



УДК 547.931.057:535.372

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕНТНОМЕЧЕННЫХ ДЕТЕРГЕНТОВ, АНАЛОГОВ ГЛИКОХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ

© 2000 г. И. В. Гречишникова, И. Д. Хазнаферова, С. В. Калинин,
Л. И. Барсуков, Юл. Г. Молотковский[#]

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 20.04.2000 г. Принята к печати 06.05.2000 г.

Синтезированы флуоресцентные аналоги гликохолата, меченные по глициновому остатку *n*-гидроксибензильным, 7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ильным или флуоресцеин-5-тиокарбамоильным флуорофорами и предназначенные для изучения мембранных процессов, в которых участвуют детергенты. Флуорофор в зондах расположен рядом с карбоксильной группой и в мембранной системе должен находиться у поверхности раздела фаз и быть чувствительным к процессам фазовых превращений. Определены величины критической концентрации мицеллообразования (ККМ) полученных аналогов; для двух первых веществ они близки величинам ККМ холата и гликохолата. Предполагается, что поведение синтезированных зондов в мембранных системах будет подобно поведению солей желчных кислот.

Ключевые слова: флуоресцентные зонды; желчные кислоты; мицеллярные свойства; синтез.

ВВЕДЕНИЕ

Детергенты широко используются как молекулярные инструменты в мембранологии: для солюбилизации биомембран до смешанных мицелл [1, 2], для включения мембранных белков, липидов и биологически активных агентов в функциональные надмолекулярные структуры [3, 4], для приготовления гомогенных липидных везикул контролируемого размера [5, 6] и т.д. Значительное применение нашли детергенты и в липосомной доставке лекарств [6]. При этом механизм процессов, протекающих при солюбилизации и реконструкции мембран, во многом остается не ясным. Особого внимания заслуживают процессы, протекающие при взаимодействии детергентов с компонентами биологических мембран, прежде всего с фосфолипидами. Перспективный метод для их изучения – применение флуоресцентных зондов, широко используемых в мембранологии [7, 8].

В исследовании процессов с участием детергентов (солюбилизации, агрегации, фазовых и структурных переходов и др.) применяются флуоресцентные зонды как нелипидной природы (дифенилгексатриен и др.), дающие усредненные параметры системы, так и флуоресцентномеченные

фосфолипиды, например пиренилмеченый фосфатидилхолин, моделирующий поведение фосфолипидного компонента (см. обзор [6]). Поведение же детергентов с помощью специфических флуоресцентных зондов изучено в значительно меньшей степени [9]; описано всего несколько флуоресцентных производных детергентов. Нам известны синтезы индолилмеченых триалкиламмонийгалогенидов и алкилсульфатов [9, 10], *N*-(7-нитробенз-2,1,3-оксадиазол-4-ил)-производных (*N*-NBD-производные) желчных кислот [11]; ранее мы синтезировали производные лизофосфатидилхолина, меченные по остатку жирной кислоты 9-антрилвинильным или 3-периленоильным флуорофором [12]. Еще одно родственное вещество, в котором NBD-флуорофор присоединен к холестеринной гидроксигруппе ножкой из нескольких оксиэтиленовых звеньев [13], едва ли может считаться подлинным производным детергента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы расширить возможности изучения мембранных систем с помощью флуоресцентных методов, мы синтезировали новые флуоресцентные производные природных детергентов. Особый интерес в этой области представляют производные желчных кислот (холевой, дезоксихолевой, гликохолевой), относящихся к неденатурирующим природным детергентам; холат и дезоксихолат натрия часто применяются при солюбилизации и реконструкции мембран. Система фосфатидилхолин-холат натрия способна под воздействием температуры претерпевать обратимую трансфор-

Сокращения: Chl-ONa – холат натрия; FITC – флуоресцеин-5-изотиоцианат; флуоресцеинил – 9'-(2-карбоксифенил)-6'-гидрокси-3'*H*-ксантен-3'-он-5-ил; FGC – *N*^α-холил-*N*^δ-(флуоресцеин-5-тиокарбамоил)-*L*-орнитин; ККМ – критическая концентрация мицеллообразования; NBD – 7-нитробенз-2,1,3-оксадиазол-4-ил; NGC – *N*^α-холил-*N*^δ-NBD-*L*-орнитин; TGC – *N*-холил-*L*-тирозин.

[#] Автор для переписки (тел./факс: (095) 330-66-01; e-mail: jgmol@ibch.ru).

мацию мицеллы–ламеллярные структуры [14, 15] и поэтому может служить удобной моделью для изучения механизмов самосборки мембран при реконструкции.

Синтез ряда флуоресцентных производных желчных кислот описали Шнайдер и др. [11]; эти зонды содержат α - или β -ориентированный *N*-NBD-остаток вместо одной из α -гидроксигрупп циклической системы. Мы полагаем, что такое расположение флуорофора, непосредственно присоединенного к неполярному циклическому ядру, может существенно влиять на амфифильные свойства желчных кислот, обусловленные строго определенной ориентацией гидроксигрупп по отношению к гидрофобному ядру молекулы [16, 17]. При этом надо отметить, что указанные зонды в ряде случаев в клетках претерпевали несколько иной, по сравнению с природными желчными кислотами, катаболизм [18].

Мы предлагаем другой подход к синтезу флуоресцентномеченых желчных кислот, при его применении структура детергента не нарушается, поскольку флуорофор присоединяется к боковой цепи, несущей карбоксильную группу, путем конъюгации природных холановых кислот с замещенными α -аминокислотами, либо изначально содержащими флуорофор, либо пригодными для его введения на последующих стадиях. В настоящем сообщении описаны синтез и ряд характеристик трех флуоресцентных зондов, аналогов гликохолевой кислоты, несущих полярный флуорофор – *n*-гидроксибензильный (IV, TGC), *N*-NBD (IX, NGC) и флуоресцеинильный (X, FGC) (схема). Выбор флуорофоров был обусловлен желанием иметь зонды с испусканием в ближней УФ- (TGC) и видимой (NGC и FGC) областях спектров, а также чтобы иметь возможность применять в исследованиях метод резонансного переноса энергии возбуждения [8] в парах с различными флуорофорами.

В полученных нами ранее флуоресцентных зондах, аналогах фосфо- и гликолипидов, неполярный флуорофор располагается на конце жирнокислотного остатка, где нарушение им функций молекулы минимально [8]. При конструировании же зондов, производных желчных кислот, чтобы не нарушать строение тригидроксихолановой системы (см. выше), мы предпочли поместить полярный флуорофор вблизи карбоксильной группы. Можно ожидать, что флуорофор, находящийся у поверхности раздела фаз, будет обладать максимальной чувствительностью к процессам фазовых и структурных превращений, характерных для дисперсных систем, содержащих соли желчных кислот. Однако при использовании зондов в мембранных системах, такое расположение флуорофора может вызвать некоторые искажения мембранной структуры по сравнению с флуорофором, находящимся в неполярной зоне. В случае мицеллярных структур искажения должны быть минимальными, так как модификация солей желчных кислот в об-

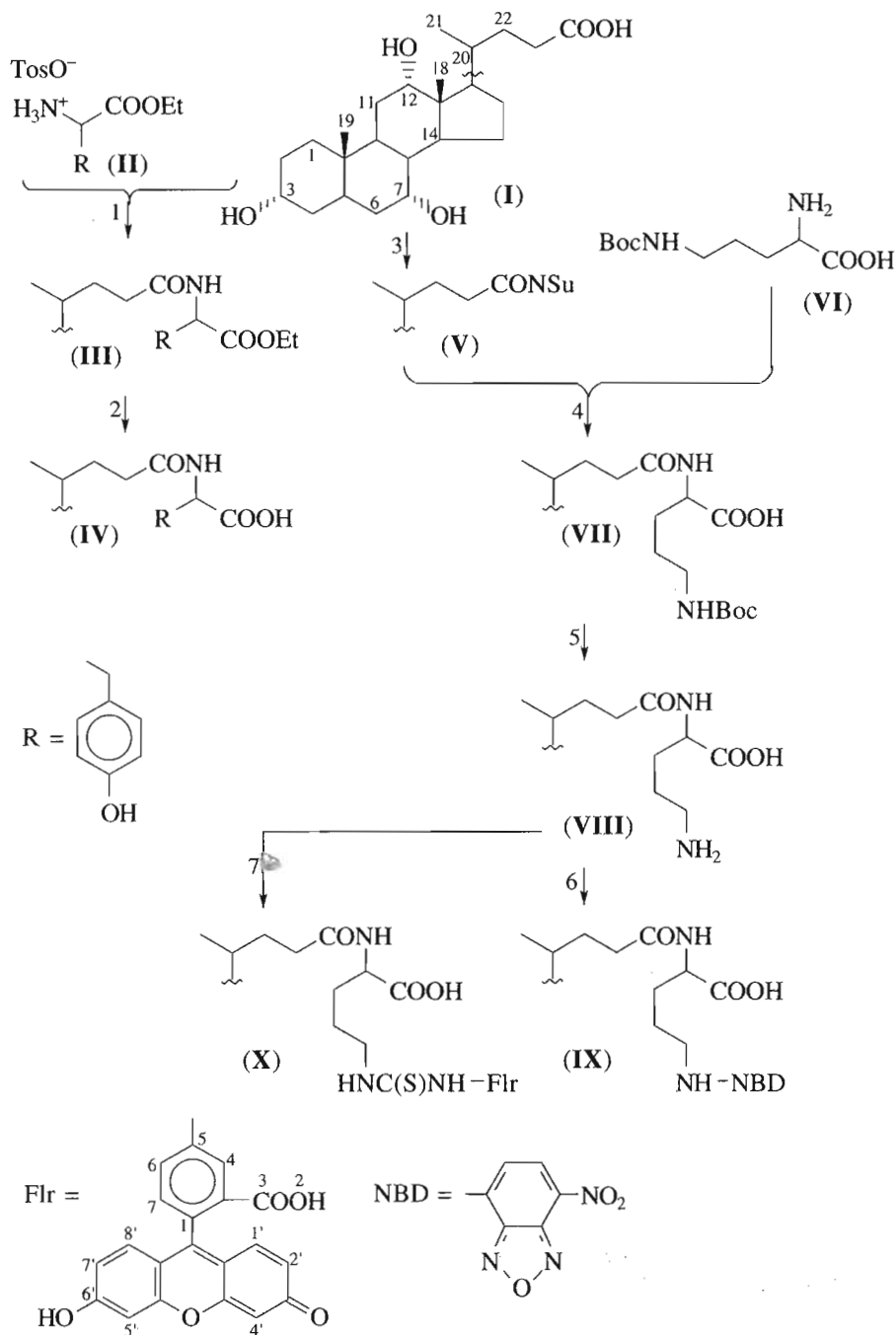
ласти карбоксильной группы незначительно влияет на их мицеллообразующие свойства [19, 20].

Все зонды – производные гликохолевой кислоты, в которых флуорофор находится на ответвлении от CH_2 -группы остатка глицина; такое их строение существенно упрощает синтез. Надо также отметить, что гликохолевая и холевая кислоты по своим мицеллообразующим свойствам различаются мало [21]. Зонд TGC (IV), несущий *n*-гидроксибензильную группу, т.е. тирозиновый флуорофор, был получен ацилированием тозилата этилового эфира тирозина (II) холевой кислотой (I) методом смешанных ангидридов с последующим омылением эфира (III). Необходимый в синтезе двух других зондов синтон, *N* ^{α} -холил-*L*-орнитин (VIII), был получен конденсацией *N*-оксисукцинимидного эфира холевой кислоты (V) с *N* ^{δ} -Вос-*L*-орнитином (VI); защитную Вос-группу амида (VII) удаляли трифторуксусной кислотой. Синтон (VIII) в реакции с NBD-хлоридом образовал зонд NGC (IX), а при обработке флуоресцеинизотиоцианатом – зонд FGC (X).

Спектры поглощения и флуоресценции (нм): TGC – λ_{max} 223 (ε 6900), 275 (ε 1300), λ_{em} 303; NGC – λ_{max} 336 (ε 6800), 470 (ε 19100), λ_{em} 541; FGC – λ_{max} 498 (ε 78000), λ_{em} 521 (в метаноле) вполне соответствуют литературным данным для других соединений с теми же флуорофорами [22, 23]. Спектры возбуждения и испускания зондов в мицеллярном растворе холата натрия приведены на рис. 1.

Нам неизвестно точное положение флуорофоров в мицелле; можно предположить, что достаточно полярная флуоресцеинильная группа зонда FGC (в липидном бислое группа расположена в зоне полярных головок [24]) локализована на границе мицеллы с водной фазой; то же, по-видимому, справедливо в отношении *n*-гидроксибензильной группы TGC. Остаток же NBD отличается невысокой полярностью, в бислое он может располагаться как на границе раздела фаз, так и в глубине его [25], при этом положение максимума испускания флуорофора зависит от свойств окружения, прежде всего полярности, как и квантовый выход, который всегда выше, если флуорофор находится в органическом растворителе или в бислое, а не в водной среде [26]. Так как у зонда NGC в Chl-ONa-мицеллах $\lambda_{\text{em}} \sim 546$ нм, в буфере 554 нм, а сдвиг в коротковолновую область указывает на уменьшение полярности окружения, мы можем считать, что в мицеллах из Chl-ONa группа NBD зонда несколько углублена в малополярную зону и водная фаза имеет к ней ограниченный доступ. Этот вывод подтверждается также следующим наблюдением.

Известно, что NBD-флуорофор способен ионизоваться в сильно основной среде, при pH > 9.8 [26]. В нейтральном буфере (pH 7.4) спектр поглощения NGC имеет обычный вид (рис. 2, *a*–1), подобный спектру возбуждения, приведенному на предыдущем рисунке; при переходе к менее полярным средам, смеси буфера с метанолом и одному



1 - ClCO_2Bu^t , Et_3N ; 2 - $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$; 3 - SuNOH , DCC ;
 4 - $\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$; 5 - CF_3COOH ; 6 - NBD-Cl , Et_3N ;
 7 - FITC.

Схема.

метанола, максимум сдвигается в коротковолновую область (спектры *a-2* и *a-3*). То же происходит со спектрами возбуждения флуоресценции, которые соответствуют спектрам поглощения (рис. 2, спектры *A-1*, *A-2* и *A-3*). Спектры испускания (рис. 2, *A-1'*-*A-3'*) показывают, что в водной среде квантовый выход падает. Но в основ-

ном буфере (pH 9.8) спектр поглощения NGC (рис. 2, *b-1*) резко отличается по форме от спектра *a-1*: он представляет собой сумму спектров нормальной (неионизованной) группы NBD и ее ионизованной формы [26]. Максимум поглощения последней приходится на ~410 нм и отчетливо виден на спектре *b-2* (раствор NGC в смеси буфера с

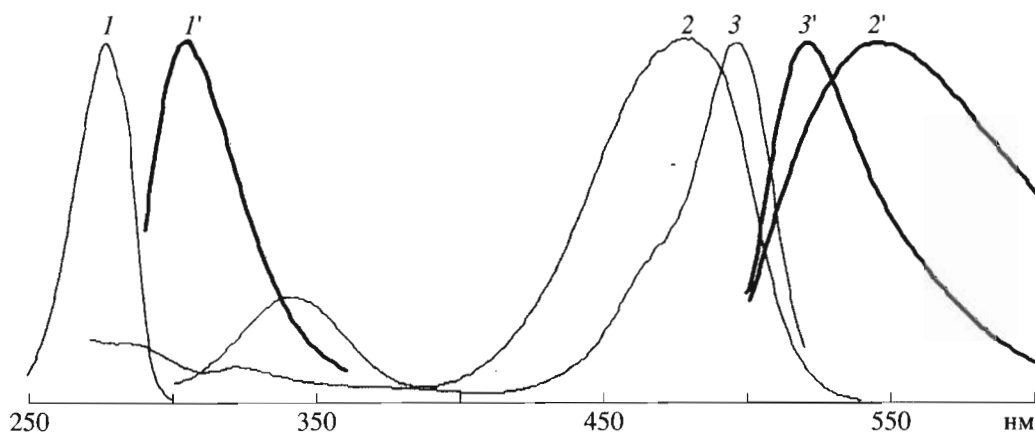


Рис. 1. Нормированные спектры возбуждения (1, 2, 3) и испускания (1', 2', 3') зондов TGC (1, 1'), NGC (2, 2') и FGC (3, 3') в 10 мМ карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9.8, содержащем 140 мМ NaCl и 19 мМ ChI-ONa. Концентрация зондов 120, 19 и 5 мкМ для (1, 1'), (2, 2') и (3, 3') соответственно, температура 20°C.

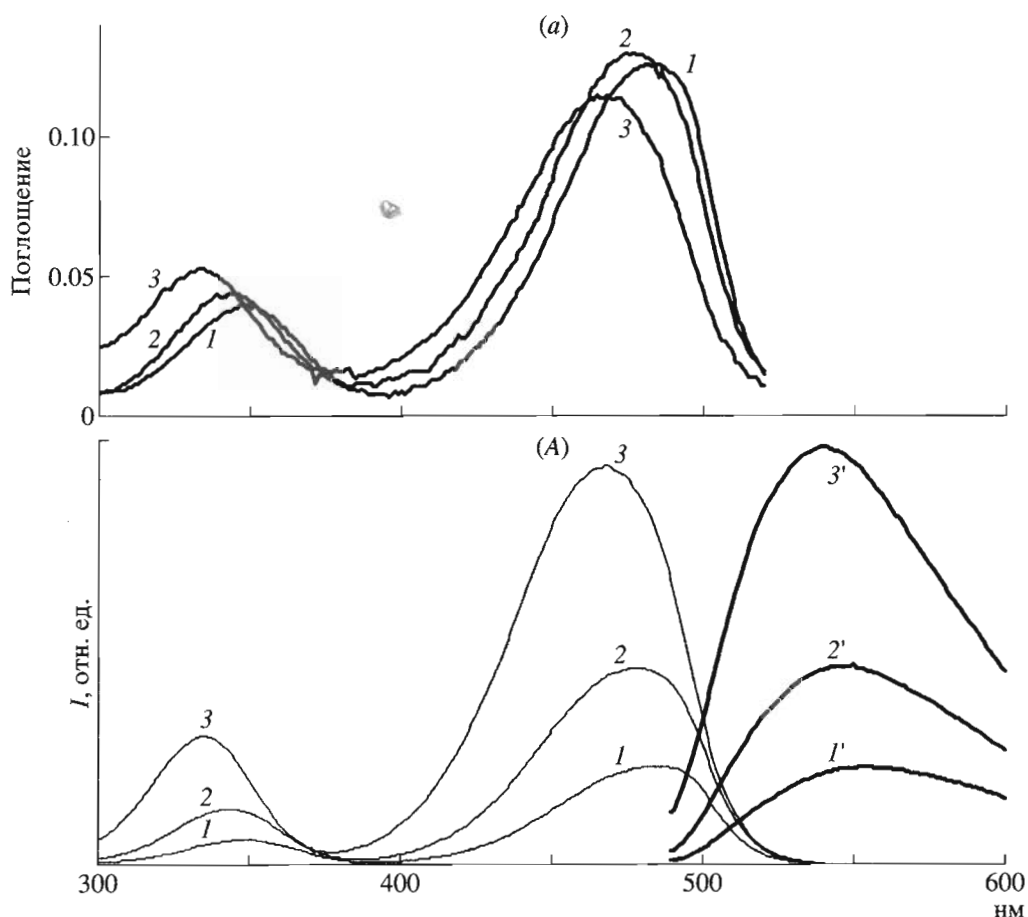


Рис. 2. Спектры: а, б – поглощения, А, Б – возбуждения (тонкая линия) и испускания (жирная линия; обозначены цифрой со штрихом) зонда NGC в буфере (1, 4), в смеси буфер–метанол, 1 : 1 (2, 5), в метаноле (3) и в буфере с 5 мМ ChI-ONa (6). а, А: спектры 1, 2 сняты в нейтральном буфере (10 мМ Трис-НСl, 140 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0.02% NaN₃, pH 7.4); б, Б: спектры 1, 2, 4–6 сняты в основном буфере (pH 9.8). Для спектров возбуждения λ_{em} 550 нм; для спектров испускания (1'–3') применено возбуждение в длинноволновом максимуме при λ_{ex} 468–483 нм, а для спектров (4', 5') – при 410 нм. Концентрация зонда 5 мкМ, температура 20°C.

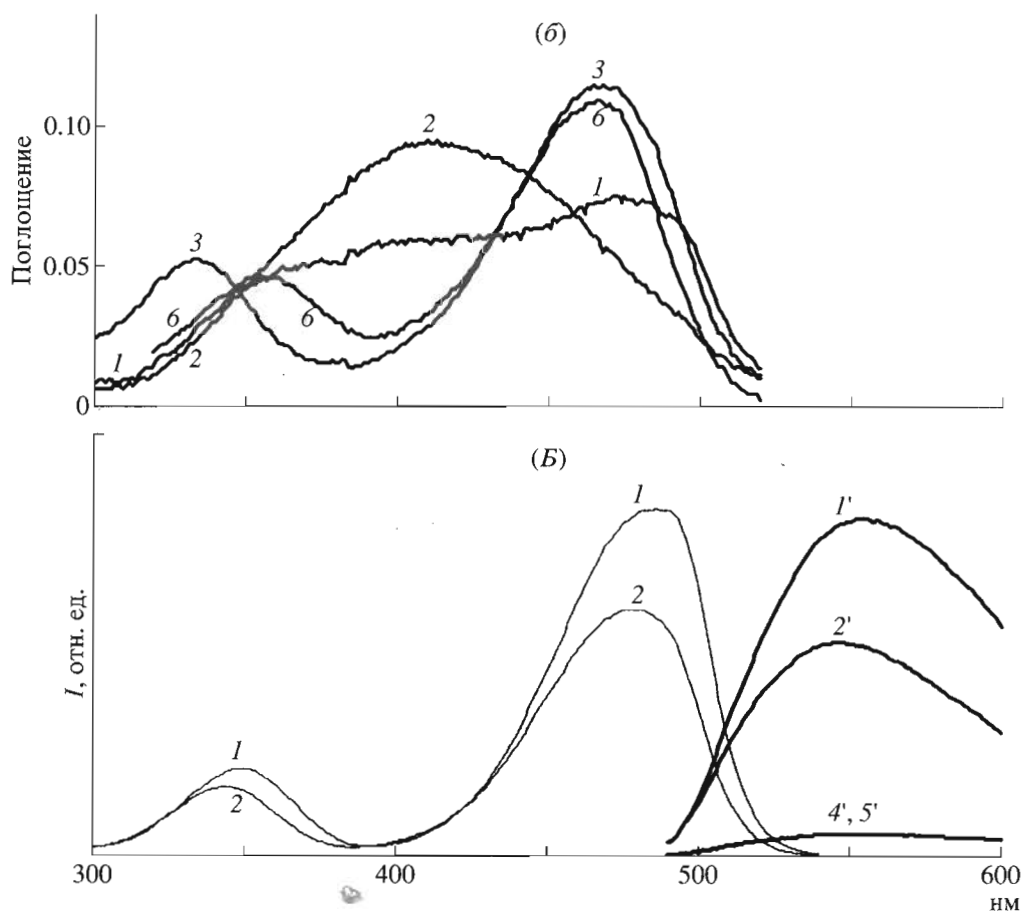


Рис. 2. Окончание.

метанолом); видимо, присутствие метанола благоприятствует ионизации NBD-группы. В то же время спектр возбуждения зонда в основном буфере (Б-1) и в смеси его с метанолом (Б-2) не изменяет своего характера (ср. со спектрами А-1 и А-2). Это говорит о том, что ионизованная форма NBD-группы не флуоресцирует или имеет незначительный квантовый выход, что подтверждается низкой интенсивностью испускания при λ_{ex} 410 нм (ср. спектры Б-4', Б-5' со спектрами Б-1', Б-2'). Спектр поглощения NGC в мицеллах Chl-ONa в основном буфере (рис. 2, б-б) показывает, что в этих условиях флуорофор частично ионизован (ср. интенсивности поглощения при 410 и 480 нм для спектров а-1 и б-б), однако в ограниченной степени. Что еще раз указывает на ограниченную доступность флуорофора для водной фазы (см. выше).

Критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) – важная характеристика детергента; близкие значения ККМ исходного детергента и его флуоресцентных производных (зондов) – один из показателей близости их амфифильных свойств и агрегационного поведения в водной среде. В случае желчных кислот измеренные значения ККМ могут заметно варьировать в зависимости от эксперимен-

тальных условий и метода определения [19]. Это связано с особенностями агрегации холата, как и гликохолата и солей других желчных кислот, в водной среде. Молекула холата не имеет четко разграниченных гидрофобной и полярной частей, как у SDS или Тритона X-100: в ней к одной стороне жесткой циклической системы присоединены HO-группы, имеется также карбоксил на конце короткой цепи. Видимо, благодаря такой структуре при концентрациях, немногим превышающих ККМ, образуются первичные мицеллы из 2–9 молекул холата, при росте концентрации число молекул в мицелле составляет 9–60; такой размытый процесс мицеллообразования и небольшие размеры мицелл затрудняют определение ККМ [21].

Для определения ККМ полученных нами зондов мы применили два часто используемых оптических метода: турбидиметрический и флуоресцентный, по изменению интенсивности флуоресценции родаминового зонда [27]. Согласно первому методу, регистрировали концентрационную зависимость интенсивности рассеянного света под углом 90° (рис. 3, А–В). Определение проводили в 20 мМ Трис-буфере (рН 8.0), содержащем 130 мМ NaCl (при меньшей основности среды возможно

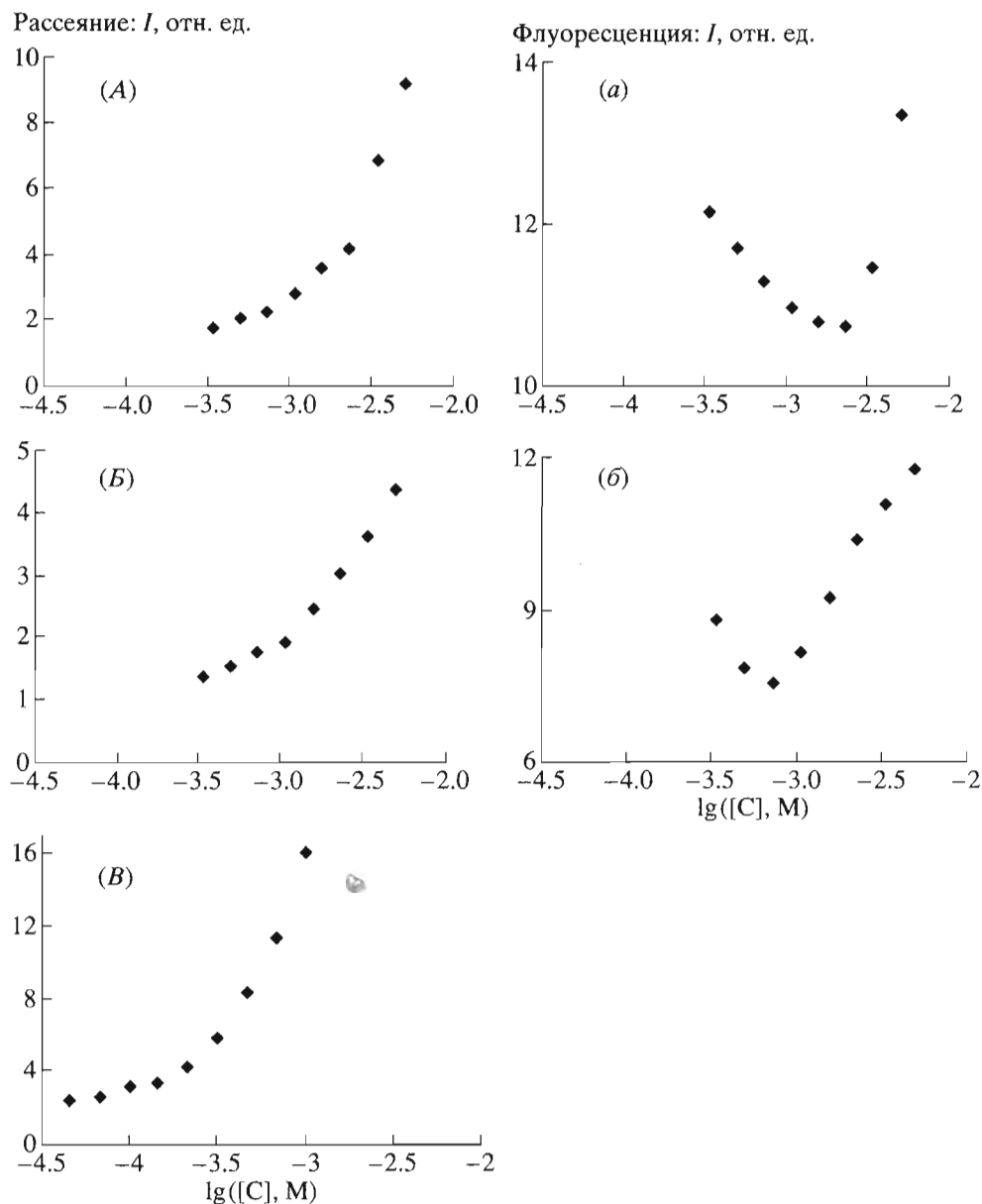


Рис. 3. Зависимости светорассеяния растворов зондов (А–В), а также интенсивности флуоресценции родамина 6G (а, б) от концентрации зондов: TGC (А, а), NGC (Б, б) и FGC (В) в 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, содержащем 130 мМ NaCl. а, б: концентрация родамина 6G 0.5 мкМ; температура 22°C.

осаждение нерастворимой кислотной формы детергента [21]). Видно, что резкого излома на полулогарифмических графиках зависимости светорассеяния системы от концентрации детергента нет, что, по-видимому, отражает постепенное увеличение размеров мицелл [21]. С помощью интерполяции прямых участков ветвей каждого графика (ср. [27]) величину ККМ для зонда TGC можно определить в ~ 2.0 мМ (рис. 3, А), для зонда NGC – ~ 1.1 мМ (рис. 3, Б) и для зонда FGC ~ 0.22 мМ (рис. 3, В). Значения, полученные для TGC и NGC, близки ККМ холата, 3–10 мМ, и гликохолата, 1–14 мМ [20]; меньшее значение ККМ для FGC, несомненно, обусловлено большим размером флуо-

рофора, хотя и обладающего значительной полярностью. При рН 9.8 (10 мМ карбонат-бикарбонатный буфер, содержащий 140 мМ NaCl) значения ККМ составляют ~ 2.5 мМ для TGC, ~ 0.75 мМ для NGC и ~ 0.25 мМ для FGC, т.е. мало отличаются от измеренных при рН 8.0 величин.

Определение ККМ с помощью флуоресцентного зонда (см. [27] и цитированную там литературу) состоит в том, что испытуемый детергент вносят в помещенный в кювету флуориметра раствор с ранее добавленным зондом (здесь – с родамином 6G), который частично растворен и флуоресцирует, а частично агрегирован и не флуоресцирует; общее испускание системы невелико из-за

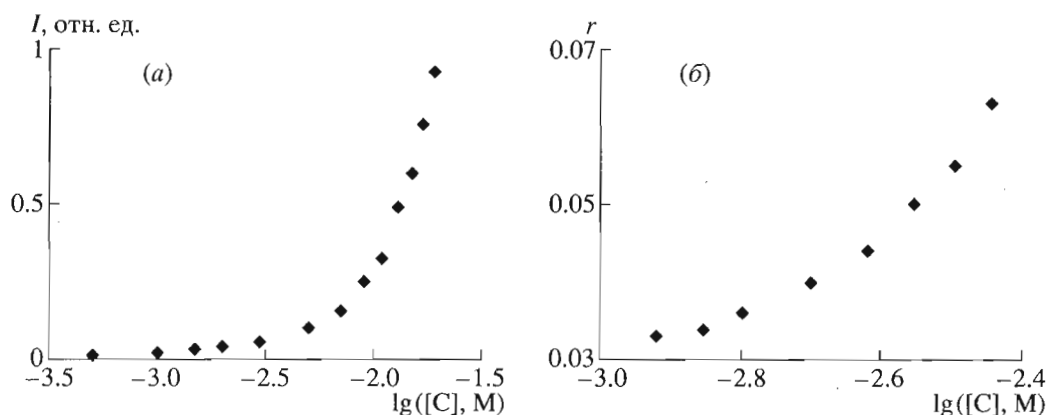


Рис. 4. Определение ККМ солей желчных кислот. (а) – зависимость интенсивности флуоресценции в максимуме (557–546 нм) зонда NGC (исходная концентрация 20 мкМ) от концентрации Chl-ONa в 10 мМ карбонат-бикарбонатном буфере, рН 9,8, содержащем 140 мМ NaCl. (б) – зависимость анизотропии зонда FGC (1 мкМ) от концентрации дезоксихолата натрия; возбуждение – при 498 нм, испускание – при 520 нм; буфер 20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, содержащий 130 мМ NaCl; температура 20°С.

низкой растворимости зонда. Пока добавляемый детергент мономерен, наблюдаемая флуоресценция системы изменяется слабо или уменьшается из-за увеличения мутности; при появлении мицелл они включают молекулы зонда, находившиеся в агрегатах, и флуоресценция возрастает. Мы определили этим методом ККМ аналогов TGC и NGC (рис. 3, а, б); полученные величины, 1,99 и 0,63 мМ соответственно, несколько ниже величин, определенных турбидиметрически (см. выше). Такие различия наблюдались и ранее [27]; в качестве объяснения можно предположить, что родаминовый зонд эффективно включается уже в первичные, состоящие из немногих молекул детергента мицеллы, которые слабо влияют на турбидиметрические параметры системы.

При попытке определить тем же методом ККМ зонда FGC информативных графиков зависимости интенсивности испускания родамина 6G от концентрации детергента получить не удалось. Это, по-видимому, следствие близости спектральных характеристик флуоресцеинильного и родаминильного флуорофоров ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 498/521 и 535/555 нм соответственно); облучение при 538 нм должно вызывать возбуждение обоих флуорофоров и обмен энергией возбуждения между ними. Как следствие, флуоресценция системы в ходе встраивания родамина 6G в мицеллы FGC представляет собой картину, которую трудно истолковать. Достаточно близкие к родаминильным характеристики имеет и зонд NGC ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 470/546 нм), однако оптическое поглощение его при 538 нм невелико, меньше и квантовый выход флуоресценции. Что и позволяет измерить ККМ зонда NGC с помощью другого, родамина 6G.

Уже сам факт близких значений ККМ для природных детергентов (холата и гликохолата) и полученных нами зондов говорит о том, что последние по своим свойствам близки природным детер-

гентам. Мы также провели измерение ККМ холата и дезоксихолата с помощью полученных зондов. Плавный перегиб на графике зависимости интенсивности испускания NGC от логарифма концентрации холата (рис. 4а) соответствует области 2–10 мМ. Средняя величина ККМ (7 мМ) согласуется со значением, указанным в литературе [20], 3–10 мМ. В данном случае увеличение интенсивности флуоресценции зонда, по-видимому, вызвано не переходом его из агрегированного состояния в мономерное (благодаря собственной высокой ККМ он в данной системе всегда мономерен), а тем, что в менее полярном окружении, в мицеллах, у NBD-флуорофора выше квантовый выход [26].

При определении ККМ дезоксихолата мы применили зонд FGC. В этом случае регистрация интенсивности испускания, как при использовании NGC, не дала бы необходимой информации, так как квантовый выход флуоресцеинила мало зависит от полярности окружения [23]. Поэтому измеряемым параметром была анизотропия флуоресценции, которая должна возрастать при включении зонда в мицеллы из-за меньшей подвижности в них флуорофора по сравнению с подвижностью в растворенных молекулах зонда. Это и наблюдается – перегиб графика, отмечающий появление мицелл, соответствует ККМ 2,0–2,4 мМ (рис. 4б); полученная величина хорошо согласуется с приведенной в литературе [20] для дезоксихолата: 1–4 мМ.

Таким образом, синтезированные нами флуоресцентные аналоги желчных кислот по своим мицеллярным свойствам довольно близки природным детергентам и могут служить инструментами исследования биологических, в первую очередь мембранных, систем. Дальнейшие проводимые нами работы в этом направлении будут предметом последующих сообщений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали *N*-гидроксисукцинимид, DCC, триэтиламин, TFA, дезоксихолат натрия (Fluka, Швейцария), *N*^δ-Вос-*L*-орнитин, *L*-тирозин (ВАСНЕМ, Швейцария), 7-нитро-4-хлор-2,1,3-бензоксадиазол (NBD-Cl), флуоресцеин-5-изотиоцианат (FITC), холевую кислоту (Serva, Германия), холат натрия (Sigma, США), остальные реактивы и растворители фирмы "Реахим" (Россия). Сухой хлороформ получали перегонкой над пятиокисью фосфора, сухие THF и 1,4-диоксан – над CaH₂, DMF – над нингидрином. Остальные растворители (отечественного производства) использовали после обычной очистки. Для колоночной хроматографии применяли силикагель L (40–100 мкм, Chemapol, Чехия), сефадекс LH-20 (Pharmacia, Швеция), LiChroprep RP-8 (25–40 мкм, Merck, Германия) и окись алюминия ("Реахим"); для ТСХ – пластинки с флуоресцентным индикатором Kieselgel 60 F₂₅₄ и без индикатора Kieselgel 60 (Merck). Системы для ТСХ: хлороформ–метанол–CH₃COOH, 90 : 10 : 1 (1), и 75 : 25 : 2.5 (2), хлороформ–метанол–7 н. NH₄OH, 65 : 35 : 8 (3), хлороформ–метанол–30% CH₃COOH, 60 : 45 : 20 (4); обнаружение с помощью фосфорномолибденовой кислоты (А), Cl₂-бензидина (Б), нингидрина (В), УФ-облучения (Г). *n*-Толуолсульфонат этилового эфира *L*-тирозина (II) получали как описано в работе [28].

Масс-спектры снимали на MALDI-времяпролетном приборе Vision 2000 (ThermoBioanalysis, Англия; матрица – 2,5-дигидроксibenзойная кислота; N₂-лазер, 337 нм, 3 нс-импульс, максимальная энергия импульса 250 мкДж) или на времяпролетном приборе МСВХ ("Электрон", Сумы, Украина) с плазменной десорбцией осколками деления ²⁵²Cf при ускоряющем напряжении +15 эВ; УФ-спектры веществ регистрировали на спектрофотометре Ultrospec II (LKB, Швеция); ИК-спектры записывали на спектрофотометре Hitachi 270-30 (Япония) в таблетках KBr и на спектрофотометре VECTOR 22 (Bruker, Германия) в пленке на призме KBr; спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 (Япония). Спектры ¹H-ЯМР (δ, м.д. относительно Me₄Si) регистрировали на спектрометре Bruker WM 500 (Германия) в смеси CDCl₃–CD₃OH, 1 : 1 (где не указано особо). Удаление растворителей проводили в вакууме на ротормном испарителе при температуре не более 45°C.

Этиловый эфир *N*-холил-*L*-тирозина (III, TGC). К охлажденному до –15°C раствору 102 мг (0.25 ммоль) холевой кислоты и 105 мкл (0.75 ммоль) триэтиламина в 2 мл сухого THF при перемешивании добавляли 33 мкл (0.25 ммоль) изобутилхлорформиата, через 10 мин к раствору образовавшегося смешанного ангидрида добавляли в один прием охлажденный раствор 95 мг (0.25 ммоль) тозилата этилового эфира *L*-тирози-

на (II) и 40 мкл (0.29 ммоль) триэтиламина в 5 мл THF. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при –15°C и оставляли на ночь при комнатной температуре; контроль реакции и разделения – ТСХ в системе хлороформ–метанол–CH₃COOH, 85 : 15 : 3 (обнаружитель А). Растворитель упаривали, к остатку добавляли 10 мл хлороформа и органическую фазу последовательно промывали конц. раствором лимонной кислоты (3 мл) и водой (3 мл). Органический растворитель удаляли в вакууме, остаток упаривали с толуолом. Остаток (169 мг) хроматографировали на колонке с 12 г окиси алюминия (акт. III) в смесях хлороформа с метанолом (от 2 до 10%), получали 130 мг (87%) эфира (III), *R*_f 0.28 (система 1; А, Б, Г). ИК-спектр, ν, см⁻¹: 3300–3500 (O–H, N–H), 1730, 1658 (C=O), 1514 (с, амид II). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 0.57 (3H, с, C18-H₃), 0.81 (3H, с, C19-H₃), 0.90 (3H, д, C21-H₃), 1.10 (3H, т, COOCH₂CH₃), 2.75, 2.86 (2H, два дд, CH₂C₆H₄OH), 3.61, 3.77 (2H, два м, H7, H12), 4.02 (2H, к, COOCH₂CH₃), 4.3 (2H, м, CHCOOH, C₆H₄OH), 6.64, 6.98 (4H, два д, C₆H₄), 8.12 (1H, д, CONH). УФ (16.6 mM NaOH в метаноле), λ_{max}, нм (ε, M⁻¹ cm⁻¹): 245 (8950), 294 (2030). Масс-спектр (²⁵²Cf), *m/z*: 601.3 [M + H]⁺.

***N*-Холил-*L*-тирозин (IV).** Раствор 75 мг (0.125 ммоль) эфира (III) в 5.5 мл метанола обрабатывали 1 мл 1 н. NaOH (перемешивание 20 ч при комнатной температуре), подкисляли, упаривали, добавляли хлороформ–метанол, 1 : 1 (10 мл), фильтровали, упаривали. Остаток подвергали гель-фильтрации на сефадексе LH-20 в системе хлороформ–метанол, 1 : 1, и хроматографии на колонке с 3.5 г силикагеля Merck 60 (40–63 мкм), элюируя градиентной системой хлороформ против метанола с 6% воды. Выход 53 мг (74%), *R*_f 0.40 (система 2; А, Б, Г). ИК-спектр, ν, см⁻¹: 3300–3500 (O–H, N–H), 1720 плечо, 1600–1680 (C=O), 1514 (с, амид II). Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.): 0.88 (3H, с, C18-H₃), 1.10 (3H, с, C19-H₃), 1.16 (3H, д, C21-H₃), 3.04, 3.29 (2H, два дд, CH₂C₆H₄OH), 3.99, 4.14 (2H, два м, H7, H12), 4.75 (1H, CHCOOH), 6.87, 7.21 (4H, два д, C₆H₄). УФ, λ_{max}, нм (ε, M⁻¹ cm⁻¹), (0.1 M NaOH): 241 (10450), 294 (2490); (0.1 M HCl): 223 (6900), 275 (1320). MALDI-MS, *m/z*: 594.9 [M + Na]⁺.

***N*-Оксисукцинимидный эфир холевой кислоты (V).** К раствору 289 мг (707 мкмоль) холевой кислоты в 4 мл THF добавляли 81 мг (704 мкмоль) *N*-гидроксисукцинимид, охлаждали реакционную смесь льдом и при перемешивании добавляли 0.8 мл 20% раствора DCC в CCl₄, оставляли на 1 сут при 0°C. Затем добавляли еще 0.4 мл раствора DCC и через 4 ч еще 0.4 мл. Через 4 ч к реакционной смеси добавляли 0.8 мл 1.5% раствора щавелевой кислоты в эфире, выдерживали 10 мин при 20°C, фильтровали и упаривали. Остаток очищали на колонке (1.3 × 100 см) с сефадексом LH-20 в системе хлороформ–метанол, 1 : 1, а затем хромато-

графией на колонке с 20 г силикагеля в градиентной системе хлороформ против метанола с 1% воды (контроль ТСХ в системе хлороформ–метанол–CH₃COOH, 88 : 12 : 1). Получали 230 мг (65%) эфира (V): аморфное вещество, R_f 0.31 (система 1; А, Г); MALDI-MS, m/z : 528.7 [$M + Na$]⁺.

N^α-Холил-N^δ-Вос-L-орнитин (VII). К раствору 90 мг (390 мкмоль) N^δ-Вос-орнитина (VI) и 65 мг NaHCO₃ в 2.5 мл воды при перемешивании прибавляли раствор 196 мг (388 мкмоль) активированного эфира (V) в 6 мл диоксана, смесь перемешивали 1 сут при комнатной температуре и упаривали наполовину. Остаток переносили в делительную воронку с 100 мл этилацетата и 40 мл 20% лимонной кислоты, органический слой отделяли, промывали насыщ. NaCl, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали. Из остатка хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование системой хлороформ против метанола с 10% AcOH) выделяли 154 мг (64%) бесцветного аморфного вещества (VII), R_f 0.53 (система 2; А, Б). ИК, ν , см⁻¹: 3420 (O–H), 1724, 1660 (C=O), 1536 (с, амид II). Спектр ¹H-ЯМР: 0.70 (3H, с, C18-H₃), 0.91 (3H, с, C19-H₃), 1.02 (3H, д, C21-H₃), 1.44 (9H, с, C(CH₃)₃), 3.08 (2H, т, CH₂NHВос), 3.36, 3.82, 3.96 (3H, три м, H3, H7, H12), 4.41 (м, CHCOOH). MALDI-MS, m/z : 662 [$M + H + K$]⁺; 646 [$M + H + Na$]⁺; 524 [$M - Вос + 2H$]⁺.

N^α-Холил-L-орнитин (VIII, TGC). Раствор 120 мг (193 мкмоль) амида (VII) в 6 мл TFA выдерживали 30 мин при комнатной температуре в атмосфере аргона, смесь дважды упаривали с толуолом. Остаток очищали на колонке с 8 г Li-Chroprep RP-8 в системе метанол–1 н. NH₄OH, 55 : 45. Получали 85 мг (85%) бесцветного аморфного продукта (VIII), R_f 0.12 (система 3; А, Б, В). ИК-спектр, ν , см⁻¹: 3408 (O–H, N–H), 1644 (C=O), 1588 (амид II). Спектр ¹H-ЯМР: 0.68 (3H, с, C18-H₃), 0.90 (3H, с, C19-H₃), 1.01 (3H, д, C21-H₃), 2.94 (2H, т, CH₂NH₂), 3.36 (м, H3, CD₃OH), 3.80, 3.96 (2H, два м, H7, H12), 4.38 (1H, м, CHCOOH). MALDI-MS, m/z : 546 [$M + Na$]⁺; 524 [$M + H$]⁺.

N^α-Холил-N^δ-NBD-L-орнитин (IX, NGC). К раствору 32 мг (61 мкмоль) N^α-холил-L-орнитина (VIII) в 8 мл смеси хлороформ–этанол, 1 : 3, при перемешивании добавляли 20 мкл (144 мкмоль) триэтиламина и раствор 25 мг (125 мкмоль) NBD-Cl в 1.3 мл этанола. Смесь выдерживали 1 сут при 45°C в атмосфере аргона; хроматографией на Li-Chroprep RP-8 в системе метанол–вода–TFA, 65 : 34 : 1, и затем на силикагеле (элюирование градиентной системой хлороформ против метанола с 10% AcOH) получали 15 мг (36%) производного (IX) в виде оранжевого аморфного вещества, R_f 0.35 (система 2; А, Г). ИК, ν , см⁻¹: 3420 (O–H, N–H), 1622 (C=O), 1588 (амид II). Спектр ¹H-ЯМР: 0.67 (3H, с, C18-H₃), 0.91 (3H, с, C19-H₃), 1.01 (3H, д, C21-H₃), 3.80, 3.94 (2H, два м, H7, H12), 6.31, 8.52 (2H,

два д, NBD). УФ (этанол), λ_{max} , нм (ϵ , M⁻¹ см⁻¹): 470 (19100), 336 (6800). MALDI-MS, m/z : 709 [$M + Na$]⁺.

N^α-Холил-N^δ-(флуоресцеин-5-тиокарбамоил)-L-орнитин (X). К раствору 23 мг (44 мкмоль) N^α-холил-L-орнитина (VIII) в 6 мл смеси DMF–карбонат–бикарбонатный буфер (50 mM, pH 9.4), 1 : 2, при перемешивании добавляли 18 мг (46 мкмоль) FITC. Смесь выдерживали 4 ч при 30°C, далее с интервалами в 1 ч прибавляли трижды по 3 мг FITC до исчезновения в смеси амина (VIII) (ТСХ в системе 2; В, Г). Смесь подкисляли 1 н. HCl до pH ~3, упаривали дважды с ксилолом до объема ~0.5 мл, добавляли 1.5 мл хлороформа, фильтровали и упаривали. Остаток фильтровали в системе хлороформ–метанол–вода, 50 : 50 : 5, через колонку 1.3 × 100 см с сефадексом LH-20. Фракции, содержащие продукт (42 мг), дважды хроматографировали на колонке с 2 г силикагеля в системе хлороформ–метанол–вода–CH₃COOH, 80 : 20 : 2 : 2. Получали 26 мг (65%) зонда (X) в виде оранжевого аморфного вещества, R_f 0.28 (система 2; А, Г). УФ (16.6 mM NaOH в метаноле), λ_{max} 498 нм (ϵ 78000 M⁻¹ см⁻¹). ИК, ν , см⁻¹: 3300–3450 (O–H, N–H), 1732 (C=O), 1608 (амид II). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆; KCCB, Гц): сигналы холила: 0.57 (3H, с, C18-H₃), 0.79 (3H, с, C19-H₃), 0.93 (3H, д, C21-H₃, $J_{21,20}$ 6.4), 3.60, 3.78 (2H, два м, H7, H12), 3.97, 4.07, 4.32 (3H, три уш.д, C3-, C7-, C12-OH), 4.14 (1H, м, CHCOOH); сигналы флуоресцеинила: 6.55, 6.57, 6.60 (4H, 3 д, H1', H2', H7', H8'), 6.667, 6.671 (2H, 2 с, H4', H5'), 7.15 (д, H7, $J_{7,6}$ 8.27), 7.76, 7.96 (2H, два уш.с, H6, H4), 8.27 (1H, уш.с, NH), 10.12 (оч.ш.с, COOH, ArOH). MALDI-MS, m/z : 913.3 [$M + H$]⁺.

Растворы детергентов и зондов для определения ККМ. Аликвоту базового раствора зонда в смеси хлороформ–MeOH, 1 : 2, упаривали, добавляли стехиометрическое количество 0.1 н. NaOH с 2 мл MeOH, упаривали, остаток растворяли в буфере (20 mM Трис–HCl, 130 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.02% NaN₃, pH 8.0 ± 0.2, или 10 mM карбонат–бикарбонатный, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.02% NaN₃, pH 9.8 ± 0.2) до конечной концентрации зонда в исходном растворе 5 mM (TGC и NGC) или 1 mM (FGC). Десять растворов меньшей концентрации для каждого зонда готовили из исходного раствора разбавлением буфером.

Таким же образом готовили растворы TGC и NGC для определения ККМ с помощью родаминового зонда; буфер, pH 8.0, содержал 0.5 мкМ родамина 6G.

Исходный раствор 19 mM Chl-ONa содержал 20 мкМ зонда NGC (буфер основной, pH 9.8). Исходный 4 mM раствор дезоксихолата натрия содержал 1 мкМ зонда FGC (буфер с pH 8.0).

Флуоресцентные измерения проводили в кварцевых кюветах (5 × 5 мм) при 20°C. Корректированные спектры возбуждения регистрировали при длине волны испускания 310, 550 и 550 нм, спектры испускания флуоресценции – при воз-

буждении на 280, 480 и 490 нм для TGC, NGC и FGC соответственно); щели на возбуждении и испускании 1.5 и 3 нм соответственно. В экспериментах по определению ККМ холата натрия значения интенсивности флуоресценции в максимуме испускания корректировали с учетом эффекта внутреннего фильтра как описано ранее [22]. Анизотропию флуоресценции измеряли по стандартной методике [22].

Интенсивность рассеянного света в опытах по определению ККМ зондов определяли на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 при одинаковых длинах волн возбуждения и испускания: 538 нм для зондов TGC и NGC и 576 нм для зонда FGC; щели на возбуждении и испускании 1.5 и 3 нм соответственно. Для зондов NGC и FGC на возбуждении устанавливали фильтр ОС-11 (отсекает свет с $\lambda < 500$ нм).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Moller J.V., Le Maire M., Andersen J.P. // Prog. Protein-Lipid Interact. 1983. V. 2. P. 147–196.
- Hooper N.M. // Mol. Membr. Biol. 1999. V. 16. P. 145–156.
- Mayer L.D., Bally M.B., Hope M.J., Cullis P.R. // Chem. Phys. Lipids. 1986. V. 40. P. 333–345.
- Silvius J.R. // Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1992. V. 21. P. 323–348.
- Lundahl P., Zeng C.-M., Lagerquist H., Cottis Chalk I., Greijer E. // J. Chromatogr. 1999. V. 722. P. 103–120.
- Lasch J. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1241. P. 269–292.
- Davenport L. // Methods Enzymol. 1997. V. 278. P. 487–512.
- Молотковский Ю.Г. // Биооргани. химия. 1999. Т. 25. С. 855–867.
- Turro N.J., Tanimoto Y., Gabor G. // Photochem. Photobiol. 1980. V. 31. P. 527–532.
- Shore N.E., Turro N.J. // J. Am. Chem. Soc. 1975. V. 97. P. 2488–2496.
- Schneider S., Schramm U., Schreyer A., Buscher H.-P., Gerok W., Kurz G. // J. Lipid Res. 1991. V. 32. P. 1755–1767.
- Razinkov V.I., Hernandez-Jimenez E.I., Mikhalyov I.I., Cohen F.S., Molotkovsky J.G. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1329. P. 149–168.
- Rando R.R., Bangerter F.W., Alecio M.R. // Biochim. Biophys. Acta. 1982. V. 684. P. 12–20.
- Полозова А.И., Дубачев Г.Э., Симонова Т.Н., Барсуков Л.И. // Биооргани. химия. 1993. Т. 19. С. 655–663.
- Polozova A.I., Dubachev G.E., Simonova T.N., Barsukov L.I. // FEBS Lett. 1995. V. 358. P. 17–22.
- Carey M.C., Montet J.-C., Phillips M.C., Armstrong M.J., Mazer N.A. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 3637–3648.
- Walter A., Vinson P.K., Kaplun A., Talmon Y. // Biophys. J. 1991. V. 60. P. 1315–1325.
- Schramm U., Dietrich S., Schneider S., Buscher H.-P., Gerok W., Kurz G. // J. Lipid Res. 1991. V. 32. P. 1769–1779.
- Coello A., Meidjide F., Nunez E.R., Tato J.V. // J. Pharm. Sci. 1996. V. 85. P. 9–15.
- Neugebauer J. A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry. Potsdam (N.Y.): Clarkson University, 1987. P. 26.
- Helenius A., McCaslin D.R., Fries E., Tanford C. // Methods Enzymol. 1979. V. 56. P. 734–749.
- Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. Гл. 2, 5, 11.
- Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Sixth Edition / Ed. M.T.Z. Spence. Eugene (OR): Molecular Probes, 1996.
- Kachel K., Asuncion-Punzalan E., London E. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1374. P. 63–76.
- Chattopadhyay A., London E. // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 39–45.
- Chattopadhyay A. // Chem. Phys. Lipids. 1990. V. 53. P. 1–15.
- Carey M.C., Montet J.-C., Small D.M. // Biochemistry. 1975. V. 14. P. 4896–4905.
- Arai I., Muramatsu I. // J. Org. Chem. 1983. V. 48. P. 121–123.

The Synthesis and Properties of Fluorescent-labeled Detergents, Analogues of Glycocholic Acid

I. V. Grechishnikova, I. D. Khaznaferova, S. V. Kalinin, L. I. Barsukov, and Jul. G. Molotkovsky[#]

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

For studying membrane processes with participation of detergents, fluorescent analogues of glycocholic acid containing *p*-hydroxybenzyl, 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl, or fluorescein-5-thiocarbamoyl fluorophore in the glycol moiety attached to glycocholic acid were synthesized. The fluorophores are in the probes near their carboxyl groups and, in membrane systems, should therefore be situated on the interface and be sensitive to phase transitions. The critical micelle concentrations were determined for the analogues and found to be close to those of cholate and glycocholate in the case of the first two compounds. We presume that the behavior of the probes in membrane systems will mimic the behavior of the bile acid salts.

Key words: fluorescent probes, bile acids, micellar properties, synthesis

[#] To whom correspondence should be addressed; phonelfax: +7 (095) 330-6601; e-mail: jgmol@ibch.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 9. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.