



УДК 547.295.94/672.1.057

СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ АНАЛОГОВ СТЕАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ

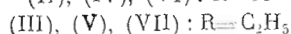
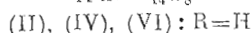
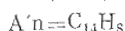
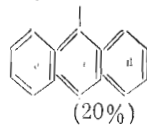
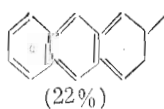
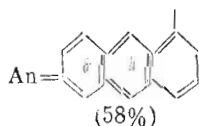
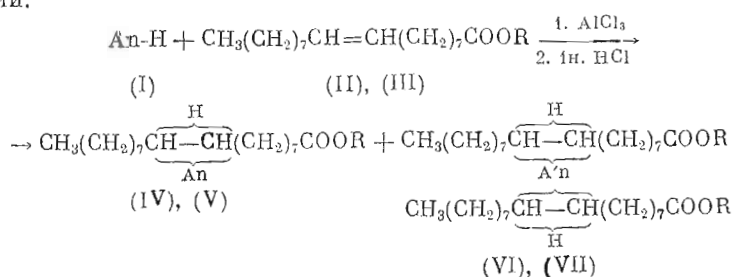
Богомоллов О. В., Каплун А. П., Швец В. И.

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

Предложен метод синтеза флуоресцентно-меченых жирных кислот с антрильным флуорофором в середине полиметиленовой цепи алкилированием антрацена природными ненасыщенными жирными кислотами или их этиловыми эфирами по Фриделю – Крафтсу. Из олеиновой кислоты получена 9(10)-антрилстеариновая кислота. Место присоединения антрацена к полиметиленовой цепи определяется локализацией двойной связи в молекуле жирной кислоты. Алкилирование антрацена происходит в положения 1, 2 и 9 в соотношении 58, 22 и 20%.

К настоящему времени известно несколько примеров синтеза флуоресцентно-меченых жирных кислот с антраценовыми флуорофорами [1–5]. Все они, за исключением ω-(2-антроил) карбоновых кислот [4, 5], получаются многостадийным синтезом. Мы предлагаем простой метод, позволяющий в одну стадию получать жирные кислоты с антрильной группой в середине цепи, алкилированием природными ненасыщенными жирными кислотами, например олеиновой, антрацена по Фриделю – Крафтсу. Ранее подобный метод мы использовали для введения флуоресцентной метки в яичный фосфатидилхолин [6].

Реакцию проводили в хлороформе, хлористом метиле, нитробензоле и дихлорэтано. Лучшие результаты получены в последнем случае. Всегда использовали 1,5-кратный избыток антрацена (I), так как при меньших его количествах значительно возрастал выход дикарбоновых кислот (VI), (VII). Хлористый алюминий брали в двукратном избытке. Большие количества хлористого алюминия приводили к заметному появлению в реакционной смеси продуктов самоконденсации антрацена [7] и соответствующих аренстеариновых кислот, наличие которых подтверждалось масс-спектрами.



При алкилировании антрацена свободной олеиновой кислотой выход антрилстеариновой кислоты (IV) не превышал 5%. По-видимому, это объясняется тем, что жирные кислоты в растворе образуют мицеллы [8] и реальная концентрация жирной кислоты, равная критической концентрации

Химические сдвиги ароматических протонов антрацена, 1-этил-, 2-этил- и 9-изопропилантрацена и этил-9(10)-антрилстеарата (V)

Н-Атом	Антрацен	9-Изопропилантрацен	1-Этилантрацен	2-Этилантрацен	Этил-9(10)-антрилстеарат (V)
1	8,01	8,49	—	7,77	7,68 (2) *
2	7,47	7,47	7,39	—	7,44
3	7,47	7,47	7,39	7,36	7,44
4	8,01	8,01	7,90	7,99	7,87 (1)
5	8,01	8,01	8,04	7,99	8,00
6	7,47	7,47	7,49	7,45	7,44
7	7,47	7,47	7,49	7,45	7,44
8	8,01	8,49	8,04	7,93	8,00
9	8,44	—	8,63	8,36	8,35 (2); 8,69 (1)
10	8,44	8,35	8,46	8,40	8,31 (9); 8,37 (2); 8,42 (1)

* Цифры в скобках обозначают место заместителя в антраценовом ядре. По соотношению интенсивностей этих сигналов определялось соотношение изомеров.

мицеллообразования, очень мала, тогда как двойные связи в мицеллах жирных кислот менее доступны для антрацена.

Поэтому в дальнейшем в качестве исходного вещества мы использовали не свободную олеиновую кислоту, а ее этиловый эфир. Выход этилового эфира антрилстеариновой кислоты (V) достигал 26%. Омылением эфира (V) получали кислоту (IV), идентичную полученной алкилированием антрацена свободной олеиновой кислотой.

Строение выделенных веществ устанавливали элементарным анализом, УФ, ИК-, масс-спектрометрией и спектрами ПМР.

Место присоединения антрацена к полиметиленовой цепи жирной кислоты определяется локализацией двойной связи в молекуле жирной кислоты. Таким образом, получалась смесь 9- и 10-антрилстеариновых кислот (IV) или их этиловых эфиров (V), что подтверждалось и соотношением интенсивностей пиков фрагментов $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CHC}_{14}\text{H}_9]^+$ в масс-спектре эфира (V).

На основе анализа спектра ПМР эфира (V) и сопоставления его со спектрами специально для этих целей синтезированных 1- и 2-этилантраценов и 9-изопропилантрацена был сделан вывод, что алкилирование антрацена происходит неизбирательно, так как спектр ПМР эфира (V) представляет наложение спектров 1-, 2- и 9-алкилантраценов (таблица). По интегральной кривой вычислено соотношение изомеров: 1-алкил — 58%, 2-алкил — 22%, 9-алкилантрацен — 20%.

По положению максимумов поглощения УФ-спектры веществ (IV), (V) также несколько отличались от спектров 1-, 2- и 9-алкилантраценов. Спектры флуоресценции эфира (V) и кислоты (IV) в органических растворителях практически одинаковы и мало зависят от полярности растворителя, вид их характерен для большинства алкилантраценов [2–5, 9].

Отсутствие значительного поглощения в районе 280–290 нм у антрилстеариновой кислоты (IV) и ее эфира (V) и интенсивное поглощение в области 350 нм позволяют использовать их в качестве акцепторов индуктивно-резонансного переноса энергии с ароматических аминокислот белков [10].

Таким образом, спектральные исследования показали, что 9(10)-антрилстеариновая кислота (IV) может быть использована в качестве флуоресцентного зонда для исследования мембран, а также для получения флуоресцентно-меченых липидов.

Экспериментальная часть

Температуры плавления определены на блоке Кофлера и не исправлены. ИК-спектры измерены на спектрофотометре Perkin-Elmer 257, УФ-спектры — на спектрофотометре Hitachi EPS-3T (Япония), спектры флуоресценции — на флуориметре Aminco SPF-1000 (США), масс-спектры — на спектрометре Varian MAT-311A (ФРГ), спектры ПМР — на

импульсном фурье-спектрометре Bruker WH-250 (США). Удаление растворителей проводили в вакууме при температуре не более 40° С. Для колоночной хроматографии применяли нейтральную окись алюминия II степени активности по Брокману (Reanal, Венгрия) и силикагель L100/160 (Chemapol, Чехословакия), для ТСХ — силуфол UV-254 (Kavalier, Чехословакия). ТСХ осуществляли в системах: гексан — диэтиловый эфир, 9:1 (А), гексан — диэтиловый эфир, 3:2 (Б); для обнаружения использовали флуоресценцию при УФ-облучении (а) и пары иода (б).

Олеиновую кислоту получали из оливкового масла по методике [11] и перед применением дополнительно очищали хроматографией на силикагеле в системе гексан — диэтиловый эфир, 92:8.

Этиловый эфир олеиновой кислоты синтезировали кипячением ее (3 ч) в 0,6 н. растворе серной кислоты в этаноле с последующей перегонкой в вакууме и хроматографией на окиси алюминия в гексане.

9-Изопропилантрацен получали из бромистого изопронила и 9-антрацена по методу [12], т. пл. 75–76° С. Ацетилированием антрацена хлористым ацетилом в бензоле [13] получали 1- и 2-ацетилантрацены. 2-Ацетилантрацен выделяли перекристаллизацией из бензола, т. пл. 193–194° С (лит. данные: т. пл. 185–186° С [11]), а 1-ацетилантрацен — из этилацетата, т. пл. 109–110° С (лит. данные: т. пл. 105–106° С [13]). Восстановление соответствующих ацетилантраценов по Кижнеру — Вольфу гидразингидратом в присутствии гидроокиси калия [14] приводило к 1- и 2-этилантраценам.

Этиловый эфир 9(10)-антрилстеариновой кислоты (V) и бис[9(10)-(1-этоксикарбонилгептадецил)]антрацен (VII). К раствору 0,35 г антрацена в 15 мл сухого свежеперегнанного дихлорэтана добавляли при перемешивании пятую часть (из общего количества 0,35 г) безводного хлористого алюминия, охлаждали смесь до 0° С и прибавляли в течение 25 мин по каплям раствор 0,4 г этилолеата (III) в 10 мл сухого дихлорэтана попеременно с оставшимся количеством хлористого алюминия, после чего перемешивали еще 30 мин при 0–5° С. Перемешивание продолжали до достижения 20° С и еще 1 ч (всего ~2,5 ч). Затем к смеси приливали 25 мл 1 н. HCl, охлажденной до 0° С, промывали водой (2×50 мл), сушили Na₂SO₄, фильтровали и фильтрат упаривали. К остатку прибавляли 20 мл гексана, нерастворившийся антрацен отсасывали, промывали гексаном и фильтрат упаривали. Остаток (0,55 г) хроматографировали на колонке с 25 г силикагеля в ступенчатой градиентной системе гексан — диэтиловый эфир. Состав фракций контролировали ТСХ в системе А (обнаружение: а, б). Получали 0,17 г (26,1%) эфира (V) в виде светло-желтого масла, *R_f* 0,40 (А); УФ (гексан), λ_{макс}, нм (ε): 257 (56 300), 332 (1600), 346 (2700), 365 (3500), 383 (2900); ИК (вазелиновое масло), ν, см⁻¹: 3080 (С—Н в Ar), 1750 (С=О в COOR), 1640, 1630 (С=C в Ar); спектр флуоресценции (гексан, возбуждение при 360 нм): λ_{макс} 415 нм; масс-спектр, *m/z*: 488 (M⁺), 219 [CH₃(CH₂)₈CHC₁₄H₉]⁺; 205 [CH₃(CH₂)₇CHC₁₄H₉]⁺, 191 (C₁₄H₉CH₂⁺), 177 (C₁₄H₉⁺). Найдено, %: С 83,41, Н 10,20. C₃₄H₄₈O₂. Вычислено, %: С 83,55, Н 9,90. Затем вымывали 0,07 г (13,4%) диалкилантрацена (VII) в виде оранжевого масла, *R_f* 0,22 (А); УФ (гексан), λ_{макс}, нм (ε): 260 (75 800), 374 (3600); ИК (вазелиновое масло), ν, см⁻¹: 3040 (С—Н в Ar), 1740 (С=О в COOR), 1640, 1630 (С=C в Ar); спектр флуоресценции (гексан, возбуждение при 365 нм): λ_{макс} 420 нм; масс-спектр, *m/z*: 798 (M⁺), 488 [C₁₇H₃₄(C₁₄H₉)COOC₂H₅]⁺, 311 (C₁₇H₃₄COOC₂H₅⁺), 191 (C₁₄H₉CH₂⁺), 177 (C₁₄H₉⁺). Найдено, %: С 81,20, Н 10,84. C₅₄H₈₀O₄. Вычислено, %: С 81,15, Н 10,85.

9(10)-Антрилстеариновая кислота (IV). 1) К раствору 1,42 г антрацена в 50 мл сухого свежеперегнанного дихлорэтана добавляли при перемешивании пятую часть (от 1,42 г) безводного хлористого алюминия, охлаждали смесь до 0° С и прибавляли в течение 40 мин по каплям раствор 1,50 г олеиновой кислоты (II) в 25 мл сухого дихлорэтана попеременно с оставшимся количеством безводного хлористого алюминия. Далее реакцию и обработку реакционной смеси проводили так же, как при получении эфира (V). Получали 0,12 г (4,9%) кислоты (IV) в виде желтого масла,

R_f 0,53 (Б); УФ (гексан), $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ): 257 (51700), 332 (1600), 347 (2800), 365 (3500), 384 (2900); ИК (вазелиновое масло), ν , см^{-1} : 3200–2500, 1710 (C=O в COOH), 1635, 1620 (C=C в Ar); спектр флуоресценции (гексан, возбуждение при 360 нм): $\lambda_{\text{макс}}$ 415 нм. Найдено, %: C 83,30, H 9,71. $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_2$. Вычислено, %: C 83,43, H 9,63.

2) Раствор 0,15 г эфира (V) и 0,04 г NaOH в 6,5 мл этанола выдерживали 5 ч при 60° С, смесь упаривали до половины первоначального объема, подкисляли 0,5 н. HCl до pH 3 и экстрагировали хлороформом (3×20 мл). Экстракт промывали водой (2×50 мл), сушили Na_2SO_4 , фильтровали, осадок промывали хлороформом и фильтрат упаривали. Получали 0,13 г (94%) кислоты (IV), идентичной кислоте, полученной по методу (1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Waggoner A., Stryer L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 67, № 2, p. 579–589.
2. Stoffel W., Michaelis G. Z. Physiol. Chem., 1976, B. 357, № 1, S. 7–19.
3. Мологковский Ю. Г., Дмитриев П. И., Никулина Л. Ф., Бергельсон Л. Д. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 588–594.
4. Каплун А. П., Башарули В. А., Шукина Л. Г., Швец В. И. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1826–1830.
5. Bony J., Tosanne J.-F. Chem. Phys. Lipids, 1983, v. 32, № 2, p. 105–121.
6. А. с. 1068441 (СССР) Способ получения флуоресцентного фосфатидилхолина / Богомолов О. В., Каплун А. П., Швец В. И. Заявл. 29.09.82 г., № 3496065/04; Опубл. в Б. И. 1984, № 3.
7. Томас Ч. Безводный хлористый алюминий в органической химии. М.: Иностранная литература, 1949, с. 712–724.
8. Тютюнников Б. Н. Химия жиров. М.: Пищевая пром-сть, 1974, с. 51–58.
9. Красовицкий Б. М., Болотин Б. М. Органические люминофоры. М.: Химия, 1976, с. 30–31.
10. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980, с. 43–47.
11. Schlenk H., Holman R. J. Amer. Chem. Soc., 1950, v. 72, № 11, p. 5001–5004.
12. Klemm L., Reed D., Miller L., Ho B. J. Org. Chem., 1959, v. 24, № 10, p. 1468–1477.
13. Gore P. J. Org. Chem., 1957, v. 22, № 2, p. 135–138.
14. Huang-Minlon. J. Amer. Chem. Soc., 1946, v. 68, № 12, p. 2487–2488.

Поступила в редакцию
11.X.1983

SYNTHESIS OF FLUORESCENT ANALOGUES OF STEARIC ACID

BOGOMOLOV O. V., KAPLUN A. P., SHVETS V. I.

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

A method for preparing fluorescence labeled fatty acids with anthryl fluorophore in the middle of polymethylene chain by Friedel – Crafts alkylation of anthracene with natural unsaturated fatty acids or their ethyl esters is described. 9(10)-Anthryl stearic acid is prepared from oleic acid. The site of anthracene attachment to the polymethylene chain depends on the double bond localization in a fatty acid molecule. The extent of anthracene alkylation at positions 1, 2 and 9 is 58, 22 and 20%, respectively.