



УДК 547.953.2'672.07

СИНТЕЗ НОВЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНОМЕЧЕННЫХ  
ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ*Молотковский Ю. Г., Дмитриев П. И., Никулина Л. Ф.,  
Бергельсон Л. Д.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Описан синтез флуоресцентномеченных кислот — N-(9-антроил)-11-аминоундекановой и 12-(9-антроил)-11-транс-додеценовой. Ацилирование этими кислотами яичного лизолецитина привело к фосфатидилхолинам, содержащим остатки флуоресцентномеченных кислот. Приведены флуоресцентные характеристики полученных соединений.

Флуоресцентные зонды — важный инструмент в исследованиях биологических и искусственных мембран (см., например, обзор [1]). Однако большинство применяемых зондов сильно отличается по своему строению от нормальных компонентов мембран, поэтому их внедрение приводит к искажению мембранной структуры [2] или дает результаты, неверно отражающие состояние мембраны; так, коэффициент латеральной диффузии пирена (флуоресцентный зонд), включенного в липидный бислой, оказался в 10 раз больше соответствующего коэффициента молекул фосфолипида [3].

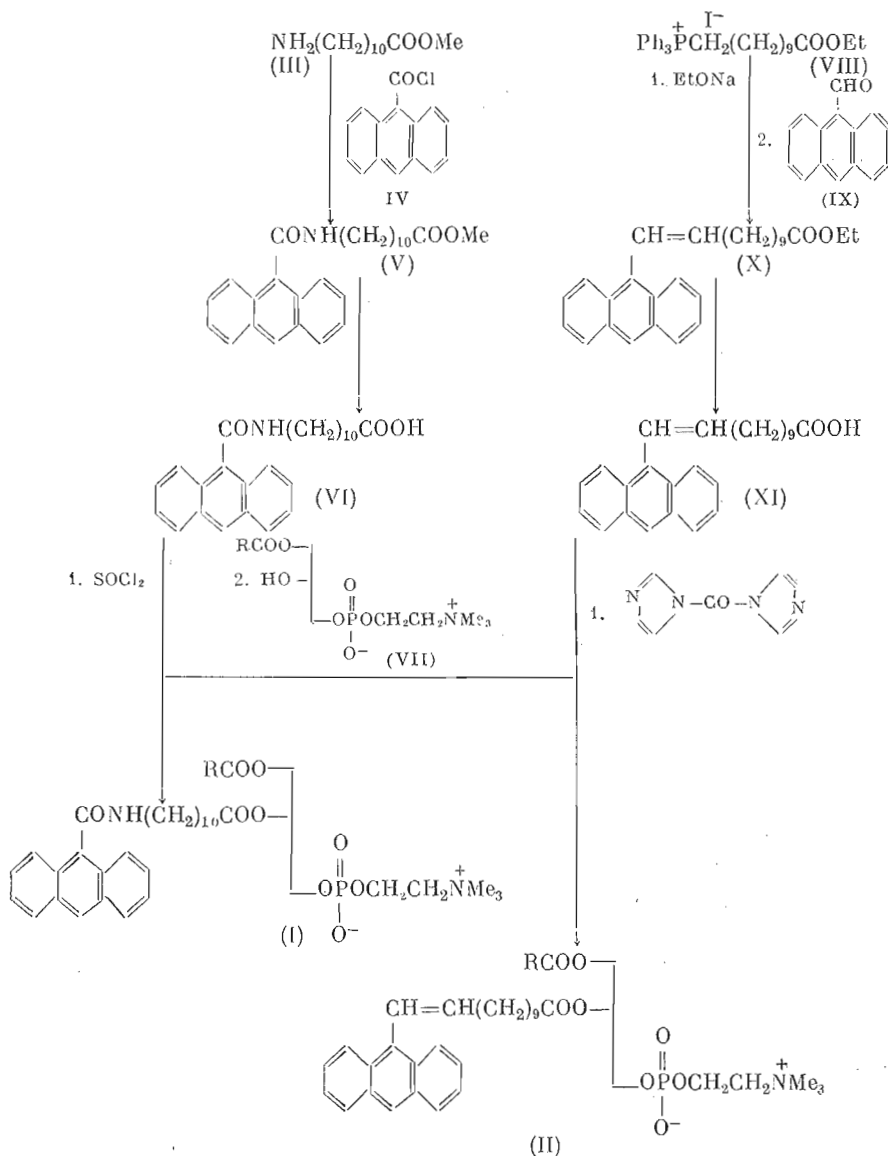
Эти недостатки в значительной мере устраняются при введении флуоресцентной метки в молекулу самого фосфолипида, причем особый интерес представляют вещества, в которых метка присоединена к жирнокислотной части, поскольку они позволяют получать информацию о гидрофобных липид-липидных и липид-белковых взаимодействиях в мембранах.

В литературе описаны два типа таких веществ. Склеир и сотр. [4] описали химический и биологический синтез фосфолипидов, содержащих остаток  $\alpha$ - или  $\beta$ -паринаровой кислоты. Недостатком этих фосфолипидов является их малая химическая стойкость [5]. Штоффель и Михаэлис сообщили о синтезе фосфатидилхолинов с моно- и диеновыми кислотами, содержащими в  $\omega$ -положении 9-антрильный остаток [6]. Преимущества антрильного остатка в качестве флуорофора связаны с его относительно высокой устойчивостью и малой полярностью. Кроме того, этот остаток, будучи присоединен к жирнокислотной цепи фосфатидилхолина, хорошо встраивается в неполярную область мембран, о чем свидетельствует тот факт, что он лишь незначительно увеличивает площадь, приходящуюся на одну молекулу в монопосле [7].

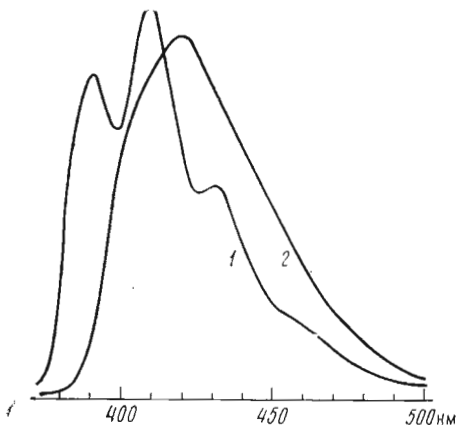
В настоящем сообщении описан более простой синтез флуоресцентномеченных жирных кислот с антраценовым остатком, в которых последний сопряжен с карбонилем или двойной связью. Это дает батохромный сдвиг

максимумов флуоресценции по сравнению с несопряженным антраценовым остатком. На основании синтезированных нами кислот были получены соответствующие флуоресцентные фосфатидилхолины (I) и (II).

Первый из указанных фосфолипидов (I) был синтезирован согласно приведенной схеме. Метилловый эфир 11-аминоундекановой кислоты (III) ацилировали хлорангидридом 9-антраценкарбоновой кислоты (IV) и омыляли полученный эфир (V) в N-(9-антроил)-11-аминоундекановую кислоту (VI). Хлорангидридом последней ацилировали кадмиевый комплекс лизолецитина, полученного из яичного фосфатидилхолина; образовавшийся флуоресцентномеченый фосфатидилхолин (I) выделяли хроматографией на силикагеле.



Необходимую для синтеза второго флуоресцентного фосфолипида (II) кислоту получали по реакции Виттига из иодида 10-этоксикарбонилдецилтрифенилфосфония (VIII) и 9-антральдегида (IX). Полученный этиловый эфир 12-(9-антрил)-11-додеценовой кислоты (X), по данным газожидкост-



Некорректированные спектры флуоресценции: 1 — N-(9-антроил)-11-аминоудекановой кислоты (VI) в этаноле (20 мкг/мл),  $\lambda_{\text{возб}}$  365 нм, щели 8 нм, коэф. усиления 1,0; 2 — 12-(9-антрил)-11-*транс*-додеценовой кислоты (XI) в этаноле (20 мкг/мл),  $\lambda_{\text{возб}}$  370 нм, щели 8 нм, коэф. усиления 0,1

ной хроматографии, представлял собой смесь примерно равных количеств двух веществ: *транс*- и *цис*-изомеров, так как в спектре ПМР продукта реакции протону при C<sub>(12)</sub> (в  $\alpha$ -положении к антраценовому ядру) соответствовали два сигнала с химическими сдвигами 7,1 и 6,9 м.д. и константами спин-спинового расщепления от другого протона при двойной связи 16,5 и 10,5 Гц соответственно. После омыления эфира (X) индивидуальный *транс*-изомер кислоты (XI) был выделен кристаллизацией из метанола; этой кислотой этерифицировали яичный лизолецитин (VII), используя для этого имидазольный метод [8].

Хотя хлорангидридный метод ацилирования лизолецитина, примененный для синтеза фосфатидилхолина (I), дает несколько более высокий выход, он уступает имидазольному методу, поскольку последний проще и требует меньшего расхода флуоресцентной кислоты.

Структура полученных флуоресцентных фосфатидилхолинов (I) и (II) подтверждена результатами их расщепления с помощью фосфолипазы A<sub>2</sub> (КФ 3.1.1.4) (использовали яд кобры *Naja naja oxiana*). Оба фосфолипида гидролизуются этим ферментом медленнее, чем яичный фосфатидилхолин, однако почти на 100%, что свидетельствует об оптической чистоте препаратов. По данным ТСХ продуктов ферментализа, практически вся флуоресцентная метка оказалась во фракции жирных кислот, тогда как образовавшийся лизолецитин не обладал заметной флуоресценцией. Отсюда следует, что ацилирование лизолецитина не сопровождалось ацильной миграцией.

Обе антраценсодержащие кислоты (VI) и (XI) обладают интенсивной флуоресценцией (см. рисунок), причем для кислоты (XI) и ее производных относительный квантовый выход примерно на порядок выше, чем для кислоты (VI). Последняя имеет спектр с обычными для антраценовых соединений тремя максимумами испускания при 389, 408 и 439 нм (в этаноле). Положение максимумов испускания в гептане и диоксане практически не меняется.

Спектр испускания антрилдодеценовой кислоты (XI) почти не структурирован, имеется только один максимум (420 нм в этаноле и гептане, 422 нм в диоксане). Причиной этого отличия может быть достаточно свободное вращение вокруг С—С-связи между жирнокислотной цепью и антраценовым ядром в возбужденном состоянии кислоты (XI), в результате чего ее спектр испускания представляет собой сумму спектров ряда конформеров с различной степенью сопряжения двойной связи и антраценового ядра. Это предположение подкрепляется тем, что в спектре испускания спиртового раствора фосфатидилхолина (II), где вещество, по-видимому, существует в виде ассоциатов (мицелл), что должно понижать подвижность антраценового флуорофора, имеется два максимума — при 412 и 430 нм.

Обращает на себя внимание тот факт, что относительная интенсивность флуоресценции кислоты (XI) увеличивается в ряду гептан — этанол — диоксан (соотношение интенсивностей 10:16:18), а у антриламиноундекановой кислоты (VI) — в ряду диоксан — гептан — этанол (главные максимумы при 410, 407 и 408 нм соответственно, соотношение интенсивностей 10:13:15). У большинства же флуорофоров (в том числе у 12-(9-антроилокси)стеариновой кислоты [9]) интенсивность флуоресценции в неполярных растворителях выше, чем в полярных. Причины указанной аномалии, вероятно, следует искать в специфическом взаимодействии флуорофора с растворителем (см. [10]).

### Экспериментальная часть

Температуры плавления определены на блоке Кофлера и не исправлены. ИК-спектры снимали на приборе UR-10 (Karl Zeiss, ГДР), спектр ПМР — на спектрометре Varian XL-100, спектры флуоресценции — на флуориметре MPF-3 (Hitachi, Япония). ГЖХ проводили на приборах Pye 104 (Англия) и «Цвет 6». Содержание глицерина и фосфора в фосфолипидах определяли по стандартным методикам [11, 12].

Растворители очищали по обычным методикам. Для колоночной хроматографии использовали нейтральную окись алюминия III ст. акт. (Reanal, Венгрия) и силикагель марки 60 (Merck, ФРГ). Для ТСХ применяли силикагель КСК (фракция менее 150 меш) с 5% гипса или готовые пластинки Silufol UV 254 (Kavalier, ЧССР).

9-Антральдегид (Koch-Light, Англия) применяли без дополнительной очистки. 9-Антраценкарбоновую кислоту (Merck, ФРГ) превращали в хлорангидрид кипячением с избытком хлористого оксалила в четыреххлористом углероде в течение 8 ч. Трифенил-(10-этоксикарбонилдецил)-фосфониййодид, 11-аминоундекановая кислота и карбонилдимидазол синтезированы, как описано ранее (соответственно [13—15]). Лизолецитин получали ферментативным гидролизом яичного фосфатидилхолина [16]; по данным ГЖХ, он содержал остатки пальмитиновой и стеариновой кислот в соотношении 5:2 (остальных жирных кислот менее 2%), с учетом этого средний молекулярный вес лизолецитина составлял 492.

Вещества, содержащие антраценовую группу, защищали от действия яркого света.

*Метилловый эфир 11-аминоундекановой кислоты (III).* Раствор 7,4 г аминоундекановой кислоты в 150 мл абс. метанола кипятили 5 ч с 5 мл конц.  $H_2SO_4$ , смесь охлаждали, медленно добавляли 40% раствор  $K_2CO_3$  до pH 9 и 200 мл эфира. Верхний слой отделяли, быстро промывали 5% NaOH, охлажденным до 0° (50 мл), затем водой и насыщ. NaCl (по 50 мл), сушили  $Na_2SO_4$ , фильтровали и упаривали в вакууме. Маслообразный остаток (6,4 г) представлял собой, по данным ТСХ на силуфоле в системе  $CHCl_3$  — метанол — 7 н.  $NH_4OH$  (6:6:1), индивидуальное вещество с  $R_f$  0,8 (обнаружение водой и нингидрином). Образец эфира (III) был перегнан, т. кип. 150° (баня)/0,3 мм рт. ст. Для последующего синтеза вещества употреблялось без дополнительной очистки.

*Метилловый эфир N-(9-антроил)-11-аминоундекановой кислоты (V).* К раствору 1,42 г эфира (III) и 0,8 мл сухого пиридина в 5 мл сухого  $CHCl_3$  прибавляли за 5 мин раствор 1,3 г хлорангидрида 9-антраценкарбоновой кислоты (IV) в 13 мл  $CCl_4$ , смесь выдерживали 2 сут при комнатной температуре и затем 4 ч при 50°, охлаждали и разбавляли 100 мл этилацетата. Полученную смесь промывали 100 мл 5% HCl, водный слой экстрагировали 100 мл эфира. Объединенные экстракты промывали водой (50 мл) и насыщ. NaCl (50 мл), сушили  $MgSO_4$ , фильтровали и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке со 100 г силикагеля в градиентной системе хлороформ — этилацетат, состав фракций контролировали ТСХ на силуфоле в системе хлороформ — этилацетат, 9:1 (пятна

видны в УФ-свете). Фракции, содержащие эфир (V) ( $R_f \sim 0,5$ ), объединяли и упаривали, выход 1,1 г (48%); светло-желтые кристаллы с т. пл. 92–95° (из эфира — петр. эфира). Найдено, %: С 77,5; Н 7,8; N 3,2.  $C_{27}H_{33}NO_3$ . Вычислено, %: С 77,29; Н 7,93; N 3,34.

*N*-(9-Антроил)-11-аминоундекановая кислота (VI). К раствору 0,55 г эфира (V) в 50 мл тетрагидрофурана прибавляли 10 мл 0,2 н. LiOH, выдерживали 2 сут при 20°. Разбавляли смесь 100 мл хлороформа, промывали 5%  $H_2SO_4$ , водой (2×20 мл), насыщ. NaCl (50 мл), сушили  $Na_2SO_4$ , фильтровали и упаривали. Остаток кристаллизовали из эфира — петр. эфира, получали 0,42 г (79%) кислоты (VI) в виде светло-желтых кристаллов, т. пл. 94–96°,  $R_f$  0,5 в системе бензол — диоксан —  $CH_3COOH$ , 40 : 10 : 1 (пятна видны в УФ-свете). УФ-спектр (этанол,  $\lambda_{max}$ , нм ( $\epsilon$ )): 251 (67 000), 329 (1520), 362 (7300), 382 (7100). ИК-спектр (вазелиновое масло,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3300 (шир. NH), 3000–2500 (шир., OH), 1712 (с, CO карбоксила), 1640 (с, амид I), 1540 (с, амид II).

*1-Ацил-2-[N*-(9-антроил)-11-аминоундеканоил] -sn-глицеро-3-фосфохолин (I). К раствору 70 мг лизолецитина в 0,2 мл хлороформа и 5 мл этанола добавляли раствор 80 мг  $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$  в 0,5 мл воды и 5 мл этанола, смесь выдерживали ночь при 2–3°, выпавший осадок отсасывали, промывали охлажденным до 0° этанолом (3×1 мл) и сушили над  $P_2O_5$  в вакууме, получали 110 мг аддукта.

К раствору 250 мг *N*-(9-антроил)-11-аминоундекановой кислоты (V) в 1 мл сухого хлороформа, охлажденному до 0°, добавляли 0,1 мл сухого диметилформамида и 45 мкл свежеперегнанного  $SOCl_2$ , выдерживали 5 мин при 0° и выпаривали при 20°/0,5 мм рт. ст. Остаток растворяли в 1 мл сухого хлороформа и упаривали в вакууме, повторяли эту процедуру еще 2 раза. Остаток растворяли в 1 мл сухого хлороформа и прибавляли при 0° в атмосфере аргона к перемешиваемой суспензии 110 мг аддукта лизолецитина с  $CdCl_2$  в 2 мл сухого хлороформа и 0,4 мл пиридина. Смесь перемешивали 10 мин при 0°, 1 ч при 20° и 5 ч при 30°, добавили 20 мл смеси хлороформ — диоксан — вода (10 : 10 : 1), перемешивали 1 ч и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 5 мл смеси хлороформ — метанол — вода (4 : 4 : 1) и фильтровали 15 мин через колонку (диаметр 4 мм), заполненную 2 мл смеси (1 : 1) амберлитов IR-45 ( $OH^-$ ) и IRC-50 ( $H^+$ ), колонку промыли еще 10 мл той же смеси растворителей и объединенные элюаты упарили в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке, заполненной 20 г силикагеля, в градиентной системе хлороформ — метанол, контролируя состав фракций ТСХ на силикагеле в системе хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (обнаружение по флуоресценции в УФ-свете, фосфорномолибденовой кислотой и реактивом Драгендорфа). Флуоресцентный фосфатидилхолин (I) получали в виде желтоватой воскообразной массы. При ТСХ на силикагеле в указанной выше системе  $R_f$  0,40; яичный лецитин в тех же условиях мигрирует в виде более растянутого пятна с  $R_f$  0,38. Спектр флуоресценции (в этаноле,  $\lambda_{возб}$  369 нм):  $\lambda_{max}$  испускания 388, 407 и 430 нм. Молярное соотношение глицерин — фосфор: найденное 1 : 1,02; вычисленное 1 : 1.

*Этиловый эфир 12*-(9-антроил)-11-додеценной кислоты (X). Синтез проводили в атмосфере аргона; посуду предварительно прогревали до 150° и охлаждали в атмосфере аргона.

Сухой этилат натрия, полученный из 205 мг натрия, растворяли в 5 мл сухого диметилформамида, охлаждали до 0° и при перемешивании за 10 мин добавляли раствор 5 г иодида трифенил(10-этоксикарбонилдецил)фосфония (VIII) в 15 мл сухого диметилформамида и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. К оранжевому раствору прибавляли за 1 раз 1,7 г 9-антральдегида, смесь перемешивали 1 ч и оставляли на ночь. Затем смесь разбавляли 20 мл  $CH_2Cl_2$  и 100 мл эфира, промывали водой (2×50 мл), 5%  $H_2SO_4$ , водой и насыщ. NaCl (по 50 мл), сушили

$Mg_2SO_4$ , фильтровали и упаривали в вакууме. Остаток кристаллизовали из 20 мл эфира при  $0^\circ$ , осадок (трифенилфосфиноксид) отделяли и промывали холодным эфиром, остаток из маточного раствора (4,2 г) хроматографировали на колонке с 250 г окиси алюминия в градиентной системе гексан — бензол. Состав фракций контролировали ТСХ на силуфоле в бензоле (пятна видны в УФ-свете). Получали 2,5 г (75%) эфира (X) в виде густого желтого масла с  $R_f$  0,7. По данным ГЖХ (колонка  $2 \times 850$  мм, 5% SE-30 на хромосорбе W,  $260^\circ$ , газ-носитель — гелий, 30 мл/мин), вещество представляло собой смесь примерно равных количеств двух изомеров с временами удерживания 7 мин (*транс*-изомер) и 10,5 мин (*цис*-изомер). ИК-спектр (пленка,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3080, 3050 (с, ароматика и =CH), 2930, 2860 (с,  $CH_2$ ), 1730 (с, C=O), 1680 (ср, C=C).

*12-(9-Антрил)-11-транс-додеценовая кислота (XI)*. К 2,5 г смеси изомерных эфиров (X) в 70 мл метанола добавляли 60 мл 5% NaOH и перемешивали 4 ч при  $40^\circ$ . Разбавляли смесь 150 мл воды, подкисляли 10%  $H_2SO_4$  до pH 1–2 и выдерживали 2 ч при  $5^\circ$ . Выпавший осадок отсасывали, сушили в вакууме над  $CaCl_2$  и дважды перекристаллизовывали из метанола. Получали 0,94 г (41%) кислоты (XI) в виде светло-желтых кристаллов, т. пл.  $96-98^\circ$ . При ТСХ на силуфоле  $R_f$  0,55 в системе бензол — этилацетат —  $CH_3COOH$ , 50:10:1 (обнаружение по флуоресценции в УФ-свете и фосфорномолибденовой кислотой). УФ-спектр (этанол,  $\lambda_{max}$ , нм ( $\epsilon$ )): 257 (84200), 349 (6200), 366 (9000), 386 (8450). ИК-спектр (вазелиновое масло,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3000–2500 (с, шир., OH), 1710 (с, CO). Спектр ПМР (в  $CDCl_3$ ,  $\delta$ , м.д.): мультиплеты 8,3; 7,9 и 7,4 (9H, ароматика), дублет 7,1 (1H, =CH при  $C_{(12)}$ ),  $J_{12-H/11-H}$  16,5 Гц), дублет триплетов 6,0 (1H, =CH при  $C_{(11)}$ ),  $J_{11-H/12-H}$  16,5 Гц,  $J_{11-H/10-H}$  6,5 Гц), мультиплет 3,4 (4H, =CHCH<sub>2</sub> и CH<sub>2</sub>CO), мультиплет 1,2–1,8 (14H, CH<sub>2</sub>). Найдено, %: C 83,4; H 8,1; O 8,5.  $C_{26}H_{30}O_2$ . Вычислено, %: C 83,38; H 8,07; O 8,54.

*1-Ацил-2-[12-(9-антрил)-11-транс-додеценоил]-sn-глицеро-3-фосфохолин (II)*. К раствору 60 мг *12-(9-антрил)-11-транс-додеценовой кислоты (XI)* в 2 мл сухого хлороформа прибавляли 30 мг карбонилдимидазола и перемешивали 30 мин, затем к смеси прибавляли 90 мг лизолецитина, высушенного в вакууме над  $P_2O_5$  в течение суток, смесь выдерживали 24 ч при  $55-60^\circ$  при перемешивании. После охлаждения к смеси прибавляли 10 мл смеси хлороформ — диоксан — вода (10:10:1), перемешивали 20 мин и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с 10 г силикагеля, как описано для флуоресцентного лецитина (I). Получали 40 мг (30%) флуоресцентного фосфатидилхолина (II) в виде светло-желтой воскообразной массы; по поведению при ТСХ вещество идентично фосфатидилхолину (I). Спектр флуоресценции (этанол,  $\lambda_{exc}$ , 362 нм):  $\lambda_{max}$  412 и 430 нм.

Молярное соотношение глицерин — фосфор: найденное 1:1,01, вычисленное 1:1.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Radda G. K., Vanderkooi J. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **265**, 509–549.
2. Krishnan K. S., Balaram P. (1975) *FEBS Lett.*, **60**, 419–422.
3. Galla H. J., Sackman E. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **239**, 103–105.
4. Sklar L. A., Hudson B. S., Simoni R. D. (1977) *Biochemistry*, **16**, 819–828.
5. Tecoma E. S., Sklar L. A., Simoni R. D., Hudson B. S. (1977) *Biochemistry*, **16**, 829–835.
6. Stoffel W., Michaelis G. (1976) *Z. Physiol. Chem.*, **357**, 7–19.
7. Stoffel W., Michaelis G. (1976) *Z. Physiol. Chem.*, **357**, 21–33.
8. Boss W. F., Kelley C. J., Landsberger F. R. (1975) *Anal. Biochem.*, **64**, 289–292.
9. Waggoner A. S., Stryer L. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 579–589.
10. Бусел Е. П. (1973) в сб.: *Итоги науки и техники. Молекулярная биология* (под ред. Волькенштейна М. В.), т. 3, с. 85–126, М.
11. Renkonen O. (1962) *Biochim. et biophys. acta*, **56**, 365–367.
12. Gerlach E., Deuticke B. (1963) *Biochem. Z.*, **337**, 477–481.
13. Бергельсон Л. Д., Вавер В. А., Ковтун В. Ю., Сенявина Л. Б., Шемякин М. М. (1962) *Ж. общ. химии*, **32**, 1802–1807.

14. Несмеянов А. Н., Фрейдлина Р. Х., Захаркин Л. И., Васильева Е. И., Кост В. Н., Васильева Т. Т. (1957) *Ж. общ. химии*, 2418–2422.
15. Staab H. A. (1956) *Angew. Chemie*, 68, 754–755.
16. Hanahan D. J., Rodell M., Turner L. D. (1954) *J. Biol. Chem.*, 206, 431–441.

Поступила в редакцию  
20.X.1978

## SYNTHESIS OF NEW FLUORESCENCE LABELED PHOSPHATIDYL CHOLINES

MOLOTKOVSKY Jul. G., DMITRIEV P. I., NIKULINA L. F.,  
BERGELSON L. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The synthesis of fluorescence labeled acids – N-(9-anthroyl)-11-aminoundecanoic and 12-(9-anthroyl)-11-*trans*-dodecenoic – was accomplished. Acylation of egg yolk lysophosphatidyl choline with these acids led to the corresponding fluorescent phosphatidyl cholines. The fluorescence data for the obtained compounds were described.

---