



УДК 547.953.07

СИНТЕЗ СПИН-МЕЧЕНОГО ФОСФАТИДИЛХОЛИНА АЛКИЛЬНОГО ТИПА

Суханов В. А.

*Научно-исследовательский институт по биологическим испытаниям
химических соединений, Кулава, Московская область*

Башарули В. А., Каплун А. П., Швец В. И.

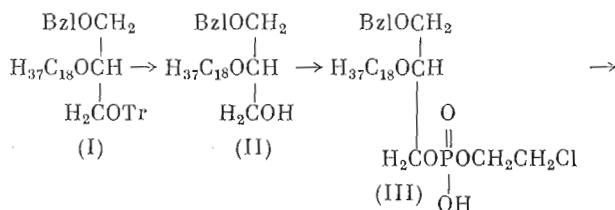
Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

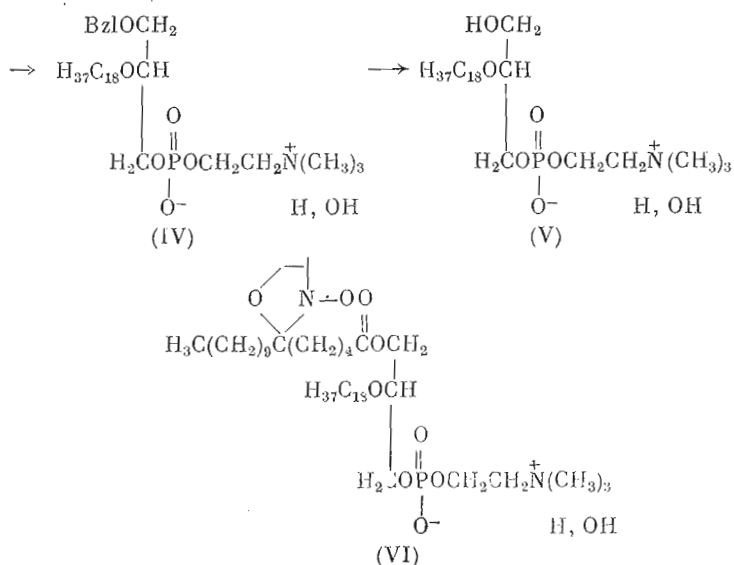
Сидоров О. М., Оханов В. В.

*Институт биорганической химии им. М. М. Шелякина Академии наук СССР,
Москва*

Описан синтез 1-[гексадекан-6-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилоксазолидин)·оил]-2-октадецил-гас-глицеро-3-фосфохолина, который может использоваться в качестве парамагнитного зонда при изучении мембранных структур, содержащих липиды различного типа. Показана применимость нового парамагнитного зонда для оценки плотности упаковки в различного типа везикулах и для изучения фазовых переходов.

Развитие метода спинового зонда и его применение в молекулярной биологии связано с успехами, достигнутыми на пути синтеза такого типа зондов [1, 2]. С целью изучения липид-белковых взаимодействий и мембранных структур нами осуществлен синтез нового парамагнитного зонда — спин-меченого фосфатидилхолина алкильного типа (VI). В отличие от полученных ранее фосфолипидных зондов ацильного типа [2, 3] новый парамагнитный зонд (VI) более удобен при изучении областей мембран, образованных фосфолипидами алкильного типа, а также может оказаться полезным при изучении фермент-субстратных взаимодействий фосфолипазы A₂ с фосфолипидами в качестве негидролизуемого фосфолипазой A₂ субстратного аналога.





1-Бензил-2-октадецил-3-тритил-*rac*-глицерин (I) получали из 1-бензил-3-тритил-*rac*-глицерина [4] алкилированием его октадецилбромидом в присутствии КОН. Защитную тритильную группу удаляли в кислой среде и алкильное производное (II) фосфорилировали избытком β -хлорэтилдихлорфосфата в пиридине. Кватернизацией триметиламином соединения (III) получали фосфохолиновое производное (IV), гидрогенолиз которого над Pd-чернью приводил к лизосоединению (V). 2-Октадецил-*rac*-глицеро-3-фосфохолин (V) ацилировали известным методом [3, 5] и получали, после препаративной ТСХ на силикагеле, 1-[гексадекан-6-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилксазолидин)оил]-2-октадецил-*rac*-глицеро-3-фосфохолин (VI) с выходом 33,5% в виде воскообразного вещества, по хроматографическим свойствам подобного спин-меченому фосфатидилхолину ацильного типа, синтезированному нами раньше [3].

Строение всех синтезированных хроматографически индивидуальных соединений подтверждалось данными ИК-спектров, элементарным анализом; для спин-меченого фосфатидилхолина (VI) снят масс-спектр, полученный с помощью десорбции полем. ИК-спектр спин-меченого алкильного фосфатидилхолина (VI) подобен ИК-спектру полученного нами раньше спин-меченого фосфатидилхолина ацильного типа [3], за исключением полосы поглощения в области 1740 см^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), которая для соединения (VI) менее интенсивна.

Для спин-меченого 2-алкилфосфатидилхолина (VI) характерен синглетный спектр ЭПР в гептановых и водных растворах, т. е. парамагнитные молекулы липида (VI) образуют обменносвязанную систему как в неполярной, так и в полярной среде, что указывает на агрегацию молекул фосфатидилхолина со значительным сближением радикальных фрагментов, по-видимому, за счет образования ламеллярных структур. Обработка таких дисперсий ультразвуком и нагревание до 60°C не приводят к изменению формы линии спектра ЭПР. Спин-меченый 2-алкилфосфатидилхолин (VI) может использоваться в качестве парамагнитного зонда. Чувствительность зонда к плотности упаковки и подвижности углеводородных цепей была проверена нами на трех различных типах везикул, образованных из: 1) яичного фосфатидилхолина (диацильного типа); 2) 1-октадецил-2-стеароил-*rac*-глицеро-3-фосфохолина (алкилацильного типа); 3) 1,2-дигексадецил-*rac*-глицеро-3-фосфохолина (диалкильного типа) (рис. 1, таблица). Из сравнения значений фактора упорядоченности для парамагнитного зонда (VI) в этих типах везикул (S_1, S_2, S_3 соот-

Значения тензоров T_{\parallel} , T'_{\perp} и фактора упорядоченности S для различного типа везикул, содержащих 1 мол.% парамагнитного зонда (VI) в трис-буфере (рН 8,0) *

Тип везикул	$2T_{\parallel}$, Гс	$2T'_{\perp}$, Гс	S	ΔS
Из яичного фосфатидилхолина (1)	50,5	19,9	0,61	0,02
Из 1-октадецил-2-стеароил- <i>rac</i> -глицеро-3-фосфохолина (2)	57,5	18,1	0,79	0,03
Из 1,2-дигексадецил- <i>rac</i> -глицеро-3-фосфохолина (3)	55,6	19,4	0,73	0,02

* Определение всех параметров см. в «Экспериментальной части».

ветственно) вытекает, что наиболее жесткая ориентация радикального фрагмента, а следовательно, и более плотная упаковка углеводородных цепей молекул наблюдается в случае везикул алкилацильного типа ($S_1 < S_2 < S_3$). Это может быть связано с большим средством парамагнитного зонда (VI) к молекулам везикул типа 2, так как оба соединения относятся к алкилацильным липидам, и (или) свойствами самих таких алкилацильных везикул.

Возможность изучения фазовых переходов везикул с помощью спин-меченого 2-алкилфосфатидилхолина (VI) продемонстрирована нами на примере везикул алкилацильного типа (2). Температурнозависимые перестройки организации везикул можно определять по изменению значений тензора (T) или S [2]. Для везикул из 1-октадецил-2-стеароил-*rac*-глицеро-3-фосфохолина обнаружен фазовый переход в области $47 \pm 1^\circ \text{C}$ (рис. 2).

Экспериментальная часть

ИК-спектры снимали на спектрометре Perkin-Elmer 257, в пленке, хлороформе и вазелиновом масле, спектры ЭПР — на радиоспектрометре Varian E-109 (США) с температурной приставкой ($\pm 1^\circ \text{C}$) при амплитуде модуляции 1 Гс и поступающей в резонатор мощности 15 мВт. Масс-спектр получен десорбцией электрическим полем на приборе Varian MAT 731 (США) с ЭВМ для обработки данных SS100MS.

Колоночную хроматографию веществ проводили на силикагеле Л 100/160, а ТСХ — на силикагеле Л 5/40 (Сhemapol, ЧССР). Для ТСХ использовали системы: петролейный эфир (т. кип. $70-90^\circ \text{C}$) — эфир, 2 : 1 (А), петролейный эфир — эфир, 1 : 2 (Б), хлороформ — ацетон — метанол, 4 : 1 : 1 (В), хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (Г). Для обнаружения веществ на пластинках их опрыскивали конц. серной кислотой или реактивом на фосфорсодержащие соединения [6] с последующим прокаливанием при $300-400^\circ \text{C}$. Фосфолипиды, содержащие холин, обнаруживали реактивом Драгендорфа [6]. При проведении препаративной ТСХ полосы с веществами, содержащими нитроксильные радикалы, обнаруживали по характерному желтому окрашиванию.

Все синтезированные вещества имели удовлетворительный элементный анализ.

В работе использовали яичный фосфатидилхолин отечественного производства. 1-Октадецил-2-стеароил-*rac*-глицеро-3-фосфохолин и 1,2-дигексадецил-*rac*-глицеро-3-фосфохолин синтезировали известным методом [7].

Везикулы готовили озвучиванием водных дисперсий липидов [8] после смешивания на ультразвуковом дезинтеграторе УЗД-1М при частоте 22 кГц и мощности 0,5 Вт в течение 5 мин без термостатирования.

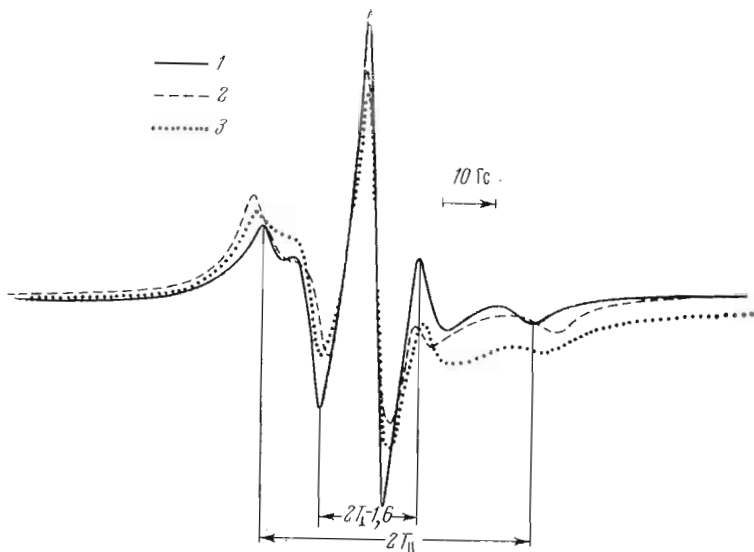


Рис. 1. Спектры ЭПР спин-меченого 2-алкилфосфатидилхолина (VI) в везикулах из яичного фосфатидилхолина, усиление $2 \cdot 10^4$ (1); 1-октадецил-2-стеароил-*rac*-глицеро-3-фосфохолина, усиление $2,5 \cdot 10^4$ (2); 1,2-дигексадецил-*rac*-глицеро-3-фосфохолина, усиление $5 \cdot 10^4$ (3). Соотношение липид - зонд, 100 : 1 (моль/моль), трис-буфер (pH 8,0), общая концентрация липидов 10^{-2} М

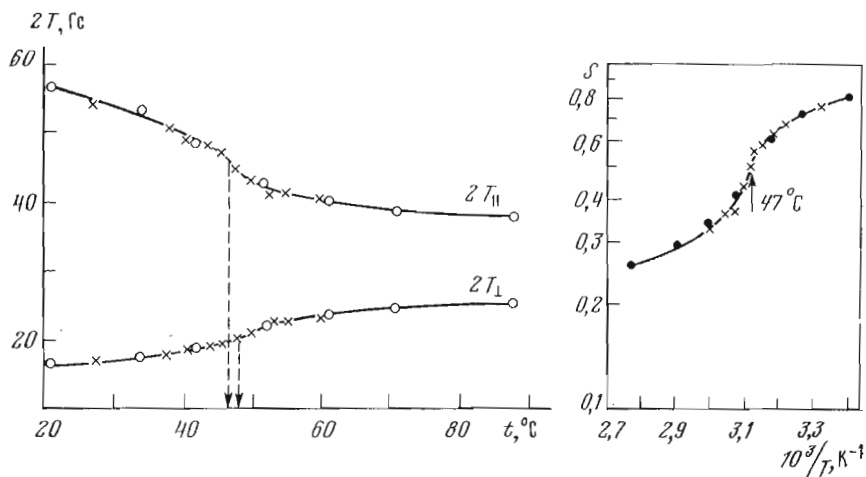


Рис. 2. Температурная зависимость значений T_{\parallel} , T'_{\perp} , S для везикул из 1-октадецил-2-стеароил-*rac*-глицеро-3-фосфохолина, содержащих 1 мол. % парамагнитного зонда (VI). Кривая построена по данным двух серий экспериментов

Фактор упорядоченности (S) определяли по формуле [9]

$$S = \frac{T_{\parallel} - T'_{\perp}}{T_{aa} - T_{bb}},$$

где T_{\parallel} и T'_{\perp} — значения тензоров сверхтонкой структуры соответственно при параллельном и перпендикулярном направлениях напряженности приложенного поля; их определяли из спектров (рис. 1), принимая, что $2T'_{\perp} = 2T_{\perp} + 1,6$ Гс [9]. Значения T_{aa} , T_{bb} взяты из литературных источников для подобных радикалов, жестко ориентированных в кристалли-

ческой решетке [10]. Среднюю квадратичную ошибку при определении S (ΔS) вычисляли по формуле

$$\Delta S = \sqrt{\left(\frac{\Delta T_{\parallel}}{2T_{\parallel}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta T_{\perp}}{2T_{\perp}}\right)^2} \cdot S.$$

Ошибка при измерении T_{\parallel} и T_{\perp} (ΔT_{\parallel} , ΔT_{\perp}) составляла 0,3 Гс.

1-Бензил-2-октадецил-3-тригил-гас-глицерин (I). В колбу на 0,5 л, снабженную мешалкой и насадкой Дина — Старка, помещали 10 г 1-бензил-3-тригил-гас-глицерина (n_D^{20} 1,6013) [4], 15 г мелкоизмельченного КОН, 11 г бромоктадекана (т. пл. 28,5°С) и 250 мл толуола. Реакционную смесь кипятили при интенсивном перемешивании до прекращения выделения воды. Реакционную массу отфильтровывали от осадка, толуольный раствор промывали водой (3×50 мл), сушили сернокислым натрием. Растворитель упаривали в вакууме, остаток хроматографировали на силикагеле. Триэфир (I) элюировали смесью петролейный эфир — эфир (9 : 1). Выход 10,95 г (68,7%); R_f 0,63 (А); 08 (Б). ИК-спектр (ν , см⁻¹): 3020, 3010, 1500 (C₆H₅); 1100 (C—O—C).

1-Бензил-2-октадецил-гас-глицерин (II). Тритильное производное (I) (4 г) растворяли в 50 мл хлороформа и добавляли 30 мл концентрированной HCl. Смесь перемешивали 4 ч, хлороформный раствор промывали водой (7×50 мл), сушили сернокислым натрием, отгоняли растворитель. Остаток хроматографировали на колонке, элюируя вещество (II) смесью петролейный эфир — эфир (9 : 1). Получали 1,8 г (72%) воскообразного соединения (II), R_f 0,15 (А), 0,35 (Б). ИК-спектр (ν , см⁻¹) (хлороформ): 3610 (ОН), 3020, 3010, 1500 (C₆H₅), 1100 (C—O—C).

1-Бензил-2-октадецил-гас-глицеро-3-фосфо-2'-хлорэтанола (III). К раствору 10 г β-хлорэтилдихлорфосфата (т. кип. 123—124°С при 10 мм рт. ст.) [11] в 35 мл пиридина и 30 мл хлороформа при -15°С и перемешивании в течение 1 ч добавляли 3,3 г вещества (II). Смесь перемешивали еще 1,5 ч при -(10—15)°С и 2 ч при 20°С, затем добавляли 20 мл воды и упаривали. Остаток экстрагировали эфиром (3×50 мл). Упаренный экстракт разделяли на колонке хроматографированием смесью хлороформ — метанол (99 : 1). Получали 3,27 г (74,2%) аморфного фосфодиэфира (III), R_f 0,45 (В). ИК-спектр (ν , см⁻¹): 3400, 3080, 3020, 1500 (C₆H₅), 1240 (P=O), 1100, 1050, 1030 (P—O—C и C—O—C).

1-Бензил-2-октадецил-гас-глицеро-3-фосфохолин (VI). К раствору 1,2 г фосфата (III) в 15 мл бензола в ампуле добавляли 30 мл триметиламина при охлаждении жидким азотом. Ампулу запаивали и выдерживали смесь 48 ч при 80—90°С. Ампулу охлаждали жидким азотом и вскрывали. Содержимое упаривали, растворяли в метаноле, добавляли смесь ионообменных смол амберлита IRA-400 (ОН⁻) и дауэкса 50W×8 (H⁺) в соотношении 1 : 1 и перемешивали в течение 30 мин. Отфильтровывали раствор, упаривали растворитель. Маслообразный осадок высушивали (3 ч, 0,1 мм рт. ст.) и растирали с 40 мл ацетона. Декантировали раствор и повторяли эту операцию дважды. Остаток высушивали (3 ч, 0,1 мм рт. ст.) и получали 0,84 г (67,4%) хроматографически однородного аморфного вещества (IV), R_f 0,15 (Г). ИК-спектр (ν , см⁻¹): 3400 (ОН), 3400, 3080, 3020, 1500 (C₆H₅), 2740, 1640 (P—O), 1240 (P=O), 1100, 1070 (P—O—C и C—O—C).

2-Октадецил-гас-глицеро-3-фосфохолин (V). Вещество (IV) (2 г), растворенное в 50 мл смеси этилацетат — метанол (1 : 9), гидрировали в токе водорода в присутствии Pd-черни. После окончания поглощения водорода реакционную смесь фильтровали, катализатор промывали метанолом (3×50 мл), фильтраты упаривали. Получали 1,67 г (96,5%) воскообразного вещества (V), R_f 0,10 (Г). ИК-спектр (ν , см⁻¹): 3500—3150 (ОН), 1240—1210 (P=O), 1100—1030 (P—O—C и C—O—C).

1-[Гексадекан-6-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметиллоксазолидин)ойл]-2-октадецил-глицеро-3-фосфохолин (VI). К 0,0675 г гексадекан-6-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметиллоксазолидин)-овой кислоты (т. пл. 30–31°С) [12] добавляли раствор 0,0310 г карбонилдиимидазола в 1 мл бензола и перемешивали смесь при комнатной температуре 20 мин. Бензольный раствор приливали к 0,100 г лизосоединения (V) и упаривали смесь досуха. Расплавляли и перемешивали реакционную массу при 40°С в течение 6 ч. Добавляли 1 мл воды, 3 мл хлороформа и упаривали. Остаток разделяли с помощью 2-кратной препаративной ТСХ в системе Г. Выделяли 0,055 г (33,5%) бледно-желтого вещества (VI), R_f 0,3 (Г). ИК-спектр (см^{-1}): 3500–3400 (вода), 1740 (C=O), 1280 (P=O), 1150, 1100, 1070–1060 (P–O–C и C–O–C). Масс-спектр (m/e): 848,4 (M^+). $\text{C}_{46}\text{H}_{92}\text{O}_9\text{N}_2\text{P}_1$. Вычислено: M 848,22. Спектр ЭПР: уширенный синглет (гептан или спирт, при концентрации 10^{-3} – 10^{-5} М).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецов А. Н. (1976) Метод спинового зонда, «Наука», М.
2. Spin-Labeling: Theory and Applications (1976) Berliner L. I., ed., Acad. Press, N. Y.
3. Суханов В. А., Жданов Р. И., Швец В. И., Евстигнеева Р. П. (1978) Биоорганич. химия, 4, 785–790.
4. Волкова Л. В., Швец В. И., Ханджарова В. С., Рыжепкова С. Ф., Преображенский Н. А. (1963) Ж. общ. химии, 33, 1848–1851.
5. Boss W. F., Kelley C. J., Landsberger F. R. (1975) Anal. Biochem., 64, 289–292.
6. Новицкая Г. В. (1972) Методическое руководство по ТСХ липидов, с. 44–45, «Наука», М.
7. Розин А. Э., Васпленко И. А., Гудкова С. Ф., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1976) Биоорганич. химия, 2, 78–81.
8. Cullis P. R. (1976) FEBS Lett., 70, 223–228.
9. Hubbell W., McConnell H. M. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 314–323.
10. Jost P., Libertini L. J., Hebert V. C., Criffith O. H. (1974) J. Mol. Biol., 59, 77–98.
11. Renshaw R. P., Hopkins C. Y. (1929) J. Amer. Chem. Soc., 51, 953–956.
12. Суханов В. А., Швец В. И., Жданов Р. И., Евстигнеева Р. П. (1977) Докл. АН СССР, 236, 1386–1389.

Поступила в редакцию
23.III.1979

THE SYNTHESIS OF A SPIN-LABELED ALKYL PHOSPHATIDYLCHOLINE

SUKHANOV V. A., BASHARULI V. A., KAPLUN A. P., SHVETS V. I.,
SIDOROV O. M., OKHANOV V. V.

Research Institute for Biological Testing of Chemical Compounds, Kupavna;
M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow

The synthesis of 1-[hexadecane-6-spiro-2'-(N-oxyl-4',4'-dimethylloxazolidine)-oyl]-2-octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine has been carried out. This compound may be used as a paramagnetic probe for studies on membrane structures containing lipids of various types. The applicability of this new paramagnetic probe to evaluating the density of packing in vesicles and to studying the phase transitions was demonstrated.