



УДК 547.426.2

© 1993 В. Н. Клыков, О. В. Остапенко,
Г. А. Серебренникова

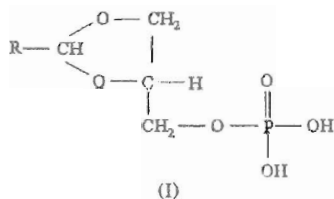
СИНТЕЗ АЦЕТАЛЬНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ, 1,2-АЛКИЛИДЕН-*sn*-ГЛИЦЕРО-3-ФОСФАТОВ

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

Предложен химико-ферментативный метод получения природных ацетальных фосфолипидов, 1,2-алкилиден-*sn*-глицеро-3-фосфатов с остатками пальмитинового и олеинового альдегидов. Способ основан на взаимодействии альдегидов с *sn*-глицеро-3-фосфохолином и последующем расщеплении фосфолипазой D промежуточных 1,2-алкилиден-*sn*-глицеро-3-фосфохолинов.

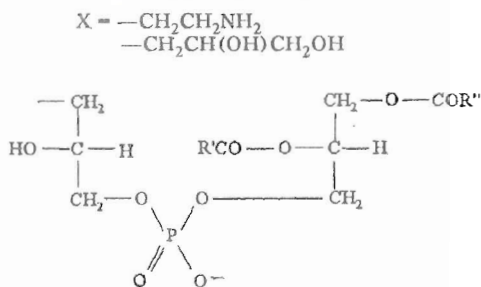
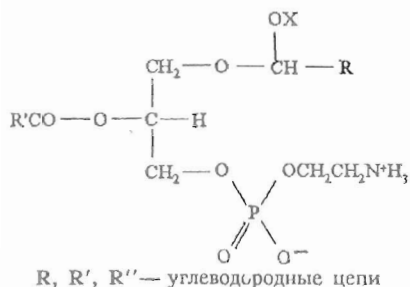
К числу минорных фосфолипидов можно отнести так называемые ацетальные липиды, включающие в себя циклические и открытые ацетальные группы.

Первые представители этого класса были обнаружены в ткани кишечника лошади [1] и мозговом слое почек кролика [2]. Данная фракция кислых фосфолипидов получила название «Darmstoff»; была обнаружена ее способность вызывать сокращение гладких мышц, качественно сравнимое с действием ацетилхолина [3–5].



На основании химических превращений и физико-химических исследований было установлено, что «Darmstoff» представляет собой смесь циклических ацеталей: 1,2-алкилиден-*sn*-глицеро-3-фосфатов (I), включающих в себя остатки пальмитинового, олеинового и линолевого альдегидов [6].

Позднее из *Clostridium butyricum* были выделены три ацетальных фосфолипида, для которых были предложены следующие структуры [7, 8]:



Таким образом, существование ацетальных фосфолипидов как класса природных соединений сомнения не вызывает.

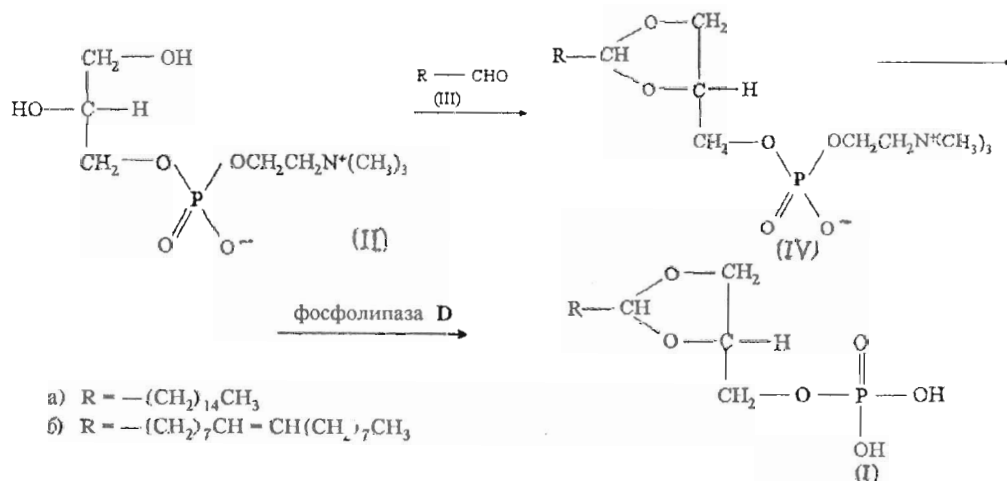
В работе [6] описано получение 1,2-алкилиденглицеро-3-фосфатов с остатками пальмитинового, олеинового и линолевого альдегидов путем ацетализации глицерина и последующего фосфорилирования 1,2-алкилиденглицеринов. Полученные соединения не были полностью охарактеризованы в связи с их нестабильностью даже в форме аммониевых солей.

Сравнительное изучение их биологической активности показало, что соединение с остатком олеинового альдегида проявляло спазмолитическую активность, аналогичную активности природных экстрактов, в то время как производное линолевого альдегида было малоактивно, а пальмитинового полностью лишено ее [6].

В поисках соединений с высокой биологической активностью были синтезированы устойчивые аналоги «Darmstoff», в которых ацетальные атомы кислорода заменены на метиленовые группы [9]. Данные фосфолипиды проявляли гипотензивный эффект.

Нами предложен химико-ферментативный синтез диастереомерных 1,2-алкилиден-*sn*-глицеро-3-фосфатов (I), основанный на взаимодействии природного *sn*-глицеро-3-фосфохолина (II), с альдегидами (III) и последующем гидролитическом расщеплении полученных 1,2-алкилиден-*sn*-глицеро-3-фосфохолинов (IV) фосфолипазой D.

Отработка условий реакции ацетализации *sn*-глицеро-3-фосфохолина альде-



гидами первоначально проводилась на примере пальмитинового альдегида. Взаимодействие между гидрофильным, нерастворимым в органических растворителях *sn*-глицеро-3-фосфохолином (II) и гидрофобным альдегидом (IIIa) удалось осуществить в среде безводной уксусной кислоты с постепенной отгонкой последней при пониженном давлении.

В аналогичных условиях проводилась реакция и с олеиновым альдегидом, который был получен окислением олеилового спирта диметилсульфоксидом в присутствии P₂O₅ с последующим разложением промежуточного комплекса триэтиламином [10].

Выходы 1,2-алкилиден-*sn*-глицеро-3-фосфохолинов (IVa, б) составили 60–70%. Индивидуальность и строение их были подтверждены данными ТСХ, ИК-, ¹H-ЯМР- и ³¹P-ЯМР-спектроскопии. Соединения (IVa, б) были получены в виде смеси диастереомеров, о чем свидетельствовало наличие в ¹H-ЯМР-спектрах двух триплетов от диастереомерных ацетальных протонов при 4,62 и 4,50 м. д. (J5 Гц).

Расщепление фосфорного сигнала в спектре ^{31}P -ЯМР также подтверждало присутствие диастереомерных форм в фосфолипидах (IVa, б).

Далее 1,2-алкилиден-*sn*-глицеро-3-фосфохолины (IV а, б) обработкой препаратом фосфолипазы D, выделенным из капусты [11], были превращены в соответствующие 1,2-алкилиден-*sn*-глицеро-3-фосфаты (Ia, б). Гидролиз проводился в ацетатном буферном растворе, содержащем ионы Ca^{2+} ; нерастворимые кальциевые соли соединений (Ia, б) далее переводили в натриевые соли и очищали хроматографией на силикагеле [12]. Строение соединений (Ia, б) в форме моноаммониевых солей подтверждены данными ИК-, ^1H -ЯМР-спектров и элементного анализа.

Экспериментальная часть

Использовали: *n*-гексадеканол (Reanal) без дополнительной очистки; DMSO перегоняли, отбирая фракцию с т. кип. 70—75° С (1,5 кПа); триэтиламин перегоняли с гидроксидом калия; оливковое масло — коммерческий продукт. Олеиновую кислоту выделяли многократной перекристаллизацией из ацетона смеси жирных кислот, полученных омылением оливкового масла. Олеиновый спирт приготовлен восстановлением метилового эфира олеиновой кислоты алюмогидридом лития (Fluka). Яичный фосфатидилхолин выделен из желтков яиц [13]. Препарат фосфолипазы D получали из листьев капусты [11].

ТСХ проводили на силуфоле (Kavalier) в системах: гексан — эфир, 10 : 1 (А); хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (Б); хлороформ — метанол — вода — конц. NH_4OH , 65 : 35 : 4 : 4 (В); метанол — вода, 4 : 1 (Г). Обнаружение — прокаливанием, а также молибденовым синим. Колоночную хроматографию проводили на кремниевой кислоте отечественного производства, силикагеле L (100/160 мкм, Chemapol) и окиси алюминия (Reanal, II степень активности). ГЖХ выполнена на хроматографе «Биохром-1» (Россия): колонка (3 × 3000 мм) 10% полиэтиленгликольадипата и 1% фосфорной кислоты на хроматоне N-Aw-DMCS, скорость азота 30 мл/мин, температура колонки 220° С (метилловые эфиры жирных кислот), 200° С (олеиновый спирт), 160° С (олеиновый альдегид). По данным ГЖХ, содержание основного вещества составляло в олеиновой кислоте 96,7%, в олеиновом спирте 95,4%, в олеиновом альдегиде 96,0%.

Центрифугирования проводили по 15 мин при 7000 г. Дисперсию оптического вращения измеряли на спектрополяриметре Perkin — Elmer 241—МС (Швеция) при 20° С. ИК-спектры сняты на спектрофотометре Shimadzu IR-435 (Япония) в тонком слое для жидкостей и в вазелиновом масле для остальных. Спектры ^1H -ЯМР (рабочая частота 200 МГц) и ^{31}P -ЯМР (при 81 МГц) снимали на импульсном спектрометре MSL-200-Bruker (ФРГ) в CDCl_3 или в смеси CDCl_3 — CD_3OD (1 : 1). Масс-спектрометрия выполнена на времяпролетном масс-спектрометре МСВХ (Украина) с ионизацией ядрами калифорния (^{252}Cf). Ускоряющее напряжение ± 5 или ± 20 кВ.

Олеиновый альдегид (IIIб). К раствору 10 г олеинового спирта и 11 мл безводного DMSO в 170 мл безводного CH_2Cl_2 прибавляли при перемешивании и охлаждении (0° С) в токе азота 16 г P_2O_5 и перемешивали 3 ч при 20° С. Затем при 0° С прибавляли 24 мл триэтиламина и перемешивали 30 мин. После этого реакционную смесь разбавляли 100 мл хлороформа и при охлаждении (0° С) нейтрализовали 10% HCl . Хлороформный слой промывали водой (2 × 100 мл), высушивали Na_2SO_4 . Хроматографией на кремниевой кислоте в гексане, затем в смесях гексан — диэтиловый эфир, 50 : 1 и 30 : 1, выделяли альдегид (III б) (высушен в вакууме 130 Па, 55° С, 1 ч). Выход 6,35 г (64%). n_D^{20} 1,4573. R_f 0,40 (А). ИК (ν , cm^{-1}): 3000 (вал. С—H) в $\text{CH}=\text{CH}$, 2940, 2850 (вал. С—H) в $(\text{CH}_2)_n$, 2700 (вал. С—H) в CHO , 1740 (вал. С=O), 1460, 1380, 720.

Пальмитиновый альдегид (IIIa). Получали аналогично из 25 г *n*-гексадеканола. Выход 20,1 г (81%).

sn-Глицеро-3-фосфохолин (II). К раствору 38 г яичного фосфатидилхолина

в смеси 220 мл хлороформа, 200 мл метанола и 60 мл воды прибавляли 0,2 н. метанольный раствор КОН до pH 9—10. Оставляли на 40 ч при 20° С. Снова добавляли по каплям раствор КОН до pH 9—10 и оставляли еще на 40 ч. Реакционную смесь нейтрализовали при охлаждении (10° С) 12% HCl до pH 7. Растворители удаляли в вакууме, остаток высушивали в вакууме (130 Па, 50° С, 30 мин) и экстрагировали хлороформом (2 × 75 мл). Осадок *sn*-глицеро-3-фосфохолина (II) хроматографировали на окиси алюминия, вещество смывали смесью изопропанол — вода (2 : 1). Затем хроматографировали на силикагеле, примеси элюировали смесью изопропанол — вода (2 : 1), *sn*-глицеро-3-фосфохолин смывали смесью изопропанол — вода (1 : 1). Растворитель удаляли в вакууме, остаток высушивали в вакууме (130 Па, 50° С, 6 ч), затем в вакуум-эксикаторе над P₂O₅ (2,5 кПа, 20° С, 72 ч). Выход 8,1 г, R_f 0,3 (Г). ДОВ [α] (с 2, метанол), град α (нм): -3,15 (581), -3,15 (579), -3,50 (546), -6,95 (408), -9,20 (366), -11,70 (334). Лит. данные [14]: [α]_D²⁰ -2,74° (с 6, вода).

1,2-[9(цис)-Октадеценилиден]-sn-глицеро-3-фосфохолин (IVб). Смесь 2,90 г *sn*-глицеро-3-фосфохолина (II), 4,50 г (50% избыток) олеинового альдегида и 75 мл безводной уксусной кислоты нагревали и отгоняли в вакууме уксусную кислоту в течение 2 ч при 80° С (температура бани). Затем к остатку прибавляли 60 мл безводной уксусной кислоты и повторяли отгонку в тех же условиях. Остаток высушивали последовательно в вакууме (2 кПа, 130 Па) 30 мин при 60° С, затем хроматографировали на кремниевой кислоте. Альдегид и примеси элюировали смесями хлороформ — метанол (65 : 25) и хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 1), вещество — смесью хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4). Остаток после удаления растворителя высушивали в вакууме (130 Па, 60° С, 3 ч). Выход 3,95 г (69,3%). R_f 0,45 (Б). ИК (ν, см⁻¹): 3400 (вал. O—H, вода), 3000 (вал. C—H) в -CH=CH-, 1660 (деф. O—H, вода), 1240 (вал. P=O), 1140, 1090, 1060 (вал. и деф. C—O), 965. ¹H-ЯМР (δ, м. д.): 4,97 (CH=CH, м), 4,62 и 4,50 (O—CH—O, т, J 5 Гц, диастереомеры), 4,01—3,72 (>CH—O, POCH₂CH₂, м), 3,66—3,30 (CH—CH₂OP, CH—CH₂OCH, м), 3,26 (CH₂N, м), 2,87 (N (CH₃)₃, с), 1,67 (CH₂CH=, м), 1,30 (O)CH—CH₂, м), 0,95 ((CH₂)_n, с), 0,52 (ССН₃, т). Масс-спектр (m/z): 505,2 ([M]⁺, 100%). ДОВ [α] (с 2, метанол), град α, (нм): +1,60 (589), +1,70 (578), +1,95 (546), +3,65 (436), +6,45 (365). Найдено, %: С 59,31; Н 9,61; Р 6,44. C₂₆H₅₂O₆NP · H₂O. Вычислено, %: С 59,63; Н 10,39; Р 5,91.

1,2-Гексадецилиден-sn-глицеро-3-фосфохолин (IVа). Смесь 1,24 г *sn*-глицеро-3-фосфохолина (II), 1,74 г (50% избыток) пальмитинового альдегида и 50 мл безводной уксусной кислоты нагревали и отгоняли в вакууме уксусную кислоту 2 ч при 80° С (температура бани). Далее вещество выделяли как описано для аналога (IVб). Выход 1,29 г (56%). R_f 0,41 (Б). ИК (ν, см⁻¹): 3400, 1660, 1240, 1140, 1090, 1050, 965. ¹H-ЯМР идентичен спектру соединения (IVб), отсутствуют сигналы при 4,97 и 1,67 м. д. Масс-спектр (m/z): 480 (M⁺, 100%). ДОВ [α] (с 2, метанол), град α, (нм): +1,65 (581), +1,85 (579), +2,20 (546), +4,75 (408), +6,75 (366), +9,55 (334), +12,30 (313). Найдено, %: С 57,75; Н 10,58; Р 6,28. C₂₄H₅₀O₆NP · H₂O. Вычислено, %: С 57,92; Н 10,53; Р 6,22.

1,2-[9(цис)-Октадеценилиден]-sn-глицеро-3-фосфат (IVб). 0,86 г препарата фосфолипазы D растворяли в 26 мл ацетатного буфера (0,2 М CH₃COONa, 0,08 М CaCl₂; pH 5,6), нерастворимую часть отделяли центрифугированием. Половину супернатанта (13 мл) прибавляли к раствору 997 мг холинфосфатида (IVб) в 20 мл того же буфера и реакционную смесь выдерживали 4 ч при 38° С. Затем прибавляли еще 13 мл супернатанта и инкубировали 4 ч при 38° С. Выпавший осадок кальциевой соли (Iб) отделяли центрифугированием, осадок диспергировали в 25 мл воды и снова центрифугировали, операцию повторяли еще раз. Са-соль высушивали лиофильно. Выход 744 мг (82%). ИК-спектр (см⁻¹): 3550, 3400, 3200, 3000, 1630, 1140, 1100, 1060, 1030, 850, 810, 720, 640, 580, 560.

0,5 г Са-соли 1,2-[9(цис)-октадеценилиден]-*sn*-глицеро-3-фосфата (Iб) суспендировали в 50 мл буфера (0,1 М цитрат натрия; pH 5,6). Суспензию экстрагировали смесью хлороформ — метанол (1 : 1, 2 × 100 мл) и смесью хлороформ — метанол (17 : 3, 2 × 50 мл). Объединенный экстракт упаривали, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, вещество элюировали смесью хлороформ — метанол — вода — NH₄OH (65 : 35 : 4 : 4). Полученную моноаммонийную соль высушивали в вакууме (130 Па, 45° С, 6 ч). Выход 0,344 г (72%). R_f 0,2 (В). ИК-спектр (ν, см⁻¹): 3500 (вода), 3200, 3000 (вал. С—Н) в СН=СН, 2400, 1660 (вода), 1140, 1060 (вал. и деф. С—О), 950, 720 (СН₂)_n, 510. ¹Н-ЯМР (δ, м. д.): 4,99 (СН=СН; м), 4,63 и 4,51 (ОСНО; т, J 5 Гц, диастереомеры), 3,92 и 3,78 (>СН—О, м, диастереомеры), 3,67—3,34 (СНСН₂ОР; СНСН₂ОСН, м), 1,66 (СН₂СН=, м), 1,26 (O)СНСН₂, м), 1,0 ((СН₂)_n, с), 0,53 (ССН₃, т). Масс-спектр: (m/z) 418,8 ([M]⁻, 100%). ДОВ [α] (с 0,5, метанол), град (λ, нм): +6,4 (589), +7,0 (578), +8,0 (546), +13,8 (436), +21,8 (365). Найдено, %: С 57,44; Н 9,52; N 3,68; P 7,30. С₂₁H₄₄O₆NP. Вычислено, %: С 57,64; Н 10,14; N 3,20; P 7,08.

1,2-Гексадецилиден-*sn*-глицеро-3-фосфат (Iа). К раствору 0,5 г 1,2-гексадецилиден-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (IVа) в 10 мл ацетатного буфера (pH 5,6) прибавляли двумя порциями 0,89 г препарата фосфолипазы D в 26 мл ацетатного буфера и термостатировали 7 ч при 38° С. Обработку и выделение Са-соли (Iа) проводили как описано в предыдущей методике. Выход 0,33 г (73%). Полученную кальциевую соль (Iа) (0,3 г) превращали в моноаммонийную путем обработки цитратным буфером (20 мл) и последующей очисткой на силикагеле в условиях предыдущего опыта. Выход 0,28 г (94%). R_f 0,2 (В). ИК (ν, см⁻¹): 3400, 2400, 1600, 1250, 1210, 1180, 1160, 1120, 1080, 1060, 950, 720, 530. Спектр ¹Н-ЯМР идентичен спектру соединения (Iб), отсутствуют сигналы при 4,99 и 1,66 м. д. Масс-спектр: (m/z) 392,6 ([M]⁻, 100%). ДОВ [α] (с 0,66, метанол — хлороформ, 1 : 1), град (λ, нм): +4,85 (581), +5,15 (579), +6,51 (546), +14,09 (408), +19,70 (366), +25,15 (334), +31,82 (313). Найдено, %: С 52,64; Н 9,82; N 3,44; P 7,08. С₁₉H₄₂O₆NP · H₂O. Вычислено, %: С 53,13; Н 10,33; N 3,26; P 7,21.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vogt W.//Arch. Exp. Path. Pharmacol. 1949. V. 206. P. 1—11.
2. Dyer D., Walaszek E. J.//J. Pharmacol. Exptl. Therap. 1968. V. 160. № 2. P. 360—366.
3. Vogt W.//J. Physiol. 1957. V. 137. P. 154—167.
4. Vogt W.//Biochem. Pharmacol. 1963. V. 12. P. 415—420.
5. Gray G. W.//J. Pharmacol. Exptl. Therap. 1964. V. 146. № 2. P. 215—240.
6. Wiley R. A., Sumner D. D., Walaszek E. J.//Lipids. 1970. V. 5. № 10. P. 803—811.
7. Goldfine H., Johnston N. C., Mattai J., Shipley G. G.//Biochemistry. 1987. V. 26. № 10. P. 2814—2822.
8. Johnston N. C., Goldfine H.//Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 961. № 1. P. 1—12.
9. Milbert A. N., Wiley R. A.//J. Med. Chem. 1978. V. 21. № 3. P. 245—248.
10. Taber D. F., Amedeo J. C., Kang Yeoun Jung//J. Org. Chem. 1987. V. 52. № 25. P. 5621—5622.
11. Lee S. Y., Hibi N., Yaman T., Shimizu S.//J. Ferment. Technol. 1985. V. 63. № 1. P. 37—44.
12. Dawson R. W.//Biochem. J. 1963. V. 88. № 3. P. 414—423.
13. Long C., Odavic R., Sargent E. J.//Biochem. J. 1967. V. 102. № 1. P. 216—229.
14. Chadha J. S.//Chem. and Phys. Lipids. 1970. V. 4. № 1. P. 104—108.

Поступила в редакцию
2.VII.1992

V. N. Klykov, O. V. Ostapenko, G. A. Serebrennikova

**SYNTHESIS OF ACETAL PHOSPHOLIPIDS,
1,2-ALKYLIDENE-*sn*-GLYCERO-3-PHOSPHATES**

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

A method for preparing natural acetal phospholipids (1,2-alkylidene-*sn*-glycero-3-phosphates) containing palmitic and oleic aldehyde residues was suggested. The method involves the condensation of the aldehydes with *sn*-glycero-3-phosphocholine and the enzymatic hydrolysis of the intermediate 1,2-alkylidene-*sn*-glycero-3-phosphocholines with phospholipase D.