

Методы синтеза дейтеромеченых липидов

Н.А.Брагина, В.В.Чупин

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова
117571 Москва, просп. Вернадского, 86, факс (095)430–7983

В обзоре рассмотрены методы синтеза дейтеромеченых гидрофобных и гидрофильных синтонов липидных молекул, а также способы получения селективно и полностью дейтерированных фосфолипидов и их аналогов. Дейтеромеченые липиды используются для изучения структурной организации и функционирования биологических мембран, в том числе при исследовании методами ЯМР и дифракции нейтронов липид-липидных и липид-белковых взаимодействий.
Библиография — 145 ссылок.

Оглавление

I. Введение	1077
II. Синтез дейтерированных жирных кислот	1078
III. Синтез дейтеромеченых гидрофильных компонентов фосфолипидов	1080
IV. Синтез фосфолипидов с дейтерированными жирными кислотами	1084
V. Синтез фосфолипидов с дейтериевыми метками в гидрофильной части молекулы	1085
VI. Синтез полностью дейтерированных липидов	1086
VII. Другие дейтеромеченые липиды	1088
VIII. Анализ дейтеромеченых липидов	1088

I. Введение

Бурное развитие молекулярной биологии, в частности науки о биомембранах, стимулировало исследования в области синтеза дейтерированных липидов. Селективно и полностью дейтерированные липиды явились мощным инструментом для изучения структурной организации и функционирования биологических мембран. Дейтерий может быть избирательно введен в любую метильную, метиленовую или метиновую группу липидной молекулы, при этом свойства липидных молекул остаются неизменными, что выгодно отличает дейтериевую метку от спиновых или флуоресцентных.

Первоначально дейтеромеченые липиды использовались лишь в масс-спектрометрии при исследовании путей фрагментации липидных молекул.^{1,2} В 70-е–80-е годы были разработаны новые методы исследования структурной организации мембран, среди которых в первую очередь необходимо отметить ЯМР ²H твердого тела^{3–6} и дифракцию нейтронов.^{7–9}

К сожалению, эти методы малочувствительны и требуют значительного количества липидов (десятки и даже сотни миллиграмм образца), поэтому разработка удобных в препаративном отношении методов синтеза дейтеромеченых

липидов, позволяющих получать такие липиды в необходимых количествах, не теряют своей актуальности.

Другое направление в использовании дейтерированных липидов связано с изучением структуры мембранных белков. Вторичную и третичную структуры мембранных белков определяют с помощью традиционного метода двумерной ЯМР ¹H спектроскопии высокого разрешения.¹⁰ Очевидно, что для такого рода исследований необходимы полностью дейтерированные детергенты, «прозрачные» для метода ЯМР ¹H. В качестве мембранного окружения обычно используют либо органические растворители, либо мицеллы, полученные из липидоподобных детергентов;^{11–14} исследования структуры мембранных белков в липидных бислоях до сих пор не проводились, так как в отличие от небольших по размеру мицелл, движение в бислоях анизотропно, что приводит к значительному уширению сигналов в спектрах ЯМР. К настоящему времени созданы принципиальные условия для изучения вторичной и третичной структуры белков в составе липидного бислоя. Показана возможность получения двумерных спектров ЯМР ¹H высокого разрешения на липидных бислоях с помощью методики вращения под магическим углом.^{15,16} Планируются работы по изучению структуры белков в составе мембран. Необходимым условием для проведения таких исследований является наличие полностью дейтерированных липидов.

В данном обзоре рассмотрены методы синтеза дейтеромеченых гидрофобных и гидрофильных предшественников липидных молекул, а также селективно и полностью дейтерированных фосфолипидов и их аналогов.

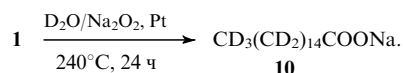
В качестве дейтерирующих агентов используют коммерчески доступные дейтеросодержащие химические реактивы,¹⁷ например, тяжелую воду (D₂O), спирты (MeOD), кислоты (D₂SO₄) или основания (NaOD). В этом случае енолизующие протоны липидов специфически обмениваются на дейтерий в условиях кислотного или основного катализа. Молекулярный дейтерий в сочетании с платиновыми, палладиевыми

Н.А.Брагина. Аспирантка кафедры химии и технологии тонких органических соединений МГАТХТ. Телефон: (095)437–1925.

В.В.Чупин. Доктор химических наук, доцент той же кафедры. Телефон: (095)437–1925.

Область научных интересов авторов: биоорганическая химия, ядерный магнитный резонанс, липиды, мембраны.

Дата поступления 4 апреля 1997 г.

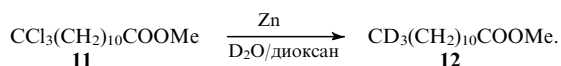


В этих условиях наблюдается частичное декарбоксилирование жирной кислоты, выход дейтерированного продукта **10** составляет 80–85%.

Полностью дейтерированные кислоты можно получать также при пропускании газообразного дейтерия через суспензию палладиевой черни в жирной кислоте.²⁸ Специфичность обмена неенолизующих протонов невысока. Однако в некоторых случаях удается провести селективный протон-дейтериевый обмен. Так, при проведении реакции в тщательно подобранных условиях можно добиться того, что обмену будут подвергаться преимущественно протоны терминальной метильной группы карбоновой кислоты.²⁹ (В качестве катализатора в работе²⁹ использовали K_2PtCl_4 .)

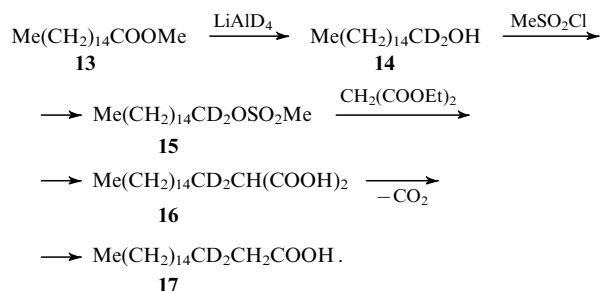
К достоинствам описанных выше методов следует отнести то, что получение дейтерированных жирных кислот не требует проведения сложных многостадийных операций. Кроме того, в качестве исходных продуктов используют доступные жирные кислоты. Реакции проходят с высокими выходами. Целевые продукты выделяют экстракцией без использования хроматографических методов очистки. Степень дейтерирования жирной кислоты зависит от количества повторений процедуры обмена, от природы дейтерирующего агента и его избытка. С целью увеличения степени дейтерирования целевых жирных кислот и более рационального использования дорогостоящих дейтерированных растворителей реакции обмена обычно проводят в 2–3 приема.

Для получения селективно дейтерированных жирных кислот требуются более сложные процедуры. В них сочетаются реакции обмена, избирательного восстановления и получения жирных кислот из отдельных синтонов. В работе²⁵ описан синтез метилового эфира лауриновой кислоты **12** с дейтерированной метильной группой на конце углеводородной цепи. Исходным соединением в этом синтезе является метиловый эфир 12-трихлордodeкановой кислоты; цинковая пыль в смеси D_2O с диоксаном специфически восстанавливает группу CCl_3 эфира **11** до CD_3 , давая продукт **12**.

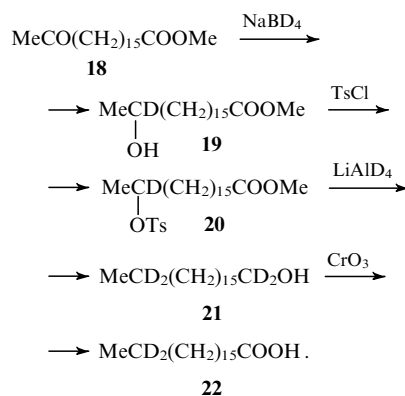


Метиловый эфир **12** может быть восстановлен до соответствующего спирта и использован для получения меченой миристиновой кислоты.^{30, 31}

Для селективного введения дейтериевых меток в различные положения углеводородных цепей жирных кислот широко применяют реакции восстановления с помощью LiAlD_4 и NaBD_4 . В этом случае введение дейтерия осуществляется в одну стадию и степень дейтерирования целевых продуктов зависит лишь от степени дейтерирования используемых LiAlD_4 или NaBD_4 . Таким способом была синтезирована $[3\text{-}^2\text{H}_2]$ -стеариновая кислота (**17**).^{19, 32} Исходным соединением в данном синтезе служил метиловый эфир пальмитиновой кислоты (**13**), который восстанавливали LiAlD_4 до спирта **14**. Далее проводили удлинение углеводородной цепи с помощью малонового синтеза. С этой целью спирт **14** активировали, переводя его в мезильное производное **15**, которое использовали в качестве алкилирующего агента. Алкилирование диэтилового эфира малоновой кислоты в щелочных условиях сопровождается омылением сложноэфирных групп. Последующее декарбоксилирование дикарбоновой кислоты **16** дает кислоту **17** с дейтериевой меткой в β -положении.



По-видимому, любая кетогруппа в углеводородной цепи может быть избирательно восстановлена до CD_2 -группы.^{19, 33} Например, метиловый эфир оксокислоты **18** можно избирательно восстановить NaBD_4 до гидроксикислоты **19**. Последнюю сначала превращают в тозилат **20** и восстанавливают LiAlD_4 до спирта **21**, дейтерированного в положении 1 и 17. Окисление спирта **21** оксидом хрома сопровождается удалением дейтерия из положения 1, в результате образуется $[17\text{-}^2\text{H}_2]$ -стеариновая кислота (**22**).



При необходимости, по такой же схеме в молекулу жирной кислоты можно стереоспецифически ввести один атом дейтерия.³³

Помимо тозилатов **20** в синтезе дейтерированных жирных кислот используют мезилаты и иодиды, которые восстанавливают с помощью LiAlD_4 .^{34, 35} Первичные и вторичные бромиды не восстанавливаются,^{35, 36} что позволяет получать необходимые синтоны для синтеза жирных кислот. Однако селективность LiAlD_4 невысока. В связи с этим был предложен другой восстанавливающий агент — NaBD_3CN .³⁷ С его помощью избирательно восстанавливают тозилаты, мезилаты и иодиды в присутствии сложноэфирных групп в апротонных растворителях.

Для получения CD_2 -групп используют также восстановление оксогрупп по Клеменсену (Zn/DCl).^{32, 38} Однако наличие подвижных дейтеронов в реакционных средах приводит также к обмену протонов, находящихся в α -положении по отношению к оксогруппе. В результате в составе углеводородной цепи появляется $(\text{CD}_2)_3$ -фрагмент. Разработан универсальный метод³⁹ замены CH_2 -группы на группу CD_2 в любом положении насыщенной жирной кислоты. Для этого соответствующий эфир карбоновой кислоты **23** восстанавливают LiAlD_4 . Образующийся при этом спирт **24** переводят в бромид и из него получают реактив Гриньяра **25**. Взаимодействием последнего с солью бромзамещенной карбоновой кислоты **26** в присутствии Li_2CuCl_4 в качестве катализатора получают карбоновую кислоту **27** с дейтерированной метиленовой группой. На этой стадии реакция протекает с высокими выходами (77–85%). Имеется тенденция к снижению выходов при увеличении длины углеводородной цепи в соединении **25**.

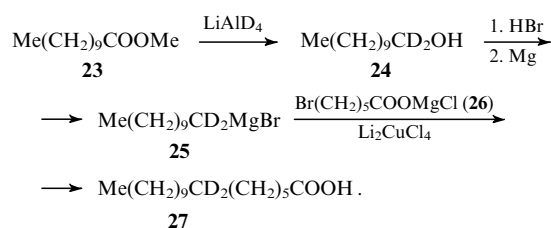


Схема 2

Варьируя длину углеводородной цепи в эфире **23** и бромзамещенной кислоте **26**, можно получать жирные кислоты с различной длиной углеводородной цепи и различным положением группы CD_2 .

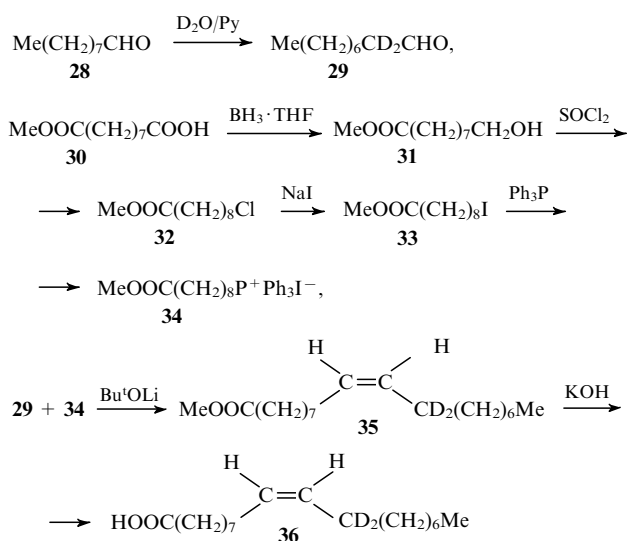
Диметилкупрат лития использовали для замены тозильной группы на метильную в синтезе метилового эфира $[13\text{-}^2\text{H}_2]$ -миристиновой кислоты.⁴⁰

Вицинально меченные дейтерием жирные кислоты получают восстановлением кратных связей газообразным дейтерием на платиновых и палладиевых катализаторах.^{41, 42} Этот способ введения дейтериевой метки сравнительно мало распространен из-за ряда неудобств: необходимости использования большого избытка дейтерия, жестких условий реакции и, главное, побочных реакций изотопного обмена. В какой-то степени избежать побочных реакций изотопного обмена позволяет гомогенный катализатор Уилкинсона — хлорид трис(трифенилфосфин)родия.^{43–46} Двойные и тройные связи можно восстанавливать на «дейтерированном» никеле Ренея.^{47, 48} Однако наибольшее применение из методов каталитического гидрирования двойных и тройных связей молекулярным дейтерием получил метод дейтерирования тройной связи на катализаторе Линдлара. Низкая активность катализатора Линдлара по сравнению с другими катализаторами позволяет селективно дейтерировать тройные связи. Реакция протекает с высокой степенью стереоселективности, и содержание *цис*-изомера (природный изомер в ненасыщенных жирных кислотах) в дидейтерированных олефинах достигает 98–99%. Таким методом были получены октадейтероарахионовая кислота⁴⁹ и ряд ненасыщенных $\text{CD}=\text{CD}$ -жирных кислот.^{49–53} Восстановление на катализаторе Линдлара используют также в ацетиленовых синтезах ненасыщенных жирных кислот с дейтеромечеными метиленовыми фрагментами, так как в условиях каталитического гидрирования не происходит обратный дейтерий-протоновый обмен.²¹

Для селективного восстановления дейтерием двойных связей ненасыщенных жирных кислот применяют также дейтерогидразин.^{32, 54, 55} Реакцию проводят в присутствии небольших количеств окислителя: кислорода, метаперiodата натрия, пероксида водорода, солей меди(II) и некоторых других. Сначала дейтерогидразин действием окислителя превращают *in situ* в динимид $\text{DN}=\text{ND}$, *син*-форма которого обеспечивает *цис*-присоединение дейтерия к двойной связи.⁵⁶

Для синтеза ненасыщенных дейтеромеченых кислот используют подход, основанный на реакции Виттига.^{44, 57–59} Пример такого синтеза представлен на схеме 2.

Дейтерий вводят в α -положение нонанала **28** реакцией обмена при кипячении альдегида в смеси $\text{D}_2\text{O}/\text{Py}$. Второй компонент реакции Виттига получают избирательным восстановлением монометилового эфира азелаиновой кислоты **30** до спирта **31**. Затем замещают гидроксильную группу на хлор (соединение **32**), а хлор на иод (соединение **33**). Иодпроизводное **33** алкилирует трифенилфосфин. Ключевой стадией данного синтеза является конденсация альдегида **29** и фосфониевой соли **34** по Виттигу. Первоначально для проведения реакции Виттига было предложено использовать в качестве катализатора этилат натрия.⁵⁸ Однако конденсация зачастую протекала с очень низкими выходами.⁶⁰ Позже было предложено использовать в качестве основания Bu^tOLi .⁵⁹ Последний получали взаимодействием эквимолярных количеств



трет-бутилового спирта и гексиллития. В этом случае конденсация соединений **29** и **34** протекала с достаточно высокой степенью стереоселективности, выход $[11\text{-}^2\text{H}_2]$ -олеиновой кислоты (**36**) и ее *транс*-изомера — $[11\text{-}^2\text{H}_2]$ -элаидиновой кислоты — достигал ~70%. Соотношение *цис*- и *транс*-изомеров составляло 95 : 5. Образование *цис*- и *транс*-изомеров в реакции Виттига является существенным недостатком данного метода, так как разделение геометрических изомеров жирных кислот требует использования специальных хроматографических методов.⁵⁷ Соотношение *цис*- и *транс*-изомеров в значительной мере зависит от условий проведения реакции.⁶⁰ Например, проводя реакцию в присутствии бис(триметилсилил)амида калия, можно повысить содержание *цис*-изомера до 98%,⁶¹ что сопоставимо со стереочистотой олефинов, получаемых гидрированием ацетиленовых соединений на катализаторе Линдлара.

Помимо рассмотренных выше методов удлинения углеводородных цепей (малоновый синтез, конденсации с участием медных катализаторов, реакция Виттига), в синтезе дейтеромеченых кислот используются и другие традиционные для химии жирных кислот подходы: ацетиленовый синтез,^{21, 35, 43, 62, 63} енаминовый синтез,^{19, 34, 64} электролитический синтез по Кольбе.^{33, 65–67} Синтез различных дейтеромеченых кислот подробно рассмотрен в обзорах^{30, 31}.

III. Синтез дейтеромеченых гидрофильных компонентов фосфолипидов

В гидрофильную часть молекул фосфолипидов входят такие остатки как холин, этаноламин, серин, глицерин, инозит и некоторые другие.^{68, 69}

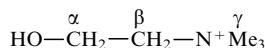
Для изучения структурных особенностей полярной области липидного бислоя были разработаны методы синтеза фосфолипидов с различными дейтеромечеными полярными участками молекул.

1. Синтез дейтерированных холинов

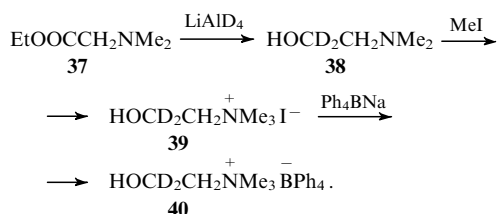
Одними из наиболее распространенных фосфолипидов в составе биологических мембран являются фосфатидилхолины.⁶⁸ Они представляют собой излюбленный объект для проведения различных биофизических и биохимических исследований. Это связано с их способностью формировать стабильный бислой в широком интервале температур, pH и ионной силы раствора. Квадратное расщепление в спектрах ЯМР ^2H сигналов от дейтериевых меток в составе холина оказалось чрезвычайно чувствительным к изменению поверх-

ностного электрического потенциала липидного бислоя,⁷⁰ это открывает новые возможности для изучения электрических свойств мембран. Поэтому не удивительно, что исследователи уделяют большое внимание получению дейтерированных холинов или их химических предшественников.

Разработанные к настоящему времени методы позволяют вводить дейтерий в любую часть холиновой молекулы. Для обозначения положений в холиновом остатке мы будем придерживаться системы обозначений, предложенной в работе⁷⁰.



Для получения холина, меченного дейтерием по α -положению, этиловый эфир *N,N*-диметилглицина (37) восстанавливают алюмодейтеридом лития, а затем проводят метилирование *N,N*-диметиламиноэтанола (38). Образующийся в результате метилирования иодид $[\alpha\text{-}^2\text{H}_2]$ -холина (39)⁷¹ конденсируют с 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицерофосфохлоридом и получают 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицерофосфо- $[\alpha\text{-}^2\text{H}_2]$ -холин.



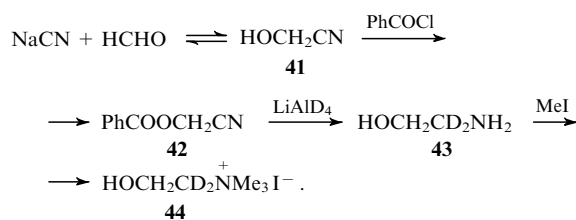
Необходимо отметить, что конденсация фосфатидной кислоты или дихлорфосфата с холином является важным этапом в синтезе фосфатидилхолинов. Данную реакцию проводят в органических растворителях (обычно в пиридине, хлороформе, хлористом метиле и др.). К сожалению, растворимость иодида холина в органических растворителях очень низка, что является причиной низких выходов на стадии конденсации фосфатидной кислоты и иодида холина. В этой связи было предложено использовать ацетат холина.⁷² Однако и в этом случае выходы варьировались в широких пределах и в лучших случаях составляли 40–60%. Это также обусловлено невысокой растворимостью ацетата холина в органических растворителях и его высокой гигроскопичностью.

При синтезе полностью дейтерированного фосфатидилхолина применяли комплекс иодида холина с иодом.⁷³ К недостаткам этого подхода следует отнести то, что комплекс иодида холина и иода нестабилен и теряет иод при хранении или высушивании в вакууме. Кроме того, после проведения конденсации необходимо удалять большой избыток свободного иода. Выход фосфатидилхолина составляет всего 25–40%.

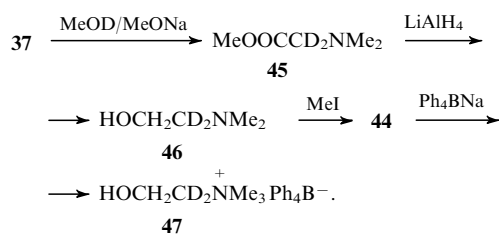
Эффективный подход к синтезу фосфатидилхолина был предложен в работе⁷⁴. Авторы использовали холин в виде тетрафенилбората. К достоинствам этого подхода следует отнести то, что данная соль практически не растворяется в воде, и холин может быть легко и количественно выделен из водных реакционных сред. Тетрафенилборат холина негигроскопичен и хорошо растворим в таких органических растворителях как пиридин, что позволяет проводить конденсацию данной соли с фосфатидной кислотой с высокими выходами. Для получения тетрафенилбората $[\alpha\text{-}^2\text{H}_2]$ -холина (40) после стадии метилирования органический растворитель удаляют в вакууме, реакционную массу разбавляют водной щелочью, нерастворимые алюминаты отфильтровывают, а $[\alpha\text{-}^2\text{H}_2]$ -холин высаживают водным раствором тетрафенилбората натрия.

Способ получения β -дейтерированного холина⁷¹ основан на методе, предложенном ранее для синтеза ^{14}C меченого этаноламина.⁷⁵ По этому методу конденсацией цианида

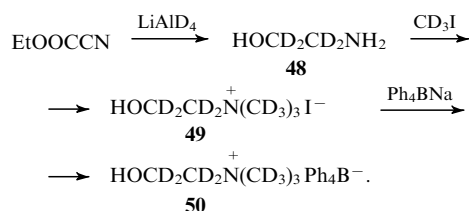
натрия и формальдегида получают нитрил гликолевой кислоты (41), который после бензоилирования дает нитрил 42. Последний восстанавливают до $[\beta\text{-}^2\text{H}_2]$ -этанолamina (43). Истощающее N-метилирование $[\beta\text{-}^2\text{H}_2]$ -этанолamina (43) приводит к иодиду $[\beta\text{-}^2\text{H}_2]$ -холина (44).



Другой способ⁷⁶ заключается в использовании в качестве исходного соединения этилового эфира *N,N*-диметилглицина (37). Подвижные α -протоны соединения 37 обмениваются на дейтерий в MeOD в присутствии метилата натрия. Обмен протекает с высокой скоростью, и равновесные условия достигаются в течение часа при комнатной температуре. Дейтеробмен сопровождается переэтерификацией этилового эфира, что приводит к соединению 45. Протекание реакции обмена легко контролируется по исчезновению сигналов CH_2 -группы и появлению сигналов CHD - и CD_2 -групп в спектрах ЯМР ^{13}C . Восстановление метилового эфира 45 до соответствующего спирта 46, последующее метилирование и получение тетрафенилбората $[\beta\text{-}^2\text{H}_2]$ -холина (47) осуществляют аналогично синтезу α -дейтерированного холина 40, только вместо алюмодейтерида лития для восстановления используют алюмогидрид лития.

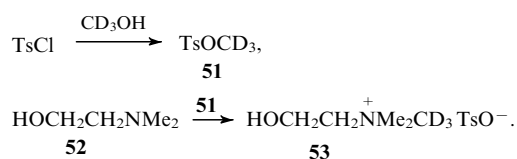


Полностью C-дейтерированный холин⁷⁴ образуется при восстановлении этилового эфира циануксусной кислоты алюмодейтеридом лития с последующим истощающим N-дейтерометилированием дейтерированного этаноламина (48). Получающийся иодид холина (49) может быть переведен в ацетат,⁷² комплекс с иодом⁷³ или тетрафенилборат (50). Последний является наиболее удобной формой холина, используемой для конденсации с фосфатидной кислотой. Суммарный выход тетрафенилборатной соли холина 50 превышает 40%.⁷⁴



Помимо рассмотренной выше схемы, для получения полностью C-дейтерированного холина применяют кватернизацию $[\text{H}_9]$ -триметиламина с 2-бром-[1,1,2,2- $^2\text{H}_4$]-этанолом, как это делается в синтезе полностью дейтерированного додецилфосфохолина (см. ниже).⁷⁷ Полностью дейтерированный β -бромэтанол может быть использован в таких схемах синтеза фосфатидилхолинов, в которых образование холинового остатка происходит на последней стадии в результате реакции бром(хлор)алканов с триметиламином.⁷⁸

Для синтеза холина с дейтерированными метильными группами применяются методы, основанные на метилировании этаноламина или его частично метилированных производных. Метилированием этаноламина и последующим осаждением холина в виде тетрафенилбората был получен $[\gamma\text{-}^2\text{H}_9]$ -холин с практически количественным выходом.⁷⁴ Другим удобным производным для синтеза фосфатидилхолинов является тозилат холина.⁷⁹ К сожалению, данная соль холина хорошо растворяется в воде. Кроме того, тозилат холина не может быть получен непосредственно реакцией ионного обмена иодида холина с *n*-толуолсульфокислотой. Для превращения иодида холина в тозилат требуется промежуточно получить ацетат холина.²⁴ Исходным соединением в синтезе тозилата $[\gamma\text{-}^2\text{H}_3]$ -холина (**53**) является тозилхлорид. При действии последнего на CD_3OH образуется метилтозилат (**51**), который используют для дейтерометилирования *N,N*-диметилэтанолamina (**52**). Тозилат холина **53** получают с количественным выходом.



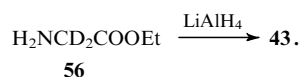
2. Синтез дейтеромеченых этаноламинов

Этаноламин — составной структурный элемент фосфатидилэтаноламинов, которые, как и фосфатидилхолины, являются цвиттер-ионными фосфолипидами. Однако в отличие от фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламины обладают принципиально иными структурообразующими свойствами. В физиологических условиях фосфатидилэтаноламины формируют в воде не протяженный бислой, а инвертированные гексагональные структуры.^{80,81} Полагают, что способность фосфатидилэтаноламинов образовывать структуры, отличные от бислоевых, в значительной степени влияет на многие функции мембран.

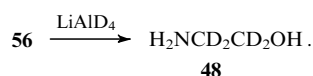
Для получения этаноламинов с дейтериевыми метками в различных положениях обычно используют методы восстановления производных глицина дейтеридами металлов.^{82–84} Так, восстановление этилового эфира глицина (**54**) алюмодейтеридом лития⁸³ приводит к этаноламину **55** с дейтериевой меткой в положении 1.



Аналогичная процедура применяется для синтеза этаноламина **43** с дейтериевой меткой в положении 2. Однако в этом случае в качестве исходных реагентов применяют дейтерированный этиловый эфир глицина (**56**) и алюмогидрид лития.⁸³

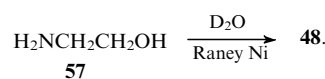


$[2\text{-}^2\text{H}_2]$ -Этаноламин **43** может быть получен и по схемам, используемым в синтезе дейтеромеченых холинов.^{71,75} Дейтерированный этиловый эфир глицина **56** может служить также исходным соединением в синтезе $[1,2\text{-}^2\text{H}_4]$ -этанолamina (**48**).⁸³



$[1,2\text{-}^2\text{H}_4]$ -Этаноламин (**48**) был получен также восстановлением этилового эфира циануксусной кислоты по схеме, предложенной для синтеза полностью дейтерированного холина.⁷⁴

Помимо реакций восстановления для получения дейтерированных этаноламинов используются реакции протон-дейтериевого обмена. Так, никель Ренея в D_2O применяется при реакции обмена протонов в этанолаmine **57**.⁸⁵ Обмен протекает неспецифически, хотя и отмечается более высокая активность положения 2. К несомненным достоинствам этого подхода следует отнести доступность исходных реагентов.



Общая методика получения и использования «дейтерированного» никеля Ренея для обмена протонов в алифатических и ароматических соединениях изложена в работе⁸⁶.

Дейтеромеченые этаноламины выделяют в виде водорастворимых хлоргидратов и обычно используют в синтезе фосфатидилэтаноламинов посредством ферментативной реакции перефосфатидилирования, которая катализируется фосфолипазой D и протекает в водных средах.

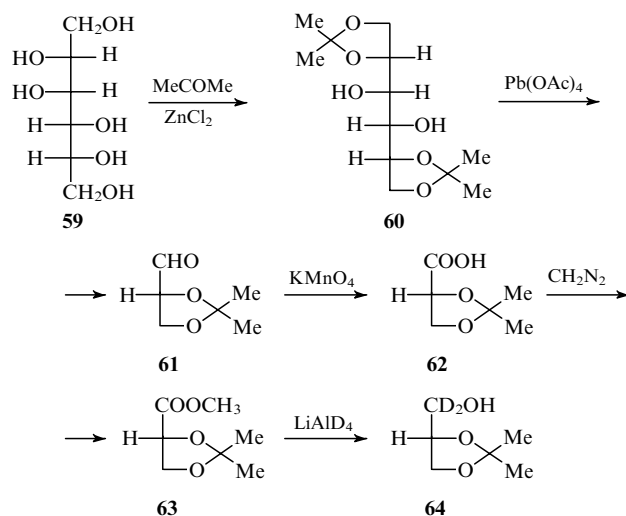
3. Синтез дейтеромеченых глицеринов

Глицерин (**58**) является структурным элементом всех глицерофосфолипидов, а также входит в состав полярного участка представителя отрицательно заряженных фосфолипидов — фосфатидилглицерина, который, в свою очередь, является структурным компонентом кардиолипина (дифосфатидилглицерина). Интерес к синтезу дейтерированных глицеринов связан не только с их применением для получения меченых липидов, но и с изучением роли глицерина как субстрата и интермедиата многочисленных процессов биосинтеза. В этой связи синтезу различных дейтеромеченых глицеринов посвящено довольно большое количество публикаций (см., например,^{73,87–95}). Разработанные к настоящему времени методы позволяют получать глицерины с дейтериевой меткой в любом положении молекулы. Незащищенные дейтеромеченые глицерины используют как субстраты в ферментативных синтезах фосфолипидов, а их изопропилиденовые производные применяют в химическом синтезе фосфатидилглицеринов. Необходимая стереоконфигурация изопропилиденглицеринов достигается за счет использования определенных оптически активных исходных реагентов. Дейтерий в молекулу глицерина вводится реакциями восстановления с помощью алюмодейтерида лития, бородейтерида натрия или их производных,^{73,87–92} а также ферментативными методами.^{87,93,94}

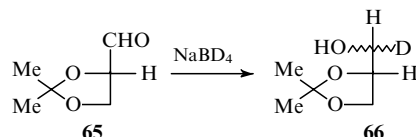
Рассмотрим синтезы различных дейтерированных глицеринов и их изопропилиденовых производных. Для получения 1,2-*O*-изопропилиден-*sn*- $[3\text{-}^2\text{H}_2]$ -глицерина (**64**) применялся традиционный для химии липидов подход,⁸⁶ основанный на превращении D-маннита (**59**) в 1,2:5,6-ди-*O*-изопропилиденовое производное **60** с последующим расщеплением вицинальной диольной группы соединения **60** тетраацетатом свинца. Для удаления остающегося в положении 1 протона защищенный D-глицериновый альдегид **61** окисляют до соответствующей глицериновой кислоты **62**, которую уже можно восстанавливать до спирта. Однако для более оптимального использования относительно дорогостоящего алюмодейтерида лития, кислоту **62** предварительного переводят в метиловый эфир **63**, который и восстанавливают, получая 1,2-*O*-изопропилиден-*sn*- $[3\text{-}^2\text{H}_2]$ -глицерин (**64**) (схема 3).⁸⁷

Во многом аналогичный подход использовали для синтеза соединения **64** в работе⁸⁸, только в этом случае окисление вицинального диола **60** осуществляли периодатом натрия, альдегида **61** — хромовой кислотой, а полученную кислоту **62** непосредственно восстанавливали алюмодейтеридом лития. Помимо D- и L-маннита в качестве исходных оптически активных реагентов используют также D- и L-серин.^{90,91}

Схема 3



Описан синтез 2,3-*O*-изопропилиден-*sn*-[1-²H]-глицерина (66).⁸⁷ Альдегид 65, являющийся энантиомером альдегида 61, был получен соответственно из L-маннита. Последний, в свою очередь, синтезировали восстановлением L-маннозы. Восстановление альдегида 65 бордейтеридом натрия приводит к изопропилиденовому производному 66, содержащему один атом дейтерия в положении 1.



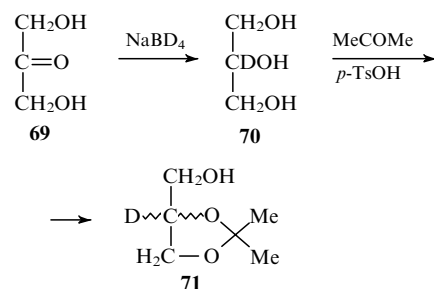
К сожалению, восстановление альдегида 65 проходит нестереоспецифически, и соединение 66 представляет собой смесь двух диастереомеров.

Для стереоспецифического введения дейтерия в глицерин применяют как химические,⁹¹ так и ферментативные^{87, 93, 94} методы. Предложен оригинальный подход,⁸⁷ основанный на ферментативной реакции протон-дейтериевого обмена. В D₂O под действием алкогольдегидрогеназы лошади один из протонов 1,2-*O*-изопропилиден-*sn*-глицерина (67) стереоспецифически обменивается на дейтерий, в результате образуется 1,2-*O*-изопропилиден-(3*R*)-*sn*-[3-²H]-глицерина (68).

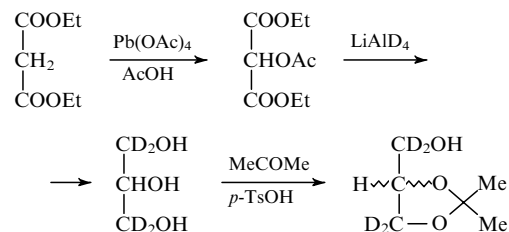


По-видимому, данная реакция имеет общий характер и может быть использована для стереоспецифического обмена одного протона на дейтерий в любом первичном спирте. Сочетанием химических и ферментативных методов был получен (1*R*,2*R*)-[1,1-²H,³H]-глицерин, стереоспецифически меченный одновременно дейтерием и тритием.⁹³

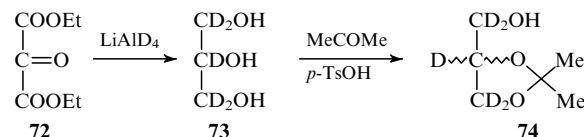
Для введения дейтерия в положение 2 молекулы глицерина используют восстановление дигидроксиацетона (69) бордейтеридом натрия.⁸⁷ При необходимости глицерин 70 может быть превращен в изопропилиденовое производное путем взаимодействия с ацетоном в присутствии *n*-толуолсульфокислоты. Однако при этом образуется рацемический изопропилиденглицерин (71).



Для избирательного введения дейтерия в положения 1 и 3 молекулы глицерина используют последовательность реакций, изображенных ниже:⁸⁷



Полностью дейтерированный глицерин 73 (подвижные протоны гидроксильных групп не учитываются) получают восстановлением диэтилоксомалоната (72) алюмодейтеридом лития.⁷³ Ферментативное фосфорилирование дейтерированного глицерина 73 обеспечивает необходимую стереоконфигурацию последующих полупродуктов в синтезе глицерофосфолипидов.⁷³ При введении изопропилиденовой защитной группы в глицерин 73 получают рацемический 1,2-*O*-изопропилиден-*rac*-[1,2,3-²H₃]-глицерин (74).⁸⁷



Дейтеромеченные глицерины и их изопропилиденовые производные используют в синтезе дейтеромеченных фосфатидилглицеринов и полностью дейтерированного фосфатидилхолина. Описано⁹² введение дейтерия в положение 3 1,2-ди-*O*-алкилглицерина. Его окисляли до диалкильного производного глицериновой кислоты реагентом Джонса. Полученную кислоту восстанавливали алюмодейтеридом лития и получали 1,2-ди-*O*-алкил-[3-²H₂]-глицерин. Данный метод не применим в синтезе диацильных производных из-за восстановления сложноэфирных связей.

4. Другие дейтеромеченные гидрофильные компоненты липидных молекул

Дейтеромеченный [²H₂]-серин является коммерчески доступным веществом и может быть использован в ферментативном или химическом синтезе дейтеромеченных фосфатидилсеринов. В работе⁹⁵ описан синтез стереоспецифически меченного дейтерием L-серина исходя из меченого аспарагина. Большое количество работ посвящено синтезу глицеролипидов с дейтериевыми метками в углеводной части молекул.^{92, 96-103} Обычно дейтерирование углеводных фрагментов осуществляют каталитическим обменом в присутствии никеля Ренея в D₂O, в результате которого происходит обмен геминального по отношению к гидроксильной группе первичных и вторичных спиртов протона.⁹⁶

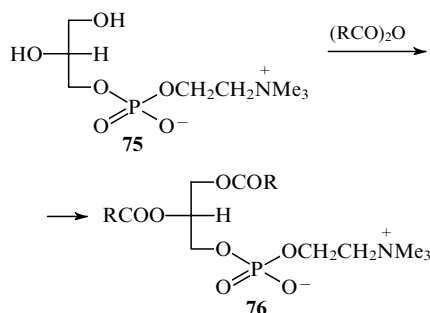
Глюкопиранозиды в результате такого обмена приобретают дейтериевые метки по 2, 3, 4, 6 и 6' положениям. Скорость обмена зависит от стерических факторов и может существенно различаться в зависимости от положения атома углерода в углеводной части молекулы. Протекание протон-дейтериевого обмена контролируют методом ЯМР ^{13}C . В случае гликозилдиглицеридов⁹⁸ и дигликозилдиглицеридов диалкильного типа,⁹⁹ а также других гликолипидов,¹⁰¹ у которых отсутствуют сложноэфирные группы, обмен проводят непосредственно в гликолипидах. При этом гликолипидные молекулы не разрушаются. Для дейтерирования гликозил-диглицеридов диацильного типа, у которых имеются относительно лабильные сложноэфирные связи, такой подход не может быть использован. В этом случае дейтерий предварительно вводят в состав углеводных фрагментов, которые затем присоединяют к диглицеридам с использованием традиционных химических методов.⁹⁷ Дейтерий в состав углеводов можно вводить, используя дейтериды металлов.¹⁰³

IV. Синтез фосфолипидов с дейтерированными жирными кислотами

Для синтеза фосфолипидов с дейтерированными жирными кислотами применяют традиционные методы химии липидов. Методы синтеза фосфолипидов подробно рассмотрены в учебных пособиях^{69, 104}, монографиях^{104–106} и обзорах^{107, 108}. В оригинальных работах, посвященных синтезу и использованию дейтеромеченых фосфолипидов, экспериментальные методики, как правило, отсутствуют (приводятся лишь ссылки на публикации, посвященные синтезу немеченых липидов). Экспериментальные методики, наиболее широко применяемые в химии липидов, суммированы и критически рассмотрены в монографиях^{105, 106}.

Из-за относительной дороговизны дейтеромеченых жирных кислот их введение в состав молекул фосфолипидов осуществляют обычно на последних стадиях синтеза. Общие химические подходы, которые наиболее часто используются для решения данной задачи, представлены ниже.

Исходным реагентом в синтезе фосфатидилхолинов является доступный *sn*-глицерофосфохолин (**75**) и/или его кадмиевый аддукт. Данное соединение легко получается при щелочном гидролизе природных фосфатидилхолинов, обычно яичного фосфатидилхолина (лецитина),^{106–108} и не имеет функциональных групп, нуждающихся в защите при ацилировании. Выбирая определенные дейтеромеченые жирные кислоты, можно получить необходимый фосфатидил-холин **76** в одну стадию (схема 4).



В качестве исходных соединений в реакции ацилирования можно использовать хлорангидриды,¹⁰⁷ ангидриды,^{109–112} имидазолиды¹¹³ или другие активированные производные жирных кислот.¹⁰⁴ Ацилирование *sn*-глицерофосфохолина **75** может сопровождаться образованием значительных количеств побочных продуктов, главным образом циклического

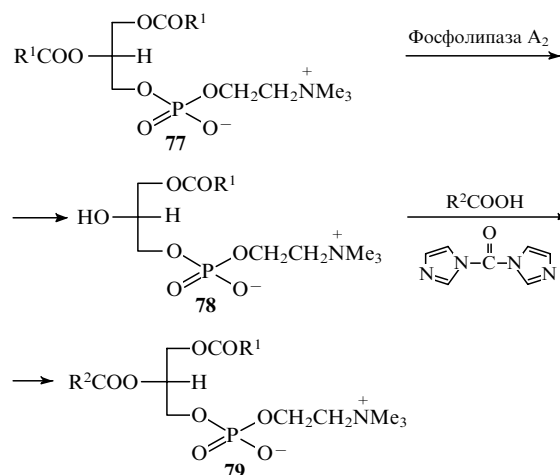
фосфата. Поэтому при проведении данной реакции требуется строгое соблюдение экспериментальных условий. В этом случае выходы продукта на стадии ацилирования *sn*-глицерофосфохолина **75** достигают 60–80% вне зависимости от используемого ацилирующего агента.

Наиболее удобными в экспериментальном отношении являются методы ацилирования *sn*-глицерофосфохолина ангидридами и имидазолидами дейтеромеченых жирных кислот. Причем если раньше в реакциях ацилирования ангидридами кислот (ангидридный метод) в качестве катализаторов использовали соли жирных кислот,¹¹¹ то в дальнейшем их заменили на 4-*N,N*-диметиламинопиридин,¹⁰⁸ натрий метилсульфенилметанид,¹⁰⁹ 4-пирролидинопиридин.¹¹⁰ В этом случае ацилирование протекает в более мягких условиях и требует меньшего времени, что особенно важно при синтезе ненасыщенных фосфатидилхолинов. Ангидриды жирных кислот получают действием на кислоты дициклогексилкарбодимида.

Имидазолиды жирных кислот образуются при взаимодействии кислоты с карбонилдиимидазолом.^{105, 106, 113} Имидазолидный метод целесообразно использовать в синтезе фосфолипидов, содержащих дорогостоящие лабильные меченые жирные кислоты (в частности, спин-меченые),¹¹³ так как для проведения исчерпывающего ацилирования имидазолидами требуется меньшее количество жирной кислоты, чем в ангидридном методе. После проведения ацилирования избыток непрореагировавшей жирной кислоты может быть выделен на стадии хроматографической очистки фосфатидилхолина.

Рассмотрим синтез фосфатидилхолинов с использованием ангидридного метода. Как видно из схемы 4, синтез фосфатидилхолинов по этому способу приводит лишь к фосфатидилхолину **76**, содержащим одинаковые жирнокислотные остатки в положениях 1 и 2 глицерина. Это является существенным недостатком, так как природные фосфолипиды, как правило, содержат в своем составе разные жирные кислоты.

Для синтеза таких фосфолипидов в качестве исходного соединения используют лизофосфатидилхолин (**78**), который может быть легко получен ферментативным гидролизом фосфатидилхолина **77** фосфолипазой A_2 .^{104, 108, 114}



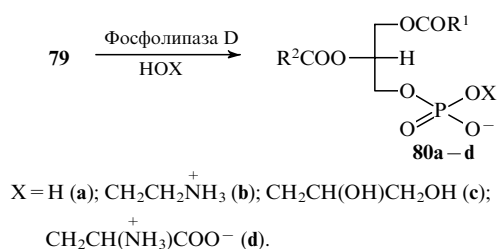
Для гидролиза фосфатидилхолинов не обязательно использовать очищенные препараты фосфолипазы A_2 . Они с успехом могут быть заменены змеиными или пчелиными ядами. Гидролиз фосфатидилхолинов фосфолипазой A_2 проходит с высокой степенью стереоселективности и может быть использован для разделения рацемических смесей синтетических фосфолипидов.^{104, 108, 114} Ацилирование лизофосфатидилхолинов осуществляют теми же методами, что и

ацилирование *sn*-глицерофосфохолина, например, с помощью имидазолида жирной кислоты. Комбинируя различные жирные кислоты на стадиях получения фосфатидилхолинов **77** и **79**, можно получить фосфатидилхолин **79** с любым желаемым набором жирнокислотных остатков, включая изотопно-меченные жирные кислоты.

Рассмотренные выше методы синтеза фосфатидилхолинов ацилированием глицерофосфатных производных оказались весьма удобными в препаративном отношении и практически полностью вытеснили полный химический синтез, по крайней мере, в случае получения фосфатидилхолинов диацильного типа. Метод ацилирования бариевой соли *sn*-глицерофосфата был успешно реализован также при синтезе полностью дейтерированной фосфатидной кислоты, из которой в дальнейшем был получен полностью дейтерированный фосфатидилхолин.⁷³

К сожалению, синтез других фосфоглицеридов ацилированием глицерофосфатных производных значительно сложнее. Для получения таких фосфолипидов как фосфатидилэтанолamines, -глицерин, -инозит, -серин необходимо избирательно блокировать все ацилируемые функциональные группы за исключением гидроксильных групп глицерина, а на последующих стадиях удалять защитные группы с сохранением структуры синтезируемых глицерофосфолипидов. Это достаточно трудно осуществить, поэтому выход целевого продукта в этих случаях низкий.

Для решения этой проблемы в синтезе глицерофосфолипидов широко применяют подход, основанный на сочетании химических и ферментативных методов, при этом в качестве исходного сырья используют доступные фосфатидилхолины. Фосфатидилхолины **79** с любым желаемым набором жирных кислот могут быть получены с помощью упомянутых выше методов и далее превращены в другие глицерофосфолипиды **80** реакцией трансфосфатидилирования, катализируемой фосфолипазой D.^{104–106, 114} Необходимым условием для успешного проведения данной реакции является наличие многократного избытка спирта (глицерина, этаноламина, серина, инозита), на который переносится фосфатидильная группа. Выходы глицерофосфолипидов **80a–d** составляют ~80%. Единственным побочным продуктом является фосфатидная кислота. Избежать образования фосфатидной кислоты невозможно, так как данная ферментативная реакция проводится в водных средах и вода конкурирует со спиртом за связывание с фосфатидильным остатком.



Экспериментальные методики использования липолитических ферментов в синтезе липидов подробно рассмотрены в монографиях^{105, 106, 114}.

Простой одностадийный метод введения дейтерия в состав жирнокислотных остатков фосфолипидов основан на каталитическом восстановлении двойных связей ненасыщенных фосфолипидов.^{115, 116} Однако данный подход не нашел широкого применения в синтезе дейтеромеченных фосфолипидов, так как в результате восстановления двойных связей получают насыщенные фосфолипиды, у которых в меченых метиленовых группах содержится лишь по одному атому дейтерия. Для обеспечения одинаковой чувствительности в последующих мембранных исследованиях содержание липидов с CHD-метками в образцах должно быть увеличено в два

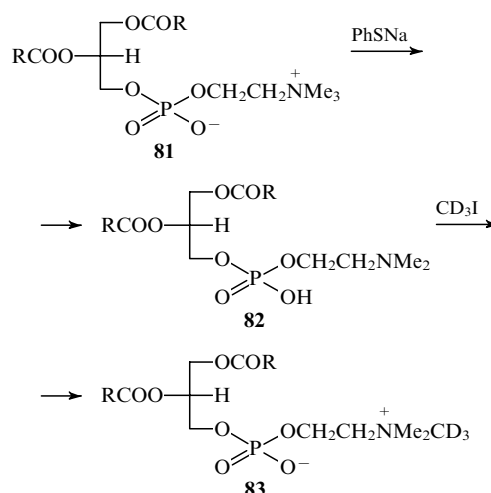
раза по сравнению с липидами, содержащими аналогичные CD₂-метки.

Для получения липидов с дейтеромечеными гидрофобными заместителями используют полный химический синтез.¹¹⁷ Последний обычно применяется для синтеза липидов неприродной структуры. Так, в работе¹¹⁷ приведен синтез 1,2-[8-²H₂]-димиристоиламино-1,2-дидезоксифосфатидилхолина — фосфолипида, в составе которого сложноэфирные группы заменены на амидные.

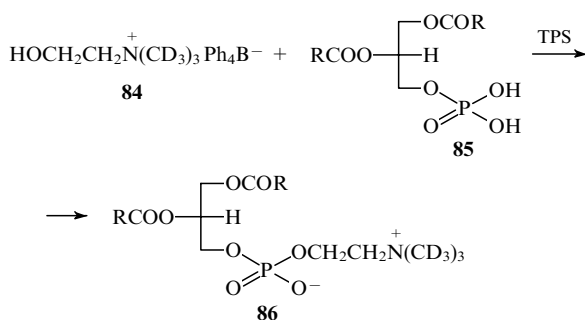
V. Синтез фосфолипидов с дейтериевыми метками в гидрофильной части молекулы

Как и в случае фосфолипидов с мечеными жирными кислотами, синтез фосфолипидов с дейтериевыми метками в гидрофильной части молекул осуществляется с помощью традиционных методов химии липидов. Вместе с тем введение дейтеромеченных гидрофильных групп в состав липидных молекул имеет ряд особенностей.

Оригинальный метод¹¹⁸ введения меченой метильной группы в γ-положение холина заключается в том, что одна из метильных групп холина может быть избирательно удалена при действии тиофенолята натрия на фосфатидилхолин **81**. Получаемый в результате этой реакции *N,N*-диметилфосфатидилэтаноламин **82** алкилируют иодистым дейтерометилем и получают фосфатидилхолин **83** с одной дейтерометильной группой в γ-положении холина. Необходимо иметь в виду, что алкилирование иодистым метилом аминокрупп в составе ненасыщенных фосфолипидов может сопровождаться модификацией двойных связей,¹¹⁹ по-видимому, из-за присутствия свободного иода в реакционной среде.

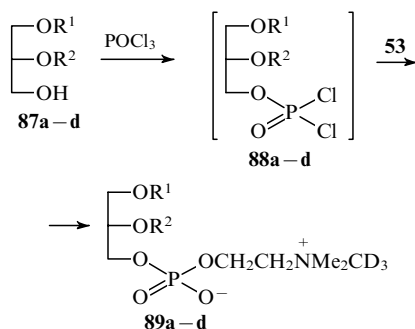


Введение дейтериевых меток в состав фосфолипидов осуществляют также на стадии создания фосфодиэфирной связи. Растворимый в органических растворителях тетрафенилборат дейтерированного холина HOCH₂CH₂N(CD₃)₃BPh₄ (**84**) фосфорилируют фосфатидной кислотой **85** в присутствии 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорида в качестве конденсирующего агента.⁷⁴ Реакцию проводят в пиридине. Выход фосфатидилхолина **86** составляет 70%. Аналогично протекают реакции с другими дейтерированными производными холина — соединениями **40** и **50**. Фосфатидная кислота **85** является доступным фосфолипидом, который можно получить фосфорилированием соответствующих диглицеридов хлороксидом фосфора^{79, 120} с последующим гидролизом дихлорфосфатов или ферментативным гидролизом (фосфолипазой D) фосфатидилхолинов.¹¹⁴ Тетрафенилбораты холинов с различными дейтериевыми метками получают в соответствии с ранее приведенными схемами.⁷⁴



$\text{R} = (\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$; $\text{TPS} = 2,4,6\text{-Pr}_3\text{C}_6\text{H}_2\text{SO}_2\text{Cl}$.

Для получения фосфолипидов специфической структуры или фосфолипидов, содержащих в своем составе несколько различных дейтериевых меток, используют методы, основанные на полном химическом синтезе. В работе²⁴ описан синтез ряда фосфатидилхолинов **89a–d** диацильного, диацильного, алкилацильного и ацилалкильного типов. Синтез фосфатидилхолинов **89a–d** осуществляют через стадии полного химического синтеза дейтеромеченых диглицеридов **87a–d** и их последующего фосфорилирования хлороксидом фосфора. Образующиеся в результате последней реакции дихлорфосфаты **88a–d** без выделения вводят во взаимодействие с тозилатом холина **53** по методу, описанному в работе⁷⁹. Выход продуктов на стадии фосфорилирования составляет 70–80%.



$\text{R}^1 = \text{COCd}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{Me}$, $\text{R}^2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{Me}$ (a);
 $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{CD}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{Me}$, $\text{R}^2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{Me}$ (b);
 $\text{R}^1 = \text{CD}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{Me}$, $\text{R}^2 = (\text{CH}_2)_{15}\text{Me}$ (c);
 $\text{R}^1 = \text{COCd}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{Me}$, $\text{R}^2 = (\text{CH}_2)_{15}\text{Me}$ (d).

Описан химический синтез дейтеромеченых фосфатидилглицеринов **91**.^{87,89} Дейтеромеченый глицерин **66**, две гидроксильные группы которого блокированы изопропилиденовой защитой, фосфорилируют фосфатидной кислотой **85** в присутствии конденсирующего агента. На последней стадии изопропилиденная защитная группа в соединении **90** удаляется относительно мягким действием борной кислоты. В зависимости от того, какой изопропилиденглицерин используется на стадии фосфорилирования, могут быть получены фосфатидилглицерины с метками в любом положении глицерина и любой желаемой стереоконфигурации. К сожалению, выход фосфатидилглицеринов невысок и составляет ~30% (схема 5).

Другой способ введения дейтеромеченого глицерина в состав фосфатидилглицеринов основан на использовании реакции перефосфатидилирования под действием фосфолипазы D, аналогично тому, как это показано для соединения **80**. Реакция перефосфатидилирования применяется и для получения других глицерофосфолипидов. Необходимо отметить, что перефосфатидилирование требует большого избытка спирта. Так, при получении 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-[1,1-²H₂]-этанолamina и -[2,2-²H₂]-этанол-

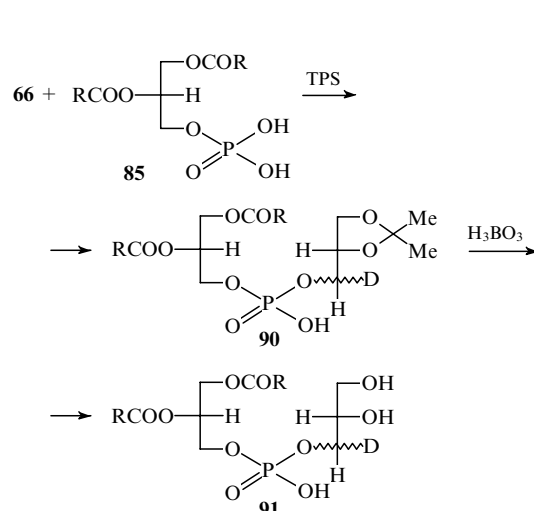


Схема 5

амина применяли 100-кратный избыток соответствующего дейтеромеченого этаноламина по отношению к 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолину.⁸³

VI. Синтез полностью дейтерированных липидов

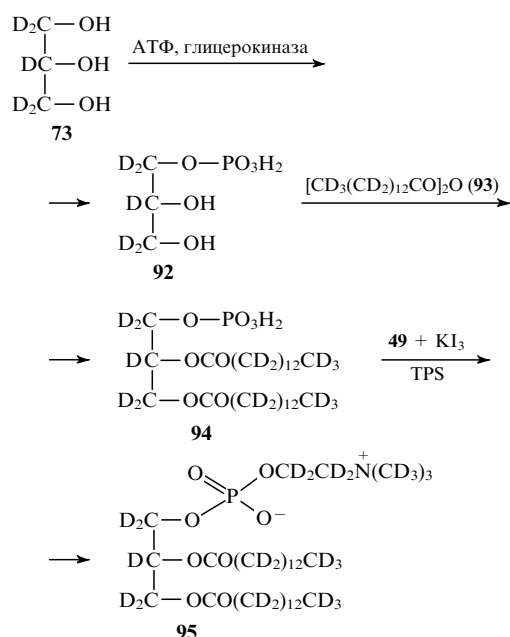
Как уже отмечалось выше, полностью дейтерированные липиды можно использовать в качестве прозрачной матрицы в исследованиях структуры мембранных белков методами двумерной ЯМР ¹H высокого разрешения. Это определило интерес к синтезу таких соединений. В литературе имеется лишь одна публикация, посвященная синтезу полностью дейтерированного фосфолипида.⁷³

1. Синтез полностью дейтерированного фосфатидилхолина

Синтез полностью дейтерированного 1,2-димиристоил-*sn*-глицерофосфохолина (**95**) был проведен в соответствии со схемой 6.⁷³ Полностью дейтерированный глицерин **73** получали восстановлением диэтилоксомалоната **72** алюмодейтеридом лития. Для создания определенной стереоконфигурации в замещенном глицерине был предложен оригинальный подход, основанный на фосфорилировании свободного глицерина с помощью АТФ в присутствии фермента — глицерокиназы. Реакция проходит с высоким выходом (66%) и приводит к глицерофосфату **92**, имеющему такую же стереоконфигурацию, как и природные глицерофосфолипиды. Глицерофосфат **92** осаждали в виде бариевой соли из водного раствора, затем с помощью ионообменной хроматографии переводили в пиридиниевую соль, которую ацилировали ангидридом полностью дейтерированной миристиновой кислоты (**93**) в пиридине в присутствии 4-*N,N*-диметил-аминопиридина. Выход 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфата (**94**) превышал 90%. Полностью дейтерированную миристиновую кислоту получали обменом на платиновом катализаторе (аналогично соединению **10**) и переводили в ангидрид действием дициклогексилкарбодиимида. Фосфатидную кислоту **94** конденсировали с полностью дейтерированным холином в присутствии 2,4,6-триизопропилбензол-сульфохлорида; для увеличения растворимости холина в органических растворителях иодид холина **49** переводили в иодный комплекс взаимодействием с K₂I₂. Выход на стадии фосфорилирования холина фосфатидной кислотой в данном способе составляет 25–40%.⁷³

Использование тетрафенилбората холина позволяет увеличить выход фосфатидилхолина **95** до 70%.⁷⁴

Схема 6



2. Синтез полностью дейтерированных фосфолипид-подобных детергентов

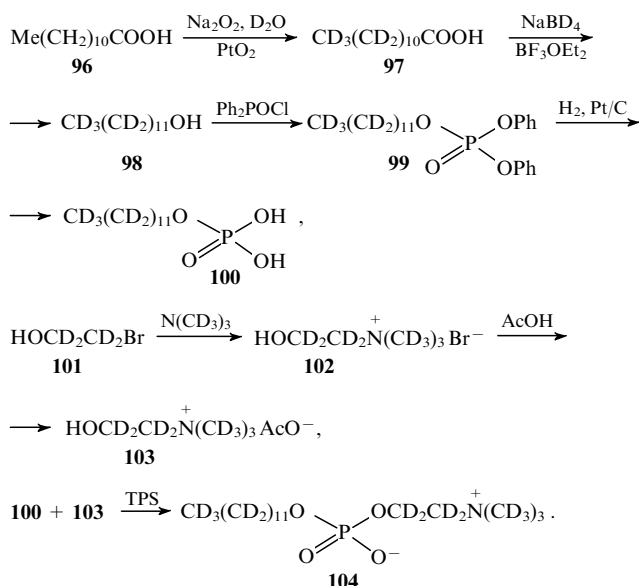
При изучении вторичной и третичной структуры белков в мембранном окружении методами двумерной ЯМР ^1H спектроскопии в качестве фосфолипидподобного детергента используют главным образом полностью дейтерированный додецилсульфат натрия. Применение в такого рода исследованиях дейтерированного додецилсульфата натрия обусловлено его коммерческой доступностью. Между тем додецилсульфат натрия не является близким структурным аналогом природных фосфолипидов. Поиски более близких структурных аналогов фосфолипидов стимулировали работы по синтезу новых детергентов.

В качестве аналога фосфатидилхолина было предложено использовать додецилфосфохолин. Структура его полярного участка в точности соответствует структуре фосфатидилхолина. В то же время наличие лишь одного короткого углеводородного остатка является причиной того, что додецилфосфохолин в воде образует мицеллы. При этом критическая концентрация мицеллообразования равна $1.1 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ (см.¹²¹), диаметр мицелл составляет $\sim 50 \text{ \AA}$, на одну мицеллу приходится 56 ± 5 молекул додецилфосфохолина.¹²²

Додецилфосфохолин использовали в мембранных исследованиях для моделирования взаимодействия фосфолипазы A_2 с поверхностью липидного бислоя.¹²¹ Синтез недеитерированного додецилфосфохолина включает фосфорилирование додецилового спирта 2-бромэтилдихлорфосфатом и последующую реакцию бромалкильного производного с триметиламином.¹²¹ Первый полный химический синтез полностью дейтерированного додецилфосфохолина (104) впервые был осуществлен в 1979 г.⁷⁷ Исходным соединением служит лауриновая кислота (96), которую подвергают тотальному протон-дейтериевому обмену по методу, описанному в работе²⁷. Полностью дейтерированную лауриновую кислоту (97) восстанавливают до лауринового спирта (98), который фосфорилируют дифенилхлорфосфатом. Защитные фенильные группы в соединении 99 удаляют каталитическим гидрированием и получают додецилфосфат (100).

Холиновую компоненту получают реакцией кватернизации полностью дейтерированных триметиламина и 2-бромэтанола (101), образующийся в результате реакции бромид

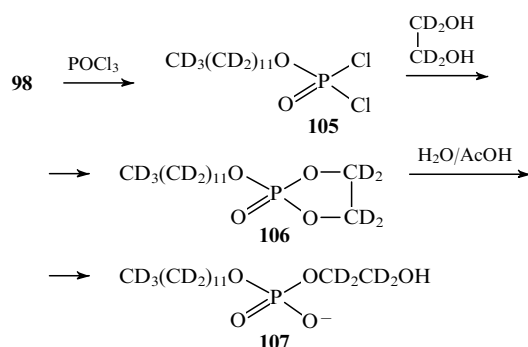
холина (102) переводят в ацетат холина (103) для увеличения его растворимости в органических растворителях. Ацетат холина 103 фосфорилируют фосфатом 100 в присутствии 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорида и получают полностью дейтерированный додецилфосфохолин (104).



Данная схема отличается многостадийностью. В дальнейшем процедура получения полностью дейтерированного холина была модифицирована.

Так, в работе¹²³ полностью дейтерированную лауриновую кислоту 97 восстанавливают алюмодейтеридом лития до спирта 98, который фосфорилируют хлороксидом фосфора. Полученный дихлорфосфат $\text{CD}_3(\text{CD}_2)_{11}\text{OP}(\text{O})\text{Cl}_2$ (105) гидролизуют водным раствором соляной кислоты и высаживают додецилфосфат 100 ацетоном. Полностью дейтерированный холин в виде тетрафенилбората 40 получают по методу, описанному в работе⁷⁴, и конденсируют его с додецилфосфатом 100 в присутствии 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорида. При выделении додецилфосфохолина (104) возникают некоторые трудности из-за его хорошей растворимости в воде, что исключает возможность использования экстракции. К настоящему времени полностью дейтерированный додецилфосфохолин (104) является коммерчески доступным соединением.

Другим представителем фосфолипидподобных детергентов является додецилфосфоэтиленгликоль. Он представляет собой структурный аналог отрицательно заряженного фосфолипида — фосфатидилглицерина. Полностью дейтерированный додецилфосфоэтиленгликоль (107) вместе с додецилфосфохолином использовали для изучения влияния липидного окружения на вторичную структуру митохондриального сигнального пептида методами двумерной ЯМР ^1H спектроскопии высокого разрешения.¹²⁴ Синтез полностью дейтерированного додецилфосфоэтиленгликоля осуществляли по методу, описанному в работе¹²⁵. Додеканол 98 фосфорилируют хлороксидом фосфора. Полученный дихлорфосфат (105) взаимодействует с полностью дейтерированным этиленгликолем, давая фосфолан 106. Последний гидролизуют водой в присутствии уксусной кислоты и получают додецилфосфоэтиленгликоль 107. Все стадии протекают с высокими выходами. Промежуточные продукты не выделяют. Необходимо отметить, что додецилфосфоэтиленгликоль обладает хелатными свойствами и после обычных процедур очистки может содержать различные поливалентные катионы. В связи с этим додецилфосфоэтиленгликоль целесообразно переводить в натриевую соль действием ионообменных смол, содержащих хелатные группы (например, Chelex).¹²⁶



VII. Другие дейтеромеченные липиды

Помимо фосфолипидов в состав биологических мембран эукариотических клеток входит холестерин. Его содержание может достигать 25% от общего количества мембранных липидов.¹²⁷ Холестерин выполняет важную роль в регулировании фазового состояния липидного бислоя.¹²⁸ Для изучения его взаимодействия с фосфолипидами методом ЯМР ^2H был синтезирован холестерин с дейтериевыми метками в различных положениях молекулы, а также его производные.^{129, 130} Синтез дейтеромеченных стероидов осуществляют с помощью методов, аналогичных тем, которые используются для синтеза дейтеромеченных жирных кислот.

В тех случаях, когда химический синтез дейтеромеченных липидов трудно осуществим, применяют микробиологический синтез. Так, описан¹³¹ синтез дейтеромеченных плазмалогенов. Введение специфически дейтерированных глицеринов в состав кардиолипина достигается при выращивании *E. coli* на питательных средах, содержащих дейтеромеченный глицерин.^{89, 90, 132, 133}

Аналогичный подход использовали для введения дейтеромеченой олеиновой кислоты в состав кардиолипина и фосфатидилглицерина,¹³⁴ а также, дейтеромеченой пальмитиновой кислоты в состав мембраны *E. coli*.¹³⁵ В этих случаях клетки *E. coli* выращивали на питательной среде, содержащей жирную кислоту и детергент. В зависимости от решаемой задачи в работах^{89, 90, 132–135} использовали различные штаммы *E. coli*. Липиды из культуральной массы выделяли обычными методами, включающими разрушение клеток, экстракцию и хроматографическую очистку. Полученные фосфолипидные препараты представляли собой смеси гомологов, отличающихся по длине и степени ненасыщенности углеводородных остатков.

Дейтеромеченные жирные кислоты, используемые в качестве источника питания бактерий, могут включаться в процессы биосинтеза других жирных кислот и превращаться в другие дейтеромеченные кислоты.^{134, 136} Микробиологический синтез можно использовать для получения полностью дейтерированных липидов. Описан¹³⁷ синтез полностью дейтерированных жирных кислот при культивировании *Scenedesmus obliquus* на питательной среде, содержащей тяжелую воду.

Дейтеромеченные жирные кислоты различной структуры с метками в различных положениях углеводородной цепи включались в состав мембраны микоплазмы *A. laidlawii*, что позволило детально исследовать профиль параметра порядка углеводородных цепей.^{138–142}

VIII. Анализ дейтеромеченных липидов

В процессе синтеза липидов, меченных дейтерием, необходимо подтверждать изотопную чистоту полученных полу-продуктов и конечных веществ, а также селективность включения метки. Эти задачи решают с помощью методов масс-спектрометрии, ЯМР высокого разрешения, газожидкостной и жидкостной хроматографии.^{30, 31}

Прямой и наиболее чувствительный метод анализа содержания дейтерия в составе органических соединений — масс-спектрометрия. Основные данные о применении этого метода в исследовании липидов, меченных стабильными изотопами, приведены в обзоре¹⁴³. Полагают, что меченые и немеченые молекулы ионизируются в равной степени. Измерения стараются проводить в условиях, обеспечивающих минимальную фрагментацию молекулярного иона. Соединения с повышенной тенденцией к фрагментации (ненасыщенные кислоты и спирты) перед анализом переводят в силильные производные.^{36, 49}

Изотопную чистоту и положение дейтериевых меток в составе липидов и их полупродуктов, используемых в синтезе липидов, можно определять с помощью ЯМР ^1H спектроскопии.^{4–6} Данный метод применяют для идентификации структуры синтезируемых интермедиатов и/или липидов. Положение и содержание дейтериевых меток определяют по уменьшению интегральной интенсивности сигнала в спектрах ЯМР ^1H , отвечающего протонам, которые замещаются на дейтерий. К сожалению, в спектрах ЯМР ^1H липидов многие сигналы перекрываются, что влияет на точность определения.

В принципе аналогичные задачи можно решать с помощью ЯМР ^2H высокого разрешения. В отличие от ЯМР ^1H , в спектрах ЯМР ^2H наблюдаются сигналы только дейтериевых меток, что в значительной степени упрощает спектры. Однако диапазон изменения абсолютных химических сдвигов в спектрах ЯМР ^2H примерно в 6.5 раз (в соответствии с гиромангнитными отношениями протона и дейтерона) меньше, чем в спектрах ЯМР ^1H . Кроме того, при записи спектров ЯМР ^2H нельзя использовать дейтериевую стабилизацию магнитного поля ЯМР-спектрометра, что также снижает разрешение. В связи с этим дифференцировать сигналы нескольких групп с близкими химическими сдвигами достаточно сложно, несмотря на относительную простоту спектров ЯМР ^2H . В какой-то степени эта проблема может быть решена с помощью сдвигающих реагентов, использование которых позволило разрешить сигналы дейтеронов в α -, β -, γ - и δ -положениях жирной кислоты.¹⁴⁴

Указанных недостатков лишена спектроскопия ЯМР на ядрах ^{13}C . Диапазон изменения химических сдвигов в спектрах ЯМР ^{13}C на порядок больше по сравнению со спектрами ЯМР ^1H и, как следствие этого, большинство сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C липидов разрешены. К достоинству метода ЯМР ^{13}C следует отнести и то, что введение дейтерия индуцирует небольшой изотопный сдвиг сигнала в сильное поле.^{30, 31, 145} В результате в спектре одновременно наблюдаются разрешенные сигналы атомов углерода, ковалентно связанных с дейтеронами и протонами, что увеличивает точность определения изотопной чистоты. Необходимо иметь в виду, что точное определение соотношения дейтерированных и недейтерированных продуктов возможно лишь при условии записи спектров ЯМР ^{13}C в условиях полной релаксации и исключения эффекта Оверхаузера. Сигналы атомов углерода, связанных с дейтерием, легко распознаются в спектрах по характерной мультиплетности из-за спин-спинового взаимодействия с дейтерием. Спин дейтерия $I=1$, т.е. сигнал CD-группы наблюдается в виде триплета с линиями равной интенсивности, константа спин-спинового взаимодействия J_{CD} составляет величину ~ 20 Гц. Серьезным недостатком метода ЯМР ^{13}C является его низкая чувствительность, которая еще более понижается при замене протонов на дейтерий из-за устранения эффекта Оверхаузера.

Среди методов анализа дейтерированных жирных кислот следует отметить газожидкостную хроматографию. Возможность разделения немеченых и дейтеромеченных жирных кислот известна давно, но достаточно трудно осуществима.³¹ В работе¹³⁴ метод ГЖХ был успешно реализован для разделения жирных кислот в виде метиловых эфиров, включая кислоты с одной дейтеромеченой метиленовой группой.

Литература

1. A.Andersson, F.Dinger, Ng.Ding-Nguyen. *Chem. Scr.*, **8**, 200 (1975)
2. A.Andersson, F.Dinger, Ng.Ding-Nguyen. *Chem. Scr.*, **9**, 155 (1976)
3. J.Seelig. *Q. Rev. Biophys.*, **10**, 353 (1977)
4. J.Seelig, D.M.Macdonald. *Acc. Chem. Res.*, **20**, 221 (1987)
5. I.C.P.Smith. In *NMR: Principal and Applications to Biomedical Research*. (Ed. J.W.Petergrew). Springer-Verlag, New York, 1989
6. R.L.Smith, E.Oldfield. *Science*, **225**, 280 (1984)
7. G.Zaccari, J.K.Blastic, B.P.Schoenborn. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 376 (1975)
8. D.L.Worcester, N.P.Franks. *J. Mol. Biol.*, **100**, 359 (1976)
9. J.L.Marx. *Science*, **198**, 481 (1977)
10. K.Wuthrich. *NMR of Proteins and Nuclear Acids*. Wiley, New York, 1986
11. A.S.Arseniev, L.I.Barsukov, V.F.Bystrov, A.L.Lomize, Yu.A.Ovchinnikov. *FEBS Lett.*, **186**, 168 (1985)
12. T.Endo, I.Shimada, D.Roise, F.Inagaki. *J. Biochem.*, **106**, 396 (1989)
13. J.Rizo, F.J.Blanco, B.Kobe, M.D.Bruch, L.M.Gierasch. *Biochemistry*, **32**, 4881 (1993)
14. V.Chupin, J.A.Killian, J.Breg, H.H.J.de Jongh, R.Boelens, R.Kaptein, B.de Kruijff. *Biochemistry*, **34**, 11617 (1995)
15. M.Hong, K.Schmidt-Rohr, D.Nanz. *Biophys. J.*, **69**, 1939 (1995)
16. Y.Yamamoto, T.Ohkubo, A.Kohara, T.Tanaka, M.Kikuchi. *Biochemistry*, **29**, 8998 (1990)
17. A.F.Thomas. *Deuterium Labelling in Organic Chemistry*. Appleton Century Crofts, New York, 1971
18. А.Дж.Уоринг. В кн. *Общая органическая химия. Кислородсодержащие соединения. Т. 2*. (Под ред. Д.Бартона, В.Д.Оллиса). Химия, Москва, 1982. С. 577
19. A.P.Tulloch. *Lipids*, **12**, 92 (1977)
20. J.G.Atkinson, J.J.Csakvary, G.T.Herbert, R.S.Stuart. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 498 (1968)
21. A.P.Tulloch. *Chem. Phys. Lipids*, **25**, 225 (1979)
22. A.J.Aasen, W.M.Lauer, R.T.Holman. *Lipids*, **5**, 869 (1970)
23. E.Oldfield, R.D.Meadows, R.Jacobs. *Biochemistry*, **17**, 2727 (1978)
24. М.В.Чудинов, М.В.Аникин, А.В.Аникин, Н.А.Брагина, В.В.Чупин, Г.А.Серебренникова. *Биоорг. химия*, **19**, 250 (1993)
25. M.E.Isabelle, L.C.Leitch. *Can. J. Chem.*, **36**, 440 (1958)
26. J.Seelig, N.Waespe-Sarcevic. *Biochemistry*, **17**, 3310 (1978)
27. Ng.Dinh-Nguyen, A.Raal, E.Stenhager. *Chem. Scr.*, **2**, 171 (1972)
28. C.Y.Y.Hsiao, C.A.Ottaway, D.B.Wetlaufer. *Lipids*, **9**, 913 (1974)
29. P.A.Colfer, T.A.Foglia, P.E.Pfeffer. *J. Org. Chem.*, **44**, 2573 (1979)
30. A.P.Tulloch. *Chem. Phys. Lipids*, **24**, 391 (1979)
31. A.P.Tulloch. *Prog. Lipid Res.*, **22**, 235 (1983)
32. K.K.Sun, H.W.Hayes, R.T.Holman. *Org. Mass Spectrom.*, **3**, 1035 (1970)
33. E.Heinz, A.P.Tulloch, J.F.T.Spencer. *J. Biol. Chem.*, **24**, 882 (1969)
34. A.P.Tulloch. *Chem. Phys. Lipids*, **18**, 1 (1977)
35. A.P.Tulloch. *Chem. Phys. Lipids*, **23**, 69 (1979)
36. A.P.Tulloch. *Chem. Phys. Lipids*, **30**, 325 (1982)
37. P.W.Westerman, N.Ghrayeb. *Chem. Phys. Lipids*, **29**, 351 (1981)
38. Г.М.Сорокоумова, Д.Г.Гусев, И.А.Василенко, А.П.Каплун, В.И.Швец. *Биоорг. химия*, **13**, 1579 (1987)
39. S.K.Das Gupta, D.Rice, R.G.Griffin. *J. Lipid Res.*, **23**, 197 (1982)
40. P.W.Westerman, N.Ghrayeb. *Chem. Phys. Lipids*, **30**, 381 (1982)
41. W.K.Rohwedder, E.D.Bitner, H.M.Peters, H.J.Dutton. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 33 (1964)
42. E.A.Emken, W.K.Rohwedder, H.J.Dutton, R.Dougherty, J.M.Jacono, J.Mackin. *Lipids*, **11**, 135 (1976)
43. R.C.Adlof, E.A.Emken. *Chem. Phys. Lipids*, **29**, 3 (1981)
44. W.J.de Jarlais, E.A.Emken. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **15**, 451 (1978)
45. H.Rakoff, E.A.Emken. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **19**, 19 (1982)
46. R.O.Adlof. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 52 (1990)
47. N.A.Khan. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3018 (1952)
48. P.M.Pojer. *Tetrahedron*, **25**, 2507 (1984)
49. U.H.Do, M.G.Sundaram, S.Ramachandran, R.W.Bryant. *Lipids*, **14**, 819 (1979)
50. J.Seelig, N.Waespe-Sarcevic. *Biochemistry*, **17**, 3310 (1978)
51. E.A.Emken, R.O.Adlof, W.J.de Jarlais, H.Rakoff. In *Proceeding of the Third International Conference on Stable Isotopes*. (Eds E.R.Klein, P.D.Klein). Academic Press, New York, 1979. P. 79
52. P.H.Buist, D.B.MacLean. *Can. J. Chem.*, **59**, 828 (1981)
53. C.Y.Byon, M.Gut, C.K.Lai. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **21**, 65 (1984)
54. Ng.Dinh-Nguyen. *Ark. Chem.*, **28**, 289 (1968)
55. B.A.Andersson, F.Dinger, Ng.Ding-Nguyen. *Chem. Scr.*, **18**, 197 (1981)
56. Р.С.Аткинсон. В кн. *Общая органическая химия. Азотсодержащие соединения. Т. 3*. (Под ред. Д.Бартона, В.Д.Оллиса). Химия, Москва, 1982. С. 289
57. H.Rakoff, E.A.Emken. *J. Labelled Comp.*, **15**, 233 (1978)
58. S.B.Farren, E.Sommerman, P.R.Cullis. *Chem. Phys. Lipids*, **34**, 279 (1984)
59. V.V.Chupin, J.A.Killian, B.de Kruijff. *Biophysical J.*, **51**, 395 (1987)
60. Д.Дж.Х.Смит. В кн. *Общая органическая химия. Соединения фосфора и серы. Т. 5*. (Под ред. Д.Бартона, В.Д.Оллиса). Химия, Москва, 1983. С. 108
61. C.Sreekumar, K.Darst, W.C.Still. *J. Org. Chem.*, **45**, 4260 (1980)
62. A.P.Tulloch, L.Bergster. *Chem. Phys. Lipids*, **28**, 347 (1981)
63. M.Elain, L.C.Leitch. *Can. J. Chem.*, **36**, 440 (1958)
64. L.Lompa-Krzymien, L.Leitch. In *Proceeding of the Third International Conference on Stable Isotopes*. (Eds E.R.Klein, P.D.Klein). Academic Press, New York, 1979. P. 87
65. Ng.Dinh-Nguyen, A.Raal, E.Stenhager. *Chem. Scr.*, **1**, 117 (1971)
66. R.H.White. *Biochemistry*, **17**, 3833 (1978)
67. S.Y.Kang, H.S.Gutowsky, J.C.Hsung, R.Jacobs, T.E.King, D.Rice, E.Oldfield. *Biochemistry*, **18**, 3257 (1979)
68. В.Г.Ивков, Г.Н.Берестовский. *Липидный бислой биологических мембран*. Наука, Москва, 1982
69. Ю.А.Овчинников. *Биоорганическая химия*. Просвещение, Москва, 1987
70. J.Seelig, P.M.Macdonald, P.G.Scherer. *Biochemistry*, **26**, 7535 (1987)
71. H.-U.Gally, W.Niederberger, J.Seelig. *Biochemistry*, **14**, 3647 (1975)
72. R.Aneja, J.S.Chadha. *Biochim. Biophys. Acta*, **248**, 455 (1971)
73. P.B.Kingsley, G.W.Feigenson. *Chem. Phys. Lipids*, **24**, 135 (1979)
74. G.S.Harison, R.G.Griffin. *J. Lipid Res.*, **25**, 1140 (1984)
75. D.E.Douglas, A.M.Burditt. *Can. J. Chem.*, **33**, 1183 (1955)
76. J.M.Leethouts, V.Chupin, J.de Gier, B.de Kruijff. *Biochim. Biophys. Acta*, **1153**, 257 (1993)
77. L.R.Brown. *Biochim. Biophys. Acta*, **557**, 135 (1979)
78. Р.П.Евстигнеева, Е.Н.Звонкова, Г.А.Серебренникова, В.И.Швец. *Химия липидов*. Химия, Москва, 1983
79. H.Brockerhoff, N.K.N.Ayengar. *Lipids*, **14**, 88 (1979)
80. P.R.Cullis, B.de Kruijff. *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 399 (1979)
81. J.M.Seddon. *Biochim. Biophys. Acta*, **1031**, 1 (1990)
82. A.Weissbach, D.B.Sprinson. *J. Biol. Chem.*, **203**, 1031 (1953)
83. J.Seelig, H.-U.Gally. *Biochemistry*, **15**, 5199 (1976)
84. A.T.Blomquist, B.F.Hiscock, D.N.Harpp. *J. Org. Chem.*, **31**, 38 (1966)
85. M.G.Taylor, I.C.P.Smith. *Chem. Phys. Lipids*, **28**, 119 (1981)
86. P.M.Pojer. *Tetrahedron Lett.*, **25**, 2507 (1984)
87. R.Wohlgenuth, N.Waespe-Sarcevic, J.Seelig. *Biochemistry*, **19**, 3315 (1980)
88. W.W.Bachovchin, R.G.Eagar, K.W.Moore. *Biochemistry*, **16**, 1083 (1977)
89. F.Borle, J.Seelig. *Biochemistry*, **22**, 5536 (1983)
90. P.R.Allegri, G.Pluschke, J.Seelig. *Biochemistry*, **23**, 6452 (1984)
91. D.S.Matteson, A.A.Kandil, R.Soundararajan. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 3964 (1990)
92. C.H.Jarrell, P.A.Joval, J.B.Giziewicz, L.A.Turner, I.C.P.Smith. *Biochemistry*, **26**, 1805 (1987)
93. Y.Asano, J.J.Lee, T.L.Shich. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 4314 (1985)
94. C.A.Townsend, S.Mao. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **86** (1987)
95. D.Gani, D.W.Young. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2393 (1983)
96. H.J.Koch, R.S.Stuart. *Carbohydr. Res.*, **59**, 1 (1977)
97. H.C.Jarrel, J.B.Giziewicz, I.C.P.Smith. *Biochemistry*, **25**, 3950 (1986)
98. H.C.Jarrel, A.J.Wand, J.B.Giziewicz, I.C.P.Smith. *Biochim. Biophys. Acta*, **897**, 69 (1987)

99. J.-P.Renow, J.B.Gizewics, I.C.P.Smith, H.C.Jarrell. *Biochemistry*, **28**, 1804 (1989)
100. R.Roy, M.Letellier, D.Fenske, H.C.Jarrell. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 378 (1990)
101. P.Ram, J.H.Prestegard. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2383 (1988)
102. D.S.Thomson, J.H.Prestegard. *Carbohydr. Res.*, **196**, 206 (1990)
103. R.H.White. *Biochemistry*, **17**, 3833 (1978)
104. Р.П.Евстигнеева, Г.А.Серебренникова, Е.Н.Звонкова, Е.И.Филиппович, Т.К.Митрофанова, Г.И.Мягкова, Ю.Е.Скляр. *Химия биологически активных природных соединений*. (Под ред. Н.А.Преображенского, Р.П.Евстигнеевой). Химия, Москва, 1976
105. H.K.Mangold, F.Paltauf. *Ether Lipids. Biochemical and Biomedical Aspects*. Academic Press, New York, 1983
106. Л.Д.Бергельсон, Э.В.Дятловицкая, Ю.Г.Молотковский, С.Г.Батраков, Л.И.Барсуков, Н.В.Проказова. *Препаративная биохимия липидов*. Наука, Москва, 1981
107. L.L.M.van Deenen, G.H.de Haas. *Adv. Lipid Res.*, **2**, 168 (1964)
108. A.J.Slotboom, P.P.M.Bonsen. *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 301 (1970)
109. C.M.Gupta, R.Radhakrishnam, H.G.Khorana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4315 (1977)
110. T.G.Warner, A.A.Benson. *J. Lipid Res.*, **18**, 548 (1977)
111. R.N.A.H.Lewis, R.N.McElhane. *Biophys. J.*, **61**, 63 (1992)
112. E.Cubero Roubles, D.van den Berg. *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 520 (1969)
113. W.F.Boss, C.J.Kelley, F.R.Landsberg. *Anal. Biochem.*, **64**, 289 (1975)
114. К.Брокерхоф, Р.Дженсен. *Липолитические ферменты*. Мир, Москва, 1978
115. B.F.Dickens, C.S.Ramesha, G.A.Thompson. *Analytical. Biochem.*, **127**, 37 (1982)
116. J.A.Osborn, F.H.Jardine, J.F.Young, G.Wilkinson. *J. Chem. Soc., A*, 1711 (1966)
117. J.Sunamoto, K.Nagai, M.Goto, B.Zindmann. *Biochim. Biophys. Acta*, **1024**, 220 (1990)
118. W.Stoffel, Kim Dac Le, Tschung Tschae Sang. *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.*, **352**, 1058 (1971)
119. B.de Kruijff, E.J.J.van Zoelen, L.L.M.van Deenen. *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 537 (1978)
120. H.Eible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4074 (1978)
121. M.C.E.van Dam, A.J.Slotboom, W.A.Pieterse, G.H.de Haas. *Biochemistry*, **14**, 5387 (1975)
122. J.Lauterwein, C.Bosch, K.Wuthrich. *Biochim. Biophys. Acta*, **556**, 244 (1979)
123. N.Dekker, A.R.Peters, A.J.Slotboom, R.Boelens, R.Kapteijn, R.Dijkman, G.de Haas. *Eur. J. Biochem.*, **199**, 601 (1991)
124. V.Chupin, J.M.Leenhouts, A.I.P.M.de Kroon, B.de Kruijff. *Biochemistry*, **35**, 3141 (1996)
125. H.H.J.de Jongh, B.de Kruijff. *Biochim. Biophys. Acta*, **1029**, 105 (1990)
126. V.V.Chupin, J.M.Leenhouts, A.I.P.M.de Kroon, B.de Kruijff. *FEBS Lett.*, **373**, 239 (1995)
127. W.R.Nes. *Lipids*, **9**, 596 (1974)
128. R.A.Demel, B.de Kruijff. *Biochim. Biophys. Acta*, **457**, 109 (1976)
129. D.N.Kirk, M.J.Varley, H.L.J.Makin, D.I.H.Trafford. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2563 (1983)
130. R.Murari, M.P.Murari, W.J.Baumann. *Biochemistry*, **25**, 1062 (1986)
131. M.Malthaner, J.Seelig. *Biochemistry*, **26**, 5826 (1987)
132. W.Yoshikawa, H.Akutsu, Y.Kyogoku. *Chem. Lett.*, **1**, 105 (1984)
133. F.Borle, J.Seelig. *Chem. Phys. Lipids*, **36**, 263 (1985)
134. A.G.Rietveld, V.V.Chupin, M.C.Koorengel, H.L.J.Wienk, W.Dowhan, B.de Kruijff. *J. Biol. Chem.*, **269**, 28670 (1994)
135. S.Y.Kang, S.H.Gutowsky, E.Oldfield. *Biochemistry*, **18**, 3268 (1979)
136. I.E.Baenziger, I.C.P.Smith, R.J.Hill, H.C.Jarrell. *Biochemistry*, **26**, 8405 (1987)
137. G.Wendt, J.A.McCloskey. *Biochemistry*, **9**, 4854 (1970)
138. G.W.Stockton, K.J.Johnson, K.W.Butler, C.F.Polnaszek, R.Cyr, I.C.P.Smith. *Biochim. Biophys. Acta*, **401**, 535 (1975)
139. G.W.Stockton, K.J.Johnson, K.W.Butler, A.P.Tulloch, Y.Boulanger, I.C.P.Smith, J.H.Davis, M.Bloom. *Nature (London)*, **269**, 267 (1977)
140. M.Rance, K.R.Jeffrey, A.P.Tulloch, K.W.Butler, I.C.P.Smith. *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 245 (1980)
141. H.C.Jarrell, K.W.Butler, R.A.Byrd, R.Deslauriers, I.H.Ekiel, I.C.P.Smith. *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 622 (1982)
142. H.C.Jarrell, A.P.Tulloch, I.C.P.Smith. *Biochemistry*, **22**, 5611 (1983)
143. W.K.Rohwedder. *Prog. Lipid Res.*, **24**, 1 (1985)
144. P.E.Pfeffer, T.A.Foglia, P.A.Barr, R.H.Obenauf. *J. Org. Chem.*, **43**, 3429 (1978)
145. A.P.Tulloch, M.Mazurek. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 692 (1973)

METHODS OF SYNTHESIS OF DEUTERIUM LABELLED LIPIDS

N.A.Bragina, V.V.Chupin

M.V.Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology

86, Prosp. Vernadskogo, 117571 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)430-7983

The review deals with methods of synthesis of deuterium labelled hydrophobic and hydrophilic syntheses of lipid molecules as well as techniques designed to obtain selectively and fully deuterated phospholipids and their analogues. Deuterium labelled lipids are used to study the structural organisation and functioning of biological membranes including NMR and neutron diffraction studies of lipid-lipid and lipid-protein interactions.

Bibliography — 145 references.

Received 4th April 1997