



УДК 547.392.52.057

© 1993 г. Д. В. Куклев, В. Г. Рыбин *, А. Б. Имбс *,
В. В. Безуглов

СИНТЕЗ МОНОЭПОКСИДОВ АРАХИДОНОВОЙ, ЭЙКОЗАПЕНТАЕНОВОЙ И ДОКОЗАГЕКСАЕНОВОЙ КИСЛОТ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
РАН Москва;*

**Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток*

Разработан удобный препаративный метод синтеза *цис*-моноэпоксипроизводных свободных полиненасыщенных жирных кислот. Исходную кислоту в спиртовом растворе обрабатывали 1,25 экв. *m*-хлорнадбензойной кислоты, получали смесь *цис*-моноэпоксидов (выход 45%), которую разделяли препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией. Описаны синтезы *цис*-моноэпоксипроизводных из арахидоновой 20 : 4 ($n - 6$), эйкозапентаеновой 20 : 5 ($n - 3$) и докозагексаеновой 22 : 6 ($n - 3$) кислот.

Моноэпоксиды полиненасыщенных жирных кислот являются продуктами эпексигеназного направления каскада арахидоновой и других полиненасыщенных жирных кислот (PUFA). Это направление включает в себя цитохром-*P*-450-зависимые (в присутствии кислорода и NADPH) процессы: а) эпоксилирование PUFA до моноэпоксидов, которые далее под действием эпоксидгидролаз превращаются в вицинальные диолы, б) аллильное окисление до моногидрокси-PUFA (подобные липоксигеназным продуктам), в) ω - или $(\omega - 1)$ -гидроксилирование PUFA до 20- и 19-гидроксипроизводных.

К настоящему времени эпоксигеназная активность описана для микросом печени [1], почек [2], глаз [3] и лейкоцитов [4]. Биологическая активность *цис*-моноэпоксипроизводных арахидоновой кислоты (EET_n) к настоящему времени достаточно хорошо документирована (см. таблицу), однако моноэпоксипроизводные других PUFA (например, эйкозапентаеновой 20 : 5 ($n - 3$) (EPA) и докозагексаеновой 22 : 6 ($n - 3$) (DHA)) изучены в гораздо меньшей степени. Это связано прежде всего с отсутствием удобного метода получения этих соединений.

Цель настоящего исследования — разработка простого метода синтеза *цис*-моноэпоксипроизводных PUFA, позволяющего получать эти соединения в количествах, достаточных для биологических испытаний.

Моноэпоксипроизводные PUFA удобно синтезировать с применением реакции Прилежаева. Обычно субстратами при этом являются метиловые эфиры соответствующих PUFA [14, 15]. Однако при омылении сложного эфира происходит расщепление оксиранового цикла, что делает невозможным получение моноэпоксидов свободных PUFA.

Для синтеза моноэпокси кислот мы применили ранее не описанное неселективное эпоксилирование свободной полиненасыщенной жирной кислоты *m*-хлорнадбензойной кислотой с последующим разделением позиционных изомеров с

Краткая характеристика биологической активности *цис*-моноэпоксипроизводных арахидоновой кислоты

Биологическая активность	Соединение *
Стимуляция высвобождения соматостатина <i>in vitro</i> из срединного бугорка гипоталамуса [5].	5,6-EETra
Стимуляция высвобождения инсулина из панкреатических островков <i>in vitro</i> [6]	14,15-EETra
Стимуляция высвобождения глюкагона из панкреатических островков <i>in vitro</i> [7]	8,9-EETra
Вазодилатор кровяного артериального потока в стенках кишок <i>in vivo</i> [8]	5,6-EETra
	8,9-EETra
	11,12-EETra
Ингибирование стимулированного вазопрессинном водоотделения в опухолях мочевого пузыря <i>in vivo</i> [9]	5,6-EETra
	11,12-EETra
	14,15-EETra
Увеличение выброса Ca^{2+} из микросом гладкой мышцы аорты собаки <i>in vivo</i> [10]	5,6-EETra
	11,12-EETA
	14,15-EETA
Увеличение количества свободного Ca^{2+} в цитозоле [11]	5,6-EETra
Ингибирование циклооксигеназы тромбоцитов <i>in vitro</i> [12]	14,15-EETra
Ингибирование агрегации тромбоцитов [13] и нейтрофилов <i>in vitro</i> [12]	14,15-EETra

* См. схему 1.

помощью ВЭЖХ. Выход смеси моноэпоксидов зависит от условий проведения реакции. Так, например, эпоксирирование в этаноле протекает гладко и приводит к целевым продуктам с выходом до 45%; из реакционной смеси можно извлечь до 40% исходной непрореагировавшей полиеновой кислоты. Таким образом, выход целевых моноэпоксидов с учетом конверсии составляет 75%. Непрореагировавшую полиненасыщенную кислоту можно еще раз ввести в реакцию эпоксирирования. Так, мы получали 67%-ную конверсию исходной полиненасыщенной кислоты за три цикла обработки.

В описываемых нами условиях проведения реакции Прилежаева происходит преимущественное окисление удаленных от группы COOH двойных связей молекул PUFA (см. схемы 1—3), что соответствует ранее описанному изомерному составу эпоксипроизводных, получаемых путем эпоксирирования сложных эфиров PUFA [14, 15].

По-видимому, свободная карбоксильная функция имеет сходное со сложноэфирной группой влияние на процесс электрофильного окисления двойных связей молекулы PUFA, а региоселективность реакции определяется как экранирующим действием ближних к окисляемой двойных связей, так и экранирующим действием карбоксильной группы, что хорошо соответствует ранним наблюдениям для реакции Прилежаева [16].

При выборе растворителя мы руководствовались необходимостью уменьшить активность надкислоты, соразмеряясь с лабильностью субстратов к окисляющим реагентам. Обычно используемые для проведения этой реакции в качестве растворителей хлористый метилен, хлороформ и четыреххлористый углерод не оптимальны, по нашему мнению, из-за чрезмерной активности надкислоты в этих растворителях [16], что приводит к образованию большого количества побочных продуктов — диэпоксидов — даже при обработке субстрата точно 1 экв. *m*-хлорнадбензойной кислоты [14, 15]. В описываемых нами условиях образование диэпоксидов PUFA происходит в незначительной степени. Из ряда других высокополярных растворителей, в которых окислительная активность *m*-хлорнадбензойной кислоты значительно снижена, этанол был выбран нами из-за удобства обработки реакционной смеси после проведения реакции.

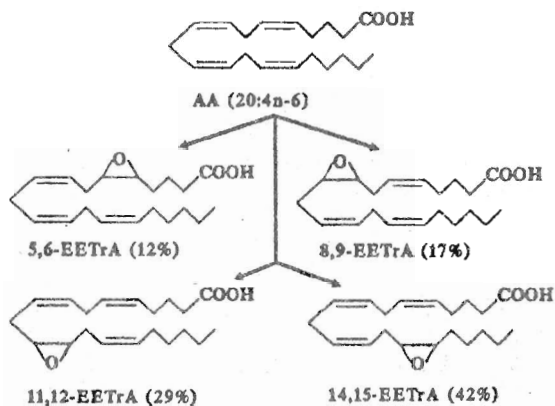


Схема 1. Изамерный состав *полностью-цис*-моноэпоксиэйкозатриеновых кислот (EETrA) (цифры перед криптограммой — положение эпокси-группы) — продуктов эпексидирования *полностью-цис*-эйкозатетраен-5,8,11,14-овой (арахидоновой) кислоты в условиях реакции Прилежаева

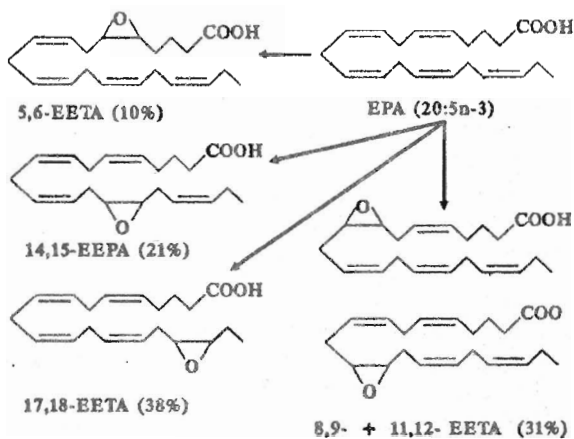


Схема 2. Изамерный состав *полностью-цис*-моноэпоксиэйкозатетраеновых кислот (EETA) — продуктов эпексидирования *полностью-цис*-эйкозопентаен-5,8,11,14,17-овой кислоты в условиях реакции Прилежаева

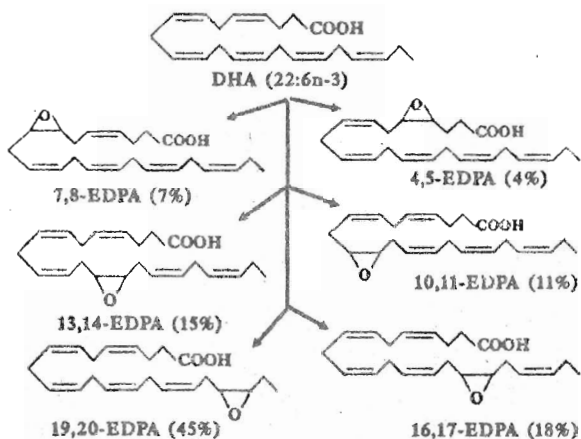


Схема 3. Изамерный состав *полностью-цис*-моноэпоксидокозапентаеновых кислот (EDPA) — продуктов эпексидирования *полностью-цис*-докозагексаен-4,7,10,13,16,19-овой кислоты в условиях реакции Прилежаева

Для селективного получения *цис*-моноэпоксипроизводных PUFA по ближайшей к карбоксильной группе двойной связи (5,6-ЕЕТгА — из АА, 5,6-ЕЕТА — из ЕРА) мы использовали ранее описанную Кори и сотр. [17] процедуру для синтеза 5,6-ЕЕТгА. Метилловый эфир 4,5-ЕДРА мы синтезировали по известному методу [18—20]. Полученные моноэпоксипроизводные PUFA использовались как стандарты при идентификации продуктов неселективного эпоксидирования.

В результате проведенного исследования разработан удобный препаративный метод синтеза эпоксигеназных метаболитов высоконенасыщенных жирных кислот, которые могут быть использованы для изучения их биологической активности и как стандарты в биохимических исследованиях.

Экспериментальная часть

УФ-спектры снимали в этаноле на приборе Specord UV VIS (Германия), масс-спектры записывали на приборе Varian Mat 44S (Германия) при ионизации электронным ударом (EI, энергия электронов 70 эВ). Для препаративного выделения эпоксикислот использовали жидкостный хроматограф DuPont 8800, снабженный колонкой Zorbax ODS (9,5×250 мм), либо ET (10×250 мм) Nucleosil 50-7. ТСХ проводили на пластинках силуфола UV 254 (Kavalier, ЧСФР) в системе *n*-гексан — диэтиловый эфир (1 : 1), обнаружение осуществляли 5% раствором фосфорно-молибденовой кислоты в этаноле. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L (Chemapol, ЧСФР); ход разделения контролировали ТСХ. Растворы упаривали на роторном испарителе при температуре бани не выше 30° С. Органические растворители очищали по стандартным методикам. Исходные высокочистые препараты PUFA (> 96%, по данным ГЖХ) были получены из природных смесей жирных кислот, как описано ранее [21, 22].

Метилирование эпоксикислот диазометаном. К раствору 10 мг эпоксикислоты в 1 мл эфира прибавляли по каплям эфирный раствор диазометана до появления слабо-желтого окрашивания. Реакционную смесь выдерживали в течение 15 мин при комнатной температуре, упаривали в вакууме, растворяли в *n*-гексане. Метилловые эфиры эпоксикислот имели R_f 0,7.

Триметилсилильные (TMS) производные хлоргидринов PUFA для масс-спектрометрического анализа. Образец метилового эфира эпоксикислоты (3—10 мг) растворяли в 200 мкл пиридина и прибавляли 50 мкл триметилхлорсилана, выдерживали 1 ч при 60° С. После охлаждения реакционную смесь упаривали в токе аргона, сухой остаток растворяли в 2—5 мл *n*-гексана и фильтровали через 100 мг силикагеля. Полученные TMS-эфиры хлоргидринов метиловых эфиров PUFA имели R_f 0,9.

Синтез эпоксидов арахидоновой кислоты. К раствору 200 мг арахидоновой кислоты в 25 мл абсолютного этанола по каплям при перемешивании прибавляли раствор 140 мг (1,25 экв.) *m*-хлорнадбензойной кислоты в 15 мл этанола. Реакционную смесь выдерживали в течение 30 мин, прибавляли 50 мг Na_2SO_3 , смесь интенсивно перемешивали 20 мин, упаривали в вакууме, остаток хроматографировали на 10 г силикагеля, элюируя градиентной смесью эфира (0 → 25%) с *n*-гексаном, содержащей 0,6% уксусной кислоты. Получали 94 мг (45%) смеси изомерных эпоксикислот в виде бесцветного, подвижного масла, R_f 0,21—0,46 (диффузное пятно). УФ-спектр: λ_{max} 206 нм. Эпоксиды разделяли с помощью обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ (RP C18), элюируя системой MeOH — H_2O — AcOH (75 : 25 : 0,05). Получали 14,15-ЕЕТгА: k' 4,8, 30 мг (42%); 8,9-ЕЕТгА: k' 5,5, 15 мг (17%), 11,12-ЕЕТгА: k' 6,1, 20 мг (29%); 5,6-ЕЕТгА: k' 7,1, 8,5 мг (12%). Всего выделено 73,5 мг эпоксидов (потери при ВЭЖХ 24%). Индивидуальные эпоксиды идентифицировали масс-спектрометрически в виде полученных из них триметилсилильных производных соответствующих метиловых эфиров хлоргидринов.

Масс-спектр, m/z (предполагаемая структура иона):
 14,15-ЕЕТРА: 442 $[M]^+$, 371 $[M - C_5H_{11}]^+$, 221 $[C_5H_{11}CH(OTMS)CHCl]^+$, 173 $[C_5H_{11}CH(OTMS)]^+$;
 8,9-ЕЕТРА: 442 $[M]^+$, 291 $[M - C_5H_{11}(CH=CHCH_2)_2]^+$, 301 $[M - MeOOC(CH_2)_3(CH=CHCH_2)]^+$, 253 $[C_5H_{11}(CH=CHCH_2)_2CH(OTMS)]^+$;
 11,12-ЕЕТРА: 442 $[M]^+$, 331 $[M - (CH_2CH=CH)C_5H_{11}]^+$, 261 $[C_5H_{11}(CH=CHCH_2)CH(OTMS)CHCl]^+$, 213 $[C_5H_{11}(CH=CHCH_2)CH(OTMS)]^+$;
 5,6-ЕЕТРА: 442 $[M]^+$, 341 $[M - MeOOC(CH_2)_3]^+$, 251 $[MeOOC(CH_2)_3CH(OTMS)CHCl]^+$, 293 $[C_5H_{11}(CH=CHCH_2)_3CH(OTMS)]^+$.

Моноэпоксиды эйкозапентаеновой кислоты синтезировали как описано для эпоксидов арахидоновой кислоты. Из 531 мг ЕРА получали 232 мг (42%) смеси изомерных эпоксикислот в виде бесцветного, подвижного масла, R_f 0,20—0,42 (диффузное пятно). УФ-спектр: λ_{max} 206 нм. Эпоксиды разделяли с помощью обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ как описано выше. Получали 17,18-ЕЕТА (k' 4,3) 70,5 мг (38%); 14,15-ЕЕТА (k' 5,0), 39 мг (21%); 8,9-ЕЕТА (k' 5,3) и 11,12-ЕЕТА (k' 5,4) 58 мг (31%); 5,6-ЕЕТА (k' 6,2) 18,5 мг (10%). Общий выход эпоксидов 186 мг (потери при ВЭЖХ 20%). Выделенные эпоксиды идентифицировали масс-спектрометрически.

Масс-спектр, m/z (предполагаемая структура иона):
 17,18-ЕЕТА: 440 $[M]^+$, 411 $[M - Et]^+$, 179 $[EtCH(OTMS)CHCl]^+$, 131 $[EtCH(OTMS)]^+$.
 14,15-ЕЕТА: 440 $[M]^+$, 371 $[M - Et(CH=CHCH_2)]^+$, 219 $[Et(CH=CHCH_2)CH(OTMS)CHCl]^+$, 171 $[Et(CH=CHCH_2)CH(OTMS)]^+$.
 8,9-ЕЕТА (а) и 11,12-ЕЕТА (б): 440 $[M]^+$, 299 $[M - MeOOC(CH_2)_3(CH=CHCH_2)]^+$ (а); 291 $[MeOOC(CH_2)_3(CH=CHCH_2)CH(OTMS)CHCl]^+$ (а), 251 $[Et(CH=CHCH_2)_3CH(OTMS)]^+$ (а); 331 $[M - Et(CH=CHCH_2)_2]^+$ (б), 259 $[M - Et(CH=CHCH_2)_2CH(OTMS)CHCl]^+$ (б), 211 $[Et(CH=CHCH_2)_2CH(OTMS)]^+$ (б).
 5,6-ЕЕТА: 440 $[M]^+$, 339 $[M - MeOOC(CH_2)_3]^+$, 291 $[Et(CH=CHCH_2)_4CH(OTMS)]^+$, 251 $[MeOOC(CH_2)_3CH(OTMS)CHCl]^+$.

Моноэпоксиды докозагексаеновой кислоты синтезировали как описано для эпоксидов арахидоновой кислоты. Из 810 мг ДНА получали 373 мг (44%) смеси изомерных эпоксикислот в виде бесцветного, подвижного масла. R_f 0,21—0,46 (диффузное пятно). УФ-спектр: λ_{max} 208 нм. Эпоксиды разделяли с помощью обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ (RP C18) в системе MeOH — H₂O — AcOH (82 : 18 : 0,05). Полного разделения достичь не удалось. Получены 19,20-ЕДРА: k' 7,7, 131 мг (46%); смесь 16,17-ЕДРА, 13,14-ЕДРА, 10,11-ЕДРА: k' 8,5, 122 мг (43%); 7,8-ЕДРА: k' 9,0, 20 мг (7%); 4,5-ЕДРА: k' 10,5, 11 мг (4%). Всего выделено 286 мг эпоксидов (потери при ВЭЖХ 17%).

Смеси изомеров эпоксикислот разделяли далее ВЭЖХ на немодифицированном силикагеле в системе *n*-гексан — изопропанол — уксусная кислота (100 : 0,2 : 0,01). Получены 16,17-ЕДРА: k' 14,2 (18%); 13,14-ЕДРА: k' 16,0 (15%); 10,11-ЕДРА: k' 19,2 (11%).

Выделенные эпоксиды идентифицировали масс-спектрометрически.

Масс-спектр, m/z (предполагаемая структура иона):
 19,20-ЕДРА: 466 $[M]^+$, 437 $[M - Et]^+$, 131 $[EtCH(OTMS)]^+$;
 16,17-ЕДРА: 466 $[M]^+$, 219 $[Et(CH=CHCH_2)CH(OTMS)CHCl]^+$, 171 $[Et(CH=CHCH_2)CH(OTMS)]^+$;
 13,14-ЕДРА: 466 $[M]^+$, 211 $[Et(CH=CHCH_2)_2CH(OTMS)]^+$, 259 $[Et(CH=CHCH_2)_2CH(OTMS)CHCl]^+$;
 10,11-ЕДРА: 466 $[M]^+$, 317 $[M - Et(CH=CHCH_2)_3]^+$, 251 $[Et(CH=CHCH_2)_3CH(OTMS)]^+$, 299 $[M - MeOOCCH_2CH_2(CH=CHCH_2)_2]^+$;
 7,8-ЕДРА: 466 $[M]^+$, 291 $[Et(CH=CHCH_2)_4CH(OTMS)]^+$, 277 $[M - Et(CH=CHCH_2)_4]^+$;
 4,5-ЕДРА: 466 $[M]^+$, 331 $[Et(CH=CHCH_2)_5CH(OTMS)]^+$, 237 $[M - Et(CH=CHCH_2)_5]^+$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Capdevila J., Kim Y. R., Martin-Wixstrom C., Falck J. R., Manna S., Estabrook R. W.//Arch. Biochem. Biophys. 1985. V. 243. № 1. P. 8—19.
2. Ferreri N., Schwartzman M., Abraham N., Chander P., McGiff J.//J. Pharmacol. Exp. Ther. 1984. V. 231. P. 441—448.
3. Schwartzman M., Balazy M., Masferrer J., Abraham N., McGiff J., Murphy R. C.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 22. P. 8125—8129.
4. Bednar M., Schwartzman M., Abraham N., McGiff J., Mullane K.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 123. № 2. P. 581—588.
5. Capdevila J., Chacos N., Falck J. R., Manna S., Negro-Vilar A., Ojeda S.//Endocrinology. 1983. V. 113. P. 421—423.
6. Falck J. R., Manna S., Moltz J., Chacos N., Capdevila J.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 114. № 2. P. 743—749.
7. Oliw E., Benthin G.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 126. № 3. P. 1090—1096.
8. Proctor K., Falck J. R., Capdevila J.//Circ. Res. 1987. V. 60. № 1. P. 50—59.
9. Schlondorff D., Petty E., Oates J.//J. Amer. Physiol. 1987. V. 253. P. F464—F470.
10. Kutsy, P., Falck J., Weiss G., Manna S., Chacos N., Capdevila J.//Prostaglandins. 1983. V. 26. № 1. P. 13—21.
11. Snyder G., Lattanzio L., Yadagiri P., Falck J. R., Capdevila J.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1986. V. 139. № 3. P. 1188—1194.
12. Fitzpatrick F. A., Ennis M. D., Baze M. E., Wynalda M. A., McGee J. E., Liggett W. F.//J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 32. P. 15334—15338.
13. Proctor K. G. et al.//Blood Vessels. 1989. V. 26. № 1. P. 53—64.
14. VanRollins M., Frade P. D., Carretero O. A.//J. Lipid Res. 1989. V. 30. № 2. P. 275—286.
15. VanRollins M.//Lipids. 1990. V. 25. № 8. P. 481—490.
16. Прилежаева Е. Н.//Реакция Прилежаева. Электрофильное окисление. М.: Наука, 1974. С. 183.
17. Corey E. J., Narwa H., Falck J. R.//J. Amer. Chem. Soc. 1979. V. 101. № 6. P. 1586—1589.
18. Куклев Д. В., Шевченко В. П., Нагаев И. Ю., Латышев Н. А., Безуглов В. В.//Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 11. С. 1574—1581.
19. Куклев Д. В., Латышев Н. А., Безуглов В. В.//Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 10. С. 1431—1433.
20. Kuklev D. V., Aizdaicher N. A., Imbs A. B., Bezuglov V. V., Latyshev N. A.//Phytochemistry. 1992. V. 31. № 7. P. 2401—2403.
21. Gaiday N. V., Imbs A. B., Kuklev D. V., Latyshev N. A.//J. Amer. Oil Chem. Soc. 1991. V. 68. № 4. P. 230—233.
22. Имбс А. Б., Гайдай Н. В., Куклев Д. В., Латышев Н. А.//Тез. докл. III Всесоюз. совещан. «Биологически активные вещества при комплексной утилизации гидробионтов». Владивосток, 1988. С. 47.

Поступила в редакцию
30.IV.1993

D. V. Kuklev, V. G. Rybin *, A. B. Imbs *, V. V. Bezuglov

**SYNTHESIS OF MONO EPOXIDES OF ARACHIDONIC,
EICOSAPENTAENOIC AND DOCOSAHEXAENOIC ACIDS**

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow;

* Institute of Marine Biology, Far East Division,
Russian Academy of Sciences, Vladivostok

A practical synthesis of *cis*-monoepoxides from free arachidonic 20:4 ($n - 6$), eicosapentaenoic 20:5 ($n - 3$) and docosahexaenoic 22:6 ($n - 3$) acids, their Cytochrome P-450 epoxygenase metabolites, is described. The free polyunsaturated fatty acids (PUFA) were oxidized each by 1.25 eq. *m*-chloroperbenzoic acid in ethanol to give a mixture of PUFAs' mono-epoxy derivatives (45%) which was separated by HPLC and the individual isomers were characterised by mass spectrometry. All regioisomers of the free PUFAs' *cis*-monoepoxides were thus obtained.