. Из сопоставления изотерм сжатия димристоилфосфатидилхолина и его смесей, содержащих 10% соответствующего зонда (рис. 1 и 2), следует, что введение DnsPC приводит к некоторому разрыхлению монослоя при низких значениях поверхностного давления ( $\Delta P$ ), тогда как AnPC изменяет плотность упаковки лишь при больших значениях  $\Delta P$ .

\* В состав природного сфингомиелина входят жирнокислотные остатки различной длины, из-за этого сфинганиновый и сфинганиновый компоненты при ТСХ не разделяются: наблюдается одно вытянутое пятно.

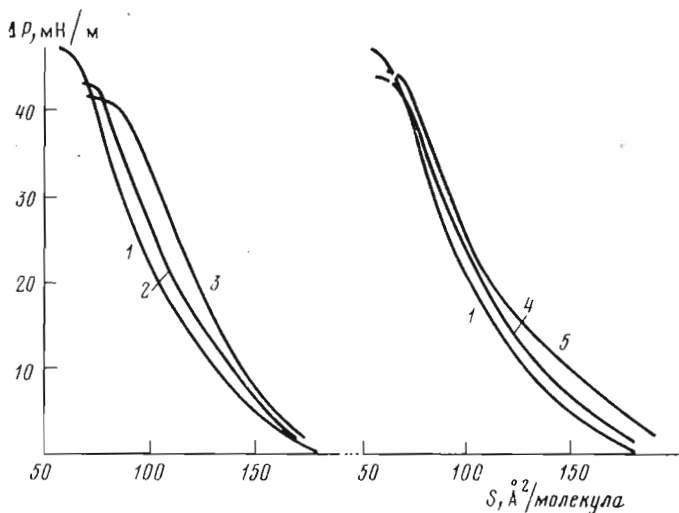


Рис. 1. Зависимости поверхностного давления от площади, приходящейся на молекулу, в монослоях фосфолипидов, построенных из димиристоилфосфатидилхолина в отсутствие (1) и присутствии флуоресцентных зондов: 2 — 1% AnPC; 3 — 10% AnPC; 4 — 1% DnsPC; 5 — 10% DnsPC (31° С, рН 7,4)

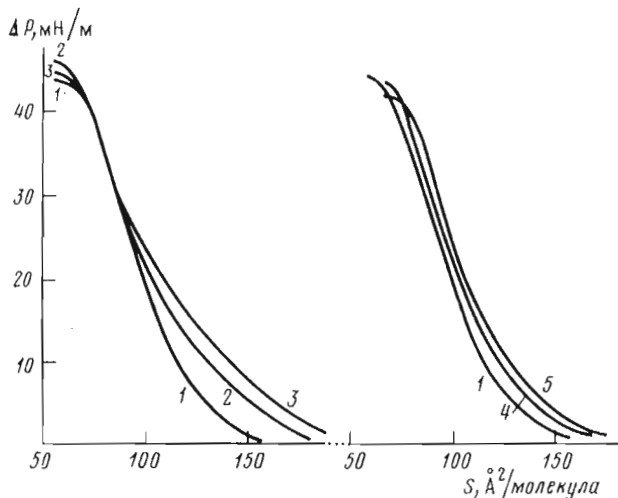


Рис. 2. Зависимости поверхностного давления от площади, приходящейся на молекулу, в монослоях фосфолипидов, построенных из смеси димиристоилфосфатидилхолина и 10% сфингомиелина из мозга быка в отсутствие (1) и присутствии флуоресцентных зондов: 2 — 1% AnSM; 3 — 10% AnSM; 4 — 1% DnsSM; 5 — 10% DnsSM (31° С, рН 7,4)

Введение AnPC приводит к уменьшению значения поверхностного давления в условиях коллапса на 2,5 мН/м и к некоторому увеличению площади, приходящейся на 1 молекулу в коллапсе, тогда как DnsPC практически не меняет значения этих характеристик. Таким образом, AnPC вносит в монослой несколько большие возмущения, чем DnsPC.

Поведение в монослое флуоресцентномеченых сфингомиелинов изучали, сравнивая изотермы сжатия монослоев, сформированных из димиристоилфосфатидилхолина, содержащего соответствующий зонд, с изотермами, полученными для смеси димиристоилфосфатидилхолина с природным сфингомиелином. Оказалось, что добавление 10 мол. % AnSM за-

метно разрыхляет монослой только при низких значениях  $\Delta P$ ; при 25 мН/м и выше изменения минимальны. Влияние DnsSM на плотность упаковки монослоя невелико и проявляется равномерно на всей кривой сжатия.

Интересно, что площадь, приходящаяся на молекулу DnsPC, при одном и том же значении  $\Delta P$  возрастает при уменьшении pH (рис. 3). По-видимому, диметиламиновая группа флуорофора экспонирована в водную фазу при невысоких значениях  $\Delta P$ , но при  $\Delta P$  более 20 мН/м флуорофор полностью вытесняется из нее. Этот вывод находится в согласии с данными флуоресцентных измерений и спектроскопии  $^1\text{H-NMR}$  (см. ниже).

При уменьшении концентрации зондов до 1 мол. % все указанные выше эффекты уменьшаются (рис. 1 и 2). Таким образом, введение в низких концентрациях синтезированных нами фосфолипидных зондов в биологические мембраны не должно приводить к существенным нарушениям их структуры. Кроме того, большинство описанных эффектов проявляется лишь при значениях  $\Delta P$  (40 мН/м и выше), которые превосходят  $\Delta P$  природных мембран (в наружном слое озвученных фосфолипидных везикул  $\Delta P$  составляет 25–30 мН/м [12], а в биологических мембранах — 30–40 мН/м [13]).

Положение максимумов флуоресценции AnPC и AnSM мало зависит от полярности растворителя. Аналогичная слабая зависимость отмечена для других зондов с антрильной [14] и пиреновой [15] группами (табл. 1). Это обстоятельство не позволяет определить полярность окружения антрильного флуорофора и, следовательно, степень его погружения в липидный бислой по положению максимума его испускания. Однако ранее проведенные исследования локализации флуорофора 9-антроилоксижирных кислот показали, что он располагается в неполярной части бислоя, причем глубина погружения антроильной метки соответствует ее расстоянию от карбоксильной группы [16, 17], в то время как метил-9-антроат располагается в середине бислоя, в зоне  $\text{CH}_3$ -групп жирнокислотных остатков [17]. Несомненно, что в нашем случае еще менее полярная группа AnPC (или AnSM) также должна находиться в неполярной части бислоя.

С таким заключением согласуется взаимодействие антрильного флуорофора с N-(2,4,6-тринитрофенил)глицином, предложенным в качестве тушителя флуоресценции Шредером и сотр. [8]. Из данных, полученных ими, можно предположить, что в фосфолипидной мембране TnpGly локализован в районе глицериновых остатков так, что карбоксильная группа остается экспонированной в водную фазу. TnpGly имеет максимумы поглощения при 345 и 425 нм ( $\epsilon$  13900 и 7400 соответственно), не обладая собственной флуоресценцией. Это делает его хорошим тушителем флуоресценции антрильного остатка. Ослабление флуоресценции донора происходит не только путем переноса энергии (динамическое тушение), но и за счет простого поглощения на длинах волн возбуждения и испускания. Для донорно-акцепторной пары AnPC — TnpGly соотношение между обоими эффектами можно оценить следующим образом. AnPC, включенный в фосфатидилхолиновые везикулы, кроме максимумов при 415 и 434 нм имеет слабо выраженное плечо при 460 нм (рис. 4, 1). Убывание интенсивности при 460 нм обусловлено в основном переносом энергии (поскольку TnpGly при 460 нм не поглощает), а при

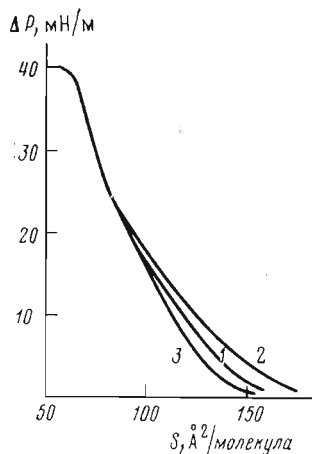


Рис. 3. Зависимость поверхностного давления от площади, приходящейся на молекулу, для DnsPC при 31°С и pH водной фазы 7,1 (1), 5,1 (2), 9,1 (3)

Флуоресцентные характеристики фосфолипидных зондов \*

Вещество	Максимум флуоресценции в различных средах, нм					Поляризация флуоресценции **
	бензол	диоксан	этанол	этиленгликоль	фосфатидилхолиновые везикулы	
AnPC	417, 434	415, 434	413, 430	417, 436	415, 434	0,10
AnSM	416, 434	415, 433	412, 431	416, 434	413, 434	0,12
DnsPC	495	490	513	524	518	0,12
DnsSM	488	490	515	527	505	0,14
N-Дансил-фосфатидилэтаноламин					515	

\* Для дансильных производных  $\lambda_{\text{возб}}^{\text{макс}}$  350 нм, для антрильных — 370 нм.

\*\* Измерена в везикулах, построенных из яичного фосфатидилхолина, при 23° С.

434 нм — и переносом энергии, и простым поглощением. С увеличением концентрации тушителя интенсивность флуоресценции при 434 нм падает сильнее (рис. 4). Поглощение тушителя на длине волны возбуждения флуорофора оценить труднее, однако оно не должно быть значительным, так как при 370 нм TnpGly имеет в спектре поглощения впадину. Таким образом, можно предположить, что при невысоких концентрациях тушителя (~1 мМ) эффект от прямого поглощения невелик.

Изучение кинетики тушения AnPC, включенного в везикулы, при действии TnpGly выявило любопытный факт (рис. 5): после добавления тушителя к суспензии интенсивность флуоресценции сначала падает (кривые 2—4; это можно объяснить постепенным включением TnpGly в везикулярную мембрану), а затем возрастает (кривая 5). Последнее явление может быть интерпретировано как результат транслокации («флип-флопа») зонда с внешнего слоя мембраны на внутренний при включении тушителя во внешний слой. Объемистая тринитрофенильная группа TnpGly, располагаясь вблизи поверхности внешнего слоя, должна его расклинивать, что и вызывает переход зонда на внутренний слой мембраны. При этом тушение флуоресценции уменьшается из-за увеличения расстояния между флуорофором и тушителем.

Иначе ведет себя в аналогичном опыте AnSM (рис. 6): после резкого падения флуоресценции, вызванного введением тушителя (кривые 1, 2), ее интенсивность снижается лишь незначительно и затем остается неизменной (3), что указывает на отсутствие транслокации AnSM. Этот результат хорошо согласуется с данными о значительно меньшей скорости «флип-флопа» сфингомиелина по сравнению с фосфатидилхолином в биологических мембранах [19].

Положение максимума испускания N-дансильной группы сильно зависит от полярности окружения [3], что позволяет оценить локализацию флуорофора в бислое по значению  $\lambda_{\text{флуор}}^{\text{макс}}$ . В везикулах дансильный флуорофор находится в зоне с полярностью, близкой к полярности этанола, по видимому, среди остатков глицерина (табл. 1). Это подтверждается близкими значениями  $\lambda_{\text{флуор}}^{\text{макс}}$ . У DnsPC и N-дансилфосфатидилэтанолamina [4], для которого установлена локализация дансильного флуорофора среди глицериновых остатков [3, 4]. У последнего соединения Dns-группа присоединена к полярной части молекулы, в случае же DnsPC и DnsSM флуорофор находится на конце неполярной цепи, которая должна изогнуться чтобы дансильный остаток мог попасть в зону поверхности бислоя. Очевидно, такой изгиб вызван полярностью диметиламиновой группы дансиль-

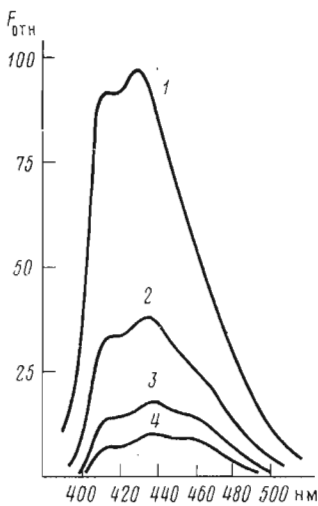


Рис. 4

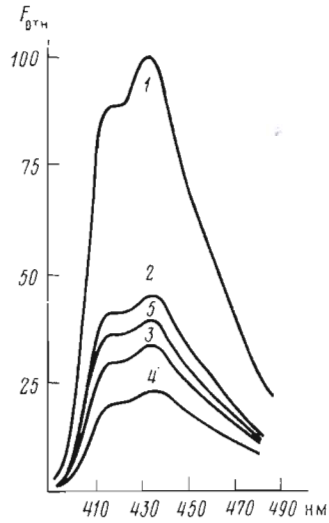


Рис. 5

Рис. 4. Тушение флуоресценции AnPC, встроенного в везикулы из яичного фосфатидилхолина, под действием TrpGly. Концентрация липида 1,5 мг/мл; буфер трис-HCl, pH 7,4; соотношение AnPC - фосфатидилхолин 1:200 (зонд добавляли в виде спиртового раствора); температура 20°С: 1 - в отсутствие TrpGly; 2, 3 и 4 - концентрация TrpGly 1, 2 и 3 мМ соответственно

Рис. 5. Тушение флуоресценции AnPC, встроенного в везикулы из яичного фосфатидилхолина, под влиянием 1 мМ TrpGly. Концентрация липида 1,5 мг/мл; буфер трис-HCl, pH 7,4; соотношение AnPC - фосфатидилхолин 1:200 (зонд вводили перед приготовлением везикул); температура 23°С. 1 - исходный спектр везикул, 2-5 - сразу после добавления тушителя, через 10, 15 и 30 мин соответственно

ного остатка, которая делает выгодным ее экспонирование в водную фазу. На первый взгляд это предположение противоречит данным экспериментов, проведенных на монослоях липидов, согласно которым дансильная группа выходит из взаимодействия с водной фазой при  $\Delta P \geq 20$  мН/м (рис. 3), в то время как поверхностное давление в везикулах оценивается величиной 25—30 мН/м [12]. Однако воздействия липидной матрицы на флуоресцентный зонд в липидных монослоях и везикулах несколько различаются: во втором случае значительная кривизна мембраны, видимо, облегчает локализацию объемистой дансильной группы вблизи внешней поверхности бислоя.

Следует отметить, что  $\lambda_{\text{флуор}}^{\text{макс}}$  DnsSM сдвинут на 13 нм в коротковолновую область по сравнению с DnsPC, что указывает на менее полярное окружение его флуорофора. Возможно, такое различие объясняется большей у DnsSM, чем у DnsPC, жесткостью алифатической цепи, несущей дансильный остаток, что затрудняет ее изгиб.

Предположение, что флуорофор DnsPC расположен близко к поверхности бислоя, было подтверждено изучением эффекта тушения флуоресценции под влиянием TrpGly (рис. 7). Несомненно, что в этом случае эффект тушения частично обусловлен простым поглощением света, поскольку спектры возбуждения дансильной группы и поглощения TrpGly имеют максимумы в одной области (340—350 нм). Однако также имеет место тушение за счет переноса энергии, поскольку после резкого падения флуоресценции сразу после добавления тушителя к везикулам, содержащим DnsPC (кривые 1 и 2), наблюдается дальнейшее постепенное уменьшение флуоресценции, вызванное, очевидно, встраиванием TrpGly в бислой (кривая 3). В отличие от AnPC-содержащих везикул, для везикул, содержащих DnsPC, увеличения флуоресценции с течением времени не наблюдается.



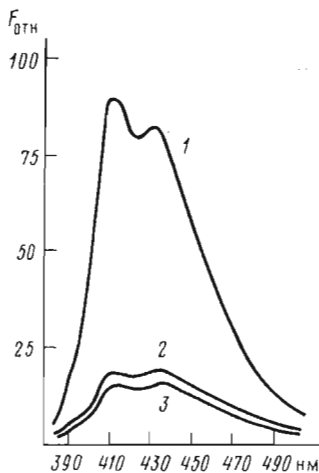


Рис. 6

Рис. 6. Тушение флуоресценции AnSM, встроенного в везикулы из яичного фосфатидилхолина, под влиянием 1,5 мМ TnpGly. Условия идентичны указанным в подписи к рис. 5. 1 — исходный спектр везикул, 2 — сразу после добавления тушителя, 3 — через 20 и 40 мин

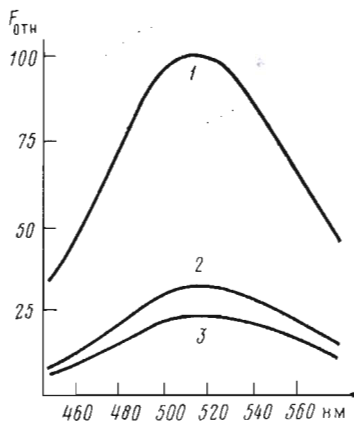


Рис. 7

Рис. 7. Тушение флуоресценции DnsPC, встроенного в везикулы из яичного фосфатидилхолина, под влиянием 1,5 мМ TnpGly. Концентрация липида 2 мг/мл; буфер трис-HCl, pH 7,4; соотношение DnsPC — фосфатидилхолина 1:100 (зонд добавляли в виде спиртового раствора); температура 20° С. 1 — исходный спектр везикул, 2 — сразу после добавления тушителя, 3 — через 20 и 40 мин

Е

Это указывает на то, что в данном случае TnpGly не является индуктором трансмембранной миграции флуоресцентного зонда.

Большие величины поляризации флуоресценции сфингомиелинов в сравнении с соответствующими фосфатидилхолинами (см. табл. 1), видимо, объясняются большей жесткостью сфингомиелиновой молекулы, создаваемой водородной связью между оксигруппой при C<sub>(3)</sub> и амидным карбониллом [20].

Дополнительное подтверждение расположения антрильного и дансильного флуорофоров в фосфатидилхолиновом бислое получены с помощью спектроскопии <sup>1</sup>H-ЯМР. Известно, что ароматическое кольцо оказывает диамагнитное экранирующее влияние на ядра, расположенные в плоскости, перпендикулярной плоскости кольца, что вызывает сдвиг их резонансных сигналов в область сильных полей. Этот эффект с успехом использовали Подо и Блэзи для установления областей локализации различных ароматических флуорофоров в фосфатидилхолиновом бислое [16].

При съемке <sup>1</sup>H-ЯМР-спектров везикул из смесей димиристоилфосфатидилхолина с AnPC и DnsPC при рабочей частоте 300 МГц хорошо идентифицируются резонансные сигналы концевых метильных групп и метиленовых групп при C<sub>(4)</sub>—C<sub>(13)</sub> жирнокислотных остатков, а также групп CH<sub>2</sub>NMe<sub>3</sub> и N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> холинового остатка (табл. 2). Данные табл. 2 показывают, что при включении AnPC в везикулы ароматический флуорофор экранирует концевые метильные и 4—13-CH<sub>2</sub>-группы (сдвиг в сильное поле на 0,05—0,07 м.д.), но не влияет на сигналы холиновой части фосфолипидов. Другую картину дает включение в везикулы DnsPC: в область сильного поля (на 0,04 м.д.) сдвигается сигнал холиновой CH<sub>2</sub>-группы, тогда как сигналы жирнокислотных CH<sub>3</sub>- и CH<sub>2</sub>-групп остаются незатронуемыми.

Эти результаты убедительно доказывают, что антрильный остаток находится в неполярной части бислоя, а дансильный — вблизи полярной головки.

Химические сдвиги протонов димиристоилфосфатидилхолина ( $\Delta\delta$ , м.д., относительно  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) в везикулярных мембранах с включенными флуоресцентными зондами

Тип атома водорода	Зонд, включенный в везикулы		
	—	AnPC	DnsPC
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}$	1,00	1,05	1,00
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$	0,59	0,66	0,60
$\text{N}(\text{CH}_3)_3$	-1,35	-1,35	-1,35
$\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$	-1,79	-1,78	-1,75

Антрильный флуорофор AnPC фиксирован на конце жирнокислотной цепи, поэтому ароматическое кольцо располагается в основном перпендикулярно плоскости бислоя, что находит отражение в экранировании протонов  $\text{CH}_2$ - и  $\text{CH}_3$ -групп жирнокислотных цепей.

В заключение отметим преимущества флуоресцентных фосфолипидных зондов по сравнению с зондами иной природы:

1) фосфолипидные зонды вызывают меньшее возмущение бислоя, чем большинство применяемых зондов;

2) флуорофор фосфолипидных зондов локализован в определенной области бислоя, тогда как нелипидные зонды могут распределяться между несколькими областями [21];

3) по своим динамическим параметрам фосфолипидные зонды близкoимитируют нативные фосфолипиды, тогда как нелипидные зонды совершают вращательные и поступательные движения, сильно отличающиеся во многих случаях от движений липидных молекул (ср. [16]).

Синтез 2-ацетиламино-3-ацетокси-3-карбокситр-эритро-пропанола-1-фосфохолина (VI) и установление его строения выполнены с участием Г. И. Музи.

### Экспериментальная часть

Масс-спектры сняты на приборах LKB-9000 (Швеция) и «Varian MAT 44» (США), спектры ПМР — на спектрометрах «Varian XL-100 и SC-300» (США), УФ-спектры — на спектрофотометре «Beckman Acta M VI», спектры флуоресценции (не корректированы) — на приборе «Hitachi MPF-3» (Япония), оптическое вращение снимали на поляриметре «Perkin Elmer 241» (Англия) при  $20^\circ\text{C}$  в хлороформе. ГЖХ метиловых эфиров жирных кислот проводили на хроматографе «Varian 2100» (США) с ионизационно-пламенным детектором (колонка  $2000 \times 2$  мм, 5% SE-30 на хромосорбе W, температура  $100 \rightarrow 300^\circ\text{C}$  ( $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ ), скорость гелия 30 мл/мин). Для анализа триметилсилиловых производных сфингозиновых оснований применяли колонку размером  $1000 \times 4$  мм, 3% OV-1 на хромосорбе W (температура  $210^\circ\text{C}$ , скорость гелия 30 мл/мин).

Растворители очищали по обычным методикам; все выпаривания проводили в вакууме на роторном испарителе при температуре не выше  $40^\circ\text{C}$ . Для колоночной хроматографии применяли силикагель марки 60 (Merck, ФРГ), для ТСХ — пластинки с силикагелем КСК [22] и готовые пластинки «Silufol UV 254» (Kavalier, ЧССР), системы для проявления: хлороформ — метанол — 7 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 65 : 35 : 8 (А); хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (В). Для обнаружения веществ на хроматограммах использовали: флуоресценцию при УФ-облучении (а), нингидрин (б), специфический реагент на фосфолипиды [23] (в), фосфорномолибденовую кислоту (г) и реактив Драгендорфа (д).

11-Аминоундекановая кислота [24], 12-(9-антрил)-11-транс-додецен-овая кислота [1] и N-дансилфосфатидилэтанолламин [4] получены как описано ранее. Бензилхлорформат, дансилхлорид, N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимид солянокислый, N-оксисукцинимид и октаметилендиамин (Merck, ФРГ), 4-диметиламинопиридин (Fluka, Швейцария) и трис-малат (Sigma, США) применяли без дополнительной очистки. Димиристоилфосфатидилхолин (Serva, ФРГ) очищали от следов лизопроевд-ного и миристиновой кислоты хроматографией на силикагеле в градиент-ной системе хлороформ — метанол. Лизофосфатидилхолин получали из фосфатидилхолина, выделенного из яичного желтка, ферментоллизом фос-фолипазой A<sub>2</sub> [25]. По данным ГЖХ, он содержал пальмитиновую и стеа-риновую кислоты в соотношении 5 : 2 (остальных кислот ~2%). С учетом этого средний молекулярный вес фосфолипида (моногидрата) 492. Сфинго-миелин выделяли по методике [26] из мозга крупного рогатого скота. По данным ГЖХ, фосфатид содержал в основном следующие кислоты: 16 : 0 (2,8%), 18 : 0 (62%), 18 : 1 (5,3%), 20 : 0 (3,0%), 22 : 0 (6,3%), 24 : 0 + 24 : 1 (10,8%). Сфингозиновые основания, по данным ГЖХ O,N-тримет-илсилиловых производных (гидролизовали сфингомиелин по методу [9], силилировали — по методу [27]), представлены смесью сфингенина и сфинганина в примерном соотношении 9 : 1. С учетом этого средний моле-кулярный вес сфингомиелина 755.

С веществами, содержащими флуоресцентные группы, работали только при слабом рассеянном свете ламп накаливания.

*Измерения поверхностного давления.* Поверхностное давление ( $\Delta P$ ) измеряли по методу Вильгельми [28] с помощью механотрона 6Mx1C, предварительно проградуированного в мН/см. В качестве измерительного элемента применяли вольфрамовую пластинку толщиной 0,1 мм и перимет-ром 10 см; точность измерений  $\pm 0,3$  мН/м. Измерения зависимости  $\Delta P$  от степени сжатия монослоя производили в кювете из полиметилметакри-лата (607×140×10 мм) с парафинированными бортами, снабженной по-движным тефлоновым барьером. Все измерения проводили в 0,01 М KCl, содержащем 0,01 М трис-малат, pH 7,4 (кроме особо оговоренных случаев); растворы готовили на бидистиллированной воде с удельным сопротивле-нием не менее 10<sup>5</sup> Ом·см.

*Фосфатидилхолиновые везикулы.* В круглодонной колбе на 50 мл вы-паривали 10% бензольный раствор яичного фосфатидилхолина (0,15—0,20 мл), липид растворяли в 3—5 мл свежеперегнанного эфира, операцию повторяли. Осажденный на стенках колбы фосфатидилхолин диспергиро-вали с помощью механического встряхивателя в 10 мл 0,2 М трис-HCl-буфера, pH 7,4. Дисперсию переносили в стеклянную пробирку и подвер-гали обработке в атмосфере аргона на ультразвуковом генераторе УЗДН-2Г (22 кГц, 100 Вт, титановый щуп диаметром 15 мм) в течение 25 мин (10+10+5) с двумя интервалами по 2 мин, при непрерывном охлаждении льдом, затем суспензию центрифугировали 10 мин при 10 000g. Суспензия везикул имела поглощение не более 0,3 в интервале 350—700 нм. Флуоресцентные зонды вводили в везикулы либо добавлением к фосфатидилхолину перед приготовлением дисперсии, либо добавлением к готовой суспензии везикул 0,1—0,2% раствора зонда в этаноле с после-дующей инкубацией в течение 45 мин. Концентрация этанола в суспензии везикул не превышала 0,5%. TrpGly добавляли к суспензии везикул в виде 1% раствора в этаноле.

*Везикулы для спектроскопии ПМР и регистрация спектров.* Везикулы получали как описано выше, но из димиристоилфосфатидилхолина с до-бавлением 4% миристиновой кислоты, а также из этой смеси и AnPC или DnsPC (мольное соотношение липид — зонд 5 : 1, концентрация 5 мг/мл). 5 мМ фосфатный буфер, содержащий 45 мМ NaCl и 30 мМ CH<sub>3</sub>COONa, го-товили на <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. Температура диспергирования и озвучивания везикул 50° С.

Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР при 300 МГц снимали при 32°С с применением 200 разверток и фурье-преобразованием.

*N*-Бензилоксикарбонил-11-амиоундекановая кислота (II). 11-Амиоундекановую кислоту (2 г) ацилировали бензилхлорформиатом по методу Шоттена-Баумана [29]. Кристаллизацией продукта реакции из эфира — толуола получали 2,37 г (71%) бесцветного кристаллического порошка, т. пл. 95–97°С. Найдено, %: С 68,0; Н 8,7; N 3,9. C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>4</sub>. Вычислено, %: С 68,0; Н 8,7; N 4,2.

*1*-Ацил-2-(*N*-бензилоксикарбонил-11-амиоундеканойл)-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (III). *N*-Бензилоксикарбонил-11-амиоундекановую кислоту (150 мг) превращали в ангидрид действием 50 мг дициклогексилкарбодиимида в 2 мл сухого СH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [30], смесь фильтровали и упаривали, остаток растирали с 1,5 мл сухого хлороформа, осадок отделяли. Фильтрат прибавляли к смеси 100 мг лизолецитина, предварительно высушенного над Р<sub>2</sub>О<sub>5</sub> (24 ч при 10 Па), 10 мг 4-диметиламинопиридина, 0,1 мл сухого триэтиламина и 1 мл сухого хлороформа, перемешивали 12 ч при 20°С. Через 24 ч смесь разбавляли 5 мл хлороформа, промывали 1% HCl, содержащей 1% NaCl (3×2 мл) и 1% NaCl (2×2 мл), и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с 10 г силикагеля в ступенчатой градиентной системе хлороформ — метанол. Выход 86 мг (52%), аморфная бесцветная масса хроматографически индивидуальна, по данным ТСХ; подвижности этого вещества и яичного фосфатидилхолина совпадают (системы А, В, обнаружение реактивами б, д). [α]<sub>D</sub>+4,1° (с 1,5). Найдено, %: Р 3,7. Для среднего *M* 809 вычислено, %: Р 3,8.

*1*-Ацил-2-(*N*-дансил-11-амиоундеканойл)-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (*DnsPC*). Раствор 80 мг фосфатидилхолина (III) в смеси (3 мл) бензол — изопропанол — диоксан — СH<sub>3</sub>COOH, 40:40:2:1 (бензол предварительно перегоняли над никелем Ренея), гидрировали в токе водорода над 20 мг свежеприготовленной палладиевой черни, контролируя процесс с помощью ТСХ (А, реагенты б, в). Фосфатидилхолин (III) и продукт гидрогенолиза — 1-ацил-2-(11-амиоундеканойл)-*sn*-глицеро-3-фосфохолин — имеют *R<sub>f</sub>* 0,6 и 0,3 соответственно. Через 7 ч гидрогенолиз завершился, катализатор отделяли и промывали смесью хлороформ — метанол, 2:1, фильтрат упаривали. Остаток растворяли в 2 мл сухого хлороформа, добавляли 30 мг дансилхлорида и 0,1 триэтиламина, смесь выдерживали 12 ч при 20°С и обрабатывали как описано в предыдущей методике (при ТСХ реагенты а, в, д). Выход 62 мг (69%), аморфная желто-зеленая масса, [α]<sub>D</sub>+7,4° (с 1). УФ, этанол, λ<sub>макс</sub>, нм (ε): 250 (15000), 330 (3100). Найдено, %: Р 3,2. Для среднего *M* 909 вычислено, %: Р 3,4.

8-Дансиламиногексиламин (VII). К раствору 20 мг октаметилендиамина и 20 мкл триэтиламина в 0,5 мл сухого хлороформа за 1 ч при интенсивном перемешивании прибавляли раствор 20 мг дансилхлорида в 1,5 мл хлороформа. Смесь перемешивали 1 ч, разбавляли 1 мл метанола и 0,5 мл воды, перемешивали 1 ч и упаривали. Остаток фильтровали через короткую колонку с 1 г окиси алюминия в смеси хлороформ — метанол, 3:1 (10 мл), затем хроматографировали на колонке с 2 г силикагеля, вещество элюировали смесями хлороформ — метанол (3:1, 2:1, 1:1), затем смесью хлороформ — метанол — конц. NH<sub>4</sub>OH (65:25:4); контроль ТСХ в той же системе, реагенты а, б. Выход 17 мг (61%), желтое маслообразное вещество; *R<sub>f</sub>* 0,7. Для *N'*-трифторацетильного производного найдено: *M* 473,1972. C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>. Вычислено: *M* 473,1960.

2-Ациламино-3-ацетокси-3-карбокси-*D*-эритро-пропанола-1-фосфохолин (VI). Сфингомиелин (300 мг) растворяли в 5 мл сухого хлороформа, добавляли 5 мл сухого пиридина и 5 мл уксусного ангидрида, через 24 ч все исходное вещество (IV) превратилось в ацетат (V) (*R<sub>f</sub>* соответственно 0,38 и 0,42 (А, реагенты в—д)). Смесь упаривали, остаток сушили при 30°С/10 Па. Полученный ацетат (V) растворяли в 150 мл ледяной СH<sub>3</sub>COOH, добавляли 30 мл окисляющего раствора (смесь 0,024 М KMnO<sub>4</sub>,

и 0,02 М NaIO<sub>4</sub>, 1:1), смесь встряхивали при 20°С, добавляя 0,024 М KMnO<sub>4</sub> порциями по 2—3 мл по мере обесцвечивания. Через 2,5 ч, когда окраска раствора более не менялась, ее обесцвечивали 20% NaHSO<sub>3</sub>, добавляли водой до 250 мл, подкисляли 0,1 н. HCl до pH 2 и вещество экстрагировали смесью хлороформ — метанол, 2:1 (2×200 мл), отделяя нижний слой. Объединенные экстракты упаривали, получали 280 мг смеси продуктов реакции, содержащей, по данным ТСХ (А, реагенты б—д), кроме неокисленного исходного липида (по-видимому, содержащего остаток сфинганина) с R<sub>f</sub> 0,4, фосфатид (VI) с R<sub>f</sub> 0,2, а также ряд более полярных веществ — видимо, продуктов избыточного окисления ацетата (V). Вещество выделяли хроматографией на колонке с 20 г силикагеля в ступенчатой градиентной системе (от 9:1 до 9:10) хлороформ — смесь хлороформа с СН<sub>3</sub>COOH и водой, 7:2:1. Получали 135 мг фосфатида (VI) в виде бесцветного воска, содержащего, по данным ГЖХ, остатки кислот 16:0 (3,0%), 18:0 (67,3%), 20:0 (3,9%), 22:0 (6,4%), 23:0 (4,5%), 24:0 (10,2%), а также небольшие количества кислот C<sub>19</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>26</sub>. С учетом этого средний молекулярный вес фосфатида (VI) (моногидрата) 659. Найдено, %: P 4,9. Вычислено, %: P 4,7.

<sup>1</sup>H-ЯМР (смесь CDCl<sub>3</sub> — CD<sub>3</sub>OD, δ, м. д.): 0,94 (т, СН<sub>3</sub>СН<sub>2</sub>), 1,34 (м, жирнокислотные СН<sub>2</sub>-группы), 1,66 (м, СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>CO), 2,26 (м, СН<sub>3</sub>CO и СН<sub>2</sub>CO), неразрешенные мультиплет при ~3,3 (СН<sub>2</sub>НМе<sub>3</sub>) и синглет при 3,48 [N(СН<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 4,55 (шир. м, СНОAc, СНННСО, СН<sub>2</sub>ОР).

*8-Дансиламиноктиламид-D-эритро-2-окси-3-ациламино-4-(холинфосфоокси)масляной кислоты (DnsSM)*. К раствору 37 мг кислоты (VI) в 1,5 мл смеси тетрагидрофуран — вода (3:1) при перемешивании добавляли раствор 30 мг N-оксисукцинимид в 0,6 мл того же растворителя и затем раствор 40 мг хлоргидрата N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимид в 0,4 мл воды. Смесь перемешивали 2 ч при 20°С, затем добавляли раствор 17 мг дансиламина (VII) в 0,5 мл вышеуказанного растворителя. Через 12 ч смесь упаривали, остаток хроматографировали последовательно на 3 г окиси алюминия и затем на 4 г силикагеля (элюирование смесью метанол — хлороформ, 3:1, 2:1, 1:1, затем хлороформ — метанол — 7 н. NH<sub>4</sub>OH, 65:35:4 и 65:35:8, порции по 10 мл). Состав фракций контролировали ТСХ (А, реагенты а—в, д). Получали 29 мг ацетата дансилмеченого сфингомиелина, имеющего одинаковую с ацетатом (V) подвижность.

Ацетат DnsSM растворяли в 1 мл этанола, добавляли 0,5 мл 10% гидразингидрата в этаноле и 0,5 мл воды, раствор выдерживали 5 ч при 20°С и упаривали. Остаток сушили 1 ч при 10 Па, растворяли в 5 мл смеси хлороформ — метанол (5:1) и фильтровали. Фильтрат упаривали, остаток сушили при 10 Па, получали 27 мг DnsSM, хроматографически индивидуального. УФ, этанол, λ<sub>макс</sub>, нм (ε): 252 (16 100), 335 (3800). Найдено, %: P 3,3. Для среднего M 976 вычислено, %: P 3,2.

*Сфингозин-1-фосфохолин (X)*. Сфингомелин (IV) (140 мг) растворяли при нагревании в 13,5 мл метанола, добавляли 1,55 мл воды и 1,45 мл конц. HCl, смесь выдерживали 12 ч при 70°С, после чего, по данным ТСХ (А, реагенты б, в), сфингомиелин (R<sub>f</sub> 0,36) в смеси отсутствовал. При хроматографии на 7 г силикагеля элюировали 35 мг сфингозина (смесью хлороформ — метанол, 9:1, хлороформ — метанол — конц. NH<sub>4</sub>OH, 10:10:1) и 32 мг сфингозин-1-фосфохолина (X); R<sub>f</sub> 0,24 (А). Найдено, %: P 6,3. C<sub>23</sub>H<sub>51</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>P. Найдено, %: P 6,4.

*N-[12-(9-Антрил)-11-транс-додеценоил]сфингозин-1-фосфохолин (AnSM)*. К раствору 17 мг сфингозин-1-фосфохолина (X) и 20 мг 12-(9-антрил)-11-транс-додеценовой кислоты (XI) в 0,4 мл смеси хлороформ — изопропанол (2:1) прибавляли при перемешивании 0,1 мл триэтиламина и 100 мкл 20% дициклогексилкарбодимид в CCl<sub>4</sub>. Смесь выдерживали 2 ч при 40°С и 12 ч при 20°С, добавляли еще 10 мг кислоты и 50 мкл раствора дициклогексилкарбодимид и выдерживали 3 ч при 40°С. После-

этого исходный фосфатид (X), согласно данным ТСХ (А, реагенты а-в), отсутствовал. Смесь помещали на колонку с 8 г силикагеля, в ступенчатом градиенте хлороформ — метанол элюировали 15 мг (51%) AnSM в виде желтой смолы. Вещество при ТСХ на пластинке с силикагелем КСК проявляется в виде двух пятен с  $R_f$  0,45 (главный компонент) и 0,50 (минорный) (А) и  $R_f$  соответственно 0,42 и 0,46 (Б). В системе хлороформ — метанол —  $\text{CH}_3\text{COOH}$  — вода (25 : 70 : 25 : 4) AnSM мигрирует в виде одного вытянутого пятна с  $R_f$  0,3. УФ-спектр AnSM повторяет спектр кислоты (XI):  $\lambda_{\text{макс}}$  257, 350, 368, 387 нм. Найдено, %: P 3,8.  $\text{C}_{49}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}_7$ . Вычислено, %: P 3,7.

Образец AnSM ацетилировали, как описано для ацетата (V). Ацетат AnSM мигрировал при ТСХ как одно пятно с  $R_f$  0,55 (А).

Раствор 0,1 мг AnSM в 0,3 мл смеси бензол — изопропанол — диоксан —  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (40 : 40 : 2 : 1) гидрировали 12 ч над предварительно восстановленной окисью платины, фильтровали и упаривали. Полученное вещество при ТСХ в нейтральной и аммиачной системах не отличалось от минорного компонента AnSM.

Авторы выражают благодарность В. Ф. Быстрову и В. И. Кондакову за съемку  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Молотковский Ю. Г., Дмитриев И. И., Никулина Л. Ф., Бергельсон Л. Д. Синтез новых флуоресцентнопомеченных фосфолипидов.— Биооргани. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 588—594.
2. Молотковский Ю. Г., Ункоцкий В. И., Бергельсон Л. Д. Ферментативный синтез флуоресцентного фосфатидилэтаноламина.— Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 1, с. 144—145.
3. Waggoner A. S., Stryer L. Fluorescent probes of biological membranes.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 67, № 2, p. 579—589.
4. Shechter E., Gulik-Krzywicki T., Azerad R., Gros C. Correlation between structure spectroscopic properties in membrane model systems. Fluorescence of dansylated protein and dansylated lipid in protein-lipid-water phases.— Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 241, № 2, p. 431—442.
5. Harris W. E. Interactions between fluorescent labeled phosphatidylserine and cations.— Chem. Phys. Lipids, 1977, v. 19, № 3, p. 243—254.
6. Gupta C. M., Radhakrishnan R., Khorana H. G. Glycerophospholipid synthesis: improved general method and new analogs containing photoactivable groups.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 10, p. 4315—4319.
7. Shimojo T., Abe M., Ohta M. A method for determination of saturated phosphatidylcholine.— J. Lipid Res., 1974, v. 15, № 5, p. 525—527.
8. Stoffel W., Hanfland P. Analysis of amino sugar-containing glycosphingolipids by combined gas-liquid chromatography and mass-spectrometry.— Z. Physiol. Chem., 1973, B. 354, № 1, S. 21—31.
9. Stoffel W., Assmann G. On the metabolism of sphinganyl- and sphingenyl-1-phosphorylcholine.— Z. Physiol. Chem., 1972, B. 353, № 1, S. 65—74.
10. Stoffel W., Zierenberg O., Tunggal B. D., Schreiber E.  $^{13}\text{C}$  Nuclear magnetic resonance studies on lipid-protein interactions in human high-density lipoprotein (HDL).— Z. Physiol. Chem., 1974, B. 355, № 11, S. 1381—1390.
11. Gaines C. L. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. N. Y.— London: Intersci. Publ., 1966, p. 256.
12. Blume A. A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers.— Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 557, № 1, p. 32—44.
13. Conrad M. J., Singer L. S. J. Evidence for a large internal pressure in biological membranes.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 10, p. 5202—5206.
14. Stoffel W., Michaelis G. Chemical synthesis of novel fluorescent-labelled fatty acids, phosphatidylcholines and cholesterol esters.— Z. Physiol. Chem., 1976, B. 357, № 1, S. 7—19.
15. Sunamoto J., Kondo H., Nomura T., Okamoto H. Liposome membranes. 2. Synthesis of a novel pyrene-labeled lecithin and structural studies on liposomal bilayers.— J. Amer. Chem. Soc., 1980, v. 102, № 3, p. 1146—1152.
16. Podo F., Blasic J. K. Nuclear magnetic resonance studies of lecithin bimolecular leaflets with incorporated fluorescent probes.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 3, p. 1032—1036.
17. Thulborn K. R., Sawyer W. H. Properties and locations of a set of fluorescent probes sensitive to the fluidity gradient of the lipid bilayer.— Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 511, № 1, p. 125—140.

18. *Schroeder F., Goh E. H., Heimberg M.* Regulation of the surface physical properties of the very low density lipoprotein.— *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 10, p. 2456–2463.
19. *Zilversmit D. B., Hughes M. E.* Extensive exchange of rat liver microsomal phospholipids.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 469, № 1, p. 99–110.
20. *Schmidt C. F., Barenholz Y., Thompson T. E.* A nuclear magnetic resonance study of sphingomyelin in bilayer systems.— *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 12, p. 2649–2656.
21. *Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980, с. 62–63.
22. *Svetashev V. I., Vaskovsky V. E.* A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids.— *J. Chromatogr.*, 1972, v. 67, № 2, p. 376–378.
23. *Vaskovsky V. E., Kostetsky V. Y., Vasendin I. M.* A universal reagent for phospholipid analysis.— *J. Chromatogr.*, 1975, v. 114, № 1, p. 129–141.
24. *Несмеянов А. Н., Фрейдлина Р. Х., Захаркин Л. И., Васильева Е. И., Кост В. Н., Васильева Т. Т.* Синтез  $\omega$ -аминокарбоновых кислот, исходя из  $\alpha,\alpha,\omega$ -тетрахлоралканов.— *Ж. общ. химии*, 1957, т. 27, № 9, с. 2418–2422.
25. *Hanahan D. J., Rodell M., Turner L. D.* Enzymic formation of monopalmitoleyl- and monopalmitoyllecithin (lysolecithins).— *J. Biol. Chem.*, 1954, v. 206, № 2, p. 431–441.
26. *Hanahan D. J.* Sphingomyelin.— *Biochemical preparations*, 1961, v. 8, p. 121–124.
27. *Carter H. E., Gaver R. C.* Improved reagent for trimethylsilylation of sphingolipid bases.— *J. Lipid Res.*, 1967, v. 8, p. 391–395.
28. *Gaines C. L.* Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. N. Y.— London: Intersci. Publ., 1966, p. 45.
29. *Гринштейн Дж., Виллиу М.* Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1966, с. 396.
30. *Salinger Z., Lapidot Y.* Synthesis of fatty acid anhydrides by reaction with dicyclohexylcarbodiimide.— *J. Lipid Res.*, 1966, v. 7, № 1, p. 174–175.

Поступила в редакцию  
11.VIII.1980

## SYNTHESIS OF NEW FLUORESCENT PHOSPHOLIPIDS AND A STUDY OF THEIR BEHAVIOUR IN MODEL MEMBRANES

MOLOTKOVSKY Jul. G., DMITRIEV P. I., MOLOTKOVSKAYA I. M.,  
BERGELSON L. D., MANEVICH E. M.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow; M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical  
Technology, Moscow*

The synthesis of fluorescent phospholipids, phosphatidylcholine with a dansyl residue attached to the 2-acyl chain, and sphingomyelins with dansyl or anthryl labels in the apolar part of the molecule, was accomplished. The behaviour of these compounds and of the earlier synthesized anthryl-labeled phosphatidylcholine, was studied in model phospholipid membranes. A study of the dependence between the square per molecule and surface tension for the above mentioned probes revealed that they introduced only minor perturbations in dimyristoylphosphatidylcholine monolayers. On the basis of fluorescence and  $^1\text{H}$  NMR data for the probes in phosphatidylcholine vesicles, it is concluded that the anthryl moiety localized in the apolar part of bilayer, and dansyl group — in the region of glycerol residues. It was shown that incorporation of the fluorescence quencher N-2,4,6-trinitrophenylglycine into vesicles induced a transbilayer-migration (flip-flop) of anthryl-labeled phosphatidylcholine.