



УДК 547.295.94'781.3.05

## ПРОИЗВОДНЫЕ СТЕАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ С ИМИДАЗОЛИНОВЫМ НИТРОКСИЛЬНЫМ ФРАГМЕНТОМ

*Борин М. Л., Кедик С. А.*

*Научно-исследовательский институт по биологическим испытаниям химических соединений, Кунава Московской обл.*

*Володарский Л. Б.*

*Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения Академии наук СССР*

*Щвец В. И.*

*Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Описан синтез октадекан-7-спиро-2'-(N-оксил-4',5',5'-триметил- $\Delta^3$ -имидазолин)овой кислоты, ее этилового эфира и соответствующей имидазолиниевой соли. Показана возможность использования самой кислоты и ее этилового эфира в качестве нитроксильных зондов для исследования биологических объектов.

Спин-меченые гидрофобные соединения, такие, как жирные кислоты, липиды, стероиды, представляют собой важный класс спиновых меток и зондов [1], с помощью которых можно получить обширную информацию о молекулярной организации модельных и биологических мембран, белок-липидных взаимодействиях, состоянии липидов и структурных изменениях в мембранах [2]. Наиболее часто в таких исследованиях используют спин-меченые жирные кислоты с 1,3-оксазолидиновым (доксильным) нитроксильным фрагментом [3]. Однако соединения, содержащие доксильный фрагмент, неустойчивы при низких значениях pH, что ограничивает область их применения.

Ранее одним из нас был предложен метод синтеза  $\Delta^3$ -имидазолиноксидов, особенностью которых является устойчивость их в кислых средах [4, 5]; исходное соединение для их синтеза — хлоргидрат 3-гидроксиламино-3-метилбутан-2-она — легкодоступно [4].

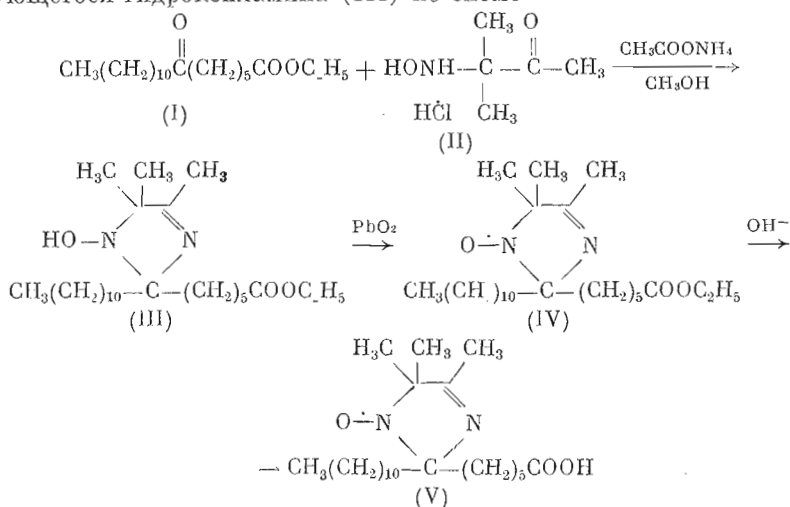
В литературе упоминалось о возможности введения  $\Delta^3$ -имидазолинового фрагмента в 10-е положение стеариновой кислоты [6].

Нами разработан препаративный метод синтеза спин-меченой стеариновой кислоты, содержащей имидазолиновый нитроксильный фрагмент в 7-м положении углеводородной цепи.

Значения параметров спектров ЭПР соединений (IV) и (V), включенных в препараты сывороточного альбумина и липосом при pH 7 (в скобках — при pH 2,5)

Параметр	В растворе альбумина		В суспензии липосом	
	(IV)	(V)	(IV)	(V)
$T_{  }$ , мГ	3,27	3,27 (3,12)	2,21	2,50
$T_{\perp}$ , мГ	0,64	1,01 (0,90)	0,93	0,85
S	1,81	0,61 (0,51)	—	1,91
$h_1/h_2$	0,96	0,71 (0,75)	0,52	0,65

Спин-меченый этиловый эфир стеариновой кислоты (IV) получали конденсацией этилсвого эфира 7-кетостеариновой кислоты (I) с хлоргидратом 3-гидроксиламино-3-метилбутан-2-она (II) в метаноле в присутствии в качестве источника аммиака ацетата аммония с последующим окислением образующегося гидроксиламина (III) по схеме



Этиловый эфир кетокислоты (I) мы получали из морфолинового сенамина циклогексанона и хлорангидрида декановой кислоты по известному методу [7].

Максимальная конверсия исходного эфира кетокислоты (I) на первой стадии синтеза (10–15%) достигнута нами через 48–72 ч. Попытки использовать в качестве источника аммиака карбонат аммония, а вместо метанола диоксан или ацетонитрил не привели к увеличению выхода целевого продукта.

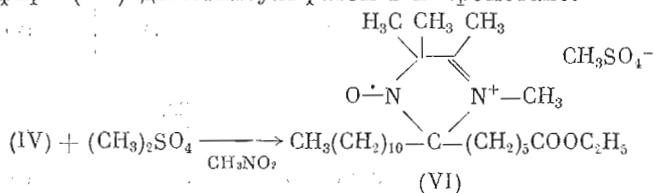
Образующийся при конденсации гидроксиламин (III) без промежуточной очистки окисляли двуокисью свинца в бензоле до соответствующего нитроксила (IV), который выделяли в индивидуальном виде колоночной хроматографией на силикагеле с выходом 55–60% в расчете на вступивший в реакцию эфир (I). При щелочном гидролизе спин-меченого эфира (IV) практически с количественным выходом образуется кислота (V).

Наличие иминогруппы в имидазолиновом фрагменте полученных спин-меченых соединений открывает возможности синтеза новых производных спин-меченых жирных кислот. Так, при алкилировании третичного атома азота 2, 2, 4, 5, 5-пентаметил- $\Delta^3$ -имидазолина образуются имидазолиновые соли [5].

Мы распространили этот метод на синтез эфира спин-меченой стеариновой кислоты с положительным зарядом в  $\Delta^3$ -имидазолиновом фрагменте. Такой зонд может представить интерес для изучения белок-липидных взаимодействий.

Кроме того, как показано в работе [5], замена иминогруппы иммониевой группировкой в гетероцикле  $\Delta^3$ -имидазолина повышает реакционную способность связи C=N; на основе такого фрагмента возможно создание липидных спиновых зондов, которые могли бы ковалентно связываться с биологическими объектами.

Имидазолиниевая соль (VI) получена нами с выходом 61% алкилированием эфира (IV) диметилсульфатом в нитрометане:



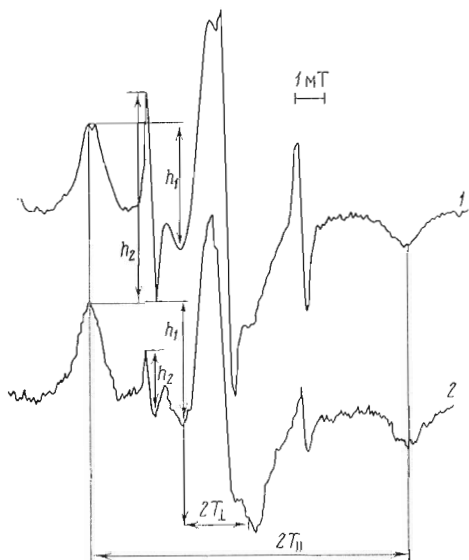


Рис. 1

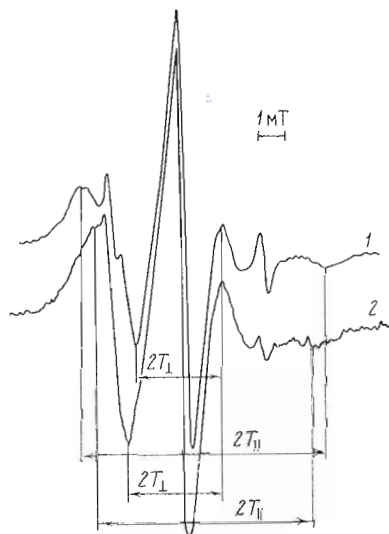


Рис. 2

Рис. 1. Спектр ЭПР спиин-меченой кислоты (V) (1) и ее этилового эфира (IV) (2) в растворе человеческого сывороточного альбумина (15 мг/мл) в изотоническом растворе NaCl, содержащем 10 мМ трис-HCl (pH 7,0). Концентрация зонда  $10^{-4}$  М

Рис. 2. Спектр ЭПР спиин-меченой кислоты (V) (1) и ее этилового эфира (IV) (2) в суспензии липосом (лецитин - холестерин, 9:1) в изотоническом растворе NaCl, содержащем 10 мМ трис-HCl (pH 7,0); концентрация зонда  $10^{-4}$  М, липидов - 8 мг/мл

Строение полученных соединений подтверждено данными оптической и радиоспектроскопии. В ИК-спектрах соединений (IV), (VI) содержатся полосы карбонила сложноэфирной группы при  $1740 \text{ см}^{-1}$ , а в ИК-спектре соединения (V) - карбоксильной группы при  $1715 \text{ см}^{-1}$ . В ИК-спектрах соединений (IV), (V) появляется полоса валентных колебаний связи  $\text{C}=\text{N}$  при  $1645 \text{ см}^{-1}$ . При переходе к соли (VI) эта полоса смещается к  $1670 \text{ см}^{-1}$ , что соответствует литературным данным [5, 8]. Масс-спектры соединений (IV), (V) согласуются с предложенной для них структурой. Спектры ЭПР растворов соединений (IV)-(VI) ( $10^{-3}$  М в этаноле) представляют собой характерные для нитроксильных радикалов триплеты [4] с константой расщепления соответственно 1,43; 1,45 и 1,34 мТ.

Полученные соединения могут быть использованы в качестве парамагнитных спиновых зондов. Мы исследовали встраивание спиин-меченой кислоты (V) и ее этилового эфира (IV) в липосомы и сывороточный альбумин. Исследование проводили при pH 7,0; кроме того, встраивание кислоты (V) в сывороточный альбумин исследовали при pH 2,5. Вид спектров (рис. 1, 2) свидетельствует о практически полной диффузии зондов в исследуемые объекты.

Из формы полученных спектров мы определили ряд параметров, позволяющих судить о структуре микроокружения зондов: значения тензоров сверхтонкой структуры  $T_{\parallel}$  и  $T_{\perp}$ , параметр упорядоченности  $S$ , характеризующий степень подвижности зонда в биологическом объекте, и параметр  $h_1/h_2$ , характеризующий степень связывания зонда с исследуемым объектом (таблица).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что синтезированные спиновые зонды могут оказаться полезными для изучения структуры и механизма действия биополимеров, а устойчивость таких липидных зондов при низких значениях pH расширяет возможности такого изучения.

## Экспериментальная часть

ИК-спектры снимали на спектрометре Perkin-Elmer 257 (США) в пленке или вазелиновом масле, масс-спектры — на приборе Hitachi RMU 6D (Япония) при температуре ионизационной камеры 250–270° С и энергии ионизирующих электронов 70 эВ. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре Varian E-4 (США) при амплитуде модуляции 0,1–0,2 мТ, частоте 100 кГц, развертке магнитного поля 2,5 Гс/мин при постоянной времени 0,3–1 с; поступающая в резонатор мощность — 10 мВт. Число спинов на 1 моль определяли по сравнению со спектрами растворов чистого нитроксильного радикала с известным содержанием числа спинов на 1 моль.

Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 100/160, ТСХ — на пластинках Silufol (Chemapol, ЧССР) в системе эфир — гексан, 2:1 (А), хлороформ — метанол — 20% аммиак, 40:3:0,2 (Б). Вещества на пластинках обнаруживали парами иода.

Все синтезированные вещества имели удовлетворительный элементный анализ.

В работе использовали человеческий сывороточный альбумин (Chemapol, ЧССР) и яичный лецитин отечественного производства [9].

Липосомы готовили по обычной методике [10].

Для изучения встраивания соединений (IV) и (V) в 100 мкл раствора альбумина или 100 мкл суспензии липосом (концентрация 15 и 8 мг/мл соответственно) в изотоническом растворе NaCl, содержащем 10 мМ трис-НСl (рН 7,0), вводили 1 мкл 1мМ раствора зонда в этаноле. Для исследования встраивания зонда (V) в альбумин при рН 2,5 образец с рН 7,0 подкисляли раствором HCl.

Фактор упорядоченности приближенно определяли по известной формуле:

$$S = \frac{T_{\parallel} - T_{\perp}}{T_{zz} - 1/2(T_{xx} + T_{yy})},$$

где  $T_{\parallel}$  и  $T_{\perp}$  — значения тензоров сверхтонкой структуры соответственно при параллельном и перпендикулярном направлениях магнитного поля, их определяли из спектров (рис. 1 и 2). Значения  $T_{xx}$ ,  $T_{yy}$  и  $T_{zz}$  взяты из литературных источников для близких по строению доксильных радикалов [11] (в связи с отсутствием необходимых табличных данных для имидазолиновых радикалов).

Ошибка при измерении  $T_{\parallel}$  и  $T_{\perp}$  составляла примерно 0,03 мТ.

*Этиловый эфир октадекан-7-спиро-2'-(N-оксил-4',5',5'-триметил- $\Delta^3$ -имидазолин)овой кислоты (IV)*. Смесь 2,80 г этилового эфира 7-кетостеариновой кислоты (I), 1,97 г хлоргидрата 3-гидроксиламино-3-метилбутан-2-она (II) и 1,98 г ацетата аммония в 100 мл метанола кипятили 30 ч. Реакционную смесь упаривали досуха и распределяли между 150 мл бензола и 100 мл насыщенного раствора  $K_2CO_3$ , бензольный слой сушили  $K_2CO_3$  и фильтровали. Полученный раствор соединения (III) перемешивали с 7,0 г  $PbO_2$  в течение 6 ч, фильтровали и концентрировали. Маслообразный остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесями петролейный эфир — эфир. Петролейным эфиром с 20% эфира вымывали 2,08 г не вступившего в реакцию исходного вещества (I), петролейным эфиром с 40% эфира — 0,53 г радикала (IV) в виде темно-желтого масла,  $R_f$  0,52 (А). Масс-спектр ( $m/z$ ): 423 ( $M^+$ ). Спектр ЭПР в этаноле:  $a_N$  1,43 мТ,  $5,5 \cdot 10^{23}$  спин/моль.

*Октадекан-7-спиро-2'-(N-оксил-4',5',5'-триметил- $\Delta^3$ -имидазолин)овая кислота (V)*. Раствор 0,17 г эфира (IV) и 0,05 г NaOH в 10 мл этанола выдерживали 10 ч при 60° С. Смесь упаривали наполовину, подкисляли до рН 3,0 добавлением 0,5 н. HCl и экстрагировали хлороформом. Хлороформный экстракт промывали водой, сушили  $Na_2SO_4$ , фильтровали и упаривали. Получали 0,142 мг (95%) кислоты (V) в виде темно-желтого воскообразного вещества.  $R_f$  0,25 (А). Масс-спектр ( $m/z$ ): 395 ( $M^+$ ). Спектр ЭПР в этаноле:  $a_N$  1,45 мТ,  $5,0 \cdot 10^{23}$  спин/моль.

Метилсульфат 2-(5'-карбэтоксиамил)-2-ундецил-3,4,5,5-тетраметил- $\Delta^3$ -имидазолиний-1-оксила(VI). К 0,073 г эфира (IV) в 5 мл сухого нитрометана прибавляли 0,03 мл свежеперегнанного диметилсульфата в 1 мл нитрометана, смесь выдерживали 20 ч при 20° С. Выпавший осадок отфильтровывали, остаток упаривали и получали 0,056 г соли (VI) в виде темно-желтого вязкого масла.  $R_f$  0,7 (Б). Спектр ЭПР в этаноле:  $a_N$  1,34 мТ,  $5,8 \cdot 10^{23}$  спин/моль.

Авторы выражают благодарность О. М. Панасенко за снятие спектров ЭПР и участие в обсуждении полученных результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Жданов Р. И. Парамагнитные модели биологически активных соединений. М.: Наука, 1981.
2. Метод спиновых зондов. Теория и применение/Ред. Берлинер Л. М.: Мир, 1979.
3. Keana J. F. W. Chem. Rev., 1978, v. 78, № 1, p. 37-64.
4. Volodarsky L. B., Grigor'ev I. A., Sagdeev R. Z. In: Biological magnetic resonance/Eds Berliner L. J., Reuben J. New York - London: Plenum Press, 1980, v. 2, p. 169-241.
5. Володарский Л. Б., Резников В. А., Кобрин В. С. Ж. орган. химии, 1979, т. 15, № 2, с. 415-422.
6. Жданов Р. И., Ромашина Т. И., Володарский Л. Б., Розанцев Э. Г. Докл. АН СССР, 1977, т. 236, № 3, с. 605-608.
7. Stork G., Brizzolara A., Landesman H., Szmuszkowicz J., Terrell R. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 2, p. 207-222.
8. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. М.: Изд-во иностр. лит., 1963, с. 387.
9. Швец В. И., Селников Г. А., Голбець И. И., Орлова Г. Л., Краснопольский Ю. М. Фармацевт. ж., 1977, т. 4, № 1, с. 79-81.
10. Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. J. Mol. Biol., 1965, v. 13, № 1, p. 238-252.
11. Hubbell W. L., McConnell H. M. J. Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 2, p. 314-326.

Поступила в редакцию  
17.V.1983

#### STEARIC ACID DERIVATIVES COMPRISING AN IMIDAZOLINE NITROXYL FRAGMENT

BORIN M. L., KEDIK S. A., VOLODARSKII L. B., SHVETS V. I.

Research Institute for Biological Testing of Chemical Compounds, Kuybyshev;  
Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the  
USSR, Novosibirsk; M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

The synthesis of octadecan-7-spiro-2'-(N-oxyl-4',5',5'-trimethyl- $\Delta^3$ -imidazoline) oic acid, its ethyl ester and corresponding imidazolium salt has been carried out. The utility of the acid and its ethyl ester as paramagnetic probes for studies on biological objects has been demonstrated.