



УДК 547.953.057:577.115.4:543.25

НОВЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ АРОМАТИЧЕСКИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 1995 г. Е. Ю. Лурье, А. П. Каплун[#], В. Н. Кулаков*, В. И. Швец

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова;

* Институт биофизики МЗ и МП РФ, Москва

Поступила в редакцию 14.04.94 г.

Предложен удобный способ получения гомологического ряда новых ароматических производных жирных кислот. Синтез заключается в восстановительном алкилировании ω - и α -аминокислот гидроксibenзальдегидами. Исследованы физико-химические свойства полученных соединений.

Ключевые слова: аминокислоты, ароматические производные жирных кислот, гидроксibenзальдегиды, основания Шиффа.

В последнее время большое внимание уделяется синтезу аналогов природных соединений, в том числе и жирных кислот (ЖК). Синтетические аналоги ЖК, как и следует из этого термина, должны обладать основными свойствами ЖК, и их главным структурным элементом является пометиленовая цепь с концевой карбоксильной группой. Изменения в структуре молекул ЖК вносятся либо с целью избирательного блокирования определенных биохимических реакций, либо для введения репортерных групп или придания соединениям дополнительных биохимических особенностей.

Известно несколько типов модифицированных ЖК. Их можно разделить на две большие группы: к первой относятся аналоги ЖК, в которых метиленовая группа или водород метиленовой группы заменены на гетероатом, ко второй – производные ЖК с более объемистыми, в том числе и репортерными, группами.

Введение гетероатомов в молекулу ЖК блокирует некоторые биохимические реакции, в которых участвуют ЖК [1]. Одним из примеров такого типа модификаций является замена β - или γ -метиленовой группы на атом серы, препятствующая дальнейшему β -окислению [2 - 4]. Также препятствует α -, β - и ω -окислению замена водо-

рода в соответствующих положениях на фтор [5, 6]. Такая модификация, например, значительно облегчает изучение транспортных процессов ЖК через плазматическую и внутриклеточные мембраны.

Среди аналогов ЖК наиболее распространены ЖК с репортерными группами, такими, как, например, флуоресцентные, спиновые, фотореактивные и др. [7].

Примером этого типа модификации ЖК служат и их ароматические производные, привлекающие внимание биохимиков со времен классических работ Франца Кноопа. Эти аналоги ЖК используются для изучения метаболизма липидов, как флуоресцентные и фотоактивируемые зонды при исследовании мембран, а также в качестве диагностических средств [7].

Особый интерес представляют методы получения жирноароматических кислот, позволяющие синтезировать гомологический ряд модифицированных жирных кислот. В случае мембранных зондов набор гомологов расширяет диапазон зондирования по толщине мембраны, а для диагностических препаратов открывает возможность выбора вещества, наиболее подходящего по физико-химическим свойствам. Удобными методами синтеза, например, флуоресцентномеченых ЖК являются ацилирование полициклических углеводородов дикарбоновыми кислотами и алкилирование/ацилирование соответствующими флуоресцентными производными ω -аминокислот.

В методах диагностики *in vivo* чаще всего фиксируется распределение вещества, обладающего контрастными свойствами (рентгенография, γ -сцинтиграфия, γ -томография, позитронно-эмиссионная томография и др.), или определяются фармакокинетические параметры маркерного вещества

Список сокращений: Ал – N-(2-гидроксibenзил)- ω -аминокарбоновые кислоты, где n (2 - 12) – количество атомов углерода в цепи ЖК; рА4 – N-(4-гидроксibenзил)- ω -аминомасляная кислота; α A4, AA, AV, AD, AE, AS – N-(2-гидроксibenзил)- α -аминокарбоновые кислоты, полученные восстановлением оснований Шиффа α -аминокислот (α -аминомасляная кислота, Ala, Val, Asp, Glu, Ser соответственно) с салициловым альдегидом; ЖК – жирные кислоты.

[#] Адрес для переписки: 117571, Москва, пр. Вернадского, 86, Каплуну А.П.

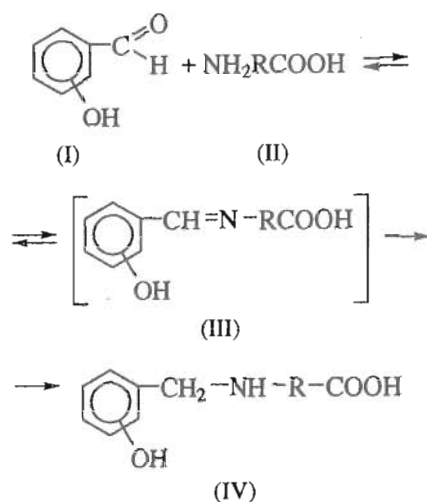
(например, скорость выведения), которые отражают особенности метаболизма при патологиях. Для увеличения вероятности визуализации изменений при патологии по сравнению с нормой необходимо выбрать маркерное вещество с невысокой скоростью метаболизма. В качестве такого "диагностического" субстрата хорошо подходят ЖК, поскольку они находятся во всех тканях живого организма, и их катаболизм представляет собой каскад последовательных реакций (β -окисление). Однако в молекуле ЖК нет репортерных групп, позволяющих следить за ее превращениями. Поэтому молекула модифицированных жирных кислот должна содержать акцепторную группу для введения меток, находящуюся предпочтительно в конце углеводородной цепи ЖК. Это обеспечит контроль за превращениями молекулы на протяжении всего процесса катаболизма.

Универсальных методов получения жирно-ароматических кислот с арильным остатком, подходящим для введения изотопных меток на последней стадии синтеза, до начала представляемой работы не было известно. Настоящая работа посвящена разработке метода синтеза гомологического ряда аналогов ЖК с ω -арильной группой, активированной для введения различных меток (изотопов), и изучению физико-химических свойств полученных соединений. Наиболее подходящей акцепторной группой, по нашему мнению, является фенольный фрагмент, позволяющий в мягких условиях и за короткое время вводить изотопы, использующиеся в качестве меток в диагностике (^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{76}Br и др.).

Из ω -замещенных ЖК, пригодных для конденсации с ароматическим фрагментом, наиболее доступны ω -аминокислоты. В этом случае в качестве фенольного фрагмента могут выступать гидроксибензальдегиды, гидроксибензойные кислоты и гидроксибензилгалогениды. Гидроксибензильные производные аминокислот более предпочтительны, так как их ароматическое кольцо не содержит электроноакцепторных заместителей в отличие от соответствующих бензоильных аналогов. Применение алкилирования гидроксибензальдегидами по сравнению с гидроксибензилгалогенидами сопряжено с меньшими методическими трудностями [8], и, кроме того, они более доступны. Поэтому в качестве ароматического компонента синтеза нами были выбраны гидроксибензальдегиды. Таким образом, удобный метод синтеза гомологического ряда аналогов ЖК, адаптированных для введения короткоживущих изотопов, состоит в последовательной конденсации гидроксибензальдегида (I) с ω -аминокислотой (II) и восстановлении полученного альдимины (III) до N-(гидроксибензил)аминокарбоновой кислоты (IV, схема).

Для синтеза N-(гидроксибензил)аминокарбоновых кислот (IV) в качестве ароматических альдегидов (I) были использованы 2- и 4-гидроксибензальдегиды; для исследования зависимости свойств полученных вторичных аминов (IV) от строения их алифатической части кроме ряда ω -аминокислот были использованы и α -аминокислоты (схема).

Синтез N-(гидроксибензил)аминокарбоновых кислот (IV) был кратко описан ранее в работе, посвященной исследованию их биологических свойств [9]. В настоящей статье мы приводим улучшенный метод синтеза, а также физико-химические свойства полученных соединений. Изменение



| Вторичный амин (IV) | R | Вторичный амин (IV) | R |
|---------------------|-------------------------------------|---------------------|---|
| A2 | -CH ₂ - | α A4 | -CH- CH ₂ CH ₃ |
| A3 | -(CH ₂) ₂ - | AV | -CH- CH(CH ₃) ₂ |
| A4, pA4* | -(CH ₂) ₃ - | AD | -CH- CH ₂ COOH |
| A6 | -(CH ₂) ₅ - | AB | -CH- (CH ₂) ₂ COOH |
| A9 | -(CH ₂) ₈ - | AS | -CH- CH ₂ OH |
| A11 | -(CH ₂) ₁₀ - | | |
| A12 | -(CH ₂) ₁₁ - | | |
| AA | -CH- CH ₃ | | |

* OH-Группа - орто; для pA4 и исходного альдегида (I) - пара.

Схема.

методики синтеза было вызвано желанием увеличить выход реакции. Поэтому в отличие от ранее предложенной методики [9] реакцию проводили не при 20°C, а при -4°C, что позволило избежать побочной реакции диспропорционирования альдегида в щелочной среде. Для восстановления использовали не водный раствор боргидрида натрия, а порошкообразный восстановитель. Это увеличивает выход целевого вторичного амина (IV), так как в отсутствие воды не происходит гидролиз основания Шиффа (III). Альдимины (III) получали в сухом метаноле, поскольку скорость реакции в менее полярных растворителях, например в хлороформе, мала. Использование молекулярных сит в качестве водоотнимающего средства не дало повышения выхода. Образующиеся после восстановления вторичные амины (IV)

выделяли переосаждением их при pH 6.5 - 7.0. Свойства соединений приведены в табл. 1.

Индивидуальность продуктов контролировали по ТСХ в двух системах, а также по данным элементного анализа. Все соединения (IV) имели характерные электронные спектры с полосами поглощения 214 и 275 нм. В ИК-спектрах полученных соединений (IV) наблюдались полосы поглощения, соответствующие карбоксилу, ароматическим связям С-Н и гидроксильной группе. Наиболее полную информацию о строении N-(гидроксibenзил)аминокарбоновых кислот (IV) получали из ¹H-ЯМР-спектров. Так, в случае N-(2-гидроксibenзил)-ω-аминоасляной кислоты (A4) наблюдали сигналы метиленовых протонов в виде триплетов с δ 2.51 м. д. (2-CH₂) и 3.35 м. д. (4-CH₂), мультиплета при 2.12 м. д. (3-CH₂) и синглета при

Таблица 1. Свойства N-(2-гидроксibenзил)аминокарбоновых кислот (IV)

| Соединение | ¹ H-ЯМР, м. д.* (мультиплетность) | УФ**, λ, нм (ε) | Т. пл., °С | R _f | |
|------------|--|--------------------------|------------|----------------|------|
| | | | | А | Б |
| A2 | 3.75 (т), 4.25 (с), 6.81 (м), 7.18 (м) | 274 (1665) 214 (5530) | >230 | 0.17 | 0.30 |
| A3 | 2.95 (т), 3.35 (т), 4.25 (с), 6.80 (м), 7.35 (м) | 274 (2040) 214 (3740) | 174 - 175 | 0.18 | 0.54 |
| A4 | 2.12 (м), 2.51 (т), 3.20 (т), 4.25 (с), 7.00 (м), 7.42 (м) | 274 (2100) 214 (5700) | 187 - 189 | 0.21 | 0.42 |
| A6 | 1.45 (м), 1.75 (м), 2.45 (т), 3.10 (т), 4.24 (с), 7.05 (м), 7.45 (м) | 274 (2069) 214 (5750) | 197 - 198 | 0.24 | 0.54 |
| A9 | 1.25 (м), 1.60 (м), 2.32 (т), 3.10 (т), 4.20 (с), 7.05 (м), 7.40 (м) | 274 (2000) 214 (5160) | 166 - 167 | 0.39 | 0.69 |
| A11 | 1.20 (м), 1.55 (м), 2.30 (т), 2.92 (т), 4.20 (с), 6.95 (м), 7.70 (м) | 274 (2300) 214 (6000) | 164 - 165 | 0.53 | 0.69 |
| A12 | 1.50 (м), 1.70 (м), 2.45 (т), 3.05 (т), 4.27 (с), 7.08 (м), 7.40 (м) | 274 (2200) 214 (6100) | 150 - 152 | 0.60 | 0.70 |
| AA | 1.45 (д), 4.00 (т), 4.22 (с), 6.85 (м), 7.25 (м) | 275 (2150) 214 (5800) | >230 | 0.47 | 0.47 |
| αA4 | 0.85 (т), 1.87 (м), 3.87 (т), 4.20 (с), 6.85 (м), 7.25 (м) | 275 (2100) 214 (5600) | >230 | 0.53 | 0.50 |
| AV | 0.85 (т), 2.25 (м), 3.75 (д), 4.25 (с), 6.85 (м), 7.25 (м) | 275 (2000) 214 (5300) | >230 | 0.55 | 0.62 |
| AD | 3.85 (м), 4.00 (т), 4.25 (л), 6.70 (м), 7.00 (м) | 275 (1800) 212 (3200) | >230 | 0.09 | 0.05 |
| AE | 2.15 (м), 2.50 (т), 3.97 (т), 4.25 (с), 6.87 (м), 7.27 (м) | 274 (1630) 212 (2970) | 182 - 183 | 0.12 | 0.27 |
| AS | 3.80 (м), 4.25 (с), 6.70 (м), 7.16 (м) | 275 (1040) 213 (2400) | 206 - 207 | 0.07 | 0.16 |
| pA4 | 2.00 (м), 2.40 (т), 3.15 (т), 4.20 (с), 6.95 (д), 7.35 (д) | 272 (1140) 224 (8400) | 200 - 203 | 0.14 | 0.40 |

* Соединения A2 - A9, AA, αA4, AD, AE, AS и AV растворяли в 5 % ²HCl в ²H₂O; соединения A11 и A12 - в 30 % ²HCl в ²H₂O; с, д, т, м - синглет, дублет, триплет, мультиплет.

** Соединения растворяли в 5 % HCl.

4.25 м. д. (Ar-CH₂), а сигналы ароматических протонов – в виде мультиплетов при 7.00 м. д. (3', 5') и 7.35 (4', 6'). У соединений с длинной цепью (A6–A12) добавляются сигналы метиленовых протонов с δ от 1.20 до 1.75 м. д. Сигналы протонов (-CH₂OH) у производного серина имеют близкий химический сдвиг с сигналами протонов в α-положении.

Поскольку молекулы N-гидроксibenзил-α- и -ω-аминокарбоновых кислот содержат карбоксильную, фенольную и аминогруппы, они могут находиться в растворе в различных ионных формах. Поэтому нами были исследованы кислотно-основные свойства полученных соединений – найдены pK, соответствующие трем переходам, и определены изоэлектрические точки (табл. 2, рис. 1). В случае AD и AE, содержащих дополнительную карбоксильную группу, наблюдалось четыре pK (табл. 2). Кислотно-основные свойства изучали титрованием 4 мМ растворов соединений (IV) 0.2 н. соляной кислотой от pH 11.8 до 2.0. Значения pK находили после преобразования исходных кривых титрования в дифференциальные (d(pH)/dV); pK фенольной группы определяли по УФ-спектрам при увеличении pH от 9.65 до 11.00. Как и ожидалось, при изменении pH в области диссоциации фенольного гидроксила менялся вид УФ-спектров: уменьшалась интенсивность полосы с максимумом поглощения 275 нм и появлялись две полосы поглощения с максимумами 236 и 290 нм (рис. 2).

N-(2-Гидроксibenзил)-ω-аминокарбоновые кислоты, меченные радиоактивным изотопом иода (¹²⁵I), подвергаются в организме β-окислению. Кроме того, сами N-(2-гидроксibenзил)-ω-аминокарбоновые кислоты ингибировали β-окисление [1-¹⁴C]стеариновой и [1-¹⁴C]олеиновой кислот, что косвенно свидетельствует о том, что полученные соединения могут быть субстратами ферментов β-окисления [9]. Таким образом, N-(гидроксibenзил)аминокарбоновые кислоты могут стать удобными инструментами для изучения метаболизма ЖК in vivo.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растворители очищали по стандартным методикам. Все остальные вещества квалификации х. ч. и ч. д. а. использовали без очистки.

Для ТСХ применяли пластинки Silufol UV-254 (Kavalier, Чехо-Словакия). ТСХ осуществляли в системах: хлороформ-метанол-вода, 65 : 25 : 4 (А), n-бутанол-уксусная кислота-вода, 4 : 1 : 1 (Б), гексан-эфир-уксусная кислота, 90 : 10 : 2 (В). Для обнаружения веществ на хроматограммах использовали флуоресценцию или поглощение при УФ-облучении (а) и ninгидрин (б) [10].

ИК-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu IR-435 (Япония) в вазелиновом масле, УФ-спектры – на спектрофотометрах Shimadzu

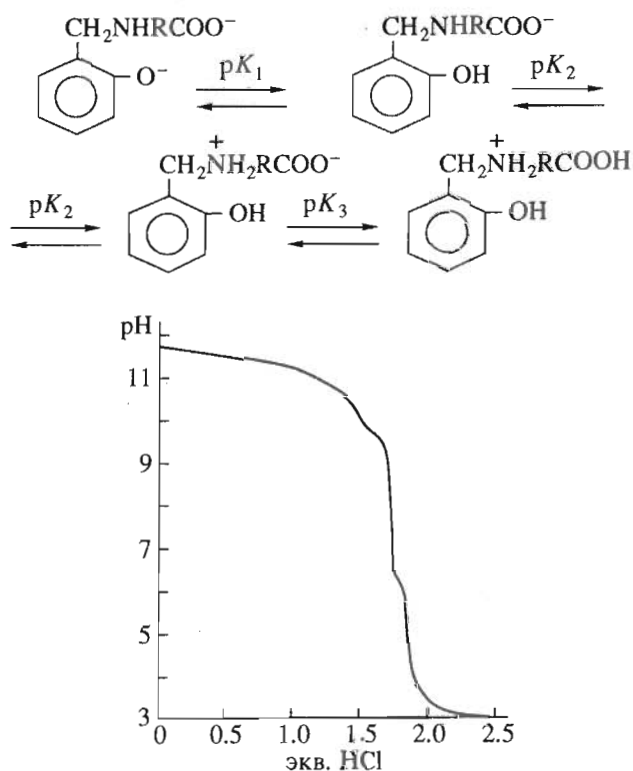


Рис. 1. Схема переходов различных ионных форм N-(2-гидроксibenзил)-ω-аминокарбоновых кислот в зависимости от pH. Приведена типичная кривая их титрования на примере A12.

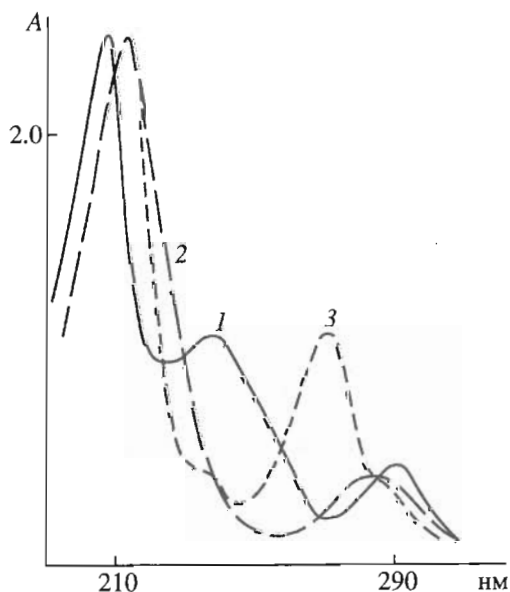


Рис. 2. УФ-спектры N-(2-гидроксibenзил)-γ-аминомасляной кислоты (A4), снятые для ее водных растворов при pH: 11.2 (1), 10.03 (2), 9.65 (3).

UV-240 и Hitachi-320 (Япония) в 5% HCl. Спектры ¹H-ЯМР записаны на спектрофотометре Visker MSL-200 (Германия) с резонансной частотой 200.13 МГц (5 и 30% ²HCl в ²H₂O); внешний стандарт – C₆²H₆.

Таблица 2. рК переходов N-(2-гидроксибензил)аминокарбоновых кислот (IV)

| Соединение | pI | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
|------------|-----|-----------------|-----------------|-----------------|
| A2 | 5.8 | 10.7 | 8.2 | 3.3 |
| A3 | 5.8 | 10.7 | 8.2 | 3.4 |
| A4 | 6.5 | 10.7 | 9.5 | 3.5 |
| A6 | 6.8 | 10.7 | 9.5 | 4.0 |
| A9 | 6.9 | 10.8 | 9.8 | 4.0 |
| A11 | 7.0 | 10.6 | 9.3 | 4.7 |
| A12 | 7.1 | 10.7 | 9.1 | 5.0 |
| AA | 6.9 | 10.0 | 9.0 | 4.7 |
| αA4 | 7.1 | 10.0 | 9.3 | 4.8 |
| AV | 7.2 | 10.0 | 9.6 | 4.8 |
| AD | 4.8 | 10.2 | 9.5 | 3.3; 6.3* |
| AE | 6.0 | 10.2 | 9.6 | 5.0; 7.0* |
| AS | 7.5 | 10.8 | 9.5 | 5.5 |

* рК перехода, соответствующего диссоциации второй карбоксильной группы дикарбоновых производных N-гидроксибензиламинокарбоновых кислот.

N-(2-Гидроксибензил)аминокарбоновые кислоты (IV). 4 ммоль исходной аминокислоты (II) растворяли в 16 мл 0.25 н. раствора NaOH в метаноле при перемешивании, охлаждали до -4°C и быстро добавляли 4 ммоль салицилового альдегида в 10 мл метанола. Перемешивали 5 мин при -4°C , затем к реакционной массе порциями добавляли 4 ммоль NaBH_4 . После 1 ч перемешивания реакционную массу упаривали наполовину и титровали 2 н. HCl до pH 6.7 - 7.0. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали метанолом, а затем переосаждали из 0.01 н. раствора NaOH 8 н. HCl, осадок высушивали в вакууме над P_2O_5 . N-(2-Гидроксибензил)аминокарбоновые кислоты (IV) – бесцветные кристаллические вещества. Выход 68 - 85%. Свойства соединений приведены в табл. 1.

N-(4-Гидроксибензил)масляная кислота (pA4). Синтез проводили так же, как указано выше; вме-

сто салицилового альдегида использовали 4-гидроксибензальдегид. Выход 71%, свойства соединения приведены в табл. 1.

Определение рК N-(гидроксибензил)аминокарбоновых кислот (IV). 4 mM раствор N-(гидроксибензил)аминокарбоновой кислоты (IV) в 0.01 н. NaOH титровали 0.2 н. HCl от pH 11.8 до 2.0. Для определения рК фенольной группы снимали УФ-спектры 2 mM растворов N-(гидроксибензил)аминокарбоновых кислот в 0.2 M фосфатных буферах с pH 11.65, 11.20, 10.96, 10.60, 10.45, 10.22, 10.15, 10.03, 9.85, 9.65 и 9.40 (см. рис. 2). Данные приведены в табл. 2.

Работа поддержана грантом Н БС 4.3 (Межвузовская научно-техническая программа "Основы биотехнологии").

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greville G.D., Tubbs P.K. // *Essays Biochem.* 1968. V. 4. P. 155 - 212.
2. Skrede S., Narce M., Bergseth S., Bremer J. // *Biochim. et biophys. acta.* 1989. V. 1005. P. 296 - 302.
3. Asirdu D., Aarsland A., Skorve J., Svardal A.M., Berge R.K. // *Biochim. et biophys. acta.* 1990. V. 1044. P. 211 - 221.
4. Bergseth S., Bremer J. // *Biochim. et biophys. acta.* 1990. V. 1044. P. 237 - 242.
5. Stoll G.H., Voges R., Gerok W., Kurz G. // *J. Lipid Res.* 1991. V. 32. P. 843 - 857.
6. Fuller R. // *J. Fluorine Chem.* 1986. V. 33. P. 361 - 375.
7. Богомолов О.В., Каплун А.П., Швец В.И. // *Успехи химии.* 1988. Т. 57. № 4. С. 684 - 708.
8. Волкова Л.Г., Левитин И.Я., Вольпин М.Е. // *Успехи химии.* 1975. Т. 44. № 7. С. 1217 - 1235.
9. Lurie E., Kaplun A., Kulakov V., Matveev V., Shvets V. // *Biochem. Molec. Biol. Int.* 1933. V. 30. P. 99 - 105.
10. Лабораторное руководство по хроматографии и смежным методам. Т. 2. / Ред. О. Микеш. М.: Мир, 1982. С. 539 - 549.

Novel Biologically Active Aromatic Derivatives of Fatty Acids

E. Yu. Lurie*, A. P. Kaplun*¹, V. N. Kulakov**, and V. I. Shvets*

*Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

**Institute of Biophysics, Russian Ministry of Health, Zhyvopisnaya ul. 46, Moscow, 123182 Russia

Abstract – A convenient method for synthesis of the homologous series of novel aromatic derivatives of fatty acids is described. The synthetic approach includes the reductive alkylation of ω- and α-amino acids with hydroxybenzaldehydes. The physicochemical properties of the compounds obtained were reported.

Key words: amino acids; fatty acids, aromatic derivatives; hydroxybenzaldehydes; Schiff bases.

¹ To whom correspondence should be addressed.