



УДК 547.953.672.7

**СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
С АНТРОИЛЬНОЙ И АНТРИЛЬНОЙ ГРУППАМИ ****Каплул А. И., Башарули В. А., Щукина Л. Г., Швец В. И.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Осуществлен синтез двух рядов флуоресцентно-меченых жирных кислот с антроильной и антрильной группами в конце цепи. Первые - 3-(2-антроил)пропановая, 6-(2-антроил)гексановая и 11-(2-антроил)ундекановая кислоты - получены ацилированием антрацена смешанными ангидридами соответствующих дикарбоновых и ортокремневой кислот в нитробензоле. Восстановление указанных кетокислот по Кижперу-Вольфу привело к 4-(2-антрил)бутановой, 7-(2-антрил)гептановой и 12-(2-антрил)додекановой кислотам соответственно.

Флуоресцентная спектроскопия в последнее время получила широкое распространение в качестве метода изучения как отдельных молекул (например, белков), так и надмолекулярных структур (например, биомембран) [2]. Объектами исследования данного метода являются системы, содержащие флуоресцирующие группы. Наиболее достоверные результаты получаются для природных флуоресцентов (белков, содержащих триптофан, порфириновых систем и т. п.).

Нефлуоресцирующие системы, такие, как модельные мембраны, изучаются с помощью флуоресцентных зондов, хотя зонды и вносят некоторые возмущения в изучаемый объект. Но так как концентрация зондов незначительна, из-за высокой чувствительности флуоресцентной спектроскопии этот метод дает приемлемые результаты, что следует из корреляции данных, полученных разными способами [3].

Для исследования мембран используются зонды двух типов: модифицированные компоненты мембран [3, 4] и вещества, инородные для биомембран (3-метоксibenзантрон, 1,8-диметиламинонафтилсульфонат, диметиламинохалкон и т. п. [2]). Топография последних в мембране определяется косвенными [5] и прямыми методами [6]. Положение флуоресцентных меток модифицированных мембранных компонентов обусловлено естественным положением веществ в мембране и локализацией флуоресцентных меток в липиде, которая задается направленным синтезом [3]. Применение зондов липидного характера для мембранных исследований является предпочтительным из-за их большего сходства с компонентами мембран по сравнению с зондами, подобными 1,8-диметиламинонафтилсульфонату.

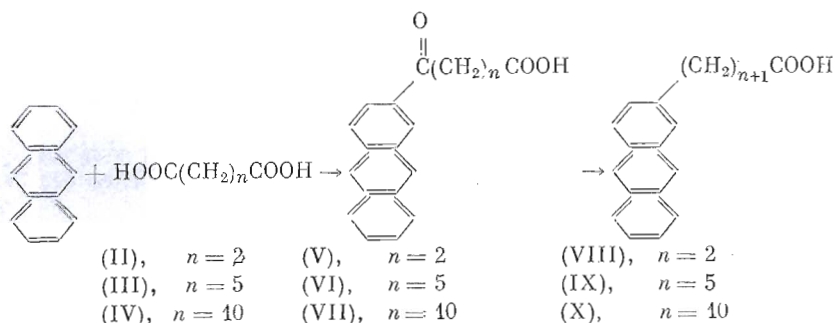
Простейшими липидными флуоресцирующими соединениями являются жирные кислоты с флуоресцентной группой. Они особенно удобны в том случае, когда есть набор таких кислот с флуоресцирующей группой в раз-

* Краткое сообщение см. [1].

личных положениях цепи. Примером подобных соединений могут служить зонды, полученные ацилированием 12-оксистеариновой, 16- и 2-оксипальмитиновых кислот 9-антрилкарбоновой кислотой [3], а также ненасыщенные жирные кислоты с антрильной группой в конце цепи, полученные в несколько стадий из 9-формилантрацена и ряда моно- и диниловых кислот [4]. Синтез перечисленных зондов отличается многостадийностью и использованием дефицитного сырья.

Настоящая работа посвящена разработке простейшего метода синтеза флуоресцентно-меченых жирных кислот с флуоресцентной группой в конце цепи. В качестве флуоресцирующей метки был выбран антрацен как наименьшая гидрофобная молекула, чья флуоресценция не накладывается на флуоресценцию белков. Для упрощения синтеза в отличие от описанных ранее методов [3, 4] использовался незамещенный антрацен.

Предлагаемый в статье метод позволяет получать из антрацена (I) и дикарбоновых кислот (II — IV) флуоресцентно-меченые жирные кислоты (V — VII), которые в один прием переводятся в флуоресцентно-меченые жирные кислоты (VIII — X) с другими флуоресцентными характеристиками. Таким образом, из антрацена и дикарбоновых кислот (II — IV) в две последовательные стадии получают два ряда флуоресцентно-меченых жирных кислот (V — VII и VIII — X).



Синтез кетокислот (V—VIII) осуществляли ацилированием антрацена (I) в нитробензоле при 18—20° С активированными производными дикарбоновых кислот (II — IV) — ацилсилоксанами, которые получали *in situ* непосредственно перед ацилированием [7]. Индивидуальные кислоты (V — VII) выделяли хроматографией на силикагеле (табл. 1).

Выбор дикарбоновых кислот обуславливался необходимостью получить набор флуоресцентных жирных кислот с флуоресцирующей группой, отстоящей на минимальное, среднее и максимальное расстояния от карбоксильной группы, что диктовалось потребностями мембранных исследований.

Поскольку заранее нельзя было с уверенностью сказать, в какое положение антрацена происходит ацилирование в данных условиях, одной из дикарбоновых кислот была выбрана янтарная (II), так как известны некоторые антроилпропановые кислоты [8]. По предложенному нами методу была получена 3-(2-антроил)пропановая кислота (V), что подтверждается совпадением физико-химических характеристик кислот, синтезированных нами и в работе [8]. Известны также некоторые корреляции между положением ацильного остатка в антраcene и свойствами ацилантраценов [9, 10]. Наиболее показательны в этом отношении спектры флуоресценции. Так, 9-ацилантрацены совершенно не флуоресцируют, а разница в положении максимума флуоресценции 1- и 2-ацилантраценов составляет 20 нм [10]. В УФ-спектрах колебательная структура наименее выражена у 1-ацилантраценов [11]. Вид спектров ПМР в области сигналов ароматических протонов также зависит от положения заместителя в антраценовом ядре и может служить для идентификации ацилантраценов [12].

Таблица 1

Физико-химические характеристики кислот (V-X)

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С (растворитель)	Найдено, %		Формула	Вычислено, %		R_f	Литературные данные [8], Т. пл., °С
			С	Н		С	Н		
(V)	41	220–221 (этил-ацетат)	78,31	5,13	$C_{18}H_{14}O_3$	78,68	5,07	0,16	220–221
(VI)	58	157–158 ($CHCl_3$)	78,69	6,41	$C_{21}H_{20}O_3$	78,73	6,29	0,21	—
(VII)	47	150–152 ($CHCl_3$)	80,44	7,74	$C_{26}H_{30}O_3$	79,97	7,74	0,36	—
(VIII)	73	194–196 ($CHCl_3$)	82,02	6,07	$C_{18}H_{16}O_2$	81,79	6,10	0,36	194–196
(IX)	74	162–164 ($CHCl_3$)	81,67	7,25	$C_{21}H_{22}O_2$	82,32	7,24	0,42	—
(X)	74	152–154 ($CHCl_3$)	82,81	8,51	$C_{26}H_{32}O_2$	82,93	8,57	0,48	—

Таблица 2

Спектральные характеристики кислот (V-X)

Соединение	УФ-спектр, λ_{\max} , нм (ϵ)	Спектр флуоресценции, λ_{\max} , нм		Масс-спектр, m/e (относительная интенсивность, %)	ИК-спектр, ν , cm^{-1}
		$CHCl_3$	C_2H_5OH		
(V)	265 (33000), 328 (2100), 345 (2500), 362 (2500), 386 (2300), 404 (2300)	447	476	278, M^+ (100), 220 (12), 205 (62), 177 (21), 60 (40)	3080, 2600–2800, 1705, 1690, 750, 690
(VI)	265 (32000), 328 (2000), 345 (2400), 362 (2400), 386 (2300), 404 (2200)	447	476	320, M^+ (100), 220 (69), 205 (71), 177 (40), 60 (25)	3080, 2600–2800, 1705, 1690, 750, 690
(VII)	265 (32000), 328 (2000), 345 (2300), 362 (2300), 386 (2200), 404 (2200)	447	476	390, M^+ (100), 220 (64), 205 (69), 177 (36), 60 (31)	3050, 2600–2800, 1700, 1690, 750, 690
(VIII)	250 (89000), 327 (2900), 342 (3400), 358 (4600), 378 (3900)	412	407	264, M^+ (100), 191 (84), 95,5 (5), 60 (4)	3060, 2600–2800, 1710, 750, 685
(IX)	250 (88000), 327 (2600), 342 (3100), 358 (4100), 378 (3600)	412	407	306, M^+ (100), 191 (80), 95,5 (4), 60 (8)	3060, 2600–2800, 1715, 755, 690
(X)	250 (87000), 327 (2400), 342 (3000), 358 (3900), 378 (3400)	412	407	376, M^+ (100), 191 (83), 95,5 (5), 60 (5)	3060, 2600–2800, 1710, 755, 690

Все синтезированные антроилкарбоновые кислоты (V–VII) имели максимум флуоресценции, характерный для 2-ацилантраценов [10], УФ-спектры отличались хорошо выраженной колебательной структурой, что, как указывалось, типично для 2-ацилантраценов [11]. Спектры ПМР в районе $\delta 7$ –9 м.д. практически идентичны со спектром 2-ацетилянтрацена и резко отличаются от спектров ПМР 1-ацетилянтрацена (1- и 2-ацетилянтрацены были получены по известной методике [9]). Таким образом, синтезированные кислоты (V–VII) идентифицировались как 3-(2-антроил)пропановая (V), 6-(2-антроил)гексановая (VII) и 11-(2-антроил)ундекановая (VIII) кислоты.

Известно, что флуоресцентные свойства простейших 2-ацилантраценов зависят от полярности растворителя [13], что оказалось присуще и синтезированным 2-антроилкарбоновым кислотам (V–VII). Разница в положении максимума флуоресценции для этих соединений в хлороформе и спирте составляла 29 нм (табл. 2). Это обстоятельство может оказаться очень полезным при использовании указанных кислот (V–VII) в качестве флуоресцентных зондов при исследовании таких свойств мембран, как

полярность отдельных областей мембран [2]. С другой стороны, использование кислот (V—VII) для исследования биологических объектов с помощью метода измерения миграции энергии с триптофана белков на данные зонды [2] не удобно, так как полосы поглощения триптофана (280 нм) и кислот (V—VII) значительно перекрываются.

Этот факт побудил нас синтезировать второй ряд флуоресцентно-меченых жирных кислот (VIII—X) с восстановленной кетогруппой, так как 2-алкилантрацены не поглощают в указанной области [14]. Кетогруппы кислот (V—VII) восстанавливались до метиленовых по Кижнеру — Вольфу. Реакция проводилась в диэтиленгликоле в присутствии избытка гидразин-гидрата и гидроокиси калия [15]. Хроматографически однородные кислоты (VIII—X) были выделены кристаллизацией (табл. 1). В результате восстановления 3-(2-антроил)пропановой кислоты (V) было получено вещество, идентичное 4-(2-антрил)бутановой кислоте (VIII) [8]. Спектральные свойства кислот (VIII—X) (УФ-спектры, спектры флуоресценции, спектр ПМР в районе $\delta 7$ —9 м.д.) оказались практически идентичными, что позволило идентифицировать соединения (IX, X) как 7-(2-антрил)гептановую и 12-(2-антрил)додекановую кислоты соответственно.

Положение максимума флуоресценции соединений (VIII—X) практически не зависит от полярности растворителя (табл. 2) в отличие от кетокислот (V—VII). В области ~ 280 нм антрилкарбоновые кислоты (VIII—X) не поглощают, а в области флуоресценции триптофана (365 нм) имеют полосу поглощения ($\epsilon \approx 4000$), что делает указанные кислоты пригодными для исследования мембран методом измерения миграции энергии с триптофана белков на зонды [2].

Строение соединений (V—X) подтверждалось также и другими спектральными данными. Так, в ИК-спектрах данных производных наблюдались полосы, соответствующие колебаниям ароматических C—H-связей (3080 см^{-1}), карбонильных групп: для соединений (V—VIII) 1705 см^{-1} (COOH) и 1690 см^{-1} (ArCO), для соединений (VIII—X) 1710 см^{-1} ; OH-группы в COOH 2900 — 2500 см^{-1} . В спектрах ПМР соединений (V—VII) наблюдался сложный мультиплет сигналов ароматических протонов с $\delta 7$ —9 м.д. (9 протонов) и группа сигналов алифатических протонов с $\delta 0,9$ — $2,8$ м.д. ($2n$ протонов); в спектрах ПМР восстановленных кислот (VIII—X) — группа сигналов с $\delta 7$ —9 м.д. и группа сигналов с $\delta 0,9$ — $2,8$ м.д. ($2n+2$ протона).

В масс-спектрах всех кислот (V—X) присутствовали пики с m/e 60, характерные для алифатических кислот [16], и пики молекулярных ионов (табл. 2). В отличие от алифатических кислот в масс-спектрах соединений (V—X) наиболее интенсивными были пики молекулярных ионов, что является типичным для жирноароматических соединений [16].

Для кетокислот (V—VII) наблюдалась фрагментация, характерная для ароматических кетонов: α -расщепление — m/e 205 ($C_{14}H_9CO$), m/e 177 ($C_{14}H_9$); β -расщепление с перегруппировкой Мак-Лафферти — m/e 220 [$C_{14}H_9C(OH)CH_2$] [16]. Для спектров восстановленных кислот (VIII—X) наиболее характерен пик с m/e 191 ($C_{14}H_9CH_2^+$), типичный для алкилароматических соединений [16]. Также наблюдался ряд двухзарядных ионов, наиболее интенсивным из которых был пик с m/e 95,5 ($C_{14}H_9CH_2^{2+}$), что подтверждает ароматическую природу данного фрагмента.

Экспериментальная часть

ИК-спектры снимали на спектрофотометре Perkin-Elmer 257 в вазелиновом масле, спектры ПМР — на импульсном фурье-спектрометре Bruker WP-60 (60 МГц) в дейтероацетоне относительно TMS, УФ-спектры — на спектрофотометре Hitachi EPS-3T в спирте (концентрация $2 \cdot 10^{-5}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ М), спектры флуоресценции на спектрофлуориметре Hitachi 204 в спирте и хлороформе (концентрация 10^{-5} М), $\lambda_{\text{возб}}$ 404 нм для соединений

(V—VII) и 378 нм для соединений (VIII—X). Масс-спектры снимали на приборе ЛКВ 2091 (энергия электронного пучка 30 эВ, температура ионизирующей камеры 90—100°С). Колоночная хроматография осуществлялась на силикагеле Л 100/160, ТСХ — на силуфоле UV-254 в системе эфир — петролейный эфир (3:1).

ω-(2-Антроил)карбоновые кислоты (V—VII). 100 ммоль дикарбоновой кислоты (II, III или IV) растворяли в 400 мл нитробензола, добавляли 75 ммоль четыреххлористого кремния и нагревали при перемешивании при 60—70°С в течение 2 ч, а затем при 80—90°С еще 8 ч. Добавляли 90 ммоль антрацена (I), охлаждали до 0°С и порциями присыпали 120 ммоль хлористого алюминия в течение 20 мин. После 1,5 ч перемешивания при 20°С реакционную массу разбавляли 100 мл ледяной воды и приливали 50 мл 6 н. соляной кислоты. Выпавший желтый осадок отфильтровывали, высушивали и промывали 200 мл бензола. Остаток экстрагировали 500 мл ацетона, экстракты упаривали и хроматографировали на колонке. Элюировали хлороформом.

ω-(2-Антрил)карбоновые кислоты (VIII—X). 10 ммоль кислоты (V, VI или VII) растворяли в 200 мл диэтиленгликоля, прибавляли 25 ммоль гидразин-гидрата и 50 ммоль гидроксида калия, кипятили 2 ч. Затем отгоняли воду и избыток гидразин-гидрата, повышая температуру отгонов до 195°С, после чего кипятили реакционную смесь еще 3 ч. Охлажденную реакционную смесь разбавляли 450 мл воды и выливали в 400 мл 6 н. соляной кислоты. В случае кислот (IX, X) выпадал осадок, который отфильтровывали и перекристаллизовывали из хлороформа. В случае кислоты (VIII) после подкисления реакционную массу экстрагировали 250 мл хлороформа, упаривали и кристаллизовали из этилацетата.

Выходы, константы, физико-химические характеристики синтезированных соединений приведены в табл. 1 и 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каплун А. П., Башарули В. А., Швец В. И. (1978) Биоорг. химия, 4, 1567—1568.
2. Добрецов Г. Е., Владимиров Ю. А. (1975) Итоги науки и техники. Биофизика, т. 5, с. 86—132, ВИНТИ, М.
3. Cadenhead D. A., Kellner R. M., Jacobson K., Papahadiopoulos D. (1977) Biochemistry, 16, 5386—5392.
4. Stoffel W., Michæelis G. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 7—20.
5. Radda G. K. (1974) Biochemistry, 12, 385—391.
6. Lesslauer W., Cain J. E., Blasie J. K. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1499—1508.
7. Юрьев Ю. К., Еляков Г. Б., Белякова З. В. (1954) Ж. общ. химии, 24, 1568—1571.
8. Cook J. W., Robinson A. M. (1938) J. Chem. Soc., 505—513.
9. Gore P. H. (1957) J. Org. Chem., 22, 135—138.
10. Красовицкий Б. М., Болотин Б. М. (1976) Органические люминофоры, с. 30—31. «Химия», М.
11. Jones R. N. (1945) J. Amer. Chem. Soc., 67, 2127—2152.
12. Jonathan N., Gordo S., Daily B. P. (1962) J. Chem. Phys., 36, 2443—2454.
13. Черкасов А. С. (1962) Оптика и спектроскопия, 12 (1), 73—80.
14. Friedel R. A., Orchin M. (1951) Ultraviolet spectra of aromatic compounds, Acad. Press, N. Y.—London.
15. Huang-Minlon (1946) J. Amer. Chem. Soc., 68, 2487—2488.
16. Сильверстейн Р., Басслер Г., Моррид Т. (1977) в кн.: Спектроскопическая идентификация органических соединений, с. 21—120, «Мир», М.

Поступила в редакцию
15.V.1979

SYNTHESIS OF FLUORESCENCE LABELED FATTY ACIDS WITH ANTHROYLIC AND ANTHRYLIC GROUPS

KAPLUN A. P., BASHARULI V. A., SHCHUKINA L. G., SHVETS V. I.

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

The synthesis of two series of the fluorescence labeled fatty acids bearing the anthroylic or anthrylic groups at the end of the chain has been performed. The first series includes 3-(2-anthroyl)propanoic, 6-(2-anthroyl)hexanoic and 11-(2-anthroyl)undecanoic acids which have been obtained by anthracene acylation with mixed decarboxylic and ortho-silicic acid anhydrides in nitrobenzene. 4-(2-Anthryl)butanoic, 7-(2-anthryl)-heptanoic and 12-(2-anthryl)dodecanoic acids have been prepared by reduction of the above ketoacids, respectively.