



УДК 547.392.52.057

СИНТЕЗ С2-ЭЛОНГИРОВАННЫХ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 1996 г. Д. В. Куклев, А. А. Попков, С. П. Касьянов,
В. Н. Акулин, В. В. Безуглов*[#]

Тихоокеанский институт океанографии и рыбного хозяйства (ТИНРО),
690600, Владивосток, просп. Шевченко, 4;

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

Поступила в редакцию 09.10.95 г.

Описан синтез С2-элонгированных полиненасыщенных жирных кислот из их природных предшественников малоновым синтезом. С использованием предлагаемой схемы синтезированы (7Z,11Z,14Z)-эйкозатриеновая, (8Z,11Z,14Z,17Z)-экозатетраеновая, (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-экозапентаеновая, (8Z,11Z,14Z,17Z)-докозатетраеновая, (7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-докозапентаеновая и (6Z,9Z,12Z,15Z,18Z,21Z)-тетракозагексаеновая кислоты, строение которых подтверждено методами ГЖХ, УФ- и масс-спектрометрии. Показано, что целевые соединения не содержат примесей продуктов *цис-транс*-изомеризации или миграции двойных связей. Суммарный выход С2-элонгированных полиеновых кислот составил 25–30% за четыре стадии.

Ключевые слова: полиеновые жирные кислоты; малоновый синтез; пирролиды, ГЖХ; пирролиды, масс-спектрометрия.

Процесс удлинения молекулы жирной кислоты на два атома углерода со стороны карбоксильной части (С2-элонгация) играет наряду с десатурацией и окислением важную роль в биосинтезе жирных кислот в организмах животных и растений, позволяя использовать короткоцепочечные жирные кислоты в качестве биосинтетических предшественников [1–3]. С2-Элонгация природных высших полиненасыщенных жирных кислот (polyunsaturated fatty acids – PUFA) с использованием химических методов к настоящему времени не описана. Это связано с высокой лабильностью и малой реакционной способностью субстратов. Для решения этой задачи нами избран малоновый синтез, широко используемый в липидной химии для получения ди- и триеновых жирных кислот (см., например, [4, 5]).

Метилловые эфиры PUFA (Ia–e) (см. схему) восстанавливали LiAlH_4 , а полностью-*цис*-3,6,9,12,15-октадекапентаеналь (If) [6] – NaBH_4 , до соответствующих полиненасыщенных спиртов (IIa–f), который далее превращали в бромиды (IIIa–f) под действием трифенилфосфин-дибромиды ($\text{Ph}_3\text{P} \cdot \text{Br}_2$) по описанной методике [7].

Попытки осуществить малоновую конденсацию обработкой полиненасыщенного бромиды

диэтилмалонатом/бутилатом натрия в бутиловом спирте при 60°C, диэтилмалонатом/этилатом натрия в этиловом спирте при 25°C или диэтилмалонатом/бутиллитием в тетрагидрофуране при –60°C не привели к желаемому диэфиру(IV). В первых двух вариантах малонового синтеза, использованных ранее для получения октадиеновых кислот [4], происходило преимущественное дегидробромирование, тогда как в последнем случае исходный бромид был выделен в неизменном виде (опыты проводили на (3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-1-бром-октадекапентаене (III_f), данные не приведены).

Сущность предложенного нами варианта малонового синтеза заключается в высокотемпературной конденсации полиненасыщенного бромиды с натриймалоновым эфиром в диглиме (диметилловый эфир диэтиленгликоля). Подобный подход никогда не применялся ранее для высоконенасыщенных бромидов. Выходы в этой реакции были достаточно высокие и составляли в среднем более 65%. Синтезированные диэфиры (IVa–f) омыляли и декарбоксилировали до соответствующих С2-элонгированных кислот (Va–f) с выходом 66–90% за две стадии.

Таким образом, нами разработан удобный метод получения С2-элонгированных PUFA, позволяющий получать целевые PUFA с высоким выходом (25–30% за четыре стадии), выделение которых из

[#] Автор для переписки. Факс: (095)335-71-03, электронная почта: vybez@ibch. sibsc. gas. ru (Internet).

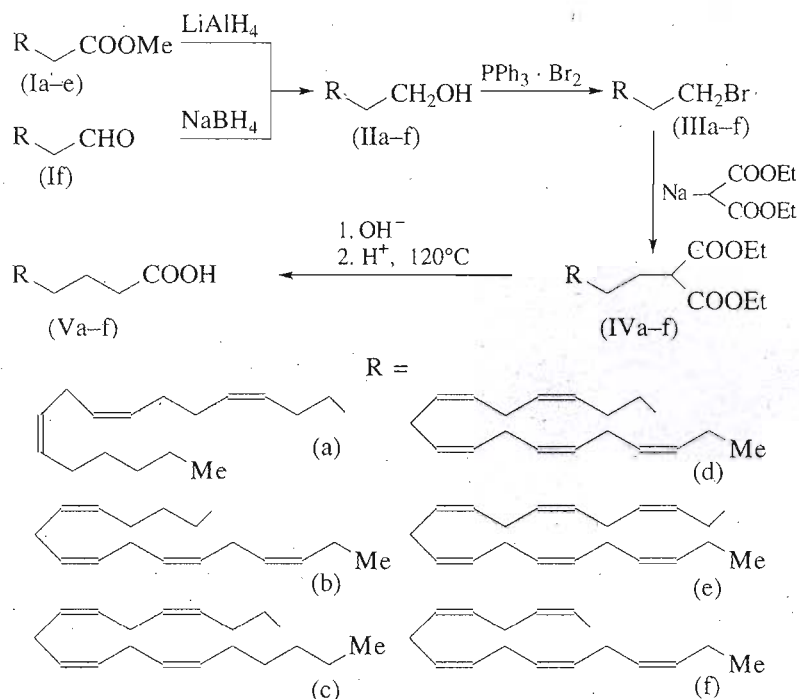


Схема.

природных смесей в препаративных количествах сопряжено с большими трудностями.

Идентичность структуры полученных PUFA природным подтверждается совпадением ECL-индексов синтезированных PUFA с ECL соответствующих природных PUFA при ГЖХ-анализе полученных из них метиловых эфиров и совпадением масс-спектров пирролидидов, полученных из синтезированных и природных PUFA. В УФ-спектрах синтезированных кислот (Va-f) не отмечено поглощение в области 230 нм. Отсутствие поглощения при 234 нм и при больших длинах волн также свидетельствует в пользу природного расположения двойных связей, что согласуется с данными литературы о том, что в ходе малонового синтеза не происходит изомеризации или миграции двойных связей в молекуле [5].

В случае эйкозатриеновой кислоты (Va), для которой природный образец нам был недоступен, масс-спектр полученного из нее пирролидида однозначно указывает положение двойных связей, а ультрафиолетовый спектр (неселективное поглощение при 206 нм) подтверждает приписываемую структуру.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ТСХ проводили на пластинках Silufol UV-254 (Kavalier, Чехия) в системе растворителей гексан-эфир, 1 : 1 (где не указано особо), обнаружение – фосфорномолибденовой кислотой, колоночную

хроматографию – на силикагеле L (Lachema, Чехия). ГЖХ эфиров жирных кислот проводили на приборе Shimadzu GC-16A (Shimadzu, Япония) с пламенно-ионизационным детектором на капиллярной кварцевой колонке (0.32 мм × 30 м) Supelcowaх-10 или SPB (Supelco, США); газ-носитель – гелий, 80 мл/мин; изотерма: температура колонки 195°C, инжектора – 220°C, детектора – 205°C. Метиловые эфиры жирных кислот идентифицировали с использованием углеродных чисел – индексов Ковача (ECL – equivalent chain-lengths, эквивалентная длина цепи) [8]. Чистота синтезированных веществ была не менее 96%. Масс-спектры регистрировали на приборе Varian Mat 44S (Varian, Германия) при ионизации электронным ударом с энергией электронов 70 эВ.

Исходные PUFA в виде метиловых эфиров выделяли из смеси общих жирных кислот жира сардины-иваси с использованием процедуры, разработанной нами ранее [6, 9].

Стандартная обработка реакционных смесей. Органический экстракт реакционной смеси промывали 1/2 объема воды, 1/2 объема насыщенного NaCl, сушили над безводным Na₂SO₄ 10–30 мин. Сушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса при температуре бани не выше 30°C. Остаток хранили в атмосфере инертного газа при температуре не выше 4°C.

I. Восстановление метиловых эфиров PUFA в полиеновые спирты (IIa-e). К 15 мл эфирного

Выходы соединений по стадиям синтеза (%) и индексы Ковача (ECL) метиловых эфиров целевых С2-элонгированных PUFA на колонке Supelcowax-10

Исходная PUFA	Выходы соединений				Целевая PUFA (V)	ECL
	(II)	(III)	(IV)	(V)		
18 : 3 (5, 9, 12) (a)	64	82	58	92	20 : 3 (7, 11, 14)	20.94
18 : 4 (ω - 3) (b)	60	79	63	72	20 : 4 (ω - 3)	21.40
18 : 5 (ω - 3) (f)	64	74	66	66	20 : 5 (ω - 3)	21.6
20 : 4 (ω - 6) (c)	65	82	74	81	22 : 4 (ω - 6)	22.95
20 : 5 (ω - 3) (d)	61	78	71	79	22 : 5 (ω - 3)	23.55
22 : 6 (ω - 3) (e)	61	71	68	72	24 : 6 (ω - 3)	25.91*

* На колонке Silar 5CP (0.25 мм × 25 м, Supelco).

раствора 200 мг метилового эфира PUFA (Ia-e) прибавляли порциями 250 мг (10 экв.) LiAlH₄. Реакционную смесь интенсивно перемешивали 3 ч при комнатной температуре. Затем к реакционной смеси прибавляли при интенсивном перемешивании смесь этилацетат-эфир (1 : 10) до прекращения выделения водорода, далее 3 мл этилацетата и 1 мл этанола, затем осторожно 10 мл воды и 20 мл 20% H₂SO₄, интенсивно перемешивали 20 мин. Органический слой отделяли, водный слой экстрагировали эфиром (50 мл). Объединенный органический экстракт подвергали стандартной обработке, остаток хроматографировали на 5 г силикагеля, элюируя градиентной смесью эфира с *n*-гексаном (до 50% эфира). Получали соответствующий полиненасыщенный спирт в виде бесцветного масла (выходы приведены в таблице), R_f 0.28. Масс-спектры Me₃Si-производных спиртов (IIa-e) содержали пики ионов типа [M]⁺, [M - Me]⁺ и [M - HOSiMe₃]⁺ с m/z 336, 321, 246 (IIa), 334, 319, 244 (IIb), 362, 347, 272 (IIc), 360, 345, 270 (IId), 386, 371, 296 (IIe) соответственно.

(3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-октадекапентаен-1-ол (IIf). К раствору 404 мг (3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-октадекапентаенала (If) [6] в 50 мл MeOH прибавляли при перемешивании 240 мг (4 экв.) NaBH₄, реакционную смесь выдерживали 20 мин при комнатной температуре, прибавляли при перемешивании 10 мл ацетона, затем 10 мл нас. NH₄Cl, интенсивно перемешивали 20 мин и экстрагировали эфиром. Эфирный экстракт подвергали стандартной обработке, остаток хроматографировали на 10 г силикагеля как описано выше. Получали 347 мг (86%) октадекапентаенола (IIf) в виде бесцветного масла, R_f 0.28. Масс-спектр Me₃Si-производного содержал ионы типа [M]⁺, [M - Me]⁺ и [M - HOSiMe₃]⁺ с m/z 332, 317, 242 соответственно.

II. Полиненасыщенные бромиды (IIIa-f). К раствору 100 мг полиенового спирта (II) в 25 мл сухого ацетонитрила при перемешивании постепенно прибавляли суспензию PPh₃ · Br₂ (получен-

ного непосредственно перед реакцией из 1.2 г PPh₃ и 0.2 мл Br₂ в 20 мл сухого ацетонитрила); ход реакции контролировали ТСХ. По прохождении реакции к реакционной смеси прибавляли 5 мл MeOH, выдерживали в течение 10 мин и упаривали реакционную смесь в вакууме. Остаток растворяли в *n*-гептане и хроматографировали на 5 г силикагеля, элюируя *n*-гептаном. Получали 102 мг соответствующего бромидов в виде бесцветного масла, R_f 0.30 (*n*-гептан). Выходы на этой стадии более 70% (см. таблицу).

III. Конденсация с диэтилмалонатом. К раствору 62 мг (0.19 ммоль) полиенового бромидов (IIIa) в 0.5 мл сухого диглима прибавляли 52 мг (1.5 экв.) натриймалонового эфира (полученного непосредственно перед опытом растворением 856 мг металлического натрия в 5 г свежеперегнанного диэтилмалоната), растворенного в 2 мл сухого диглима, смесь перемешивали, запаивали в ампулу и выдерживали при 140°C в течение 2 ч. Затем ампулу охлаждали, вскрывали, прибавляли 5 мл воды и 5 мл *n*-пентана, энергично встряхивали, пентановый слой отделяли, водный слой экстрагировали *n*-пентаном (5 мл). Объединенные пентановые слои подвергали стандартной обработке. Остаток хроматографировали на 1 г силикагеля, элюируя градиентной смесью эфира (от 10 до 50%) с *n*-гексаном, получали 34 мг (58%) этилового эфира 2-карбэтоксипроизводного целевой PUFA (IVa) в виде бесцветного масла, R_f 0.78. Аналогично получали производные (IVb-f). Выходы на этой стадии составляли в большинстве случаев более 60% (см. таблицу).

IV. Декарбоксилирование малоновых производных (IV). К раствору 30 мг этилового эфира 2-карбэтоксипроизводного PUFA (IV) в 3 мл спирта прибавляли 2 мл воды и 300 мкл 40% KOH. Реакционную смесь выдерживали 4 ч при комнатной температуре, разбавляли 5 мл воды, подкисляли 1.5 н. HCl до pH 2 и экстрагировали эфиром (3 × 5 мл), экстракт подвергали стандартной обработке. Остаток растворяли в 3 мл диглима,

прибавляли 0.75 мл 1.5 н. HCl, реакционную смесь запаивали в ампулу и выдерживали 1 ч при 120°C. Затем ампулу охлаждали, вскрывали, прибавляли 5 мл воды и 5 мл *n*-пентана, энергично встряхивали, пентановый слой отделяли, водный слой экстрагировали *n*-пентаном (5 мл). Объединенные экстракты подвергали стандартной обработке и получали целевые PUFA (V) в виде бесцветных вязких масел, R_f 0.49. Выходы и определенные методом ГЖХ углеродные числа (ECL) метиловых эфиров синтезированных PUFA см. в таблице.

Масс-спектры пирролидидов PUFA (V). Условия съемки: электронный удар, прямой ввод в источник с эмиттера, массовые числа представлены в единицах m/z , в скобках приведены предполагаемые структуры ионов.

Соединение (Va): 359 ($[M]^+$), 288 ($[M - C_5H_{11}]^+$), 262 ($[M - C_5H_{11} - (CH=CH)]^+$), 248 ($[M - C_5H_{11} - (CH=CHCH_2)]^+$), 208 ($[M - C_5H_{11} - (CH=CHCH_2)_2]^+$), 194 ($[M - C_5H_{11} - (CH=CHCH_2)_2 - CH_2]^+$), 168 ($[M - C_5H_{11} - (CH=CHCH_2)_2 - CH_2 - CH=CH]^+$).

Соединение (Vb): 357 ($[M]^+$), 328 ($[M - Et]^+$), 288 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)]^+$), 248 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_2]^+$), 208 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_3]^+$), 168 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_4]^+$).

Соединение (Vc): 385 ($[M]^+$), 314 ($[M - C_5H_{11}]^+$), 274 ($[M - C_5H_{11} - CH=CHCH_2]^+$), 234 ($[M - C_5H_{11} - (CH=CHCH_2)_2]^+$), 194 ($[M - C_5H_{11} - (CH=CHCH_2)_3]^+$), 168 ($[M - C_5H_{11} - (CH=CHCH_2)_3 - CH=CH]^+$).

Соединение (Vd): 383 ($[M]^+$), 354 ($[M - Et]^+$), 314 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)]^+$), 274 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_2]^+$), 234 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_3]^+$), 194

($[M - Et - (CH=CHCH_2)_4]^+$), 168 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_4 - (CH=CH)_2]^+$), 154 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_5]^+$).

Соединение (Ve): 409 ($[M]^+$), 380 ($[M - Et]^+$), 340 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)]^+$), 300 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_2]^+$), 260 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_3]^+$), 220 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_4]^+$), 180 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_5]^+$), 154 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_5 - (CH=CH)_2]^+$), 140 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_6]^+$).

Соединение (Vf): 355 ($[M]^+$), 326 ($[M - Et]^+$), 286 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)]^+$), 246 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_2]^+$), 206 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_3]^+$), 166 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_4]^+$), 126 ($[M - Et - (CH=CHCH_2)_5]^+$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhukova N.V. // Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem. 1991. V. 100. P. 801-804.
2. Abulnaja K.O., Tighe C.R., Harwood J.L. // Phytochemistry. 1992. V. 31. P. 1155-1159.
3. Cinti D.L., Cook L., Nagi M.N., Suneja S.K. // Prog. Lipid Res. 1992. V. 31. P. 1-51.
4. Christie W.W., Holman R.T. // Chem. Phys. Lipids. 1967. V. 1. P. 407-423.
5. Spener F., Mangold H.K. // Chem. Phys. Lipids. 1973. V. 11. P. 215-218.
6. Куклев Д.В., Латышев Н.А., Безуглов В.В. // Био-орган. химия. 1991. Т. 17. С. 1433-1436.
7. Tai H.H., Sih C. // Methods Enzymol. 1982. V. 86. P. 99-109.
8. Christie W.W. // J. Chromatogr. 1988. V. 447. P. 305-314.
9. Gaiday N.V., Imbs A.B., Kuklev D.V., Latyshev N.A. // J. Am. Oil Chem. Soc. 1991. V. 68. P. 230-233.

Synthesis of C2-Elongated Polyunsaturated Fatty Acids

D. V. Kuklev, A. A. Popkov, S. P. Kas'yanov, V. N. Akulin, and V. V. Bezuglov*¹

Pacific Research Institute of Fisheries & Oceanography (TINRO), Vladivostok, pr. Shevchenko 4, 690600 Russia

* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, V-437, GSP-7, 117871 Russia

Abstract—The synthesis by a modified malonic ester procedure of C2-elongated polyunsaturated fatty acids from their natural precursors was described. Using the suggested scheme, (7Z,11Z,14Z)-7,11,14-eicosatrienoic, (8Z,11Z,14Z,17Z)-8,11,14,17-eicosatetraenoic, (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic, (8Z,11Z,14Z,17Z)-8,11,14,17-docosatetraenoic, (7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-7,10,13,16,19-docosapentaenoic, and (6Z,9Z,12Z,15Z,18Z,21Z)-6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoic acids were synthesized. Their structures were confirmed by GC, UV, and MS data, which coincided with those of natural compounds. The target compounds were shown to be free from by-products, which could result from *Z*-*E* isomerization or migration of double bonds. The overall yields of the four-step synthesis of C2-elongated polyenoic acids were 25-30%.

Key words: polyenoic fatty acids, malonic ester synthesis, GC of pyrrolidides, MS of pyrrolidides.

¹ To whom correspondence should be addressed.