



УДК 547.455.623'118'364.057

© 1992 г. Ю. Л. Себякин, Е. Н. Ким, Р. П. Евстигнеева

## СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НАТРИЕВОЙ СОЛИ (9*Z*, 11*E*)-ОКТАДЕКАДИЕН-9,11-ИЛ(β-*D*-ГЛЮКОПИРАНОЗИЛ)ФОСФАТА

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

Осуществлен синтез полимеризуемой под действием УФ-облучения натриевой соли (9*Z*, 11*E*)-октадекадиен-9,11-ил(β-*D*-глюкопиранозил)фосфата. Показано, что после полимеризации липидные дисперсии из фосфогликолипида приобретают повышенную устойчивость к действию органического растворителя.

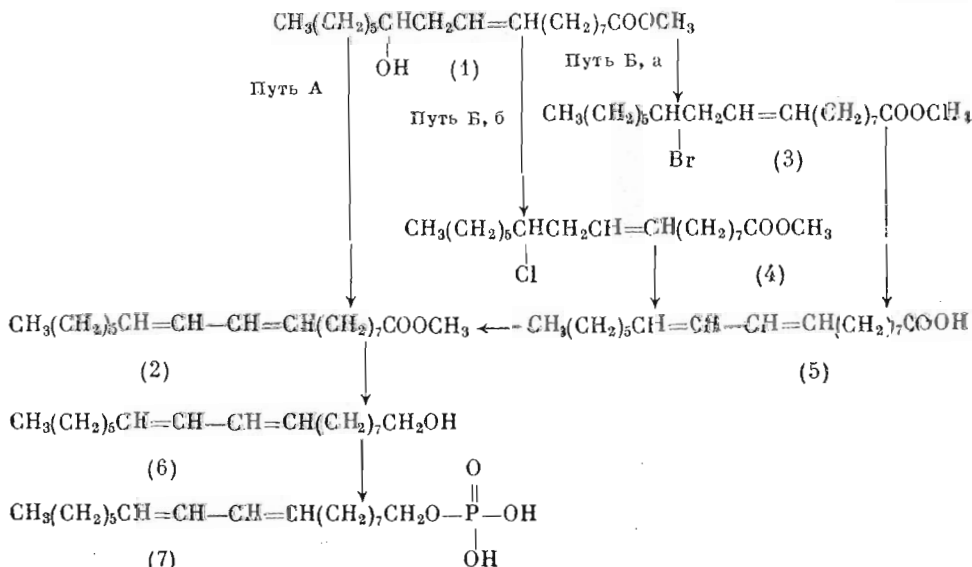
Одним из недостатков искусственных липидных систем (монослоев, плоских бислоев, липосом), широко используемых для моделирования биологических мембран [1, 2], является их относительно низкая стабильность во времени и высокая чувствительность к действию внешних факторов [3].

Для преодоления этих недостатков предложено использовать полимеризующиеся липиды [4].

В настоящей работе, продолжающей ранее начатые исследования по синтезу и изучению свойств гликолипидов [5, 6], способных к полимеризации, описан синтез натриевой соли фосфогликолипида (10). Показано, что образованные этим соединением липидные дисперсии после полимеризации обладают повышенной устойчивостью к действию органических растворителей.

Синтез липида (10) осуществлен по схемам 1 и 2.

Схема 1



Исходным соединением для получения длинноцепного ненасыщенного спирта (6) послужил доступный метиловый эфир рицинолевой кислоты (1), который дегидратировали и затем восстанавливали с помощью  $\text{LiAlH}_4$  в сухом эфире.

Дегидратацию метилового эфира рицинолевой кислоты осуществляли азеотропной отгонкой воды с толуолом в присутствии каталитических количеств ортофосфорной кислоты или нагреванием при  $150^\circ\text{C}$  с  $\text{KHSO}_4$ . Лучшие результаты (высокий выход, меньшее количество побочных продуктов) были получены в первом случае (схема 1, путь А).

Однако, по данным ПМР-спектров, полученное соединение (6) содержало (в зависимости от используемого катализатора) от 10 до 50% изомера с метиленазделенной системой двойных связей ( $\delta$  2,8 м. д.). Поэтому в дальнейшем для получения чистого спирта (6) был применен иной подход, который заключался в проведении реакции отщепления галогенводорода от соответствующего ненасыщенного галогенида (3 или 4) действием *трет*-бутилата калия (схема 1, путь Б).

Галогениды (3) и (4) получали бромированием (четырехбромистый углерод — трифенилфосфин) или хлорированием (четыреххлористый углерод — трифенилфосфин) метилрицинолеата (1). Выходы как на стадии галогенирования, так и на стадии элиминирования были сопоставимы; диеновая кислота (5) не содержала примесей соединения с метиленазделенной группировкой и образовывалась с высоким выходом. Описанный подход является модификацией известного метода [7].

Строение полученной кислоты (5) подтверждено данными ПМР-, ИК- и УФ-спектров. Конфигурация двойных связей определена измерением констант спин-спинового взаимодействия ( $K_{\text{ССВ}}$ ) протонов при двойных связях:  $J=15$  и  $10,5$  Гц, что отвечает *E,Z*-изомерии диеновой группировки.

Для получения ненасыщенного спирта (6) кислоту (5) превращали в соответствующий метиловый эфир (2), а затем восстанавливали  $\text{LiAlH}_4$  в эфире.

Фосфат непредельного спирта (7) получали фосфорилированием спирта (6) хлорокисью фосфора в присутствии пиридина или триэтиламина [8] и ввиду его неустойчивости использовали на следующей стадии без дополнительной очистки от небольшой примеси неорганического фосфата.

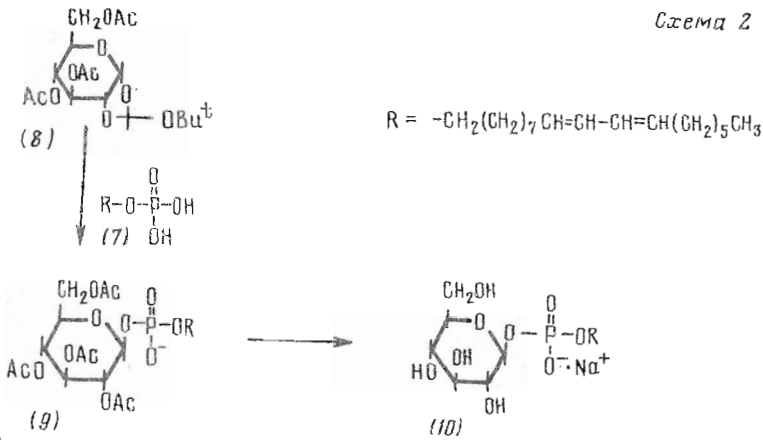
Последующее раскрытие диоксоланового цикла 1,2-*O-трет*-бутилортоацетатил-*D*-глюкозы (8) фосфатом (7) [9] и удаление защитных группировок приводило к фосфогликолипиду (10) в виде натриевой соли (схема 2), которая была охарактеризована данными ИК- и УФ-спектров. Аномерная чистота и отсутствие изомеризации в алифатической части молекулы подтверждено данными ПМР-спектров.

Нами была изучена устойчивость полимерных липидных дисперсий из фосфогликолипида (10) в сравнении с неполимеризованными липидными дисперсиями из того же липида по отношению к действию органического растворителя — этанола [10, 11].

Фосфогликолипид (10), суспендированный в дистиллированной воде с последующей обработкой ультразвуком, полимеризовали в кварцевой кювете под действием УФ-облучения; ход полимеризации контролировали изменением УФ-спектра и данными ТСХ.

Известно, что этанол быстро разрушает липидные дисперсии из природных фосфолипидов, растворяя их с образованием молекулярного или мицеллярного раствора. Это сопровождается резким уменьшением мутности системы, поэтому наиболее удобный способ наблюдения за процессом — измерение величины оптического поглощения.

В случае липидных дисперсий из фосфогликолипида (10) обработка этанолом в концентрациях от 0 до 50% приводит к существенному снижению поглощения света неполимеризованными липидными дисперсия-



ми и лишь к небольшому полимеризованными, что свидетельствует о значительно большей устойчивости полимеризованных липидных дисперсий к действию растворителя. Наблюдаемое небольшое понижение поглощения полимеризованных липидных дисперсий под действием 15% растворов этанола обусловлено скорее всего изменением коэффициента преломления среды, от которого зависит светорассеяние, что хорошо согласуется с литературными данными [11].

Таким образом, показано, что после полимеризации липидные дисперсии из синтезированного фосфолипидов (10) приобретают стабильность во времени и значительную устойчивость к действию растворителей, что указывает на возможность использования липидных дисперсий на их основе в качестве стабильных моделей биомембран.

### Экспериментальная часть

Растворители очищали по стандартным методикам. Применяли трифенилфосфин (Merck, ФРГ). Метилловый эфир рицинолевой кислоты получали из касторового масла щелочным гидролизом, последующей этерификацией свободных кислот и хроматографическим разделением метиловых эфиров на колонке с силикагелем.

Спектры ПМР снимали в дейтерохлороформе на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker WM-250 (ФРГ) с рабочей частотой 250 МГц, внутренний стандарт — гексаметилдисилоксан. ИК-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu IR-435 (Япония), УФ-спектры — на спектрофотометре Shimadzu IR-240 (Япония). Данные ДОВ получали на спектрополяриметре Perkin — Elmer MC 241 (Англия). Температуры плавления определяли на приборе Boettius (ГДР) и не корректировали.

ТСХ осуществляли на пластинках Silufol UV-254 (ЧСФР) в системах растворителей: хлороформ — метанол, 5:1 (А); гексан — эфир, 4:1 (Б); гексан — эфир, 4:1 (В); хлороформ — метанол — 25% аммиак, 15:2:0,1 (Г); эфир — петролейный эфир, 4:1 (Д); хлороформ — метанол — вода, 65:25:4 (Е); обнаружение обугливанием при 350°С; вещества, содержащие двойные связи, обнаруживали опрыскиванием 10% раствором марганцовокислого калия. Обнаружитель для фосфорных эфиров — молибденовый синий [12]. Колоночную и препаративную хроматографию на пластинках проводили на силикагеле L 40/100 мкм (ЧСФР).

*Метилловый эфир (9Z,11E)-октадекадиен-9,11-овой кислоты (2)* (схема 1, путь А). Раствор 68,8 мл (62,5 г, 200 ммоль) метилового эфира рицинолевой кислоты (1) в 50 мл толуола нагревали при 150° С в течение 30 мин с 0,9 мл 85% ортофосфорной кислоты с одновременной азеотропной отгонкой воды в приборе Дина — Старка. Затем реакционную массу нейтрализовали бикарбонатом натрия и хроматографировали на колонке, элюируя вещество (2) гексаном. Выход 37,5 г (63,6%),  $n_D^{20}$  1,4775,  $R_f$  0,82 (А). Найдено, %: С 77,92; Н 11,56.  $C_{19}H_{34}O_2$ . Вычислено, %: С 78,07; Н 11,68. УФ-спектр (метанол,  $\lambda_{max}$ , нм;  $\epsilon$ ): 231,5; 3500. ИК-спектр (в пленке,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 2900, 2835, 1460, 720 (СН), 1730 (С=О), 1455 (С—О), 1240, 1170 (С—О—С), 980 (С=С).

*Метилловый эфир (9Z)-12-бромоктадекаен-9-овой кислоты (3)* (схема 1, путь Б, а). К раствору 0,8 г четырехбромистого углерода и 1 г метилового эфира рицинолевой кислоты (1) в 20 мл хлористого метилена при 0° С в течение 1 ч прибавляли раствор 1 г трифенилфосфина в 20 мл хлористого метилена и перемешивали 1 ч. Далее реакционную массу промывали водой (3×50 мл), сушили  $MgSO_4$ , упаривали растворитель в вакууме. Остаток наносили на колонку (30×400 мм) с силикагелем, элюировали смесью гексан — эфир (10 : 1). Выход 0,8 г (66,6%),  $R_f$  0,85 (Б), 0,75 (В).

*(9Z,11E)-Октадекадиен-9,11-овая кислота (5)*. Раствор 0,7 г (2,1 ммоль) соединения (3) в 5,2 мл (6,3 ммоль) 1,5 М раствора трет-бутилата калия в трет-бутиловом спирте выдерживали 2 ч при температуре в бане 75° С. Растворили смесь в воде, подкисляли HCl до pH 5, экстрагировали хлороформом, экстракт промывали водой до нейтральной реакции (3×100 мл), сушили  $MgSO_4$ , растворитель упаривали в вакууме. Препаративной ТСХ (обнаружение парами  $I_2$ ) в системе гексан — эфир (2 : 1) выделяли 0,3 г (57,7%) соединения (5),  $R_f$  0,57 (Б), т. пл. 47–50° С. ПМР-спектр ( $\delta$ , м. д.): 0,89 (т, 3H,  $-CH_2-CH_3$ ,  $J$  7 Гц), 1,36 (с, 16H,  $-CH_2-$ ), 1,61 (т, 2H,  $-CO-CH_2-CH_2-$ ,  $J$  7 Гц), 2,11 (дт, 4H,  $-CH_2-CH=CH-CH=CH-CH_2-$ ,  $J$  7 Гц), 2,36 (т, 2H,  $-CO-CH_2-$ ,  $J$  8 Гц), 5,36 (м, 1H,  $CH=CH-CH=CH-$ ), 5,67 (дт, 1H,  $-CH=CH-CH=CH-$ ,  $J$  15; 7 Гц), 5,97 (т, 1H,  $-CH=CH-CH=CH-$ ,  $J$  10,5 Гц), 6,30 (дд, 1H,  $-CH=CH-CH=CH-$ ,  $J$  15; 10,5 Гц).

*Метилловый эфир (9Z,11E)-октадекадиен-9,11-овой кислоты (2)*. Раствор 24,5 г (0,25 моль) соединения (5), 2,5 мл серной кислоты и 1 г гидрохинона в 250 мл метанола кипятили 5 ч. Ход реакции проверяли с помощью ТСХ (система Д). Охлажденную реакционную смесь выливали в 2 л воды и экстрагировали эфиром (5×200 мл), экстракт промывали раствором  $NaHCO_3$  до pH 7, сушили  $MgSO_4$ . Из продукта реакции фракционной перегонкой получали 20,2 г (72,1%) соединения (2),  $n_D^{20}$  1,4775,  $R_f$  0,82 (А).

*Метилловый эфир (9Z)-12-хлороктадекаен-9-овой кислоты (4)* (схема 1, путь Б, б). К раствору 10 г (32 ммоль) соединения (1) в 150 мл четыреххлористого углерода прибавляли 9,9 г (38 ммоль) трифенилфосфина и кипятили при 80° С в течение 2 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, массу разбавляли 50 мл хлороформа, промывали водой (2×200 мл), сушили  $MgSO_4$ , упаривали. Остаток наносили на колонку с силикагелем (30×400 мм). Элюировали системой гексан — эфир (10 : 1). Выход 4,6 г (43,4%),  $R_f$  0,75 (В).

*(9Z,11E)-Октадекадиен-9,11-овая кислота (5)*. Растворили 4,6 г (14,5 ммоль) соединения (4) в 28,5 мл (42,9 ммоль) 1,5 М раствора трет-бутилата калия в трет-бутиловом спирте, при этом выпадал белый осадок. Смесь выдерживали при 75° С и кипятили в течение 1~1,5 ч до полного прохождения реакции. Продукт реакции выделяли как описа-

но выше (путь Б, а) и после колоночной хроматографии получали 2,4 г (61,5%) кислоты (5), идентичной продукту, полученному по методу (а). При кристаллизации из 90% метанола на холоду получали кристаллический образец кислоты (5), т. пл. 47–50° С.

(9Z,11E)-Октадекадиен-9,11-ол (6). К суспензии 1,14 г алюмогидрида лития в 30 мл сухого эфира при перемешивании добавляли по каплям раствор 6,75 мл (20 ммоль) эфира (2) в 10 мл сухого эфира с такой скоростью, чтобы поддерживать равномерное кипение растворителя (40 мин). Затем реакционную массу кипятили еще 30 мин, охлаждали до 5° С и последовательно обрабатывали 25 мл влажного эфира, 50 мл воды и 50 мл 10% серной кислоты. Органический слой отделяли, водный дважды экстрагировали 50 мл эфира, экстракты сушили сульфатом натрия, упаривали, получали 5,11 г (96,0%) продукта (5),  $n_D^{20}$  1,4740,  $R_f$  0,25 (А). Найдено, %: С 79,85, Н 12,61.  $C_{18}H_{34}O$ . Вычислено, %: С 79,87; Н 12,62. УФ-спектр (метанол,  $\lambda_{max}$ , нм;  $\epsilon$ ): 230,5; 6700. ИК-спектр (в пленке,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 2900, 2835, 1450, 720 (СН), 1050 (С–О), 3320, 1375 (ОН), 980 (С=С).

(9Z,11E)-Октадекадиен-9,11-ил-1-фосфат (7). К охлажденному до –5° С раствору 1,805 г (11,9 ммоль) хлорокиси фосфора в 2 мл безводного тетрагидрофурана при перемешивании добавляли 1,3 мл пиридина и затем в течение 1,5 ч раствор 0,5 г (1,878 ммоль) спирта (6) в 10 мл тетрагидрофурана. Смесь перемешивали 30 мин при 0° С, затем при –5° С по каплям прибавляли 0,5 мл дистиллированной воды, перемешивали 30 мин при 0° С и 30 мин при 20° С. Растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в хлороформе, промывали водой, добавив метанол или водный раствор NaCl для лучшего разделения водного и органического слоев.

Растворитель удаляли в вакууме, добавляя свежие порции бензола (3×100 мл). Остаток растворяли в безводном хлороформе и пропускали через колонку со смолой КУ-2 (Н<sup>+</sup>). Выход после удаления растворителя 0,29 г (77%) хроматографически однородного продукта,  $R_f$  0,25 (Г), который без дальнейшей очистки использовали на следующей стадии.

(9Z,11E)-Октадекадиен-9,11-ил(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)фосфат (9). К раствору 1,3 г (3,75 ммоль) соединения (7) в 5 мл безводного бензола порциями в течение 30 мин прибавляли 1,5 г (3,70 ммоль) трет-бутилового ортоэфира D-глюкозы (8). Смесь выдерживали при 40–50° С в течение 2 ч, периодически встряхивая, затем концентрировали в вакууме до объема 2 мл, остаток наносили на колонку с силикагелем, элюировали продукт реакции хлороформом. Выход соединения (9) 2 г (76,9%),  $R_f$  0,66 (Д),  $[\alpha]_D^{20}$  +5,4° (с 1, хлороформ). ИК-спектр (в пленке,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3350 (О–Н), 2892 (СН), 2173 (С=С), 1738 (С=О), 1710 (С=С), 1362 (СН<sub>3</sub>), 1220 (Р=О), 1031 (Р–О), 920 (СН=СН). УФ-спектр (метанол,  $\lambda_{max}$ , нм;  $\epsilon$ ): 230,9; 10,4·10<sup>3</sup>. ПМР-спектр (δ, м. д.): углеводная часть, аномерный протон –5,02 (д, 1H,  $J_{1,2}$  9,5 Гц); липидная часть –6,5–5,2 (м, 4H, СН=СН–СН=СН).

Натриевая соль (9Z,11E)-октадекадиен-9,11-ил(β-D-глюкопиранозил)-фосфата (10). К перемешиваемому при 19–20° С раствору 1,3 г (1,87 ммоль) соединения (9) в 15 мл безводного метанола прибавляли 4 мл 1% метилата натрия в метаноле, перемешивали 1 ч, ход реакции контролировали ТСХ. Растворитель удаляли в вакууме. Остаток дважды перекристаллизовывали из смеси метанол–ацетон, получали 0,9 г (91,8%) соединения (10), т. пл. 89–90° С,  $R_f$  0,22 (Е),  $[\alpha]_D^{20}$  +17,5° (с 1, метанол). ИК-спектр (вазелиновое масло,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3350 (–О–Н), 2892 (–СН), 2173 (С=С), 1710 (С=С), 1362 (СН<sub>3</sub>), 1220 (Р=О), 1031

(P-O), 920 (CH=CH). УФ-спектр (метанол,  $\lambda_{\max}$ , нм;  $\epsilon$ ): 321,3;  $6,7 \cdot 10^3$ .  
Найдено, %: P 5,77. C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>Na. Вычислено, %: P 5,80.

**Приготовление липидных дисперсий.** Порцию липида (5 мг) осаждали на стенках круглодонной 50-мл колбы выпариванием из метанольного раствора, добавляли 5 мл дистиллированной воды и озвучивали на приборе УЗДН-1 (частота 44 кГц) в атмосфере азота при температуре 0°С в течение 3 мин.

**Полимеризация липидных дисперсий.** Суспензию липидной дисперсии (3 мл) помещали в кварцевую кювету (длина оптического пути 1 см), растворенный воздух удаляли барботированием аргона (10 мин), затем суспензию облучали светом ртутной лампы высокого давления ДРШ 250-3 на расстоянии 5 см в атмосфере азота. В образце поддерживали температуру 16–17°С с помощью термостатируемого кюветодержателя спектрофотометра.

Ход полимеризации контролировали ТСХ в системе (А) и по изменению УФ-спектра. По данным ТСХ, происходило уменьшение пятна мономера (10) с  $R_f$  0,22 и увеличение пятна на старте пластинки. На УФ-спектре отмечалось исчезновение полосы поглощения с  $\lambda_{\max}$  231 нм.

Для полной полимеризации липида (10) требовалось около 2 ч.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dorn K., Ringsdorf H. // Contem. Top. Polym. 1984. V. 5. № 1. P. 73–100.
2. Fendler J. H. // Science. 1984. V. 223. № 4639. P. 888–894.
3. Ияков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М.: Наука, 1981. С. 142–199.
4. Бадер Х., Дорн К., Хунфер Б., Рингсдорф Х. // Успехи химии. 1987. Т. 56. № 2. С. 2028–2075.
5. Русанова Е. Е., Волкова Л. В., Евстигнеева Р. П. // Биоорганич. химии. 1987. Т. 10. № 7. С. 957–962.
6. Себякин Ю. Л., Ким Е. Н., Абилова Д. Б., Евстигнеева Р. П. // Биоорганич. химии. 1989. Т. 15. № 5. С. 681–685.
7. Grigor J., MacInnes D. M., Mc Lean J., Hogg A. J. P. // J. Chem. Soc. 1955. V. 77. № 6. P. 1069–1071.
8. Hunter N. R., Charlton J. L., Green N. A. // Org. Prep. Proced. Int. 1981. V. 13. № 1. P. 19–22.
9. Данилов Л. Л., Дружинина Т. Н., Шибанов В. П., Кочетков Н. К. // Биоорганич. химии. 1980. Т. 6. № 3. С. 468–469.
10. Regen S. L. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1985. V. 446. P. 296–306.
11. Молодковский Ю. Г., Дергоусов А. А., Бергельсон Л. Д. // Биоорганич. химии. 1988. Т. 14. № 11. С. 1557–1564.
12. Кейтс М. Техника липидологии. — Пер. с англ. — М.: Мир. 1975. С. 143.

Поступила в редакцию  
26.VIII.1991  
После доработки  
1.XI.1991

Yu. L. SEBYAKIN, E. N. KIM, R. P. EYSTIGNEEVA

#### SYNTHESIS AND PROPERTIES OF SODIUM (9Z, 11E)- OCTADECADIEN-9,11-YL(β-D-GLUCOPYRANOSIDE)PHOSPHATE

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

{9Z, 11E}-Octadecadien-9,11-yl(β-D-glucopyranosyl)phosphate sodium salt has been synthesized and its polymerization under UV irradiation has been investigated. The compounds is shown to produce lipids dispersions which, after polymerization, acquire an increased stability to the deteriorating action of the organic solvent.