

Н.В. Гроза,
И.В. Иванов,
А.Б. Голованов,
Г.И. Мягкова

ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ω-ГИДРОКСИПРОИЗВОДНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЖИРНОКИСЛОТНЫХ СУБСТРАТОВ

УДК: 547.465.5.087

Разработана универсальная схема получения 18-гидроксипроизводных природных растительных полиненасыщенных жирных кислот, 18-гидрокси-(9Z,12Z)-октадекадиеновой кислоты (18-HODE) и 18-гидрокси-(9Z,12Z,15Z)-октадекатриеновой кислоты (18-HOTrE), на основе ацетиленовой стратегии синтеза с последующим восстановлением тройных связей на катализаторе Линдлара.

ВВЕДЕНИЕ

Переокисное окисление липидов является общим процессом для всех биологических организмов. Продукты как ферментативной, так и неферментативной окислительной трансформации эфиров полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) регулируют механизмы развития растений и их адаптации к условиям окружающей среды, клеточного апоптоза [1]. Гидропероксиды полиненасыщенных жирных кислот в растениях синтезируются под действием липоксигеназ и являются субстратами для дальнейшего метаболизма. Среди многочисленных соединений, обладающих сигнальными свойствами, производные жасмоновой кислоты, альдегиды и дивинильные эфиры ПНЖК (соединения с антимикробной и антигрибковой активностью), длинноцепные спирты, травматин [1,2].

Эндогенными субстратами ферментативной окислительной трансформации в растениях являются октадекадиеновые и октадекатриеновые жирные кислоты — аналоги линолевой (18:2) и α-линоленовой (18:3) кислот [2]. В представленной работе с целью изучения механизмов взаимодействия растений с патогенами, вредителями, абиотического стресса и различных стадий развития была разработана универсальная схема получения 18-гидроксипроизводных полиненасыщенных жирных кислот C₁₈: 18-гидрокси-(9Z,12Z)-октадекадиеновой кислоты (18-HODE) и 18-гидрокси-(9Z,12Z,15Z)-

октадекатриеновой кислоты (18-HOTrE). 18-HODE и 18-HOTrE были синтезированы через соответствующие полиацетиленовые предшественники с применением металлоорганических реагентов в реакции кросс-сочетания пропаргилбромида с терминальными ацетиленовыми спиртами с последующим стереоселективным восстановлением тройных связей на катализаторе Линдлара (5% Pd/CaCO₃, отравленном тетраацетатом свинца).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения метаболизма жирных кислот в клетках растений была разработана универсальная схема получения терминальных гидроксипроизводных полиненасыщенных жирных кислот C₁₈: 18-гидрокси-(9Z,12Z,15Z)-октадекатриеновой (9) и 18-гидрокси-(9Z,12Z)-октадекадиеновой (6) кислот. Стратегия синтеза основана на образовании полиацетиленовых предшественников (5) и (8) (схема 1), которые получены с использованием реакции кросс-сочетания [3] единого для двух полиненасыщенных кислот пропаргильного фрагмента, метилового эфира 11-бром-9-ундециновой кислоты (4) [4], с 3,6-гептадин-1-олом (3) или 6-гептин-1-олом (7) [5], соответственно. 3,6-Гептадин-1-ол (3) получали с применением реакции кросс-сочетания терминального ацетиленового спирта, 3-бутин-1-ола (1), и 1-(тозилокси)-3-триметилсилил-2-пропина (2) [6] с последующим снятием триметилсилильной защиты при помощи фторида аммония. Каталитическое гидрирование [4] метиловых эфиров полиацетиленовых кислот (5) и (8) на катализаторе Линдлара в присутствии хинолина в сухом бензоле с последующим омылением полиеновых промежуточных эфиров с использованием водно-метанольного раствора LiOH привело к получению свободных полиненасыщенных жирных кислот (6) и (9), соответственно.

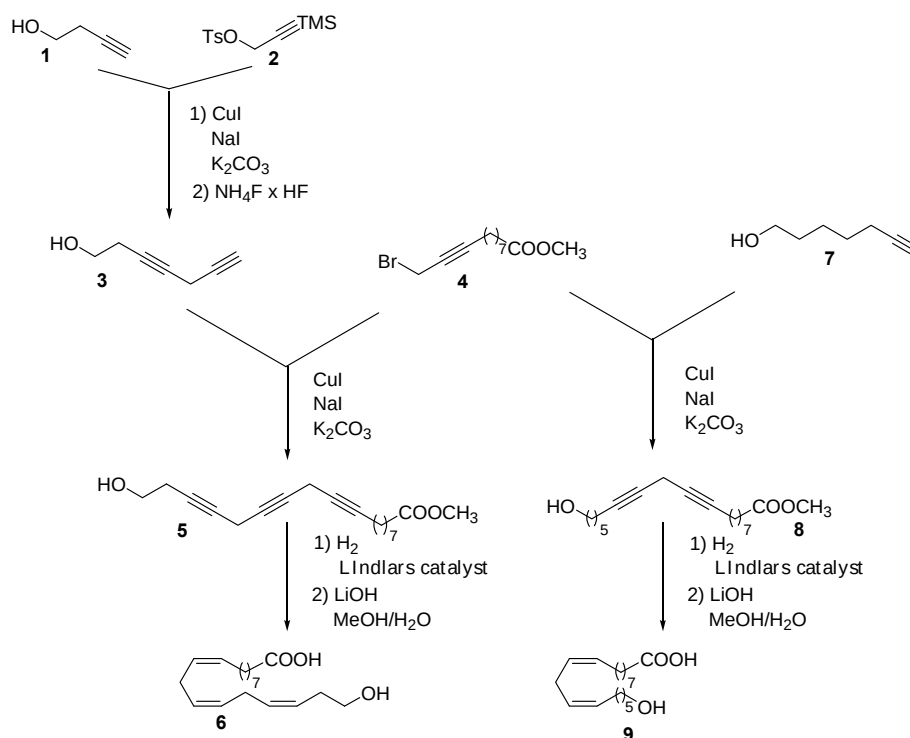


Схема 1. Синтез 18-гидрокси-(9Z,12Z)-октадекадиеновой кислоты (18-HODE) и 18-гидрокси-(9Z,12Z,15Z)-октадекатриеновой кислоты (18-HOTrE).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

¹H- и ¹³C-ЯМР спектры регистрировали на спектрометре Bruker MSL 200 МГц или Bruker MSL 300 МГц в CDCl₃ с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта для ¹H-ЯМР и относительно сигнала дейтерия в CDCl₃ ($\delta^{13}\text{C}=77.19$ ppm) для ¹³C-ЯМР. Приведены химические сдвиги в миллионных долях, константы спин-спинового взаимодействия – в герцах. HPLC анализ проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-10Avp, снабженном SPD-10Advp UV-детектором. HPLC анализ на обращенной фазе проводили с использованием колонки Nucleosil C₁₈; 250 x 4 мм, размер частиц 5 мкм (Machery-Nagel, Германия) при скорости элюирования 1 мл/мин (элюент MeOH/H₂O, 85:15 по объему). Препаративное HPLC разделение метиловых эфиров полиеновых кислот проводили с использованием колонки Lichrospher 100 RP18; 250 x 22.5 мм, размер частиц 10 мкм (Knauer, Берлин, Германия) при скорости элюента 10 мл/мин (элюент MeOH/H₂O, 90:10). Колоночную флэш-хроматографию проводили с использованием Silica Gel 60 (Merck, Германия, размер частиц 70-230 мкм). Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) применяли пластины Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия). Масс-спектры ESI MS регистрировали на масс-спектрометре Finnigan MAT-900XL, температура ионизации 180°C, напряжение электронов 70 эВ. Растворители сушили или использовали реагенты высокой степени чистоты Merck, Aldrich. Стеклопосуду и шприцы перед использованием сушили при 140 °C. Реакции кросс-сочетания проводили в атмосфере сухого аргона.

3,6-Гептадин-1-ол (3). К суспензии предварительно осушенных и измельченных солей CuI (5.64 г, 29.60 ммоль), NaI (4.44 г, 29.60 ммоль) и K₂CO₃ (3.06 г, 22.20 ммоль) в 20 мл сухого диметилформамида (DMF) в токе аргона прибавляли тозилат (2) (4.50 г, 15.95 ммоль) и 3-бутин-1-ол (1) (1.01 г, 14.50 ммоль) в 5 мл сухого DMF. Реакционную смесь оставляли на ночь при перемешивании при комнатной температуре, разлагали 150 мл насыщенного водного раствора NH₄Cl, продукты экстрагировали диэтиловым эфиром (далее – эфир) (3 x 80 мл), объединенные эфирные экстракты промывали насыщенным водным раствором NaCl (2 x 50 мл), сушили Na₂SO₄, растворитель упаривали, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент – эфир/гексан, 2:3), собирали

фракции, содержащие продукт с $R_f = 0.18$ (эфир/гексан, 2:3). К раствору 1.61 г. продукта в 20 мл DMF прибавляли раствор NH_4F (1.65 г, 44.57 ммоль) в 7 мл H_2O . Полученную гомогенную смесь оставляли на ночь при перемешивании при комнатной температуре. К реакционной смеси прибавляли 25 мл H_2O , органические продукты экстрагировали этилацетатом (3 x 50 мл), объединенные органические экстракты сушили Na_2SO_4 , растворитель упаривали. Продукт очищали на колонке с силикагелем (элюент – эфир/гексан, 2:3). Выход соединения (**3**) 0.72 г (46%). $R_f = 0.32$ (эфир/гексан, 2:1). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3600-3200 (OH), 2240 ($\text{C}\equiv\text{C}$). ^1H -ЯМР-спектр (200 МГц, CDCl_3): 3.61 (т, 2H, $J=6.4$ Гц, 1- CH_2), 3.08 (м, 2H, 5- CH_2), 2.35 (тт, 2H, $J=2.5$ и 6.4 Гц, 2- CH_2), 2.04 (м, 1H, 7-CH). ^{13}C -ЯМР-спектр (50 МГц, CDCl_3): 78.73, 77.88, 75.35, 68.73, 61.13, 23.09, 9.60.

Метилловый эфир 18-гидрокси-9,12,15-октадекатриновой кислоты (5). В насыщенной аргоном предварительно осушенной круглодонной колбе, снабженной магнитной мешалкой, суспендировали в 15 мл DMF безводные соли K_2CO_3 (1.17 г, 8.47 ммоль), NaI (1.69 г, 11.30 ммоль) и CuI (2.15 г, 11.30 ммоль). К суспензии прибавляли метилловый эфир 11-бром-9-ундециновой кислоты (**4**) (1.70 г, 6.21 ммоль), затем гептадиинол (**3**) (0.61 г, 5.65 ммоль) в 5 мл DMF. Полученную реакционную смесь непрерывно перемешивали 24 часа при комнатной температуре, разлагали 150 мл насыщенного водного NH_4Cl , липофильные продукты экстрагировали эфиром (3 x 70 мл), объединенные органические экстракты промывали насыщенным водным раствором NaCl (2 x 100 мл), сушили Na_2SO_4 , растворитель упаривали. Остаток очищали на колонке с силикагелем в токе аргона (элюент – эфир/гексан, 1:1). Выход соединения (**5**) 1.15 г, (67%). $R_f = 0.30$ (эфир/гексан, 3:1). ^1H -ЯМР-спектр (200 МГц, CDCl_3): 3.62 (т, 2H, $J=6.4$ Гц, 18-CH), 3.59 (с, 3H, OCH_3), 3.06 (м, 4H, 11- и 14- CH_2), 2.36 (тт, 2H, $J=2.1$ и 6.4 Гц, 17- CH_2), 2.23 (т, 2H, $J=7.4$ Гц, 2- CH_2), 2.07 (м, 2H, 8- CH_2), 1.20-1.60 (м, 2H, CH_2). ^{13}C -ЯМР-спектр (50 МГц, CDCl_3): 174.18, 80.83, 76.23, 75.31, 74.50, 74.14, 73.95, 61.24, 51.31, 34.15, 29.08, 28.71 (3C), 24.96, 23.20, 18.71, 9.78.

18-Гидрокси-(9Z,12Z,15Z)-октадекатриеновая кислота (6). Суспензию катализатора Линдлара (1.00 г) в 10 мл сухого бензола насыщали H_2 при комнатной температуре, затем охлаждали до 10°C . Метилловый эфир (**5**) (0.968 г, 3.20 ммоль) в 20 мл бензола и 1.1 мл хинолина прибавляли к суспендированному катализатору в токе аргона. Аргон постепенно замещали на водород, реакционную смесь перемешивали 2 часа при 10°C . Количество водорода измеряли при помощи газовой бюретки. После окончания поглощения H_2 катализатор отфильтровывали, фильтрат промывали водным раствором HCl (2M, 1 x 100 мл), растворитель упаривали. Сырой остаток очищали при помощи препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ (RP-HPLC) (элюент – метанол/вода, 90:10 по объему). Выход чистого промежуточного продукта 0.809 г (75%). $R_f = 0.45$ (эфир/гексан, 5:1). RP-HPLC: $R_t = 8.77$ мин (метанол/вода, 85:15). Водный раствор LiOH (0.4M, 15 мл) прибавляли к раствору продукта (0.392 г, 1.30 ммоль) в 20 мл метанола, реакционную смесь перемешивали 8 часов при комнатной температуре, метанол упаривали, остаток подкисляли водным раствором 1M HCl до pH 5.0. Липофильные продукты экстрагировали эфиром (3 x 50 мл), эфирные экстракты сушили Na_2SO_4 , растворитель упаривали. Продукт очищали на колонке с силикагелем (элюент – эфир/гексан, 3:1). Выход соединения (**6**) 0.332 г (89%). RP-HPLC: $R_t = 6.30$ мин (метанол/вода/уксусная кислота, 85:15:0.1 по объему). $R_f = 0.26$ (эфир/гексан, 5:1 с 1% уксусной кислоты). ^1H -ЯМР-спектр (300 МГц, CDCl_3): 5.52 (м, 1H) и 5.28-5.40 (м, 5H, $\text{CH}=\text{CH}$), 3.65 (т, 2H, $J=6.4$ Гц, 18- CH_2), 2.80 (м, 4H, 11- и 14- CH_2), 2.34 (м, 4H, 2- и 17- CH_2), 2.04 (м, 2H, 8- CH_2), 1.60 (м, 2H, 3- CH_2), 1.28-1.40 (м, 8H, CH_2). ^{13}C -ЯМР-спектр (75 МГц, CDCl_3): 179.53, 131.31, 130.52, 128.81, 127.85, 125.66, 62.34, 34.16, 30.84, 29.61, 29.19, 29.13 (3C), 27.31, 25.90, 25.80, 24.81. Масс-спектр ESI MS (m/z): 317 [$\text{M}+\text{Na}^+$].

Метилловый эфир 18-гидрокси-9,12-октадекадиновой кислоты (8). В насыщенной аргоном предварительно осушенной круглодонной колбе, снабженной магнитной мешалкой, суспендировали в 15 мл DMF безводные соли K_2CO_3 (0.74 г, 5.36 ммоль), NaI

(1.07 г, 7.14 ммоль) и CuI (1.36 г, 7.14 ммоль). К суспензии прибавляли метиловый эфир 11-бром-9-ундециновой кислоты (**4**) (0.98 г, 3.57 ммоль), затем 6-гептин-1-ол (**7**) (0.40 г, 3.57 ммоль) в 4 мл DMF. Полученную реакционную смесь непрерывно перемешивали 24 часа при комнатной температуре, разлагали 150 мл насыщенного водного NH_4Cl , липофильные продукты экстрагировали эфиром (3 x 80 мл), объединенные органические экстракты промывали насыщенным водным раствором NaCl (1 x 100 мл), сушили Na_2SO_4 , растворитель упаривали. Остаток очищали на колонке с силикагелем в токе аргона (элюент – эфир/гексан, 2:1). Выход соединения (**8**) 0.84 г (79%). $R_f = 0.41$ (эфир/гексан, 3:1). ^1H -ЯМР-спектр (300 МГц, CDCl_3): 3.59 (с, 3H, OCH_3), 3.52 (т, 2H, $J = 6.4$ Гц, 18- CH_2), 3.06 (м, 2H, 11- CH_2), 2.21 (т, 2H, $J = 7.4$ Гц, 2- CH_2), 2.04 (м, 4H, 8- и 14- CH_2), 1.20-1.60 (м, 16H, CH_2). ^{13}C -ЯМР-спектр (75 МГц, CDCl_3): 174.22, 80.38, 80.16, 74.91, 74.72, 62.74, 51.35, 34.11, 32.35, 29.04, 28.75 (4C), 25.11, 24.96, 18.75 (2C), 9.71.

18-Гидрокси-(9Z,12Z)-октадекадиеновая кислота (9). Суспензию катализатора Линдлара (506 мг) в 10 мл сухого бензола насыщали H_2 при комнатной температуре, затем охлаждали до 10°C . Метиловый эфир (**8**) (723 мг, 2.41 ммоль) в 15 мл бензола и 0.4 мл хинолина прибавляли к суспендированному катализатору в токе аргона. Аргон постепенно замещали на H_2 , реакционную смесь перемешивали 1.5 часа при 10°C . Количество водорода измеряли при помощи газовой бюретки. После окончания поглощения H_2 катализатор отфильтровывали, фильтрат промывали водным раствором HCl (2M, 1 x 100 мл), растворитель упаривали. Сырой остаток очищали при помощи препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ (RP-HPLC) (элюент – метанол/вода, 90:10 по объему). Выход чистого промежуточного продукта 566 мг (77%). $R_f = 0.56$ (эфир/гексан, 3:1). RP-HPLC: $R_t = 8.69$ мин (метанол/вода, 85:15). Водный раствор LiOH (0.3M, 20 мл) в токе аргона прибавляли к раствору продукта (400 мг, 1.30 ммоль) в 30 мл метанола, реакционную смесь перемешивали 8 часов при комнатной температуре, метанол упаривали, остаток подкисляли водным раствором 1M HCl до pH 5.0. Липофильные продукты экстрагировали эфиром (3 x 50 мл), эфирные экстракты сушили Na_2SO_4 , растворитель упаривали. Продукт очищали на колонке с силикагелем (элюент – эфир/гексан, 3:1). Выход соединения (**9**) 241 мг (63%). RP-HPLC: $R_t = 6.05$ мин (метанол/вода/уксусная кислота, 85:15:0.1 по объему). $R_f = 0.15$ (эфир/гексан, 5:1 с 1% уксусной кислоты). ^1H -ЯМР-спектр (300 МГц, CDCl_3): 5.28-5.40 (м, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$), 3.62 (т, 2H, $J = 6.4$ Гц, 18- CH_2), 2.75 (м, 2H, 11- CH_2), 2.31 (т, 2H, $J = 7.4$ Гц, 2- CH_2), 2.06 (м, 4H, 8- и 14- CH_2), 1.58 (м, 4H, 3- и 17- CH_2), 1.20-1.40 (м, 12H, CH_2). ^{13}C -ЯМР-спектр (75 МГц, CDCl_3): 179.32, 130.23, 129.93, 128.32, 128.10, 63.01, 34.17, 32.61, 29.64, 29.57, 29.22, 29.14 (2C), 27.31 (2C), 25.77, 25.54, 24.83. Масс-спектр ESI MS (m/z): 319 [$\text{M}+\text{Na}^+$].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 04-03-32454 и № 05-03-32392)

ЛИТЕРАТУРА:

1. I.Stenzel, B.Hause, O.Miersch, T.Kurz, H.Maucher, H.Weichert, J.Ziegler, I.Feussner, C.Wasternack. //Plant Molecular Biology. – 2003. – Vol.51. – P.895-911.
2. I.Feussner, C.Wasternack. //Annu. Rev. Plant Biol. – 2002. – Vol.53. – P.275-297.
3. И.В. Иванов, Н.В.Гроза, Е.Е.Мнасиа, Г.И. Мягкова. //Биоорган. Химия. – 1995. – Т.21, № 10. – С.802-805.
4. И.В. Иванов, Н.В.Гроза, Кюн Х., Г.И. Мягкова. //Биоорган. химия. – 1998. – Т.24, № 6. – С.454-457.
5. H.Sprecher. //Progr. Chem. Fats Other Lipids. – 1978. – Vol.15. – P.219-254.
6. М.А. Lapitskaya, L.L.Vasiljeva, K.K.Pivnitsky. //Synthesis. – 1993. – P.65-66.