



УДК 577.336 : 547.426.221'815.4.057 : 535.372

© 1991 г.

Ю. Г. Молотковский

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЛИПИДНЫЕ ЗОНДЫ НА ОСНОВЕ  
РОДАМИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

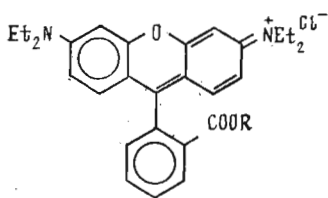
Синтезированы родаминовые липидные производные: *rac*-(2,3-диолеил)глицериновые эфиры родаминов В и 101, *cis*-9-октадециловый гомолог родамина 6G и *cis*-9-октадециловый эфир родамина 101. Показано, что эти соединения могут применяться как флуоресцентные зонды в мембранных исследованиях.

Родамины — группа красителей ксантенового ряда — широко применяются в научных исследованиях, в частности как лазерные красители и красители для флуоресцентной микроскопии. Родамины и их производные используются также в качестве флуоресцентных зондов при изучении мембран. Хотя родаминильные хромофоры содержат положительно заряженные группы и имеют значительные размеры, что неизбежно вызывает существенные нарушения ими мембранной упаковки, их преимущества (испускание в длинноволновой области, высокие молярный коэффициент поглощения и квантовый выход) обуславливают широкое применение родаминовых производных в мембранологии. Поскольку все родамины в заметной степени растворимы в воде, для мембранолога часто предпочтительнее оказываются их липидные производные. Так, действием на фосфолипид изотиоцианата родамина В получили N-родаминовое производное фосфатидилэтаноламина [1]. Более простое производное, октадециловый эфир родамина В, было получено этерификацией октадеканола родамином В хлорангидридным методом [2].

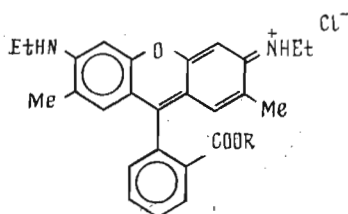
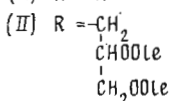
Применение родаминовых производных липидов в мембранологии довольно специфично и чаще всего основано на том, что они служат акцепторами энергии возбуждения других зондов. Их, например, используют для регистрации слияния двух популяций мембран. Если одна из них мечена родаминовым производным, а другая флуоресцеиновым, то слияние их приводит к появлению переноса энергии возбуждения флуоресцеинил → родаминил; уровень этого переноса служит мерой слияния двух популяций мембран [2].

Библиографию по применению в мембранологии родаминовых зондов можно найти в каталоге-справочнике фирмы Molecular Probes (США), составленном ее главой Хоглендом [3]. В каталоге этой фирмы кроме упомянутых выше веществ имеется ряд других липофильных производных родаминов, например октадециловые эфиры родаминов 6G и 101; синтезы этих зондов в доступной нам литературе не описаны. Известно, однако, что синтез самого родамина 6G (III) и его гомологов, эфиров низших спиртов, был осуществлен этерификацией исходной кислоты (III при R = H) соответствующими спиртами в присутствии серной кислоты [4].

Имея потребность во флуоресцентных зондах, испускание которых приходится на длинноволновую область спектра, мы предприняли синтез липидных производных родаминов В, 6G и 101. В качестве липофильной части зондов были применены остатки *rac*-(1,2-диолеил)глицерина или *cis*-9-октадецеанола (олеилового спирта). Ненасыщенные остатки были выбраны потому, что, по нашему опыту, липиды, несущие ненасыщенные алифатические цепи, лучше, чем аналогичные насыщенные соединения, встраиваются в мембраны.

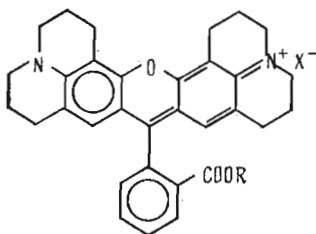


(I) R = H

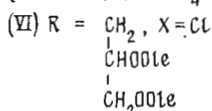


(III) R = Et

(IV) R =  $(\text{CH}_2)_8\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$



(V) R = H, X = ClO<sub>4</sub>



ole - олеил

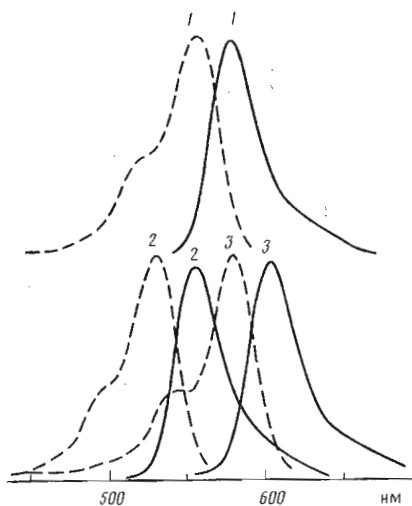
(VII) R =  $(\text{CH}_2)_8\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ , X = Cl

Из родамина В (I) его *rac*-(2,3-диолеил)глицериновый эфир (II) был получен путем стандартной этерификации в присутствии дициклогексилкарбодиимида и диметиламинопиридина. Точно таким же образом из родамина 101 (V) мы синтезировали его *rac*-(2,3-диолеил)глицериновый эфир (VI) и *cis*-9-октадецениловый эфир (VII).

Применить такую же методику для получения липидного аналога родамина 6G, имеющего вторичные аминогруппы и этерифицированную карбоксильную группу, было затруднительным — это потребовало бы введения нескольких дополнительных стадий. Поэтому *cis*-9-октадецениловый аналог красителя (IV) мы получили кислотной переэтерификацией родамина 6G избытком олеилового спирта.

Все родаминовые производные (II, IV, VI, VII) были выделены колоночной хроматографией, последовательно на окиси алюминия и силикагеле; они представляют собой аморфные хроматографически индивидуальные вещества. ТСХ на силикагеле родаминовых зондов, как и самих родаминов, сопряжена с некоторыми трудностями. Системы для проявления должны содержать кислоту, без чего красители на пластинке образуют вместо пятен полосы, несомненно, из-за частичного протонирования аминогрупп. Но и при содержании 3—5% уксусной кислоты в системе красители мигрируют компактными пятнами только на 3—4 см, затем пятна растягиваются. При увеличении же содержания кислоты в системе резко возрастает подвижность зондов — они оказываются вблизи фронта системы. Мы нашли выход в том, что пластинку с нанесенными веществами перед проявлением выдерживали в парах уксусной кислоты (см. «Экспериментальную часть») — все красители при этом мигрируют в виде компактных пятен.

Строение зондов (II, IV, VI, VII) было подтверждено с помощью спектральных данных. Их УФ-спектры повторяют спектры исходных родаминов (см. «Экспериментальную часть»); спектры возбуждения флуоресцен-



Спектры возбуждения (штрих) и испускания (сплошная линия) родаминовых зондов (в скобках далее указаны  $\lambda_{\text{возб}}$  и  $\lambda_{\text{исп}}$  (нм) для спектров возбуждения и испускания), снятые в этаноле: 1 — *rac*-(2,3-диолеил)глицеринового эфира родамина В (II) (610, 520); 2 — *cis*-9-октадеценилового аналога родамина 6G (IV) (600, 500); 3 — *rac*-(2,3-диолеил)глицеринового эфира родамина 101 (VI) (620, 540). Спектры 1 для удобства смещены вверх

ции зондов практически идентичны спектрам поглощения (рисунок). Это свидетельствует о том, что в ходе синтеза родаминовые флуорофоры изменений не претерпевают. В ИК-спектрах липидных зондов по сравнению со спектрами исходных родаминов резко возрастает интенсивность полос валентных колебаний C—H (2850—2920  $\text{см}^{-1}$ ). В спектрах зондов (II, VI) появляется сильная полоса поглощения 1733—1735  $\text{см}^{-1}$  сложноэфирных групп C=O (алифатических и ароматической) или в спектре зонда (VII) — при 1717  $\text{см}^{-1}$  (ароматический сложноэфирный карбонил); при этом исчезают полосы поглощения карбоксильной группы. В спектре же липидного зонда (IV) сохраняется та же полоса валентных колебаний C=O при 1716  $\text{см}^{-1}$ , что и в спектре исходного родамина (III).

Масс-спектры всех липидных зондов, снятые с ионизацией ускоренными атомами ксенона, дали ожидаемые пики ионов  $[M - X]^+$  (X — противоион, всюду  $\text{Cl}^-$ ).

Спектры флуоресценции, показанные на рисунке, повторяют спектры исходных красителей со сдвигом на несколько нанометров в длинноволновую область (спектры производных родамина 101 (VI, VII) идентичны; приведен один). Диапазон цвета спектров флуоресценции набора синтезированных зондов лежит в границах от оранжевого у зонда (II) до глубоко красного у зондов (VI, VII), что увеличивает возможности применения этих веществ в мембранных исследованиях.

Квантовые выходы липидных зондов, определенные в этаноле по сравнительному методу [5], оказались равными величинам для исходных красителей, которые были использованы как стандарты. Так как квантовый выход родамина В при комнатной температуре составляет около 0,5 [6], а родаминов 6G и 101 — около 1 [7], то соответственно такие же величины должны быть у зондов (II, IV и VI, VII).

Как показали предварительные опыты, все синтезированные зонды, прибавленные в виде растворов в полярных растворителях (этанол, диметилсульфоксид) к препаратам биологических (тени эритроцитов) или искусственных (фосфатидилхолиновые липосомы) мембран, эффективно в них встраиваются, что видно по быстрому увеличению интенсивности флуоресценции после добавления зонда (данные не приводятся). Мы пока что не пытались выяснить локализацию флуорофоров наших зондов в бислое, но полагаем, что они должны находиться в зоне полярных головок фосфолипидов. Это, в свою очередь, должно быть сопряжено с заметными нарушениями структуры бислоя, что необходимо учитывать при использовании родаминовых производных в мембранных исследованиях.

Родамин В-меченый триглицерид (II) был с успехом применен нами в качестве метчика клеток при поточной флуориметрии. Поскольку его флуорофор — хороший акцептор энергии возбуждения другого флуорофора, периленоильного ( $\lambda_{\text{исп}}$  500—520 нм), разделенное введение в две по-

пуляции клеток зонда (II) и перилеиноилмеченого триглицерида позволяет после смешения этих популяций регистрировать с помощью поточного цитофлуориметра кинетику слияния клеток двух типов и выделить субпопуляцию слившихся клеток [8].

То же производное родамина В (II) было использовано как донор энергии возбуждения для фотосистем I и II, что позволило получить препарат фотосинтетически активных растительных мембран [9].

### Экспериментальная часть

Все работы с родаминовыми красителями проводили при рассеянном свете ламп накаливания. УФ-спектры снимали на спектрофотометре Srepcord UV VIS (Carl Zeiss, ГДР) в этаноле, ИК-спектре — на приборе UR 11 (Carl Zeiss, ГДР) в  $\text{CCl}_4$ , спектры флуоресценции (корректированы) — на спектрофлуориметре Hitachi 650 (Япония) в этаноле, масс-спектры с ионизацией ускоренными атомами и регистрацией положительных ионов — на спектрометре Kratos MS-50-TC (Великобритания) (энергия атомов ксенона 8 эВ, матрица — глицерин).

Использовали родамин В, дициклогексилкарбодимид и 4-диметиламинопиридин (Fluka, Швейцария), родамин 6G и *rac*-1,2-диолеоилглицерин (Sigma, США), родамин 101 (Lambda Physik, ФРГ), силикагель 60 (63—200 мкм) и готовые пластинки с силикагелем 60 для ВЭТСХ (Merck, ФРГ); остальные реактивы — отечественного производства. Для ТСХ применяли систему хлороформ — изопропанол — метанол —  $\text{CH}_3\text{COOH}$  — вода, 80 : 15 : 8 : 3 : 1; пластинки перед проявлением выдерживали 10 мин в парах  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; обнаружение фосфорномолибденовой кислотой (непредельные соединения) и парами иода (диметиламинопиридин). Растворители очищали по обычным методикам. *цис*-9-Октадеценол (Merck, ФРГ) очищали дробной кристаллизацией из ацетона [10].

*rac*-(2,3-Диолеоил)глицериновый эфир родамина В (II). К раствору 146 мг (235 мкмоль) *rac*-1,2-диолеоилглицерина, 140 мг (292 мкмоль) родамина В и 40 мг (0,33 ммоль) 4-диметиламинопиридина в 2 мл сухого хлористого метилена при перемешивании прибавляли 300 мкл 20% раствора дициклогексилкарбодимида в  $\text{CCl}_4$  (296 мкмоль), а через 20 ч — еще 150 мкл. На следующий день к смеси добавляли 0,1 мл  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , перемешивали 1 ч, упаривали смесь в вакууме, остаток хроматографировали сначала на 15 г окиси алюминия (акт. III) в градиентной системе хлороформ — изопропанол, затем на 12 г силикагеля в градиентной системе хлороформ против смеси хлороформ — метанол —  $\text{CH}_3\text{COOH}$  — вода, 40 : 16 : 3 : 1, контроль ТСХ. Выделенный зонд растворяли в 10 мл хлороформа, интенсивно перемешивали 3 ч с 10 мл 20% водного NaCl, высушивали NaCl, фильтровали и упаривали. Получали 188 мг (74%) производного (II) в виде аморфной темно-красной массы;  $R_f$  0,60 ( $R_f$  родамина В 0,18). Масс-спектр:  $m/z$  1045 ( $[M - Cl]^+$ ). Видимый спектр:  $\lambda_{\text{макс}}$  558 нм ( $\epsilon$  92 000), плечо 520 нм. ИК,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 2920, 2845 (C—H алиф.), 1733 с (C=O алиф. сл. эф.), плечо 1715 (C=O аром. сл. эф.). Флуоресценция: максимум 585 нм ( $\lambda_{\text{возб}}$  520 нм).

*rac*-(2,3-Диолеоил)глицериновый эфир родамина 101 (VI). Получали как зонд (II) из 39 мг родамина 101 и 100 мг диолеина; аморфная темно-красная масса, выход 50 мг (67%),  $R_f$  0,62 (у родамина 101  $R_f$  0,22). Масс-спектр:  $m/z$  1094 ( $[M - Cl]^+$ ). Видимый спектр:  $\lambda_{\text{макс}}$  578 нм ( $\epsilon$  106 000), плечо 540 нм. ИК,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 2920, 2850 с (C—H алиф.), 1735 с (C=O алиф. сл. эф.), плечо 1715 (C=O аром. сл. эф.). Флуоресценция: максимум 602 нм ( $\lambda_{\text{возб}}$  540 нм).

*цис*-9-Октадецениловый эфир родамина 101 (VII). По методике, описанной для зонда (II), из 35 мг родамина 101 и 100 мг олеилового спирта получали 40 мг (80%) зонда (VII). Аморфное темно-красное вещество,  $R_f$  0,53 (у родамина 101  $R_f$  0,22). Масс-спектр:  $m/z$  741 ( $[M - Cl]^+$ ). Видимый спектр:  $\lambda_{\text{макс}}$  578 нм ( $\epsilon$  108 000), плечо 540 нм. ИК,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 2920, 2850 с (C—H алиф.), 1717 с (C=O сл. эф.). Флуоресценция: максимум 601 нм ( $\lambda_{\text{возб}}$  540 нм).

*цис-9-Октадецениловый эфир родамина 6G (IV)*. Смесь 1 г (2,09 ммоль) родамина 6G, 3,3 г (12,8 ммоль) олеилового спирта и 1 г *n*-толуолсульфокислоты выдерживали в темноте при 110° С, пропуская через смесь ток аргона. Ход реакции контролировали ТСХ: происходило накопление оранжевого производного (IV) с  $R_f$  0,51 и побочного продукта реакции красного цвета ( $R_f$  0,7); у исходного родамина 6G  $R_f$  0,15 (оранжевый). Через 55 ч смесь охлаждали, разбавляли 50 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и 100 мл эфира, промывали 10%  $\text{KHCO}_3$  (3 × 50 мл), водой и насыщ. NaCl (по 50 мл), высушивали  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Из остатка хроматографией выделяли (см. выделение зонда (II)) производное (IV), выход 0,79 г (53%). Масс-спектр:  $m/z$  666 ( $[\text{M} - \text{Cl}]^+$ ). Видимый спектр:  $\lambda_{\text{макс}}$  531 нм ( $\epsilon$  104 000), плечо 500 нм. ИК,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3190 с шир. (NH), 2920, 2850 с (C—H алиф.), 1716 с (C=O аром. сл. эф.). Флуоресценция: максимум 555 нм ( $\lambda_{\text{возб}}$  495 нм).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Struck D. K., Pagano R. E. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 11. P. 5404—5410.
2. Keller P. M., Person S., Snipes W. // J. Cell Sci. 1977. V. 28. P. 167—177.
3. Haugland R. P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Eugene (OR, USA): Molecular Probes, 1989. 234 P.
4. Bovet D. // Helv. chim. acta. 1934. V. 17. № 6. P. 1460—1465.
5. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зоны в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. С. 63, 64.
6. Karstens T., Kobs K. // J. Phys. Chem. 1980. V. 84. № 14. P. 1781—1872.
7. Reisfeld R., Zusman R., Cohen Y., Eyal M. // Chem. Phys. Lett. 1988. V. 147. № 2/3. P. 142—147.
8. Tertov V. V., Sayadyan H. S., Kalantarov G. F., Molotkovsky J. G., Bergelson L. D., Orekhov A. N. // J. Immunol. Methods. 1989. V. 118. № 1. P. 139—143.
9. Сорокин Е. М., Бобылев Г. С., Молотковский Юл. Г., Молотковский Юр. Г. Способ получения фотосинтетически активных тилакоидных мембран хлоропластов: А. с. 1477740 СССР. Зарегистр. 08.01.89.
10. Loev B., Dawson C. R. // J. Amer. Chem. Soc. 1956. V. 78. № 6. P. 1180—1183.

Поступила в редакцию  
12.VII.1990

Jul. G. MOLOTKOVSKY

#### FLUORESCENT LIPID PROBES, DERIVATIVES OF THE RHODAMINE DYES

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

Rhodamine lipid derivatives, *rac*-(2,3-dioleoyl)glycerol esters of Rhodamine B and Rhodamine 101, *cis*-9-octadecenyl homologue of Rhodamine 6G and *cis*-9-octadecenyl ester of Rhodamine 101, were synthesized and used as fluorescent membrane probes.