



УДК 547.392.52.057

ОКИСЛЕНИЕ ОКТАДЕКАПЕНТАЕНОВОЙ (18:5n-3) КИСЛОТЫ
СОЕВОЙ 15-ЛИПОКСИГЕНАЗОЙ

© 1995 г. Д. В. Куклев, Г. С. Когтева, Н. А. Латышев, В. В. Безуглов*

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

Поступило в редакцию 07.04.95 г.

Впервые показано, что ODPА – (3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-октадекапентаеновая кислота – легко подвергается ферментативному окислению соевой 15-липоксигеназой с образованием новых оксипинов. Первичный продукт перекисного окисления был идентифицирован как (13S,3Z,6Z,9Z,11E,15Z)-13-гидропероксиоктадекапентаеновая кислота, двум вторичным продуктам была приписана структура (13S,3Z,6Z,9Z,11E,15Z)-13-гидроксиоктадекапентаеновой кислоты и (3Z,6Z,9Z,11E)-13-оксотридекатетраеновой кислоты на основании данных ЯМР, УФ и масс-спектрометрии. Было отмечено отсутствие среди продуктов липоксигеназного окисления 9-региоизомеров и кетодиенов.

Ключевые слова: октадекапентаеновая кислота, оксипиновы, соевая 15-липоксигеназа, 13-гидроксиоктадекапентаеновая кислота.

Природная ODPА – (3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-октадекапентаеновая кислота (I), – найденная в липидах морских организмов [1, 2], является максимально ненасыщенной метиленразделенной C18-жирной кислотой нормального строения. ODPА до настоящего времени не рассматривали в качестве предшественников оксипинов: в литературе отсутствуют данные об окисленных производных ODPА, равно как и о путях ее метаболизма в организме человека и животных. Наличие четырех диаллильных атомов углерода и аллильного атома в α-положении к карбоксильной группе делают структуру ODPА уникальным и весьма интересным объектом для изучения окислительного метаболизма. Известно, что C18-кислоты – основные полиеновые жирные кислоты высших растений, в последних оксипиновы образуются действием различных липоксигеназ. С этой точки зрения было интересно изучить ферментативное окисление ODPА растительной 15-липоксигеназой.

Развивая работы по изучению окисленных производных природных полиеновых жирных кислот [3], мы провели исследование основных продуктов окисления ODPА с помощью липоксигеназы соевых бобов.

ODPA была синтезирована по методике [4] в количестве более 2 г в виде бесцветного подвижного масла без специфического запаха и вкуса. Чистота ODPА, использованной в ферментатив-

ных исследованиях, была более 96% по данным ГЖХ-анализа.

Для получения гидропероксида (II, см. схему) 20 мкг соевой 15-липоксигеназы (КФ 1.18.11.12, тип I, 130000 ед. акт./мг белка; Sigma, США) растворяли в 10 мл 0.2 М боратного буфера (рН 9.0) (буфер А), насыщенного кислородом, и прибавляли 200 мкг ODPА в 20 мкл этанола. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при 23°C. Липидные продукты экстрагировали с помощью патрона Amprer C2 (Amersham, Англия), промывая его последовательно 5 мл воды и 0.1 мл этанола, продукт элюировали 8 мл этанола. УФ-спектр: λ_{\max} 233 нм (этанол). Масс-спектр FAB (fast atom bombardment, ионизация быстрыми атомами), m/z : 307 [M + H]⁺.

Альдегид (III) получали по следующей методике: к 500 мл буфера А при перемешивании прибавляли раствор 100 мг ODPА в 2 мл этанола. 15-Липоксигеназу сои (15 мг) растворяли в малом объеме буфера А и прибавляли к реакционной смеси, которую затем перемешивали 15 мин при 22°C, подкисляли конц. HCl до рН 4. Липидные продукты экстрагировали на колонке с 15 г обращенной фазы C12, промывая ее водой, смесью вода-метанол (80 : 20) и метанолом (по 200 мл). Метанольный элюат, содержащий искомого соединения, упаривали в вакууме, продукты разделяли хроматографией на силикагеле. Выход (3Z,6Z,9Z,11E)-13-оксотридекатетраеновой кислоты (III) 11.5 мг (14%). При ТСХ на силикагеле R_f 0.12 (гексан-эфир, 1 : 1). УФ-спектр: λ_{\max} 278 нм (этанол, ε 24900), отсутствует тонкая структура.

* Автор для переписки (факс: (095)335-71-03, электронная почта: vvbez@ibch.siocb.msk.su (Internet)).

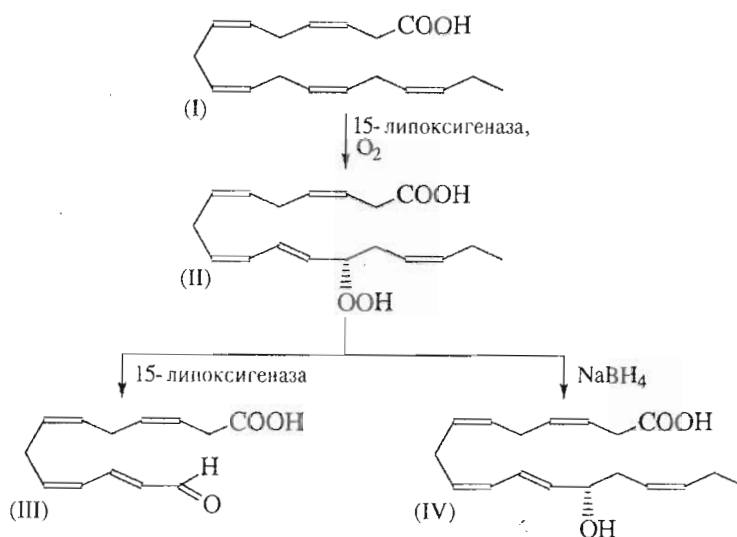


Схема.

Спектр 1H -ЯМР (δ , м. д.): 2.87 (м, 2H, H5), 3.13 (м, 2H, H8), 3.17 (м, 2H, H2), 5.47 (м, 2H, H6, H7), 5.61 (м, 2H, H3, H4), 5.96 (м, 1H, H9), 6.19 (дд, 1H, H12, J 17.0, J' 7.1 Гц), 6.30 (м, 1H, H10), 7.48 (дд, 1H, H11, J 14.1, J' 8 Гц), 9.63 (д, 1H, H13, J 8.8 Гц). Масс-спектр (EI*) метоксиимина метилового эфира альдегида (III), ключевые ионы, m/z (интенсивность, %): 263 ($[M]^+$, 1.3), 150 ($[M - CH_2CH=CHCH_2COOMe]^+$, 100). Из смеси продуктов реакции были также выделены: 40 мг OCPA и 1 мг (3Z,6Z,9Z,11E,15Z)-13-гидроксиоктадекапентаеновой кислоты (IV, см. схему).

Гидроксикислоту (IV) получали так же, как альдегид (III), но к раствору фермента в буфере А сначала прибавляли раствор 30 мг $NaBH_4$ в 5 мл буфера А, а затем OCPA, перемешивали 20 мин при 22°C. Реакционную смесь обрабатывали так, как описано выше. Выход (3Z,6Z,9Z,11E,15Z)-13-гидроксиоктадекапентаеновой кислоты (IV) 28 мг (25.2%). R_f 0.46 (гексан-эфир, 1 : 1). УФ-спектр: λ_{max} 234 нм (ϵ 29600, этанол). $[\alpha]_D +10.0^\circ$. 1H -ЯМР-спектр (δ , м. д.): 1.02 (т, 3H, H18), 2.08 (м, 2H, H17), 2.35 (м, 2H, H14), 2.85 (м, 2H, H5), 2.96 (м, 2H, H8), 3.17 (м, 2H, H2), 4.28 (дт, 1H, H13, J 9.0, J' 5.5 Гц), 5.40 (м, 2H, H15, H16), 5.45 (дт, 1H, H9, J 11.0, J' 7.0 Гц), 5.39 (м, 2H, H6, H7), 5.61 (м, 2H, H3, H4), 5.73 (дд, 1H, H12, J 15.0, J' 5.5 Гц), 6.01 (т, 1H, H10, J 11.0 Гц), 6.58 (дд, 1H, H11, J 15.0, J' 11.0 Гц). Масс-спектр (EI) Bu^tMe_2Si -производного метилового эфира, ключевые ионы, m/z (интенсивность, %): 418 ($[M]^+$, 3), 349 ($[M - EtCH=CHCH]^+$, 69), 265 ($[M - MeOOSCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2]^+$, 24).

* Electron impact (электронный удар).

Масс-спектр (EI) Bu^tMe_2Si -производного метилового эфира, гидрированного над PtO_2 , ключевые ионы, m/z (интенсивность, %): 428 ($[M]^+$, 0.1), 357 ($[M - C_3H_{11}]^+$, 100), 339 ($[M - Bu^t-MeOH]^+$, 22), 215 ($[M - (CH_2)_{11}COOMe]^+$, 73). Из смеси продуктов реакции также выделили 48 мг OCPA. Величина и знак оптической активности полученной нами гидроксикислоты (IV) и известная высокая энантиоселективность соевой липоксигеназы [5] позволили идентифицировать гидроксикислоту (IV) как 13S-энантиомер.

Таким образом, нами впервые установлено, что OCPA способна окисляться соевой 15-липосигеназой. Основной продукт липоксигеназной реакции – 13-гидропероксикислота (II), которая в дальнейшем превращается в альдегидокислоту (III), а под действием восстановителей может быть превращена в гидроксикислоту (IV). Альдегидокислота (III) является преобладающим конечным продуктом в случае, когда липоксигеназная реакция проводится при недостатке кислорода в инкубационной среде и концентрации фермента, превышающей 10 мкг/мл. Следует отметить, что ни в одном из наших экспериментов мы не наблюдали образования 9-гидр(пер)оксиизомера в составе продуктов липоксигеназного окисления OCPA; этот факт ставит исследуемую кислоту на особое место в ряду других C18-жирных кислот [6]. Необходимо также указать на факт отсутствия среди вторичных продуктов окисления (3Z,6Z,9Z,11E,15Z)-9-оксооктадекапентаеновой кислоты, в то время как для пиноленовой кислоты и ряда других жирных кислот наличие кетодиеновых соединений в спектре продуктов окисления липоксигеназой – распространенное явление [3, 6].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ackman R.G. // Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils. V. 1 / Ed. R.G. Ackman. Boca Raton: CRC Press, 1989. P. 118 - 119.
2. Kuklev D.V., Aizdaicher N.A., Imbs A.B., Bezuglov V.V., Latyshev N.A. // Phytochemistry. 1992. V. 31. P. 2401 - 2403.
3. Куклев Д.В., Имбс А.Б., Лонг Ф.К., Безуглов В.В. // Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. С. 1238 - 1240.
4. Куклев Д.В., Латышев Н.А., Безуглов В.В. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. С. 1433 - 1436.
5. Hamberg M., Samuelsson B. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. P. 5329 - 5335.
6. Sanz L.C., Perez A.G., Rios J.J., Olias J.M. // J. Agric. Food Chem. 1993, V. 41. P. 696 - 699.

Oxidation of Octadecapentaenoic (18:5n-3) Acid with Soybean 15-Lipoxygenase

D. V. Kuklev, G. S. Kogteva, N. A. Latyshev, and V. V. Bezuglov¹

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

Abstract – It is shown for the first time that (3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadecapentaenoic acid (ODPA) is readily oxidized with soybean 15-lipoxygenase to form new oxylipins. Based on NMR, UV, and mass-spectrometry, the primary peroxidation product was identified as (13S,3Z,6Z,9Z,11E,15Z)-13-hydroperoxyoctadecapentaenoic acid, and two secondary products were identified as (13S,3Z,6Z,9Z,11E,15Z)-13-hydroxyoctadecapentaenoic and (3Z,6Z,9Z,11E)-13-oxotridecatetraenoic acids. The lipoxygenase oxidation products were found to contain no 9-regioisomers and ketodienes.

Key words: octadecapentaenoic acid, oxylipin, soybean 15-lipoxygenase, 13-hydroxyoctadecapentaenoic acid.

¹ To whom correspondence should be addressed; fax: (095)335-7103, e-mail: vvbez@ibch.siobc.msk.su.