



УДК 577.366+547.953'67/68.057+547.295'67/68.057

МЕМБРАННЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ

II.* АЛКИЛИРОВАНИЕ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ
УГЛЕВОДОРОДОВ ПО ФРИДЕЛЮ — КРАФТСУ — УДОБНЫЙ МЕТОД
ВВЕДЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МЕТКИ В ГИДРОФОБНУЮ ОБЛАСТЬ
ПРИРОДНЫХ ЛИПИДОВ

*Вогомоллов О. В., Якунина Н. Б., Каплун А. П.,
Швец В. И.*

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

Алкилирование пирена олеиновой или 10-ундеценовой кислотами в условиях реакции Фриделя — Крафтса получены соответственно 9(10)-(4-пиренил)стеариновая и 10(11)-(4-пиренил)ундекановая кислоты. Аналогично взаимодействием антрацена и пирена с яичными фосфатидилхолином и фосфатидилэтаноламином, фосфатидилинозитом из пекарских дрожжей или дифосфатидилглицерином из сердечной мышцы крупного рогатого скота синтезированы флуоресцентные аналоги природных фосфолипидов. Методами химического и ферментативного расщепления установлено, что метка локализуется преимущественно в ацильных остатках во втором положении глицеринового скелета молекулы фосфолипида.

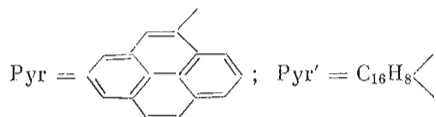
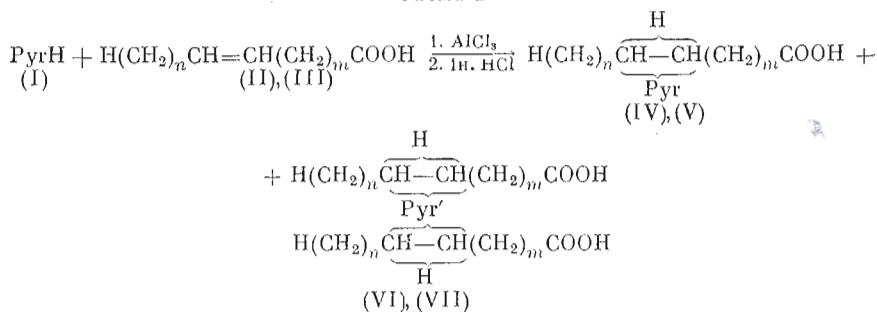
В арсенале современных методов исследования модельных и биологических мембран прочное место занял метод флуоресцентных зондов [2]. Удобными мембранными зондами зарекомендовали себя флуоресцентные аналоги природных фосфолипидов, естественных компонентов биологических мембран [3]. Разнообразие решаемых с их помощью задач требует применения зондов, различающихся как по спектральным параметрам флуорофора, так и по типу фосфолипида и по месту локализации метки в его молекуле. Ранее мы сообщали об одностадийном методе получения антрисодержащих аналогов стеариновой кислоты и яичных фосфолипидов — фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина и меткой в гидрофобной области молекулы, алкилированием антрацена по Фриделю — Крафтсу олеиновой кислотой [4] или соответствующими природными фосфолипидами [4, 5]; в настоящей работе мы описываем приложение этого метода к более сложным анионным фосфолипидам: фосфатидилинозиту из пекарских дрожжей и дифосфатидилглицерину из сердечной мышцы крупного рогатого скота.

Метод алкилирования ароматических углеводородов олефинами по Фриделю — Крафтсу в принципе может быть использован для введения в гидрофобную область липидов и других ароматических флуорофоров, например пиренильного остатка. Выбор этой метки обусловлен способностью как самого пирена, так и его производных образовывать эксимеры, легко регистрируемые в условиях эксперимента — это открывает дополнительные методические возможности использования пиренилсодержащих зондов [6]. Данная работа посвящена исследованию взаимодействия пирена с олеиновой и 10-ундеценовой кислотами, а также с фосфолипидами: яичными фосфатидилхолином и фосфатидилэтаноламином, фосфатидилинозитом из пекарских дрожжей и дифосфатидилглицерином из сердечной мышцы крупного рогатого скота.

Алкилирование пирена (I) олеиновой (II) и 10-ундеценовой (III) кислотами осуществляли в условиях, аналогичных алкилированию антрацена олеиновой кислотой [4]: при комнатной температуре в среде дихлорэтана с использованием 1,5-кратного избытка пирена и 2-кратного из-

* Сообщение I см. [1].

Схема 1



(II), (IV), (VI): $m = 7; n = 8$
 (III), (V), (VII): $m = 8; n = 0$

бытка безводного хлористого алюминия (схема 1). Выход соответствующей пиренилкарбоновой кислоты (IV), (V) достигал 30–37%, при этом образовывалось также до 5% диалкилпиренов (VI), (VII). Методом масс-спектрометрии было установлено, что при алкилировании пирена олеиновой кислотой, так же как в случае алкилирования антрацена, получалась смесь 9- и 10-пиренилстеариновых кислот (IV): в спектре пиренилстеариновой кислоты кроме сигнала молекулярного иона (m/z 484) наиболее интенсивными наблюдались сигналы фрагментов $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CHPyr}]^+$ и $[\text{CH}(\text{Pyr})(\text{CH}_2)_m\text{COOH}]^{+}$ ($m, n=7, 8$). Место присоединения пиренильного остатка к полиметиленовой цепи кислоты (V) устанавливали с помощью спектроскопии ПМР. По соотношению интенсивностей сигналов протонов С-концевой метильной группы и метиленовой группы в α -положении к карбоксилу (0,80 и 2,35 м.д. соответственно) вычислено, что в пиренилундекановой кислоте (V) 88% пиренильных остатков присоединяется к концевому С11-, а 12% — к С10-атому молекулы. В случае этилового эфира антрилундекановой кислоты, полученного по методике, описанной для этилового эфира антрилстеариновой кислоты [4], содержание антрильного остатка при С11 и С10 составляло соответственно 64 и 36% — такая разница может объясняться тем, что более объемистая пиренильная группа, по-видимому, испытывает большие, чем антрильная, стерические затруднения при присоединении к С10-атому углеводородной цепи кислоты.

Ранее методом спектроскопии ПМР было установлено, что при алкилировании антрацена олеиновой кислотой или ее этиловым эфиром происходит замещение в антрацене по 1, 2 и 9-му положениям в соотношениях 58, 22 и 20% соответственно [4]. С помощью препаративной ВЭЖХ на обращенной фазе в системе метанол — ацетонитрил (9:1) для полученного ранее этилового эфира 9(10)-антрилстеариновой кислоты [4] осуществлено разделение изомеров по месту замещения в антраценовом ядре. Этил-9(10)-(9-антрил)стеарат имеет время удерживания 1,21 ч, -(1-антрил)стеарат — 1,38 ч и -(2-антрил)стеарат — 1,50 ч. Спектры ПМР выделенных изомеров в области сигналов ароматических протонов, а также УФ-спектры идентичны спектрам соответствующих алкилантраценов, синтезированных ранее [4]. Соотношение изомеров оказалось близким к рассчитанному на основании анализа спектров ПМР: 1-антрил — 2-антрил — 9-антрил = 51 : 23 : 26.

Характер замещения в пирене для кислот (IV), (V) определяли с помощью спектроскопии ^{13}C -ЯМР. Сопоставление спектров метиловых эфиров пиренилстеариновой и пиренилундекановой кислот со спектром образца метил-4-(1-пиренил)бутирата показало, что пирен в них замещен

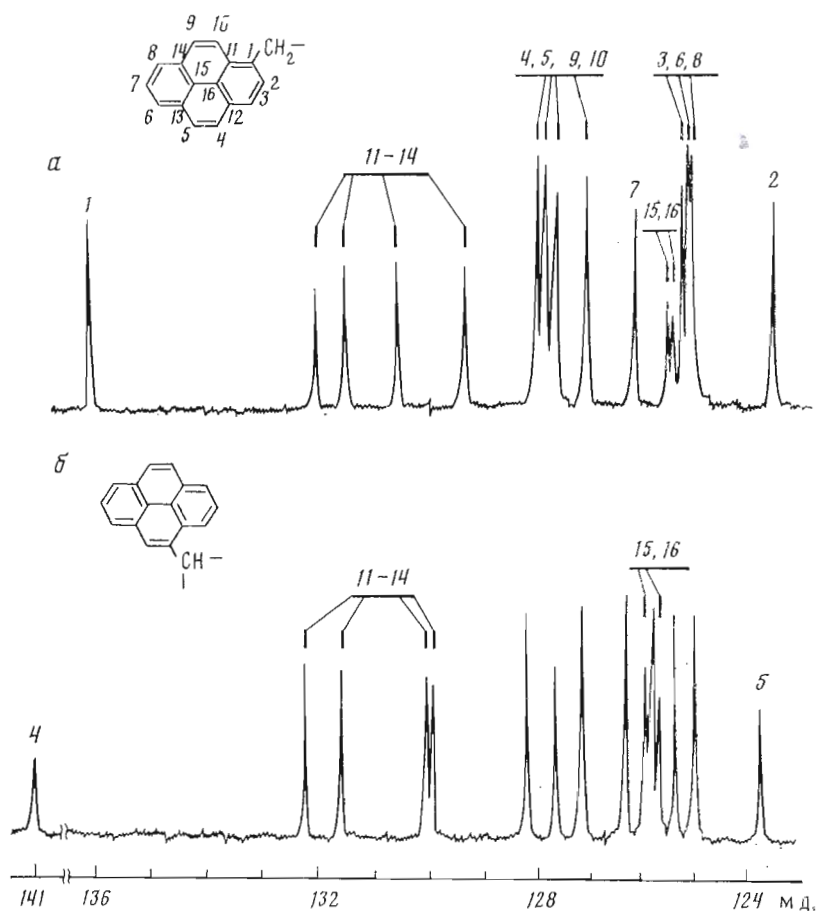
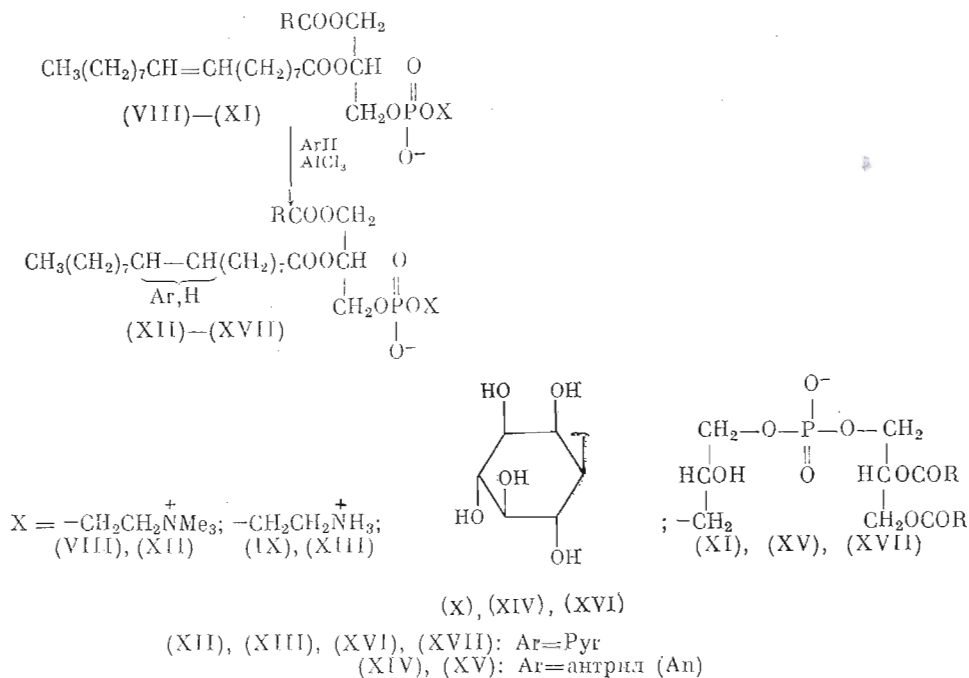


Рис. 1. Спектры ^{13}C -ЯМР (62,9 МГц, область сигналов ароматических С-атомов) метил-4-(1-пиренил)бутирата (а) и метилового эфира 9(10)-(4-пиренил)стеариновой кислоты (в) (б)

по-разному. Спектры эфиров кислот (IV), (V) содержали по 15 сигналов ароматических атомов углерода, что свидетельствовало об изомерной чистоте по месту замещения в пиреновом ядре (рис. 1). Сигналов четвертичных атомов углерода, идентифицированных с помощью методики «спиновое эхо», оказалось 7, как и в случае метил-4-(1-пиренил)бутирата. Следовательно, пиренилкарбоновые кислоты (IV), (V) не являются 2-алкилпиренами, так как в противном случае в их спектрах наблюдалось бы не более 5 сигналов четвертичных атомов углерода. На основании полученных данных был сделан вывод, что кислоты (IV), (V) имеют в основном структуру соответственно 9(10)-(4-пиренил)стеариновой и 10(11)-(4-пиренил)ундекановой кислот.

Закономерности, установленные при исследовании взаимодействия антрацена с фосфатидилхолином (VIII) и фосфатидилэтанололамином (IX) [1], оказались верными и в случае алкилирования антрацена фосфатидилинозитом (X) и дифосфатидилглицерином (XI), а также пирена — фосфолипидами (VIII) — (XI) (схема 2). Меченые фосфолипиды выделяли колоночной хроматографией на силикагеле. По хроматографической подвижности полученные вещества (XII) — (XVII) не отличались от природных фосфолипидов, а УФ-спектры и спектры флуоресценции антрил- (XIV), (XV) и пиренилмеченых фосфолипидов (XII), (XIII), (XVI), (XVII) подобны спектрам соответственно антрил- и пиренилстеариновой кислоты. Сопоставление УФ-спектров синтезированных нами ранее 1-ацил-2-[9(10)-антрилстеароил]- и 1-ацил-2-[9(10)-(4-пиренил)стеароил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолина [1, 7] со спектрами фосфолипидов (XII) — (XVII).



показало, что последние представляют собой смеси меченых и исходных веществ, и позволило определить их соотношения.

Проведенные исследования подтвердили, что на степень модификации фосфатидов (VIII)–(XI) (отношение количества молей модифицированного фосфолипида, рассчитанного по известному содержанию метки в выделенном флуоресцентно меченом фосфатиде, к количеству молей исходного вещества, взятого в реакцию) сильное влияние оказывает соотношение фосфолипид – хлористый алюминий [1]: при 5 экв. катализатора флуоресцентную метку содержали 65% выделенного фосфатидилхолина (XII), 64% фосфатидилэтаноламина (XIII), 15–18% фосфатидилинозита (XIV), (XVI) и 9–10% дифосфатидилглицерина (XV), (XVII). Тот факт, что фосфатиды (X) и (XI) значительно хуже включают метку, может объясняться тем, что они содержат больше групп, способных образовывать комплексы с хлористым алюминием (кроме сложноэфирных и фосфатных групп еще и гидроксигруппы), выводя катализатор из реакции. При использовании же более 5 экв. AlCl₃ в реакции с фосфатидилэтаноламином (IX), 5,5 экв. – с фосфатидилхолином (VIII) и дифосфатидилглицерином (XI) и 6 экв. – с фосфатидилинозитом (X) побочные процессы, протекающие в присутствии хлористого алюминия [1], являются причиной существенного уменьшения степени их целевой модификации – образования флуоресцентно меченных фосфолипидов (XII)–(XVII) (рис. 2). В оптимальных условиях степень модификации фосфатидилхолина (VIII) достигала 26%, фосфатидилэтаноламина (IX) – 17%, фосфатидилинозита (X) и дифосфатидилглицерина (XI) – 5–7%.

Строение синтезированных веществ (XII)–(XVII) устанавливали с помощью спектральных методов: УФ-, флуоресцентной спектроскопии и масс-спектрометрии, а также методами химического и ферментативного расщепления. Так, в масс-спектре пиренилмеченого фосфатидилхолина (XII) (ионизация поем) наблюдались молекулярные ионы двух видов: 1-пальмитоил-2-пиренилстеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (M⁺, m/z 964) и 1-стеароил-2-пиренилстеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (M⁺, m/z 989). При щелочном метанолизе антрил- и пиренилмеченых фосфолипидов (XII)–(XVII) получались в основном метиловые эфиры соответственно антрилстеариновой (M⁺, m/z 474) и пиренилстеариновой кислоты (M⁺,

пазой A_2 змеиного яда. Все фосфолипиды, кроме дифосфатидилглицеринов (XV), (XVII), гидролизывались данной фосфолипазой; при этом 90—95% флуоресцентной метки содержалось в жирных кислотах, а 5—10% — в лизофосфолипидах. Таким образом, метка распределяется в основном в соответствии с распределением ненасыщенных жирных кислот в молекулах природных фосфолипидов. Для подтверждения этого алкилировали антрацен 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолином (XVIII) с последующим анализом образующихся веществ (схема 3).

При гидролизе антрилфосфатидилхолинов (XIXa—г) фосфолипазой A_2 во фракции жирных кислот присутствовал 41% метки, в лизофосфатидилхолине — 49% и в негидролизованшемся антрилфосфатидилхолине — 10%. В продуктах щелочного метанолиза двух последних фракций были обнаружены в значительных количествах метиловые эфиры антрацен-бистеариновой кислоты [4]: для лизофосфатидилхолина — 29% (в виде монометилового эфира (XXI)), а для негидролизованшегося антрилфосфатидилхолина — до 47%. Всего же, по данным УФ-спектроскопии, в продуктах щелочного гидролиза флуоресцентно меченного фосфатидилхолина (XIXa—г) содержалось до 19% кислот, сшитых антраценом. Антрилфосфатидилхолин (XIXr), содержащий такие кислоты, медленнее гидролизывается фосфолипазой A_2 , поэтому негидролизовавшийся антрилфосфатидилхолин обогащен ими. Следовательно, по данным ферментативного гидролиза, распределение метки в антрилфосфатидилхолинах (XIXa—г) между первым и вторым положениями глицерипового остатка близко к 1, что подтверждает распределение метки в молекулах фосфолипидов (XI) — (XVII) в соответствии с распределением ненасыщенных жирных кислот в природных липидах. Образование значительного количества сшитых кислот в данном случае обусловлено пространственным сближением двойных связей двух остатков олеиновой кислоты в молекуле 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (XVIII).

Таким образом, метод алкилирования полициклических ароматических углеводов по Фриделю — Крафтсу природными веществами, содержащими двойные связи (в частности, ненасыщенными жирными кислотами и фосфолипидами), может служить простым универсальным методом введения ароматического фрагмента (например, флуоресцентной метки) в гидрофобную область этих веществ.

Экспериментальная часть

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu UV-240 (Япония), спектры флуоресценции — на спектрофлуориметрах Aminco SPF-1000 (США) и Hitachi MPF-4 (Япония), масс-спектры — на спектрометрах Varian MAT-311A и Varian MAT-731 (США), спектры ПМР и ^{13}C -ЯМР (с полной развязкой от протонов) — на импульсном Фурье-спектрометре Bruker WH-250 (ФРГ). Препаративную ВЭЖХ этилового эфира 9(10)-антрилстеариновой кислоты проводили на хроматографе Knauer (ФРГ), колонка LiChrosorb RP-18, 5 мкм (16×250 мм), элюент — метанол — ацетонитрил, 9 : 1; скорость элюирования 3 мл/мин; детекция по поглощению при 290 нм.

Растворители удаляли в вакууме при температуре не более 35—40° С. Для колоночной хроматографии применяли силикагель L 40/100 (Chemapol, Чехословакия), для ТСХ — пластинки силуфол UV-254 (Kavalier, Чехословакия). ТСХ осуществляли в системах гексан — эфир, 9 : 1 (А); гексан — эфир, 3 : 2 (Б); петролейный эфир (т. кип. 40—70° С) — эфир — уксусная кислота, 80 : 20 : 4 (В); хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (Г); хлороформ — метанол — конц. NH_4OH , 65 : 35 : 5 (Д). Для обнаружения веществ на хроматограммах использовали флуоресценцию при УФ-облучении (а), пары иода (б), молибденовый синий (в), реактив Драгендорфа (г), пингидрин (д) и периодат натрия — бензидин (е) [8].

Линофильзованный ид змеи *Crotalus adamanteus* (Serva, ФРГ) и яичный фосфатидилхолин (отечественного производства) использовали без дальнейшей очистки. Дифосфатидилглицерин (отечественного производства) перед использованием очищали колоночной хроматографией на силикагеле ([9], с. 162—163). Фосфатидилэтаноллами выделяли из яичного желтка ([9], с. 141—142), фосфатидилинозит — из пекарских дрожжей ([9], с. 178—179), олеиновую кислоту — из оливкового масла [10] и перед применением дополнительно очищали колоночной хроматографией на силикагеле в системе гексан — эфир, 92 : 8. 10-Ундеценую кислоту (отечественного производства) очищали колоночной хроматографией на силикагеле в системе гексан — эфир, 3 : 2. Метиловые эфиры жирных кислот получали по методу [11], 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин — по методу [9], с. 111—112). С флуоресцентными веществами работали при слабом рассеянном свете.

9(10)-(4-Пиренил)стериновая кислота (IV). К раствору 1,16 г пирена в 10 мл сухого дихлорэтана добавляли при перемешивании пятую часть (от 1,02 г) безводного хлористого алюминия, охлаждали смесь до 0° С и прибавляли по каплям раствор 1,08 г олеиновой кислоты (II) в 5 мл дихлорэтана попеременно с оставшимся количеством $AlCl_3$, перемешивали 30 мин при 0–5° С, давали смеси нагреться до комнатной температуры и перемешивали 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 безводным Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат уваривали. Остаток растворяли в 20 мл гексана, нерастворившийся шрени отфильтровывали, промывали гексаном, фильтрат уваривали. Остаток хроматографировали на колонке с 75 г силикагеля в ступенчатой градиентной системе гексан – диэтиловый эфир. Состав фракций контролировали ТСХ в системе Б (обнаружение: а, б). Получали 0,55 г (30%) кислоты (IV) в виде светло-желтого масла, R_f 0,49 (Б), 0,33 (В, обнаружение: а, б), УФ (метанол), λ_{max} , нм (ε): 234 (32 400), 242 (54 200), 265 (19 400), 275 (37 300), 312 (9000), 325 (21 000), 341 (29 900); спектр флуоресценции (этанол, возбуждение при 342 нм), λ_{max} , нм: 375, 395, 415; масс-спектр, m/z : 484 (M^+), 327, 341 [$CH_3(CH_2)_n \cdot CHC_{16}H_9$] $^+$ ($n=7,8$), 357, 371 [$CH(C_{16}H_9)(CH_2)_mCOOH$] $^+$ ($m=7,8$), 215 ($C_{16}H_9CH_2^+$), 201 ($C_{16}H_9^+$). Найдено, %: С 84,27, Н 9,15. $C_{34}H_{44}O_2$. Вычислено, %: С 84,25, Н 9,15. Затем выделяли 0,15 г (5%) диалкилпирена (VI), R_f 0,16 (Б, обнаружение: а, б); УФ (метанол), λ_{max} , нм (ε): 237 (72 900), 246 (120 100), 268 (45 000), 279 (86 700), 317 (21 700), 331 (48 400), 347 (67 400); спектр флуоресценции (гексан, возбуждение при 346 нм), λ_{max} , нм: 380, 400, 420; масс-спектр, m/z : 766 (M^+), 484 [$CH_3(CH_2)_n \cdot CH(C_{16}H_9)(CH_2)_mCOOH$] $^+$ ($m, n=7,8$), 215 ($C_{16}H_9CH_2^+$), 201 ($C_{16}H_9^+$).

10(II)-(4-Пиренил)ундекановая кислота (V). Из 3,69 г пирена, 2,24 г 10-ундекановой кислоты (III) и 3,25 г безводного $AlCl_3$ по методике, описанной для пиренилфосфатидиолеиновой кислоты (IV), получали 1,71 г (37%) кислоты (V) в виде светло-желтого масла, R_f 0,48 (Б, обнаружение: а, б); УФ (хлороформ – метанол, 1:1), λ_{max} , нм (ε): 243 (29 600), 254 (12 600), 265 (24 000), 275 (31 400), 312 (11 500), 326 (25 600), 342 (30 900); спектр флуоресценции (этанол, возбуждение при 342 нм), λ_{max} , нм: 376, 395, 416. Найдено, %: С 83,55, Н 7,78. $C_{27}H_{30}O_2$. Вычислено, %: С 83,94, Н 7,77.

Пиренилфосфатидилхолин (XII). 113 мг фосфатидилхолина (VIII) и 45 мг пирена растворяли в 4 мл сухого дихлорэтана и при перемешивании прибавляли постепенно 108 мг безводного $AlCl_3$. Смесь перемешивали 1 ч при 18–22° С, последовательно прибавляли 1,5 мл 1% HCl, 6 мл MeOH и 1 мл воды. Органический слой отделяли, водно-метанольный промывали хлороформом (3×5 мл), объединенные хлороформные экстракты промывали дистиллированной водой (10 мл) и уваривали. Остаток хроматографировали на колонке с 16 г силикагеля в ступенчатой градиентной системе хлороформ – метанол. Получали 41 мг пиренилфосфатидилхолина (XII) в виде желтоватого воскообразного вещества, R_f 0,4 (Г, обнаружение: а, в, г); $[\alpha]_D^{+7,4}$ (с 1,5; хлороформ). По данным УФ-спектра, подобного спектру 1-ацил-2-[9(10)-(4-пиренил)стеароил]-sn-глицеро-3-фосфохолина [7], содержание метки составляло 83% (степень модификации 26%); спектр флуоресценции (этанол, $\lambda_{возб}$ 342 нм), λ_{max} , нм: 376, 396, 415; масс-спектр, m/z : 961 (M^+ : 1-пальмитоил-2-пиренилстеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин), 989 (M^+ : 1-стеароил-2-пиренилстеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин).

Пиренилфосфатидилэтаноламин (XIII). Из 103 мг фосфатидилэтанолamina (IX), 42 мг пирена и 93 мг безводного $AlCl_3$ по методике, описанной для пиренилфосфатидилхолина (XII), получали 23 мг хроматографически однородного пиренилфосфатидилэтанолamina (XIII) в виде желтоватого аморфного вещества, R_f 0,65 (Г, обнаружение: а, в, д); $[\alpha]_D^{+6,4}$ (с 1,5; хлороформ); содержание метки 64% (степень модификации 17%); спектры УФ и флуоресценции такие же, как для фосфатидилхолина (XII).

Пиренилфосфатидилинозит (XVI). Из 12 мг фосфатидилинозита (X), 5 мг пирена и 12 мг хлористого алюминия по той же методике получали 6 мг пиренилфосфатидилинозита (XVI) в виде желтоватой аморфной массы, R_f 0,38 (Г, обнаружение: а, в, е); $[\alpha]_D^{+7,0}$ (с 0,6; хлороформ – метанол, 1:1); содержание метки 18% (степень модификации 7%); УФ (хлороформ – метанол, 1:1), λ_{max} , нм: 236, 245, 267, 278, 315, 329, 343; спектр флуоресценции (этанол, $\lambda_{возб}$ 342 нм), λ_{max} , нм: 375, 396, 415.

Пиренилдифосфатидилглицерин (XVII). Из 89 мг дифосфатидилглицерина (XI), 37 мг пирена и 41 мг хлористого алюминия получали 47 мг пиренилдифосфатидилглицерина (XVII) в виде светло-желтого аморфного вещества, R_f 0,70 (Г, обнаружение: а, в); $[\alpha]_D^{+5,4}$ (с 0,6; хлороформ); содержание метки 10% (степень модификации 5%); УФ (хлороформ – метанол, 1:1), λ_{max} , нм: 235, 245, 266, 277, 314, 328, 343; спектр флуоресценции (этанол, $\lambda_{возб}$ 342 нм), λ_{max} , нм: 376, 396, 417.

Антрилфосфатидилинозит (XIV). Из 20 мг фосфатидилинозита (X), 5 мг антрацена и 16 мг безводного $AlCl_3$ аналогично получали 11 мг антрилфосфатидилинозита (XIV) в виде слегка желтоватой аморфной массы, R_f 0,37 (Г, обнаружение: а, в, е); $[\alpha]_D^{+7,7}$ (с 0,6; хлороформ – метанол, 2:1); содержание метки 15% (степень модификации 6%); УФ (хлороформ – метанол, 1:1), λ_{max} , нм: 258, 335, 350, 366, 385; спектр флуоресценции (этанол, $\lambda_{возб}$ 360 нм), λ_{max} , нм: 390, 412, 434.

Антрилдифосфатидилглицерин (XV). Из 76 мг дифосфатидилглицерина (XI), 28 мг антрацена и 35 мг безводного $AlCl_3$ аналогично получали 30 мг антрилдифосфатидилглицерина (XV), R_f 0,71 (Г, обнаружение: а, б); $[\alpha]_D^{+5,8}$ (с 0,8; хлороформ); содержание метки 9% (степень модификации 3%); УФ (хлороформ – мета-

пол. 1:1), λ_{max} , нм: 257, 332, 347, 364, 383; спектр флуоресценции (этанол, $\lambda_{\text{возб}}$ 360 нм), λ_{max} , нм: 391, 411, 435.

Антрилфосфатидилхолин (XIXa-г). Из 75 мг 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (XVIII), 26 мг антрацена и 65 мг безводного хлористого алюминия аналогично получали 46 мг антрилфосфатидилхолина (XIXa-г) в виде слегка желтоватого воскообразного вещества, R_f 0,4 (Г), 0,5 (Д, обнаружение: а, в, г); $[\alpha]_D^{+25}$ (с 1,5; хлороформ); содержание метки 29% (степень модификации 14%); УФ (метанол), λ_{max} , нм: 257, 330, 345, 364, 382; спектр флуоресценции (этанол, $\lambda_{\text{возб}}$ 360 нм), λ_{max} , нм: 390, 412, 435.

Расщепление флуоресцентно меченных фосфолипидов фосфолипазой A₂. 1) В пробирке объемом 15 мл выпаривали 0,5 мл 0,1% бензольного раствора пиренилфосфатидилхолина (XII) или антрилфосфатидилхолина (XIXa-г) и 45 мкл 10% спиртового раствора яичного фосфатидилхолина. К ним добавляли 5 мл эфира и 0,5 мл раствора 1 мг лиофилизированного яда змеи *Crotalus adamanteus* [12] в 0,1 М боратном буфере (рН 7,5), содержащем 1,6 мг CaCl₂. Смесь встряхивали 15 мин и инкубировали 4 ч при 20°С. Растворители упаривали, остаток растворяли в 2 мл смеси хлороформ – метанол (1:1), центрифугировали, сульфатат переносили в другую пробирку, упаривали и полученные продукты разделяли на колонке с 1 г силикагеля в градиентной системе хлороформ – метанол. В реакционной смеси присутствовал нерасщепившийся флуоресцентно меченный фосфатидилхолин. Количество флуоресцентной метки, определенное по поглощению при 341 (для пиренилфосфатидилхолина) или 364 нм (для антрилфосфатидилхолина), составляло: в случае пиренилфосфатидилхолина (XII) во фракции жирных кислот – 80%, в лизофосфатидилхолине – 4% и в нерасщепившемся фосфатидилхолине – 16%; в случае антрилфосфатидилхолина (XIXa-г) – соответственно 41, 49 и 10%.

2) Для гидролиза пиренилфосфатидилэтанолamina (XIII), а также антрил- и пиренилмеченных фосфатидилинозитов (XIV), (XVI) и дифосфатидилглицеринов (XV), (XVII) выпаривали в пробирке (объемом 15 мл) 0,5 мл 0,1% бензольного раствора соответствующего меченого фосфолипида (в случае фосфатидилинозитов (XIV), (XVI) использовали растворы в хлороформе) и 45 мкл 10% спиртового раствора яичного фосфатидилхолина. Дальнейшие операции проводили так же, как описано в пункте 1. Антрил- и пиренилмеченные дифосфатидилглицерины (XV), (XVII) не гидролизались данной фосфолипазой (так же, как и исходный дифосфатидилглицерин (XI)). В продуктах гидролиза пиренилфосфатидилэтанолamina (XIII) метка распределялась следующим образом: в жирных кислотах – 78%, в лизофосфатидилэтанолamine – 9% и в нерасщепившемся фосфатидилэтанолamine – 13%; при гидролизе антрилфосфатидилинозита (XIV) и пиренилфосфатидилинозита (XVI) – соответственно 74–76, 7–9 и 15–19%.

Мягкий щелочной метанолиз флуоресцентно меченных фосфолипидов (XII)–(XVII), (XIXa-г), (XXa-в). В пробирке объемом 15 мл выпаривали раствор 5–10 мг соответствующего меченого фосфолипида (или лизофосфолипида), к остатку последовательно добавляли 0,2 мл хлороформа, 0,3 мл метанола и 0,5 мл 2 н. NaOH в метаноле, интенсивно перемешивали и выдерживали 15 мин при комнатной температуре [12]. После этого прибавляли 0,2 мл метанола, 0,3 мл хлороформа и 0,9 мл воды, смешивали и центрифугировали, отделяли водно-метанольную фазу пастеровской пилеткой, а хлороформную промывали смесью метанол – вода, 10:9 (2××0,5 мл) и упаривали. Метилловые эфиры флуоресцентно меченных жирных кислот идентифицировали методами ТСХ, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии.

1) В случае пиренилфосфатидилхолина (XII), а также антрил- и пиренилмеченных фосфатидилинозитов (XIV), (XVI) были обнаружены только метилловые эфиры антрилстеариновой [4] (R_f 0,40 (А, обнаружение: а, б), масс-спектр, m/z : 474 (M^+)) и пиренилстеариновой (IV) кислоты (R_f 0,36 (А, обнаружение: а, б), масс-спектр, m/z : 498 (M^+)). В случае фосфатидилэтанолamina (XIII) и дифосфатидилглицеринов (XV), (XVII) кроме этого отмечалось образование метилловых эфиров соответственно антрил- и пиренилоктадеценной кислот (M^+ , m/z 472 и 496 соответственно, интенсивности молекулярных ионов эфиров этих кислот не превышали 5% от интенсивности молекулярных ионов эфиров антрил- и пиренилстеариновой кислот).

2) В продуктах щелочной метанолиза антрилфосфатидилхолина (XIXa-г) кроме метиллового эфира антрилстеариновой кислоты был обнаружен диметилловый эфир антрацен-бистеариновой кислоты, R_f 0,25 (А, обнаружение: а, б), масс-спектр, m/z : 770 (M^+). Количество его, определенное по поглощению при 374 нм [4], достигало 19% от общего количества флуоресцентно меченных жирных кислот, содержащихся в фосфатидилхолине (XIXa-г).

3) При щелочном метанолизе фракций лизофосфатидилхолина (XXa-в) и не гидролизованного фосфолипазой A₂ антрилфосфатидилхолина (XIXa-г) также образовались смеси метилловых эфиров антрилстеариновой и антрацен-бистеариновой кислот в соотношениях: в первом случае 71:29, а во втором 53:47. Полученный при метанолизе фракции лизофосфатидилхолина (XXa-в) монометилловый эфир антрацен-бистеариновой кислоты (XXI) имел R_f 0,37 (В, обнаружение: а, б), масс-спектр, m/z : 756 (M^+).

ЛИТЕРАТУРА

1. Богомолов О. В., Капун А. П., Швеиц В. И. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. № 11. С. 1560–1564.
2. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. // Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980.

3. Bergelson L. D., Molotkovsky Yul. G., Manevich Y. M. // Chem. Phys. Lipids. 1985. V. 37. № 2. P. 165–195.
4. Богомолов О. В., Каплун А. П., Швец В. И. // Биооргани. химия. 1984. Т. 10. № 7. С. 975–978.
5. Богомолов О. В., Каплун А. П., Швец В. И. Способ получения флуоресцентного фосфатидилхолина: А. с. 1068441 СССР // Б. И. 1984. № 3. С. 75.
6. Galla H.-J., Hartmann W. // Chem. Phys. Lipids. 1980. V. 27. № 3. P. 199–219.
7. Богомолов О. В., Каплун А. П., Якунина Н. Б., Швец В. И., Евстигнева Р. П. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 279. № 2. С. 383–386.
8. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам/Ред. Микеш О.: Пер. с англ./Ред. Березкин В. Г. М.: Мир, 1982. Ч. II. С. 539–549.
9. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г. и др. Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981.
10. Schlenk H., Holman R. // J. Amer. Chem. Soc. 1950. V. 72. № 11. P. 5001–5004.
11. Беккер Г., Бергер В., Домике Г. и др. Органикум. Практикум по органической химии: Пер. с нем. М.: Мир, 1979. Т. II. С. 248–250.
12. Кейтс М. Техника липидологии: Пер. с англ. М.: Мир, 1975.

Поступила в редакцию
14.1.1988

**MEMBRANE FLUORESCENT PROBES.
II. FRIEDEL — CRAFTS ALKYLATION OF POLYCYCLIC AROMATIC
HYDROCARBONS — A USEFUL METHOD FOR INCORPORATION
OF FLUORESCENT LABEL INTO HYDROPHOBIC MOIETY
OF NATURAL LIPIDS**

BOGOMOLOV O. V., YAKUNINA N. B., KAPLUN A. P., SHVETS V. I.

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

9(10)-4-(Pyrenyl)stearic and 10(11)-(4-pyrenyl)undecanoic acids are prepared by alkylation of pyrene with oleic or 10-undecenoic acids, respectively, under Friedel — Crafts reaction conditions. Fluorescent analogues of natural phospholipids are synthesized by unteraction of anthracene and pyrene with egg phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, baker's yeast phosphatidylinositol or bovine heart diphosphatidylglycerol. Localisation of the label in the acyl moiety, mainly in the second position of the glycerol backbone, is established by methods of chemical and enzymatic degradation.