



УДК 547.924:535.372

## ФЛУОРЕСЦЕНТНОМЕЧЕННЫЕ АНАЛОГИ ХОЛЕСТЕРИНА

© 1997 г. И. В. Гречишникова, Ю. Г. Молотковский<sup>#</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 27.12.96 г.

Исходя из ацетата прегненолона синтезированы новые флуоресцентные аналоги холестерина, (22E, 20R)-3 $\beta$ -гидрокси-23-(9-антрил)-24-норхола-5,22-диен и его 20S-изомер, в которых антрилвинильная группа замещает фрагмент C22–C27 алкильной цепи стерина. Оба аналога имеют флуоресцентные характеристики, типичные для антрилвинильных зондов, и хорошо включаются в фосфолипидный бислой; предполагается применение их для исследования мембранных систем.

*Ключевые слова:* мембранные зонды; 9-антрилвинильный флуорофор; реакция Виттига; спектры флуоресценции.

Флуоресцентные липидные зонды с 9-антрилвинильной меткой показали себя удобными инструментами для исследования структуры мембран и протекающих в них процессов; нами синтезирован набор этих зондов – фосфолипидных [1–3] и гликолипидных [4, 5], – с помощью которых был проведен ряд мембранных исследований. Однако дальнейшее развитие этих исследований сдерживалось отсутствием удобного флуоресцентного зонда, моделирующего холестерин.

Холестерин – один из важнейших компонентов мембран эукариотических клеток; его роль в модулировании физических свойств бислоя и, тем самым, мембранных функций является в последние десятилетия предметом интенсивного изучения. Описано значительное число флуоресцентных аналогов холестерина; некоторые из них нашли применение в мембранных исследованиях, однако лишь в ограниченных пределах. Зонды, содержащие сопряженную триеновую систему – дегидроэргостерин [6] и холеста-5,7,9(11)-триен-3 $\beta$ -ол [7, 8], – имеют весьма сходное с холестерином строение и соответственно сходное поведение в мембранных системах. Однако близость спектра флуоресценции триенового хромофора к спектру триптофана и низкий квантовый выход делают применение этих зондов в природных мембранах проблематичным; за немногими исключениями, они используются только для изучения модельных систем.

Аналоги холестерина, меченные по боковой цепи N-(7-нитробенз-2-окса-1,3-дiazол-4-ильным) (N-NBD) [9] или 1-пиренилметилоксикарбонильным [10] флуорофором, мало пригодны для

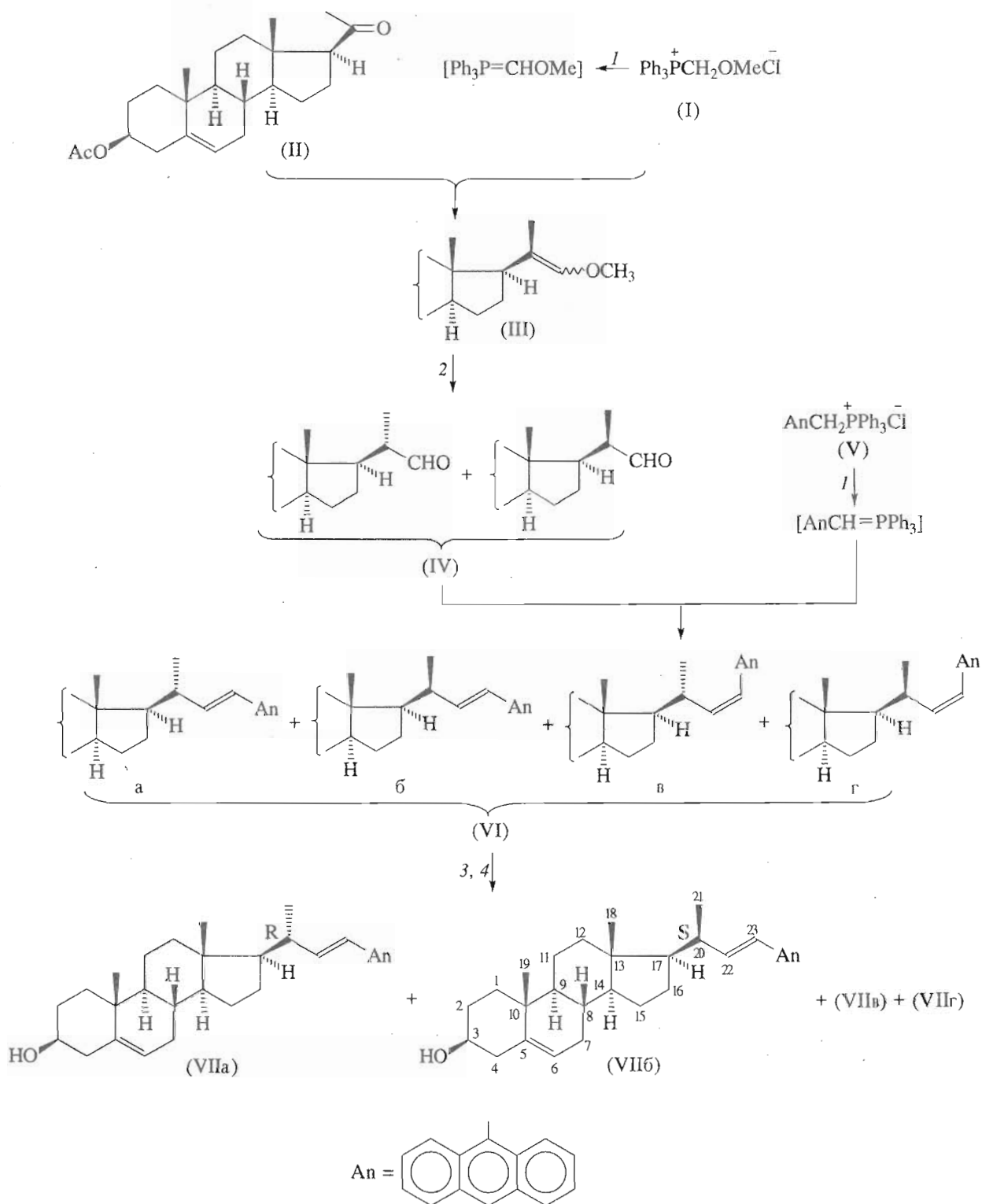
исследований, связанных с регистрацией анизотропии флуоресценции: параметры испускания N-NBD-группы сильно зависят от полярности окружения, а пиренильный флуорофор имеет слишком длительное время жизни возбужденного состояния. Кроме того, обе эти группировки обладают заметной полярностью, что может делать локализацию флуорофора в мембране неопределенной. Заслуживает также упоминания холестериновый аналог, в котором боковая цепь представляет собой (EEE)-1-метил-6-фенилгексатриеновый хромофор [11]; зонд этот не получил дальнейшего применения, вероятно, вследствие того, что по своим флуоресцентным характеристикам ( $\lambda_{\text{исп}}$  390 нм) он не имеет ощутимых преимуществ перед упомянутыми выше холестатриенолом и дегидроэргостерином.

Поэтому мы предприняли синтез флуоресцентных зондов (VII) (схема), в которых антрилвинильная группировка замещает фрагмент C22–C27 алкильной цепи холестерина. Разумеется, молекула холестерина претерпевает при этом изменения, однако лишь в той части, которая в мембране локализована в ее наименее плотно упакованной области – антрилвинильный флуорофор ввиду своей гидрофобности располагается в глубине бислоя [2]. Мы учитывали также, что довольно значительные модификации боковой цепи холестерина мало влияют на его мембранные свойства, в частности на характер взаимодействия с фосфолипидами [12, 13].

Исходным соединением для синтеза служил ацетат прегненолона (3 $\beta$ -ацетокси-5-прегнен-20-он) (I), который в реакции Виттига с метоксиметилентрифенилфосфораном образовал виниловый эфир (II) (см. схему). Ранее подобная реакция проводилась с прегненолоном и его ацетатом [14]

Сокращения: офВЭЖХ – обращенно-фазовая ВЭЖХ, Ап – 9-антрил.

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: jgmol@ibch.siobc.ras.ru).



1 – трет-амилат калия; 2 – H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>; 3 – OH<sup>-</sup>; 4 – ВЭЖХ

Схема 1.

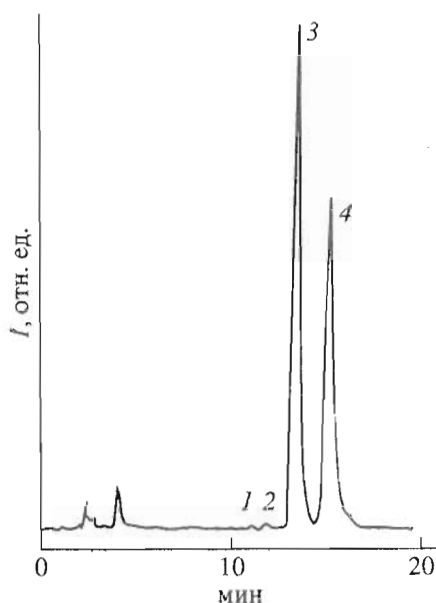


Рис. 1. ВЭЖХ смеси конечных продуктов синтеза, антрилвинильных аналогов холестерина (VIIa-г). Колонка 3.3 × 150 мм, Seraport 7C<sub>18</sub> (Tessek, Дания-Чехия), система ацетонитрил–метанол (2 : 1); скорость 0.5 мл/мин, флуоресцентный детектор. 1, 2 – 22Z-изомеры (VIIв, г), 3 – 20R, 22E-изомер (VIIа), 4 – 20S, 22E-изомер (VIIб).

или тетрагидропириновым эфиром [15], причем фосфоран из метоксиметилтрифенилфосфонийхлорида (I) получали при комнатной температуре, а сам синтез Виттига проводили также при комнатной температуре [15] или даже при кипячении в THF [14]. Повторить эту реакцию в подобных условиях нам не удалось: при комнатной температуре образовавшийся из соли (I) фосфоран (в качестве основания применяли димсилат натрия в диметилсульфоксиде, бутиллитий в толуоле и др.) в течение нескольких минут терял характерную красную окраску, что свидетельствовало о его разложении, а добавленный ацетат прегненолона (II) оставался неизменным.

Синтез удалось осуществить в более мягких условиях – фосфоран получали при 0°C и его конденсацию с ацетатом прегненолона (II) также проводили при пониженной температуре (ср. [16]). Образовавшийся метилвинильный эфир (III), как видно из данных <sup>1</sup>H-ЯМР-спектра, представлял собой смесь 20E- и 20Z-изомера (таблица); отношения сделаны по аналогии с данными работ [14, 15, 17] (Петит и др. [14] уже получали этот эфир в виде 20E-изомера, судя по спектру <sup>1</sup>H-ЯМР). После кислотного гидролиза эфира (III) образовался альдегид (IV) в виде смеси 20R- и 20S-изомеров (данные спектра <sup>1</sup>H-ЯМР приведены в таблице) в соотношении 6 : 4. Он был введен в новый синтез Виттига с фосфораном, полученным из 9-антриметилтрифенилфосфонийхлорида (V).образова-

лись четыре флуоресцентных продукта реакции – два основных и два минорных (по данным офВЭЖХ; не приведены).

Индивидуальные соединения на этой стадии не выделяли; колоночной хроматографией была выделена их смесь; главным продуктам реакции мы приписали строение 20R, 22E- (а) и 20S, 22E- (б) изомерных эфиров (VI), что было подтверждено спектром <sup>1</sup>H-ЯМР; ввиду малого содержания минорных компонентов (не более 2%) их примесь не отразилась на качестве спектра. В спектре были идентифицированы отдельные сигналы протонов R- и S-изомеров (ср. [15, 17]) для всех метильных групп и H<sub>б</sub>; константа спин-спиновой взаимодействия протонов ациклической двойной связи ( $J_{22,23} = 16.5$  Гц) указывает на ее *транс*-конфигурацию. В таком случае минорные компоненты смеси должны быть 22Z-изомерами (VIIв, г), что подтверждается спектрами флуоресценции соответствующих спиртов (VIIв, г) (см. ниже). Высокая избирательность реакции карбонил-олефинирования на этой стадии – соотношение E- и Z-изомеров составило 98 : 2, – несомненно, обусловлена стерическими препятствиями для образования *цис*-двойной связи, создаваемыми двумя объемистыми группами, норхолановой и антрильной.

После щелочного омыления смеси ацетатов (VIa-г) образовавшиеся целевые соединения (VIIa-г) разрешались в процессе офВЭЖХ так же хорошо, как и ацетаты (VIa-г) (рис. 1) (ВЭЖХ на прямой фазе в обоих случаях не давала удовлетворительного разрешения изомеров). Это позволило провести препаративное выделение стериновых аналогов (VIIa-г); хотя минорные компоненты (VIIв, VIIг) ввиду их низкого содержания были получены в количествах, достаточных только для регистрации масс-спектров и спектров флуоресценции, эти вещества были надежно идентифицированы. Спектры флуоресценции основных изомеров (VIIа, б) с главным максимумом испускания при 432 нм (см. рис. 2) совпадают со спектрами других антрилвинильных зондов [2], что подтверждает 22E-строение зондов (VIIа, б). У минорных же изомеров (VIIв, г) этот максимум сдвинут на ~12 нм в коротковолновую область, что указывает на их 22Z-конфигурацию [18] (рис. 2).

Как показывают предварительные эксперименты, оба стериновых зонда, 20R, 22E-аналог (VIIа) (т.е. имеющий одинаковую с холестерином конфигурацию при C20) и 20S, 22E-изомер (VIIб), хорошо включаются в липосомы из яичного фосфатидилхолина. При этом анизотропия флуоресценции для зонда (VIIа) равна 0.135, а для зонда (VIIб) составляет 0.126, что существенно превышает величины анизотропии для антриметилвинильных фосфатидилхолина (0.050) и сфингомиелина (0.084) в тех же условиях. По-видимому, различие вызвано тем, что в стериновых зондах

флуорофор отделен от остальной жесткой тетрациклической части молекулы только двумя одинарными связями, вращение вокруг которых ограничено стерическими препятствиями; деполяризация флуоресценции обусловлена в основном подвижностью всей молекулы зонда. В фосфолипидных же зондах с остатком (11*E*)-12-(9-антрил)-11-додеценовой кислоты [2] флуорофор отделен 12 одинарными связями от остальной части молекулы, которая сама по себе также не имеет жесткой структуры; деполяризация флуоресценции в этом случае вызывается подвижностью как всего зонда, так и флуорофора относительно остальной части молекулы. Эти различия зондов двух типов, несомненно, необходимо учитывать при мембранных исследованиях, результаты которых будут темой нашего следующего сообщения.

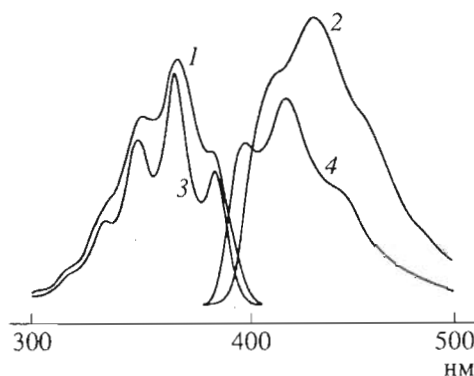


Рис. 2. Спектры возбуждения (1, 3) ( $\lambda_{\text{исп}}$  430 нм) и испускания (2, 4) ( $\lambda_{\text{возб}}$  370 нм) антрилвинильных аналогов холестерина в этаноле. 1, 2 – 20*R*,22*E*-изомер (VIIa); 3, 4 – один из 22*Z*-изомеров (VIIв, г).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали 3β-ацетокси-5-прегнен-20-он, трифенилфосфин, 9-хлорметилантрацен фирмы Fluka (Швейцария), остальные реактивы и растворители – отечественного производства. Сухой ацетонитрил получали перегонкой над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, сухой THF – перегонкой над CaH<sub>2</sub>, остальные растворители очищали по обычным методикам. Упаривание проводили в вакууме при температуре не выше 40°C. трет-Амилат калия [15], хлорметилметилловый эфир [19] и метоксиметилфосфонийхлорид [20] получали как описано ранее.

Температуры плавления определены на блоке Кофлера и исправлены. Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 (Япония), УФ-спектры – на спектрофотометре LKB Ultrospec II (Швеция) в этаноле. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker WM 500 в дейтерохлороформе. Масс-спектры с ионизацией электронным ударом (EI; энергия электронов 70 эВ) снимали на масс-спектрометре Varian MAT 44S (США); с плазменной десорбцией осколками деления <sup>252</sup>Cf – на времяпролетном приборе МСБХ (“Электрон”, Сумы, Украина). Аналитическую ВЭЖХ проводили на приборе

Данные спектров <sup>1</sup>H-ЯМР соединений (III), (IV), (VI) и (VIIa, б) в CDCl<sub>3</sub> (δ, м.д.; КССВ, Гц)

Соединение	C18-H <sub>3</sub>	C19-H <sub>3</sub>	C21-H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> COO	CH <sub>3</sub> O	H3	H6	H22	H23	An
(III)	E: 0.58 (с) Z: 0.65 (с)	1.03 (с)		2.03 (с)	3.47 (с) 3.56 (с)	4.61 (м)	5.38 (с. р.* дд)	5.79 (с) 5.89 (с)		
(IV)	R: 0.69 (с) S: 0.73 (с)	1.01 (с)	R: 1.03 (д) S: 1.13 (д)	2.03 (д ~ с)		4.53 (м)	5.30 (с. р. дд)	R: 9.54 (д) J <sub>22,20</sub> 5.05 S: 9.58 (д) J <sub>22,20</sub> 3		
(VI)	R: 0.95 (с) S: 0.87 (с)	R: 1.03 (с) S: 1.07 (с)	R: 1.32 (д) S: 1.36 (д)	R: 2.02 (с) S: 2.04 (с)		4.6 (шир. м)	R: 5.38 (с. р. дд) S: 5.41 (с. р. дд)	5.92 (дт)	7.07 (2д = т) J <sub>23,22</sub> 16.5	7.45 (м) 7.99 (м) 8.33 (м)
(VIIa)	0.88 (с)	1.06 (с)	1.37 (д) J <sub>21,20</sub> 6.6			3.55 (м)	5.38 (с. р. дд)	5.88 (дд) J <sub>22,23</sub> 16.5	7.05 (д) J <sub>23,22</sub> 16.5	7.46 (м) 8.00 (м)
(VIIб)	0.96 (с)	1.03 (с)	1.33 (д) J <sub>21,20</sub> 6.4			3.50 (м)	5.36 (с. р. дд)	5.95 (дд) J <sub>22,23</sub> 16.5	7.09 (д) J <sub>23,22</sub> 16.5	8.34 (м)

\* с. р. – слабо разрешенный.

Altex 334 (США) с УФ-детектором ( $\lambda$  254 нм) или с флуоресцентным детектором Beckman 157 (возбуждение 305–397 нм, регистрация испускания при  $\lambda > 430$  нм) с колонкой (3.3 × 150 мм) Sерагон 7C<sub>18</sub> (Tessek, Дания–Чехия). Для колоночной хроматографии использовали силикагель 60 (63–200 мкм, Merck), силикагель 100/160 (Chemapol, ЧСФР) и сефадекс LH-20 (Pharmacia, Швеция); для ТСХ – пластинки Kieselgel 60 (Merck) в системах толуол–хлороформ–этилацетат–CH<sub>3</sub>COOH, 50 : 5 : 3 : 1 (1), хлороформ–метанол–конц. NH<sub>4</sub>OH, 65 : 25 : 4 (2), толуол–этилацетат, 19 : 1 (3), обнаружение с помощью фосфорномолибденовой кислоты (А), иода (Б), УФ-облучения (В) и 2,4-динитрофенилгидразина (Г).

**(22E,Z)-3β-Ацетокси-22-метокси-23,24-динор-5,20(22)-холодиен (III).** Синтез проводили в атмосфере аргона; посуду предварительно 20 мин выдерживали при 150°C и охлаждали в токе аргона. К суспензии 17.4 г (50.8 ммоль) метоксиметилтрифенилфосфонийхлорида (I) в 140 мл смеси толуол–ТНФ, 1 : 1, при 0°C и перемешивании в течение 10 мин добавляли 74 мл 0.68 М раствора (50.5 ммоль) *трет*-амилата калия в толуоле и выдерживали еще 40 мин при 0°C. К темно-красному раствору прибавляли за 1 мин раствор 6 г (16.7 ммоль) ацетата прегненолона (II) в 25 мл ТНФ, смесь перемешивали 3 ч при 0°C, контролируя ход реакции ТСХ (система 1, обнаружение: А, Б, В), и оставляли на ночь при –15°C. Смесь промывали 1 н. HCl (1 × 40 мл), насыщ. NaHCO<sub>3</sub> (2 × 40 мл) и насыщ. NaCl (2 × 40 мл), сушили MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 10 мл хлороформа и добавляли 200 мл эфира, охлаждали до 0°C, осадок трифенилфосфиноксида отделяли и промывали холодным эфиром. Остаток после упаривания фильтра (19 г) хроматографировали на колонке с 230 г силикагеля, элюируя бензолом и системой бензол–этилацетат, 98 : 2. Получали 5.8 г (90%) бесцветного кристаллического вещества ( $R_f$  0.56 в системе 1), в котором, по данным <sup>1</sup>H-ЯМР (см. таблицу), 20E- и 20Z-изомер находятся в соотношении 4 : 1; т.пл. 137–139°C. Масс-спектр (EI),  $m/z$ : 387 [M]<sup>+</sup>, 327 [M – AcO]<sup>+</sup>. Лит. данные [14]: т.пл. 110–116°C; после кристаллизации 125–130°C.

**(20R,S)-3β-Ацетокси-23,24-динорхол-5-ен-22-аль (IV).** Раствор 1.01 г (2.6 ммоль) винилового эфира (III) в 20 мл эфира перемешивали 40 мин с 1 мл 60% HClO<sub>4</sub> в атмосфере аргона, затем смесь разбавляли 20 мл эфира и промывали водой (2 × 15 мл), насыщ. KHCO<sub>3</sub> (15 мл) и насыщ. NaCl (15 мл), сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали в вакууме в атмосфере аргона. Получали 0.95 г (98%) альдегида (IV) в виде бесцветного порошка, не имеющего четкой температуры плавления,  $R_f$  0.44 (система 1; А, Б, Г). <sup>1</sup>H-ЯМР – см. таблицу. Масс-спектр (EI),  $m/z$ : 313 [M – AcO]<sup>+</sup>, пик молекулярного иона отсутствует.

**(9-Антриметил)трифенилфосфонийхлорид (V).** Раствор 2.9 г (11 ммоль) трифенилфосфина и 2.5 г (11 ммоль) 9-хлорметилантрацена в 25 мл ацетонитрила кипятили с обратным холодильником в атмосфере аргона 12 ч и оставляли на ночь при 0°C. Затем раствор декантировали с выпавших кристаллов, которые промывали эфиром (3 × 50 мл) и сушили в вакууме. Получали 5.17 г (96%) кристаллического продукта, содержащего, по данным ТСХ (в системе 2 на 0.5 длины пластинки, затем в системе 3 на полную длину; обнаружение: А–В), незначительные примеси. Этот продукт использовали далее без дополнительной очистки. Аналитический образец, полученный трехкратной кристаллизацией из смеси хлороформ–эфир и гель-фильтрацией через сефадекс LH-20 в системе хлороформ–метанол, 8 : 1, имел т.пл. 266–268°C. Найдено, %: С 80.90; Н 5.55. Вычислено для C<sub>33</sub>H<sub>26</sub>ClP, %: С 81.06; Н 5.36.

**(20R,S)-3β-Ацетокси-23-(9-антрим)-24-нор-5,22-холодиен (VI).** Общие условия проведения реакции – см. синтез эфира (III). К суспензии 4 г (8.2 ммоль) соли (V) в 30 мл смеси толуол–ТНФ (1 : 1) при комнатной температуре и перемешивании в течение 10 мин добавляли 7.4 мл 1.02 М (7.5 ммоль) *трет*-амилата калия в толуоле. Через 40 мин к темно-вишневому раствору при перемешивании прибавляли 0.88 г (2.4 ммоль) альдегида (IV) в 10 мл ТНФ и оставляли на 20 ч; контроль реакции ТСХ в системе 1 (А–В). Затем смесь выливали в 50 мл 1 н. HCl, экстрагировали эфиром (3 × 70 мл) и этилацетатом (2 × 30 мл). Объединенные экстракты промывали водой, насыщ. NaHCO<sub>3</sub> и насыщ. NaCl (по 80 мл), сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали. Остаток быстро фильтровали через колонку с силикагелем, элюируя толуолом с 2% эфира, для удаления трифенилфосфиноксида. Получали 1.6 г аморфного продукта, который хроматографировали на 100 г силикагеля в градиентной системе петролейный эфир против смеси хлороформ–ацетон, 9 : 1, выделяли 0.82 г (64%) смеси изомерных эфиров (VIa-г), не разделяющейся при ТСХ (условия см. выше),  $R_f$  0.70. Данные спектра <sup>1</sup>H-ЯМР – см. таблицу. Масс-спектр (CI),  $m/z$ : 546.4 [M]<sup>+</sup>, 531.3 [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 203 [AnCHCH]<sup>+</sup>, 178 [An + H]<sup>+</sup>. ВЭЖХ (метанол, 0.5 мл/мин, флуоресцентный детектор): для основных изомеров  $k'$  17.0 (*R*-эпимер) и 19.2 (*S*-эпимер).

**(22E,20R)-3β-Гидрокси-23-(9-антрим)-24-нор-5,22-холодиен (VIIa) и (22E, 20S)-3β-гидрокси-23-(9-антрим)-24-нор-5,22-холодиен (VIIб); 22Z-эпимеры (VIIв, VIIг).** К раствору 818 мг (1.5 ммоль) эфира (VI) в 75 мл смеси ТНФ–MeOH, 3 : 2, при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли 4 мл 15% NaOH. Через 22 ч смесь нейтрализовали 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, органические растворители отгоняли, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой (2 × 80 мл), растворяли в 100 мл

хлороформа, сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали с толуолом. Остаток (0.81 г) хроматографировали на колонке с 40 г силикагеля, элюируя хлороформом, затем хлороформом с 3% этилацетата. Получали 0.72 г (96%) смеси стерinov (VIIa-г), не разделяющейся при ТСХ в системе 1 (обнаружение А, В),  $R_f$  0.22. ВЭЖХ (метанол, 0.5 мл/мин, флуоресцентный детектор): для *цис*-изомеров  $k'$  7.60 и 8.23, для *транс*-изомеров  $k'$  9.80 (*R*-эпимер) и 10.85 (*S*-эпимер).

Препаративная ВЭЖХ: колонка 10 × 250 мм, Nucleosil 100-7C<sub>18</sub> (Macherey-Nagel, Германия); метанол-вода, 19 : 1 (6 мл/мин), УФ-детектор (~6 мг смеси/цикл разделения). Из 78 мг смеси получили 38.4 мг *R*-изомера (VIIa) и 19.4 мг *S*-изомера (VIIб), а также по ~0.3 мг изомеров (VIIв, г).

22*E*-Эпимеры (VIIa) и (VIIб): УФ (этанол),  $\lambda_{\text{макс}}$ , нм ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 368 (7800), 386 (7000) для обоих; данные спектров <sup>1</sup>H-ЯМР индивидуальных изомеров – см. таблицу; масс-спектры (Сf) одинаковы,  $m/z$ : 504 [ $\text{M}^+$ ], 230 [ $\text{AnCH}=\text{CHCH}(\text{CH}_3)^+$ ], 178 [ $\text{An}^+$ ]; спектры флуоресценции идентичны (рис. 2).

22*Z*-Эпимеры (VII в, г): масс-спектры (Сf) одинаковы,  $m/z$ : 504 [ $\text{M}^+$ ], 231 [ $\text{AnCH}=\text{CHCH}(\text{CH}_3)^+$ ], 178 [ $\text{An}^+$ ]; спектры флуоресценции идентичны – см. рис. 2.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Молотковский Ю.Г., Дмитриев П.И., Никулина Л.Ф., Бергelson Л.Д. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. С. 588–594.
2. Bergelson L.D., Molotkovsky J.G., Manevich Y.M. // Chem. Phys. Lipids. 1985. V. 37. P. 165–195.
3. Молотковский Ю.Г., Смирнова М.М., Карюхина М.О., Бергelson Л.Д. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 586–589.
4. Имбс А.Б., Молотковский Ю.Г., Бергelson Л.Д. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 527–532.
5. Molotkovsky J.G., Mikhalov I.I., Imbs A.B., Bergelson L.D. // Chem. Phys. Lipids. 1991. V. 58. P. 199–212.
6. Fischer R.T., Cowlen M.S., Dempsey M.E., Schroeder F. // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 3322–3331.
7. Иоффе Д.В., Лапшин Е.Н., Добрецов Г.Е., Кузнецов А.С. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 944–949.
8. Hyslop P.A., Morel B., Sauerheber R.D. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 1025–1038.
9. Craig I.E., Via D.P., Mantulin W., Pownall N.J., Gotto A.M., Smith L.C. // J. Lipid Res. 1981. V. 22. P. 637–696.
10. Kao Y.J., Doody M.C., Smith L.C. // J. Lipid Res. 1986. V. 27. P. 781–785.
11. Drew J., Gowda G., Morand P., Proulx P., Szabo A.G., Williamson D. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1985. P. 901–902.
12. Nakamura T., Nishikawa M., Inoue K., Nojima S., Akiyama T., Sankawa U. // Chem. Phys. Lipids. 1980. V. 26. P. 101–110.
13. Vilcheze C., McMullen T.P.W., McElhaney R.N., Bitman R. // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1279. P. 235–242.
14. Pettit G.R., Green B., Dunn G.L., Sunder-Plassmann P. // J. Org. Chem. 1970. V. 35. P. 1285–1289.
15. Schow S.R., McMorris T.C. // J. Org. Chem. 1979. V. 44. P. 3760–3764.
16. Nicolaou K.C., Magolda R.L., Claremon D.A. // J. Am. Chem. Soc. 1980. V. 102. P. 1404–1409.
17. Narvid T.A., Cooney K.E., Uskokovic M.R. // Helv. Chim. Acta. 1974. V. 57. P. 771–780.
18. Имбс А.Б., Молотковский Ю.Г., Бергelson Л.Д. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 272–278.
19. Arlino J.S., Karady S., Slettinger M., Weinstock L.M. // Synthesis. 1979. P. 970–971.
20. Wittig G., Schlosser M. // Chem. Ber. 1961. V. 94. S. 1373–1383.

## Fluorescent-Labeled Analogues of Cholesterol

I. V. Grechishnikova and Jul. G. Molotkovsky

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

Received December 27, 1996

**Abstract**—Starting from pregnenolone acetate, new fluorescent analogues of cholesterol, (22*E*,20*R*)-3β-hydroxy-23-(9-anthryl)-24-norcholesta-5,22-diene and its 20*S*-isomer, were synthesized. They bear an anthrylvinylyl group instead of the C22–C27 fragment of the sterol alkyl chain and possess fluorescent properties characteristic of anthrylvinylyl probes. Both analogues can be easily incorporated into the phospholipid bilayer and used for the study of membrane systems.

**Key words:** membrane probes, 9-anthrylvinylyl fluorophore, the Wittig reaction, fluorescence spectra.