



УДК 547.392.52.057

© 1993 Д. В. Куклев, А. Б. Имбс *,
Фам Куок Лонг *, В. В. Безуглов

ПРОДУКТЫ ЛИПОКСИГЕНАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПИНОЛЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

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

* Институт биологии моря Дальневосточного отделения РАН, Владивосток

Ключевые слова: 5Z,9Z,12Z-октадекатриеновая кислота, 15-липоксигеназа.

Пиноленовая кислота (5Z,9Z,12Z-октадекатриеновая кислота) — (I) (см. схему) — относится к группе ненасыщенных жирных C₁₈-кислот с нерегулярным расположением двойных связей. Ее ближайшими структурными аналогами являются колумбиновая (5E,9Z,12Z-октадекатриеновая) кислота — 5-транс-изомер пиноленовой кислоты, α-линоленовая (9Z,12Z,15Z-октадекатриеновая) и γ-линоленовая (6Z,9Z,12Z-октадекатриеновая) кислоты.

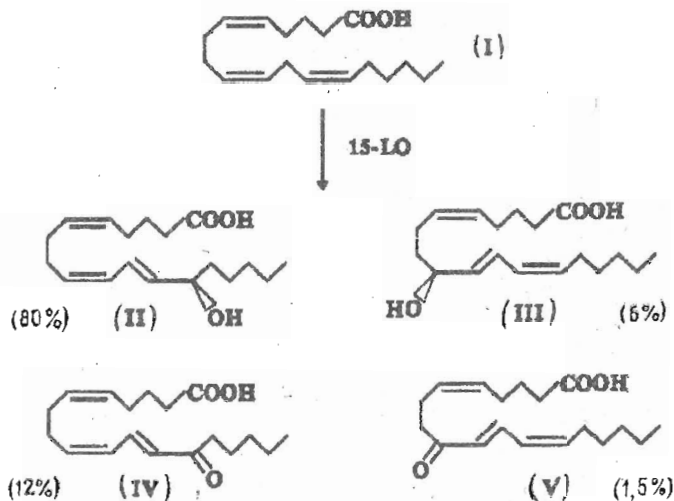
Пиноленовая кислота входит в состав липидов многих видов животных и растений [1, 2]. Ее основной источник — масло орехов голосеменных растений. Например, в видах семейства *Pinaceae* ее содержание достигает 15% [3]. Масла, включающие пиноленовую кислоту, являются полноценными диетическими продуктами [4, 5], а также традиционно используются в лечебных целях, в частности как противоожоговые средства.

Оксилипины * C₁₈-семейства в настоящее время изучаются как возможные структурные аналоги эйкозаноидов в цепях биохимической регуляции млекопитающих [7, 8]. Неметиленразделенные жирные кислоты C₁₈-семейства до настоящего времени не рассматривали в качестве предшественников оксилипинов: в литературе отсутствуют данные об окисленных производных пиноленовой кислоты, равно как и о путях их метаболизма в организме человека и животных.

Целью данной работы было установление структуры и состава продуктов, образующихся при окислении пиноленовой кислоты 15-липоксигеназой соевых бобов.

Пиноленовую кислоту выделяли из смеси общих жирных кислот семян *Pinus koraiensis* обращенно-фазовой колоночной хроматографией (чистота более 96% по данным ГЖХ). Препаративное окисление пиноленовой кислоты 15-липоксигеназой (15-LO) проводили как описано ранее [9]. В реакцию вводили 500 мг кислоты и 50 мг фермента в боратном буфере (pH 9,0). После инкубации в течение 40 мин

* Оксилипины — термин, предложенный Гервиком [6] для описания продуктов метаболических превращений полиненасыщенных жирных кислот с участием ферментативного окисления хотя бы на одной стадии.



при 23° С из реакционной смеси выделяли 230 мг пиноленовой кислоты и 47,8 мг смеси продуктов окисления (конверсия 17%), состоящей из 38,4 мг (80%) 13-гидрокси-5Z,9Z,11E-октадекатриеновой кислоты (II) (см. схему), 2,9 мг (6%) 9-гидрокси-5Z,10E,12Z-октадекатриеновой кислоты (III), 5,7 мг (12%) 13-оксо-5Z,9Z,11E-октадекатриеновой кислоты (IV) и 0,8 мг (1,5%) 9-оксо-5Z,10E,12Z-октадекатриеновой кислоты (V).

Ниже приведены данные ЯМР-спектров (δ , м.д.; J , Гц) и масс-спектров (m/z).

Соединение (I). ¹H-ЯМР-спектр: 0,89 (т, 3H, H-18; $J_{18,17}$ 6), 1,3 (м, 6H, H-15, 16, 17), 1,71 (м, 2H, H-3), 2,12 (м, 8H, H-4, 7, 8, 14), 2,36 (т, 2H, H-2; $J_{3,2}$ 5,5), 2,79 (дд, 2H, H-11), 5,39 (м, 6H, H-5, 6, 9, 10, 12, 13). Масс-спектр пирролидида*: 331 [M]⁺, 260 [$M - C_5H_{11}$]⁺, 234 [$M - (CH=CH)C_5H_{11}$]⁺, 194 [$C_4H_8N(CO)(CH_2)_3CH=CHCH_2CH_2$]⁺, 180 [$C_4H_8N(CO)(CH_2)_3CH=CHCH_2$]⁺, 140 [$C_4H_8N(CO)(CH_2)_3$]⁺, 126 [$C_4H_8N(CO)CH_2CH_2$]⁺, 113 [$C_4H_8N(CO)CH_2$]⁺.

Соединение (II). ВЭЖХ: k' 5,1 (колонка RSIL C18, MeOH — H₂O — AcOH, 75 : 25 : 0,02), ТСХ: R_f 0,15 (*n*-гептан — эфир, 1 : 1), УФ-спектр: λ_{max} 234 нм (ξ 24 600, этанол), ¹H-ЯМР-спектр: 0,89 (т, 3H, H-18, $J_{18,17}$ 6), 1,3 (м, 6H, H-15, 16, 17), 1,55 (м, 2H, H-14), 1,70 (м, 2H, H-3), 2,11 (м, 4H, H-4, 7), 2,22 (м, 2H, H-8), 2,365 (т, 2H, H-2; $J_{2,3}$ 5,5), 4,211 (ддд, 1H, H-13; $J_{13,12}$ 6,5), 5,36 (м, 1H, H-9), 5,43 (м, 2H, H-5, 6), 5,682 (дд, 1H, H-12; $J_{12,11}$ 16, $J_{12,13}$ 6,5), 6,00 (дд, 1H, H-10; $J_{10,11}$ 10, $J_{10,9}$ 11), 6,517 (дд, 1H, H-11; $J_{11,10}$ 10, $J_{11,12}$ 16). Масс-спектр пирролидида: 348 [$M + H$]⁺, 330 [$M + H - H_2O$]⁺, 276 [$M - C_5H_{11}$]⁺, 235 [$M - C_4H_8N(CO)CH_2$]⁺, 194 [$C_4H_8N(CO)(CH_2)_3CH=CHCH_2CH_2$]⁺, 180 [$C_4H_8N(CO)(CH_2)_3CH=CHCH_2$]⁺, 140 [$C_4H_8N(CO)(CH_2)_3$]⁺, 126 [$C_4H_8N(CO)CH_2CH_2$]⁺, 113 [$C_4H_8N(CO)CH_2$]⁺; метилового эфира с TMS-защищенной гидроксильной группой: 380 [M]⁺, 365 [$M - Me$]⁺, 309 [$M - C_5H_{11}$]⁺, 291 [$M - HOTMS + H$]⁺, 225 [$M - MeOOC(CH_2)_3CH=CHCH_2$]⁺, 181 [$M - CH=CHCH(OTMS)C_5H_{11}$]⁺; гидрированного над PtO₂ метилового эфира с TMS-защищенной гидроксильной группой: 371 [$M - Me$]⁺, 315 [$M - C_5H_{11}$]⁺, 173 [$M - TMSOCHC_5H_{11}$]⁺.

Соединение (III). ВЭЖХ: k' 5,6 (колонка RSIL C18, MeOH — H₂O — AcOH, 75 : 25 : 0,02), ТСХ: R_f 0,15 (*n*-гептан — эфир, 1 : 1), УФ-спектр: λ_{max} 234 нм (ξ 25 300,

* В скобках приведена предполагаемая структура иона.

этанол). Масс-спектр (III) гидрированного над PtO_2 метилового эфира с TMS-защищенной гидроксильной группой: 371 $[M - \text{Me}]^+$, 259 $[M - \text{C}_9\text{H}_{19}]^+$, 229 $[M - \text{TMSOCH}_2\text{C}_9\text{H}_{19}]^+$.

Соединение (IV). ВЭЖХ: k' 3,9 (колонка RSIL C18, $\text{MeOH} - \text{H}_2\text{O} - \text{AcOH}$, 75 : 25 : 0,02), ТСХ: R_f 0,22 (n -гептан — эфир, 1 : 1), УФ-спектр: λ_{max} 278 нм (ξ 16 400, этанол). ^1H -ЯМР-спектр: 0,892 (т, 3H, H-18; $J_{18,17}$ 6), 1,3 (м, 4H, H-16, 17), 1,6 (м, 2H, H-15), 1,7 (м, 2H, H-3), 2,1 (м, 6H, H-4, 7, 8), 2,365 (т, 2H, H-2), 2,54 (т, 2H, H-14; $J_{14,15}$ 6), 5,4 (м, 2H, H-5, 6), 5,9 (м, 1H, H-9), 6,16 (м, 2H, H-10, 12), 7,5 (дд, 1H, H-11). Масс-спектр пирролидида: 346 $[M + \text{H}]^+$, 331 $[M - \text{Me} + \text{H}]^+$, 274 $[M - \text{C}_5\text{H}_{11}]^+$, 246 $[M - (\text{CO})\text{C}_5\text{H}_{11}]^+$, 232 $[M - \text{C}_4\text{H}_8\text{N}(\text{CO})\text{CH}_2]^+$, 194 $[\text{C}_4\text{H}_8\text{N}(\text{CO})(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2]^+$, 180 $[\text{C}_4\text{H}_8\text{N}(\text{CO})(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CHCH}_2]^+$, 140 $[\text{C}_4\text{H}_8\text{N}(\text{CO})(\text{CH}_2)_3]^+$, 126 $[\text{C}_4\text{H}_8\text{N}(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_2]^+$, 113 $[\text{C}_4\text{H}_8\text{N}(\text{CO})\text{CH}_2]^+$.

Соединение (V). ВЭЖХ: k' 4,6 (колонка RSIL C18, $\text{MeOH} - \text{H}_2\text{O} - \text{AcOH}$, 75 : 25 : 0,02), ТСХ: R_f 0,22 (n -гептан — эфир, 1 : 1), УФ-спектр: λ_{max} 278 нм (ξ 16 400, этанол). Масс-спектр пирролидида: 346 $[M + \text{H}]^+$, 331 $[M - \text{Me} + \text{H}]^+$, 274 $[M - \text{C}_5\text{H}_{11}]^+$.

Таким образом, нами впервые установлено, что пиноленовая кислота успешно окисляется 15-липоксигеназой с образованием 13-гидрокси-5Z,9Z,11E-октадекатриеновой кислоты в качестве основного продукта. Мы не проводили изучение стереохимии продуктов окисления, однако, учитывая неоднократно подтвержденную высокую стереоспецифичность соевой липоксигеназы [10], гидроксипродуктам были приписаны структуры (S)-энантиомеров (см. схему).

Биологическая активность 13(S)-гидрокси-5Z,9Z,11E-октадекатриеновой кислоты в настоящее время нами изучается, однако на основании данных о том, что термически поврежденные клетки кожи человека увеличивают продукцию метаболитов 15-липоксигеназы [11], можно предположить, что высокая противоожоговая активность пиноленовой кислоты частично связана с ее превращением в 13(S)-гидрокси-5Z,9Z,11E-октадекатриеновую кислоту.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takagi T., Itabashi Y. // *Lipids*. 1982. V. 17. № 10. P. 716—723.
2. Takagi T., Kaneniwa M., Itabashi Y. // *Lipids*. 1986. V. 21. № 9. P. 558—565.
3. Yoon T. H., Im K. J., Koh E. T., Ju J. S. // *Nutr. Res.* 1989. V. 9. № 3. P. 357—361.
4. Holman R. T. // *Chem. and Ind.* 1981. V. 20. P. 704—709.
5. Sagroneives L. // *J. Sci. Food and Argicul.* 1992. V. 59. № 3. P. 413, 414.
6. Gerwick W. H., Moghaddam M., Hamberg M. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1991. V. 290. № 2. P. 436—444.
7. Froats T. K., Huo Z. Y., Elliott W. J. // *Clin. Res.* 1990. V. 38. № 3. A859.
8. Nugteren D. H., Christ-Hazelhof E. // *Prostaglandins*. 1987. V. 333. № 3. P. 403—417.
9. Baldwin J. E., Davis D. J., Hughes L., Guttarige N. J. A. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 1979. V. 1. P. 115—121.
10. Maycock A. L., Pong S.-s., Evans J. F., Miller D. K. // *Biochemistry of the Lipoxygenase Pathway. In: Bioactive Molecules*. V. 11 / Ed. Rokach J. Amsterdam: Elsevier, 1989, P. 143—208.
11. Green F. A. // *J. Invest. Dermatol.* 1989. V. 93. № 3. P. 486—491.

Поступило в редакцию
15.VII.1993

*D. V. Kuklev, A. B. Imbs *, Pham Quok Long *,
V. V. Bezuglov*

LIPOXYGENASE PRODUCTS FROM PINOLENIC ACID

*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*

Pinolenic acid (5Z,9Z,12Z-octadecatrienoic acid), a well known component of *Pinaceae* seed oil, is shown to be converted to new oxylipins by the soybean 15-lipoxygenase. The major product of lipoxygenase reaction was identified as 13-hydroxy-5Z,9Z,11E-octadecatrienoic acid (80%), the by-products being 13-oxo-5Z,9Z,11E-octadecatrienoic acid (12%), 9-hydroxy-5Z,10E,12Z-octadecatrienoic acid (6%) and 9-oxo-5Z,10E,12Z-octadecatrienoic acid (1,5%). All structural assignments were done with the use of ¹H-NMR, UV and mass spectrometry of the above acids and their derivatives.