



УДК 547.392.52.057

© 1991 г.

Д. В. Буклев, В. П. Шевченко, И. Ю. Нагаев,
Н. А. Латышев, В. В. Безуглов

СИНТЕЗ 4,5-ДЕГИДРОДОКОЗАГЕКСАЕНОВОЙ,
5,6-ДЕГИДРОЭЙКОЗАПЕНТАЕНОВОЙ КИСЛОТ И ИХ СЕЛЕКТИВНО
МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ПРОИЗВОДНЫХ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Разработан метод синтеза 5,6-дегидроэйкозапентаеновой и 4,5-дегидродокозагексаеновой кислот из природной эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот соответственно. Селективным гидрированием тритием указанных ацетиленовых производных жирных кислот получены [5,6-³H]эйкозапентаеновая и [4,5-³H]-докозагексаеновая кислота с Z-конфигурацией двойных связей и молярной радиоактивностью 1,5—1,8 ПБк/моль. Обсуждается структура ряда побочных продуктов синтеза.

В последние годы не ослабевает интерес к основным PUFA ω-3-ряда — ЕРА и ДНА, биологическая важность которых не вызывает сомнений [1—5]. Для изучения путей и продуктов превращения FA широко применяются их радиоактивно меченные производные, в том числе FA, высоко меченные тритием [6]. Введение тритиевой метки в строго определенное положение в некоторых случаях является необходимым требованием [7]. Ранее нами был описан метод получения [5,6-³H]арахидоновой кислоты с молярной радиоактивностью 1,5—1,8 ПБк/моль из природной АА через 5,6-дегидро-АА [8] с применением схемы синтеза, предложенной Кори и сотр. [9], и последующим селективным гидрированием тритием. Применение выбранной последовательности реакций с существенно измененными реагентами позволяет получать дегидроаналоги ЕРА и ДНА по ближней к карбоксильной группе двойной связи с достаточным выходом [10, 11], а также ряд весьма ценных эйкозаноидов (5,6-эпоксикислоты, 5-НЕТЕ и др.).

Цель настоящего исследования — синтез 5,6-дегидро-ЕРА и 4,5-дегидро-ДНА из природных ЕРА и ДНА, а также разработка метода получения селективно меченных тритием по ближней к карбоксильной группе Δ-4- или Δ-5-двойной связи высоко радиоактивных субстратов для изучения путей и продуктов окислительного метаболизма PUFA.

Ключевой стадией описываемого нами синтеза дегидропроизводных PUFA является иод-лактонизация. Ранее при исследовании кинетики этой реакции было показано, что иод-лактонизация, осуществляемая в спирте, протекает быстрее и более гладко, чем в других растворителях (диоксан, THF, изопропанол), и, кроме того, требует меньшего избытка иода, который в щелочной среде приводит к неселективному окислению PUFA [12]. Использование в качестве субстрата реакции не индивидуальных FA, а природной смеси, обогащенной ЕРА и ДНА, значительно удешевляет продукт.

Обработкой иодом природной смеси PUFA рыбьего жира получили с выходом 62 и 77% иодлактоны ЕРА (Ia) и ДНА (Iб), которые были разделены колоночной хроматографией. Следует отметить, что для синтеза ацетиленовых FA нет необходимости тщательно разделять лабильные иодлактоны (Ia, б), так как полученные из них метиловые эфиры 5,6-эпокси-ЕРА (IIa) и 4,5-эпокси-ДНА (IIб), а также соответствующие ацетиленовые FA достаточно различаются по хроматографической подвижности. Однако для успеха дальнейших превращений требуется обязательная очистка реакционной массы быстрой фильтрацией через силикагель.

Раскрытие иодлактонов в эпоксикислоты (5,6-эпокси-АА и 5,6-эпокси-ЕРА) действием LiOH/THF/H₂O, примененное Кори и сотр. [9] для по-

Сокращения: PUFA — полиненасыщенные жирные кислоты, FA — жирные кислоты, АА — арахидоновая кислота, ДНА — докозагексаеновая кислота, 5,6-ДНЕРА — 5,6-дегидроэйкозапентаеновая кислота, 4,5-ДНДНА — 4,5-дегидродокозагексаеновая кислота, THF — тетрагидрофуран, 5-НЕТЕ — 5-гидроксиг-6E,8Z,11Z,14Z-эйкозатетраеновая кислота.

лучения 5,6-эпокси-АА, оправдано, по нашему мнению, только для получения соответствующих эпоксикислот как таковых. Метилловые эфиры эпоксикислот — ключевой продукт в синтезе ацетиленовых FA — удобнее получать обработкой соответствующих иодлактонов Et_3N в MeOH. Нами также показано, что взаимодействие γ -иодлактона (Iб) с $\text{LiOH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ приводит к 4,5-визициальному диолу (IIв) в качестве основного продукта реакции, а не к 4,5-эпокси-ДНА. По-видимому, это обусловлено значительно большей скоростью замещения иода гидроксильной группой в указанных условиях по сравнению со скоростью омыления пятичленного лактонного цикла без образования необходимого интермедиата — иодгидрина.

Расщепление эпоксидов для получения суммы изомерных бромгидринов (IIIа, в и IIIб, г) проводили обработкой 32% HBr в двухфазной системе, чем достигали 77% выхода на этой стадии. Ранее описанный Кори и соотр. реагент $\text{KBr}/\text{AcOH}/\text{THF}$ [9] в случае 5,6-эпоксидов неоптимален, а в случае 4,5-эпоксида ДНА неприемлем, так как побочный продукт — соответствующий бромлактон (IIIд) — становится основным продуктом реакции. Применение более высокой концентрации HBr также приводит к увеличению доли бромлактонов, а меньшей — к увеличению доли визициальных диолов и гидроксиллактонов. Хроматографически очищенные бромгидрины (IIIа, в и IIIб, г), отнесение структур которых осуществляли на основании данных ЯМР и масс-спектров (см. «Экспериментальную часть»), окисляли до бромкетонов (IVа, в и IVб, г) реактивом Джонса [13].

Для получения ацетиленовых FA (Va, б) хроматографически очищенные бромкетоны (IVа, в и IVб, г) обрабатывали тозилгидразином, реакция с которым протекает быстрее, чем с 2,4-динитрофенилсульфонилгидразином, и приводит к более простым смесям по сравнению с ранее описанными [9]. Таким образом получили соединения (Va, б) с выходом 17—20% и чистотой 60—65% по данным ГЖХ; в качестве примесей (до 10%) идентифицированы алленовые соединения (VIа, б), остальное составляли компоненты неизвестного строения. Индивидуальные ацетиленовые эфиры (IVа, б) выделяли препаративной ВЭЖХ на обращенной фазе.

Структуры метиловых эфиров ацетиленовых FA устанавливали, изучая масс-спектры полученных из них пирролидидов. Этот распространенный метод масс-спектрометрического исследования [14—16] был успешно применен некоторыми из нас при анализе сложных PUFA — 4,6,8,11,14-эйкозапентаеновой, 4,6,8,11,14,17-эйкозагексаеновой, 3,5,7,10,13,16,19-докозагептаеновой кислот [17]. Масс-спектрометрия пирролидидов позволила точно определить положение двойных и тройной связи с ацетиленовых FA, а сравнение масс-спектров пирролидидов исходных FA с пирролидидами ацетиленовых FA дало возможность по уменьшению массы характерных осколков фрагментации на две единицы утверждать, что в результате синтетических преобразований удаленные от карбоксильной группы не менее чем на 7 углеродных атомов двойные связи не затрагиваются (см. табл. 1).

Продукты синтеза, имеющие алленовую структуру, обнаруживали в виде пика, имеющего большее время удерживания при ГЖХ на Carbowax 20M , чем соответствующая ацетиленовая жирная кислота. Соединения с алленовой структурой (VIа, б), выделенные как пик «наездник» у пика основного продукта при препаративной ВЭЖХ на обращенной фазе, имели дополнительный максимум поглощения в УФ-области при 230 нм с экстинкцией, характерной для изолированных алленовых систем. По данным ИК-спектров, неалленовые двойные связи в соединениях (VIа, б) имели Z-конфигурацию. На основании спектральных данных, включая и данные масс-спектрометрии пирролидидов (не приведены), мы приписали алленовым соединениям структуры (VIа — для продукта из EPA и VIб — для продукта из ДНА).

Гидрирование тройных связей проводили на катализаторе Линдлара в смеси гептан — диоксан в различных соотношениях, с селективностью 80—90%. Полученные тритированные метиловые эфиры (VIIа, б) омыляли и после микропрепаративной ВЭЖХ получали [5, 6- ^3H]эйкозапен-

Масс-спектрометрическая фрагментация пирролидидов ЕРА, 5,6-ДНЕРА и ДНА, 4,5-ДНДНА

Структурный фрагмент	ЕРА	5,6-ДНЕРА	ДНА	4,5-ДНДНА
$[M]^+$	355	353	381	379
$[M - C_2H_5]^+$	326	324	352	350
$[M - C_2H_5(CH=CHCH_2)]^+$	286	284	312	310
$[M - C_2H_5(CH=CHCH_2)_2]^+$	246	244	272	270
$[M - C_2H_5(CH=CHCH_2)_3]^+$	206	204	232	230
$[M - C_2H_5(CH=CHCH_2)_4]^+$	166	164	192	190
$[M - C_2H_5(CH=CHCH_2)_5]^+$	—	—	152	149

Таблица 2

Химические сдвиги (δ , м.д.) протонов соединений (Iб; IIа,б; IIIб,г,д; VIIб)

Отнесение	Соединения						
	(Iб)	(IIа)	(IIб)	(IIIб)	(IIIг)	(IIIд)	(VIIб)
H-2	2,56м	2,40м	2,50м	2,52м	2,63м	2,60м	2,51м
H-3а	2,42м	1,53м	1,81м	1,92м	2,27м	2,23м	2,51м
H-3б	2,72м		1,94м			2,42м	
H-4	4,27м	1,83м	2,98м	3,59м	4,19м	4,74м	
H-5	4,13м	2,95м	2,98м	4,05м	3,56м	4,04м	
H-6а	2,83м	2,95м	2,24м	2,87м	2,44м	2,94м	2,94м
H-6б			2,40м				
H-7а	5,58м	2,23м	5,50м	5,54м	5,56м	5,64м	5,42м
H-7б		2,40м					
H-8	5,39м	5,37м	5,37м	5,40м	5,40м	5,43м	5,42м
H-9	2,83м	5,37м	2,84м	2,87м	2,87м	2,94м	2,85м
H-10	5,39м	2,84м	5,37м	5,40м	5,40м	5,43м	5,42м
H-11	5,39м	5,37м	5,37м	5,40м	5,40м	5,43м	5,42м
H-12	2,83м	5,37м	2,84м	2,87м	2,87м	2,94м	2,85м
H-13	5,39м	2,84м	5,37м	5,40м	5,40м	5,43м	5,42м
H-14	5,39м	5,37м	5,37м	5,40м	5,40м	5,43м	5,42м
H-15	2,83м	5,37м	2,84м	2,87м	2,87м	2,94м	2,85м
H-16	5,39м	2,84м	5,37м	5,40м	5,40м	5,43м	5,42м
H-17	5,39м	5,37м	5,37м	5,40м	5,40м	5,43м	5,42м
H-18	2,83м	5,37м	2,84м	2,87м	2,87м	2,94м	2,85м
H-19	5,39м	2,07м	5,37м	5,40м	5,40м	5,43м	5,42м
H-20	5,39м	0,99т	5,37т	5,40м	5,40м	5,43м	5,42м
H-21	2,08м		2,07м	2,08м	2,09м	2,09м	2,11м
H-22	0,98т		0,99т	0,99т	0,99т	0,99т	0,99т
COOMe		3,69с	3,69с	3,70с	3,71с		3,71с

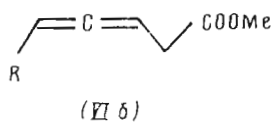
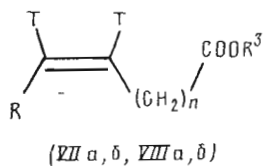
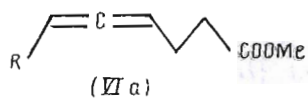
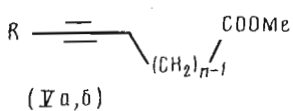
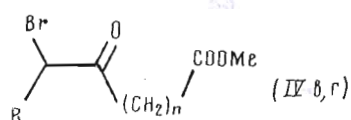
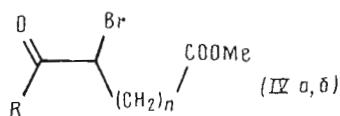
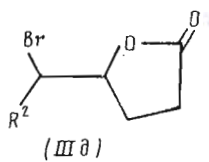
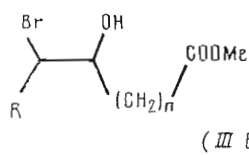
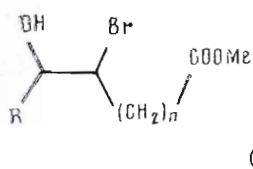
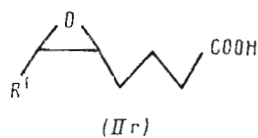
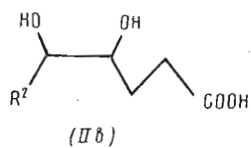
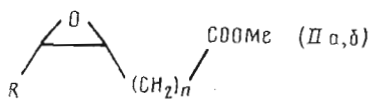
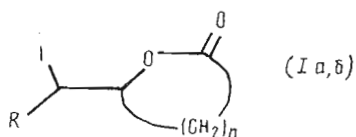
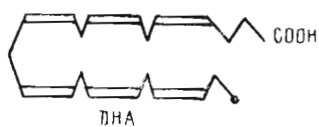
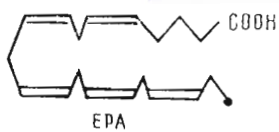
* м — мультиплет, т — триплет, с — синглет; (Iб) — под-лактон ДНА, (IIа) — метиловый эфир 5,6-эпоксида ЕРА, (IIб) — метиловый эфир 4,5-эпоксида ДНА, (IIIа) — метиловый эфир 4-бром, 5-гидрокси-ДНА, (IIIг) — метиловый эфир 5-бром, 4-гидрокси-ДНА, (IIIд) — γ -бром-лактон ДНА, (VIIб) — метиловый эфир 4,5-дегидро-ДНА.

таеновую (VIIIа) и [4,5- 3H]докозагексаеновую (VIIIб) кислоты с молярной радиоактивностью 1,5—1,8 ПБк/моль.

Структуры соединений (Iб, IIа, IIб, IIIб, IIIг, IIIд, Vб) подтверждены данными ПМР; отнесения сигналов сделаны на основании экспериментов по селективному подавлению протонов (см. табл. 2).

Экспериментальная часть

УФ-спектры снимали в этаноле на приборе Specord UV-VIS (ГДР), ИК-спектры — в CCl_4 на приборе Specord 75IR (ГДР). Спектры ПМР измеряли на спектрометре Bruker WM-500 (ФРГ), химические сдвиги протонов (δ) приведены относительно внутреннего стандарта — $(CH_3)_4Si$ для растворов в дейтерохлороформе. Масс-спектры снимали на приборе Varian Mat 44S при ионизации электронным ударом (энергии электронов 70 эВ) (EI) либо при химической ионизации аммиаком (CI). Для ГЖХ-анализов использовали хроматограф Shimadzu GC9AM с интегратором



Для серий а, в $n=3$, $R=R^1$

Для (VII) $R^3=Me$

Для серий б, г $n=2$, $R=R^2$

Для (VIII) $R^3=H$



C-R3A (Shimadzu), с капиллярной кварцевой колонкой (0,25 мм × 25 м) с привитой фазой Carbowax 20M, детектор-пламенно-ионизационный, газ-носитель — гелий, температура инжектора 210° С, температура термоста-та колонок 195° С. Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе «Милицром-1». Для препаративного выделения использовали жидкост-ный хроматограф DuPont 8800, снабженный колонкой Zorbax ODS (9,4 × × 250 мм). ТСХ осуществляли на пластинках Silufol UV 254 (Kavalier) с применением систем гексан — диэтиловый эфир, 1 : 1 (А), хлористый метилен (Б), вещества обнаруживали 10% раствором фосфорномолибдено-вой кислоты в спирте. Колоночную хроматографию проводили с исполь-зованием силикагеля L (Chemapol, ЧСФР); ход разделения контролиро-вали по ТСХ. Упаривание растворов проводили на испарителе при тем-пературе не выше 30° С. Органические растворители очищали по стан-дартным методикам. Исходный препарат жирных кислот рыбьего жира сардины иваси, предоставленный ИБМ ДВО АН СССР, содержал, по данным ГЖХ-анализа, 35% ДНА и 30% ЕРА.

Полностью *цис-6-иод-8,11,14,17-эйкозатетраен-5-олид* (Ia) и пол-ностью-*цис-5-иод-7,10,13,16,19-докозакентаен-4-олид* (Iб). К раствору 30 г жирных кислот рыбьего жира, содержащему 10,5 г (0,032 моль) ДНА и 9 г (0,029 моль) ЕРА, в 75 мл спирта при интенсивном перемешивании добавляли 200 мл 20% раствора KHCO_3 , смесь интенсивно перемешивали. К полученному прозрачному раствору по каплям в течение 2 ч прибавляли 380 мл 12% раствора I_2 (45,6 г I_2 , 0,179 моль, 3 экв.) в спирте и реакцион-ную смесь интенсивно перемешивали в темноте 8 ч при 20° С. Затем к реак-ционной смеси прибавляли 100 мл насыщенного раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, энер-гично встряхивали и экстрагировали смесью гексан — эфир (4 : 1, 3 × × 300 мл). Органический экстракт промывали насыщенным раствором NaCl (2 × 100 мл), сушили над Na_2SO_4 . Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток растворяли в 200 мл гексана и промывали свежеприготовленным 4,5% раствором Na_2CO_3 в 40% спирте (2 × 50 мл), водой (50 мл), насыщенным раствором NaCl , сушили над Na_2SO_4 . Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток хроматографировали на 450 г силикагеля, элюируя градиентной смесью эфира (0 → 5%) с бензолом. Получали 7,90 г (62%) иодлактона (Ia) и 11,20 г (77%) иодлактона (Iб) в виде светло-желтого масла.

Иодлактон (Ia): R_f 0,63 (Б), УФ-спектр: λ_{max} 210 нм; масс-спектр СI (основные пики), m/z : 446 ($[M + \text{NH}_3 + \text{H}]^+$)*, 318 ($[M - \text{HI} + \text{NH}_3 + \text{H}]^+$), 301 ($[M - \text{HI}]^+$).

Иодлактон (Iб): R_f 0,72 (Б), УФ-спектр: λ_{max} 210 нм, масс-спектр СI (основные пики), m/z : 472 ($[M + \text{NH}_3 + \text{H}]^+$), 346 ($[M - \text{HI} + \text{NH}_3 + \text{H}]^+$).

Метиловый эфир полностью-цис-4,5-эпокси-7,10,13,16,19-докозакен-таеновой кислоты (IIб). К раствору 9,7 г (0,021 моль) иодлактона (Iб) в 50 мл метанола прибавляли 16 мл Et_3N (11,6 г, 5,5 экв.), реакционную смесь кипятили 3 ч, а затем упаривали досуха в вакууме. Остаток встря-хивали с гексаном (3 × 70 мл), кристаллы триэтиламониевой соли отде-ляли фильтрацией. Фильтрат упаривали досуха в вакууме и хроматогра-фировали на 30 г силикагеля, элюируя градиентной смесью эфира (0 → → 20%) с гексаном. Получали 5,40 г (71%) эпоксида (IIб) в виде бесцвет-ного подвижного масла. R_f 0,58 (А). Масс-спектр ЕI (основные пики), m/z : 358 ($[M]^+$), 327 ($[M - \text{MeO}]^+$); СI (основные пики), m/z : 376 ($[M + \text{NH}_3 + \text{H}]^+$), 359 ($[M + \text{H}]^+$). Для установления точного положения оксиранового цикла эпоксид (IIб) превращали в вицинальный диол с со-хранением сложноэфирной группы, полученное из него бистриметилси-лильное производное анализировали масс-спектрометрически. Масс-спектр ЕI (основные пики), m/z : 520 ($[M]^+$), 489 ($[M - \text{OMe}]^+$), 331 ($[M - \text{MeOOCCH}_2\text{CH}_2\text{CHOSiMe}_3]^+$), 291 ($[M - \text{C}_2\text{H}_5(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5]^+$), 189 ($[M - \text{C}_2\text{H}_5(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CHOSiMe}_3)]^+$).

Метиловый эфир полностью-цис-5,6-эпокси-8,11,14,17-эйкозатетраен-овой кислоты (IIа) синтезировали аналогично 4,5-эпокси ДНА, но реак-цию проводили в течение 1 ч. R_f 0,51 (А). Масс-спектр ЕI (основные пики),

* В скобках приведена предполагаемая структура иона.

m/z : 332 ($[M]^+$), 315 ($[M - H_2O]^+$), 301 ($[M - MeO]^+$), масс-спектр СІ (осн. пики), m/z : 350 ($[M + NH_3 + H]^+$), 333 ($[M + H]^+$), 301 ($[M - MeO]^+$).

Полностью-цис-5,6-эпокси-8,11,14,17-эйкозатетраеновая кислота (IIг). К раствору 308 мг (0,72 мкмоль) иодлактона (Iа) в 20 мл свежеперегнанного THF прибавляли 15 мл 0,2 н. раствора LiOH (2 экв.). Реакционную смесь выдерживали 16 ч при 20° С, затем к реакционной смеси прибавляли 50 мл воды, подкисляли 1,5 н. HCl до pH 2 и экстрагировали смесью петролейный эфир — диэтиловый эфир, 3 : 1 (3 × 30 мл). Органический экстракт промывали водой (1 × 50 мл), насыщенным NaCl (1 × 50 мл), сушили над Na₂SO₄. Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток растворяли в минимальном количестве гексана и хроматографировали на 11 г силикагеля, элюируя градиентной смесью эфира (0 → 25%) с гексаном, содержащей 0,6% уксусной кислоты. Получали 95 мг (41%) (IIг), бесцветное подвижное масло. R_f 0,21(A).

Метилловые эфиры полностью-цис-5-бром, 6-гидрокси-8,11,14,17-эйкозатетраеновой кислоты (IIIа) и полностью-цис-6-бром,5-гидрокси-8,11,14,17-эйкозатетраеновой кислоты (IIIв). К раствору 1,72 г (4,8 мкмоль) эпоксида (IIа) в 50 мл гептана прибавляли 37 мл 32% HBr (30 экв.) и реакционную смесь интенсивно перемешивали 1 ч при 20° С, затем органический слой отделяли, промывали водой (10 мл), насыщенным раствором NaCl (10 мл), сушили над Na₂SO₄. Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме и хроматографировали на 25 г силикагеля, элюируя градиентной смесью эфира (0 → 25%) с гексаном. Получали 1,63 г (77%) смеси изомерных бромгидринов, состоящей из 840 мг соединения (IIIа) и 790 мг (IIIб) в виде светло-желтого масла с характерным запахом.

5-Бром,6-гидроксиизомер (IIIа). R_f 0,40 (A). Масс-спектр Me₃Si-производных по гидроксильной группе EI (основные пики), m/z : 486 ($[M^+]$) (⁸¹Br), 484 ($[M^+]$) (⁷⁹Br), 471 и 469 ($[M - Me]^+$), 455 и 453 ($[M - MeO]^+$), 404 ($[M - HBr]^+$), 315 ($[M - HBr - OSiMe_3]^+$), 297 и 295 ($[MeOOCCH_2CH_2CH_2CH(OSiMe_3)CH - Br]^+$), 203 ($[MeOOCCH_2 - (CH_2)_2CH - OSiMe_3]^+$).

6-Бром,5-гидроксиизомер (IIIв). R_f 0,30 (A). Масс-спектр Me₃Si-производного по гидроксильной группе EI (основные пики), m/z : 486 ($[M^+]$) (⁸¹Br), 484 ($[M^+]$) (⁷⁹Br), 471 и 469 ($[M - Me]^+$), 455 и 453 ($[M - MeO]^+$), 404 ($[M - HBr]^+$), 315 ($[M - HBr - OSiMe_3]^+$), 297 и 295 ($[MeOOCCH_2CH_2CH_2CHBrCHOSiMe_3]^+$), 215 ($[MeOOCCH_2CH_2CH_2CH_2 - OSiMe_3]^+$).

Метилловые эфиры полностью-цис-4-бром-5-гидрокси-7,10,13,16,19-докозапентаеновой кислоты (IIIб) и полностью-цис-5-бром,4-гидрокси-7,10,13,16,19-докозапентаеновой кислоты (IIIг) синтезировали аналогично эфирам (IIIа, в). Получали смесь изомеров (IIIб и IIIг) такого же состава.

4-Бром,5-гидроксиизомер (IIIв). R_f 0,43 (A). Масс-спектр Me₃Si-производного по гидроксильной группе EI (основные пики), m/z : 512 ($[M^+]$) (⁸¹Br), 510 ($[M^+]$) (⁷⁹Br), 497 и 495 ($[M - Me]^+$), 481 и 479 ($[M - MeO]^+$), 431 ($[M - HBr]^+$), 341 ($[M - HBr - OSiMe_3]^+$), 283 и 281 ($[MeOOCCH_2CH_2CH(OSiMe_3)CHBr]^+$), 189 ($[M - MeOOCCH_2CH_2CH - OSiMe_3]^+$).

5-Бром,4-гидроксиизомер (IIIг). R_f 0,29 (A). Масс-спектр Me₃Si-производного по гидроксильной группе EI (основные пики), m/z : 512 ($[M^+]$) (⁸¹Br), 510 ($[M^+]$) (⁷⁹Br), 497 и 495 ($[M - Me]^+$), 481 и 479 ($[M - MeO]^+$), 431 ($[M - HBr]^+$), 341 ($[M - HBr - OSiMe_3]^+$), 297 и 295 ($[MeOOCCH_2CH_2CHBrCH(OSiMe_3)CH_2]^+$), 283 и 281 ($[MeOOC - (CH_2)_2CHBrCHOSiMe_3]^+$), 215 ($[MeOOCCH_2CH = CHCH(OSiMe_3)CH_2]^+$), 201 ($[MeOOCCH_2CH = CHCHOSiMe_3]^+$).

Полностью-цис-5-Бром-7,10,13,16,19-докозапентаен-4-олид (IIIд). *Вариант 1.* К раствору 100 мг эпоксида (IIб) в 3 мл свежеперегнанного THF прибавляли 10 мл насыщенного раствора KBr в AcOH; реакционную смесь выдерживали 3 ч при 20° С, упаривали досуха в вакууме. Остаток встряхивали с гексаном (2 × 10 мл), кристаллы KBr отделяли фильтрацией, фильтрат упаривали, остаток хроматографировали на 5 г силикагеля, элюируя хлористым метиленом. Получали 46 мг (41%) соединения (IIIд),

Вариант 2. Аналогично синтезу бромгидринов (IIIа—г), но с использованием 48% HBr из эпоксида (IIб) получали лактон (IIIд) с выходом

43—50%. R_f 0,72 (Б). Масс-спектр EI (основные пики), m/z : 408 ($[M^+]$) (^{81}Br), 406 ($[M^+]$) (^{79}Br), 379 и 377 ($[M - \text{C}_2\text{H}_5]^+$), 326 ($[M - \text{HBr}]^+$), 312 и 310 ($[M - (\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2\text{CH}_3]^+$), 272 и 270 ($[M - (\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}_3]^+$).

Метилловые эфиры полностью-цис-5-бром-6-оксо-8,11,14,17-эйкозатетраеновой кислоты (IVa) и полностью-цис-6-бром-5-оксо-8,11,14,17-эйкозатетраеновой кислоты (IVб). Раствор 1,095 г бромгидринов (IIIa, в) в 50 мл ацетона охлаждали до -15°C , к холодному раствору при интенсивном перемешивании прибавляли порциями по 100 мкл (по каплям) 1300 мкл реактива Джонса, смесь перемешивали 30 мин при -15°C , после чего позволяли нагреться до 20°C и перемешивали еще 10 мин, затем к реакционной смеси прибавляли 25 мл воды и экстрагировали гексаном (3×50 мл). Органический экстракт промывали водой, насыщенным раствором NaCl (50 мл), сушили над Na_2SO_4 . Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток хроматографировали на 15 г силикагеля, элюируя градиентной смесью эфира (0→12%) с гексаном. Получали 640 мг (64%) смеси изомерных бромкетонов в виде слегка желтого масла с характерным запахом. R_f 0,65 (А). Масс-спектр смеси бромкетонов (IVa, в), EI (основные пики), m/z : 330 ($[M - \text{HBr}]^+$), 299 ($[M - \text{HBr} - \text{OMe} + \text{H}]^+$).

Метилловые эфиры полностью-цис-4-бром-5-оксо-7,10,13,16,19-докозапентаеновой кислоты (IVб) и полностью-цис-5-бром-4-оксо-7,10,13,16,19-докозапентаеновой кислоты (IVв) синтезировали из соединения (IIIб, г) аналогично синтезу бромкетонов из соединений (IIIa, в). Выход 64%. R_f 0,65 (А). Масс-спектр смеси бромкетонов, EI (основные пики), m/z : 356 ($[M - \text{HBr} + \text{H}]^+$), 326 ($[M - \text{HBr} - \text{OMe} + \text{H}]^+$).

Метилловый эфир 5,6-дегидро-ЕРА (Va). К раствору 213 мг (0,48 мкмоль) смеси изомерных бромкетонов (IVa, в) в 12 мл хлороформа прибавляли 5 мг гидрохинона, 6 мл уксусной кислоты и 189 мг (2,1 экв.) тозилгидразина, смесь тщательно перемешивали и оставляли в темноте под аргоном на 16 ч при 20°C . Затем к реакционной смеси прибавляли 50 мл воды и экстрагировали (2×50 мл) гексана, органический слой отделяли, промывали 20% раствором Na_2CO_3 (2×10 мл), насыщенным раствором NaCl (50 мл), сушили над Na_2SO_4 . Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, хроматографировали на 10 г силикагеля, элюируя градиентной смесью эфира (0→10%) с гексаном. Получали 30 мг (17%) смеси метиловых эфиров (Va, VIa) с содержанием изомеров (87 : 13 соответственно) и чистотой 75%. Обращенно-фазовой ВЭЖХ выделяли эфир (Va), R_f 0,9 (А). Масс-спектр пирролидида соединения (Va) — см. табл. 1.

Метилловый эфир 4,5-дегидро-ДНА (Vб). Синтезировали аналогично синтезу соединения (Va) из бромкетонов (IVб, г). Получили с выходом 17% смесь изомерных метиловых эфиров (Vб, VIб) с соотношением 87 : 13 и чистотой 75%, из смеси выделяли метилловый эфир (Vб). R_f 0,9 (А). Масс-спектр пирролидида из соединения (Vб) — см. табл. 1.

Кратно меченные тритием метилловые эфиры полиеновых жирных кислот (VIIa) и (VIIб). Ацетиленовый предшественник (Va или Vб) (5 мг) растворяли в 0,5 мл смеси диоксан — гептан (1 : 9), переносили в ампулу объемом 7 мл, содержащую катализатор (15 г, 5% Pd/BaSO₄, импрегнированный диацетатом свинца и боргидридом натрия). Ампулу замораживали жидким азотом, вакуумировали до давления $1 \cdot 10^{-3}$ гПа, напускали тритий до давления 350 гПа, размораживали и перемешивали содержимое ампулы 60 мин при 20°C . Ампулу вновь замораживали жидким азотом и удаляли избыточный тритий вакуумированием. Катализатор отделяли фильтрованием реакционной смеси через 50 мг силикагеля, используя в качестве элюента бензол (3 мл). Трехкратным упариванием с метанолом удаляли лабильный тритий, остаток растворяли в 0,1 мл смеси метанол — вода (7 : 3) и очищали ВЭЖХ на колонке ($4,6 \times 250$ мм) с фазой Servachrom 10 C18, оснащенной предколонкой ($4,6 \times 75$ мм) с Silasorb 7,5 C18, в линейном градиенте вода — метанол. Выход метиловых эфиров (VIIa) и (VIIб) соответственно [5,6-³H]эйкозапентаеновой

и [4,5-³H]докозагексаеновой кислот составил 4,3 мг (85%) и 2,3 мг (45%) соответственно с молярной радиоактивностью 1,5—1,8 ПБк/моль.

Гидролиз метиловых эфиров полиеновых жирных кислот (VIIa, б). К раствору 2 мг метилового эфира жирной кислоты (VIIa или VIIб) в 200 мкл спирта прибавляли 0,5 мл 1,5 н. LiOH, 1 мл спирта и 1 мл воды и оставляли на 16 ч при 20° С. Затем к реакционной смеси прибавляли 10 мл воды и осторожно подкисляли 1,5 н. HCl до pH 4; экстрагировали смесью гексан — диэтиловый эфир, 1 : 1 (3 × 10 мл). Органический экстракт промывали водой (2 × 20 мл), насыщенным раствором NaCl (15 мл), сушили над Na₂SO₄. Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме и получали 1,5 мг (75%) свободной жирной кислоты (VIIIa либо VIIIб) с мол. радиоактивностью 1,5—1,8 ПБк/моль. R_f 0,49 (A).

Пирролидиды жирных кислот для масс-спектрометрического анализа. К раствору 3—5 мг образца FA в 200 мкл пирролидина прибавляли 10 мкл свежеперегнанной уксусной кислоты, реакционную смесь помещали в ампулу, запаивали и выдерживали 1 ч при 120° С. После охлаждения к реакционной смеси прибавляли 1 мл хлороформа, промывали 0,1 н. HCl (3 × 1 мл), сушили над Na₂SO₄, осушитель отфильтровывали через 0,5 г силикагеля. Фильтрат упаривали досуха, сухой остаток растворяли в 0,5 мл гексана. Пирролидиды исследуемых жирных кислот имели R_f 0,5—0,6 (хлороформ — ацетон, 15 : 1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Williams M. A. et al. // Lipids. 1989. V. 24. № 9. P. 753—758.
2. Lokesh B. R. et al. // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 958. P. 99—107.
3. Yoshino S., Ellis E. F. // Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 1989. V. 36. P. 165—170.
4. VanRollins M. et al. // J. Lipid Res. 1989. V. 30. P. 275—286.
5. VanRollins M. // Lipids. 1990. V. 25. № 8. P. 481—490.
6. Бергельсон Л. Д. и др. Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981.
7. Gronn M. et al. // Biochim. et biophys. acta. 1990. V. 1044. P. 249—254.
8. Шевченко В. П. и др. // Тез. симпоз. «Включение радиоактивной метки в органические соединения». Братислава, 1988. С. 33.
9. Corey E. J. et al. // Tetrahedron. 1980. V. 21. № 44. P. 4243.
10. Безуглов В. В. и др. Способ получения [5,6-³H]тимонодоновой и [4,5-³H]докозагексаеновой кислот. А. с. 4498480/31—04(133154) СССР.
11. Шевченко В. П. и др. // Тезисы IV Всесоюз. конф. «Синтез и исследование простагландинов». Минск, 1989. С. 83.
12. Gaydai N. V. et al. // J. Oil Amer. Chem. Soc. 1991. № 4.
13. Djerassi C. et al. // J. Org. Chem. 1956. V. 21. P. 1547.
14. Andersson B. A., Holman R. T. // Lipids. 1975. V. 10. № 3. P. 185—190.
15. Andersson B. A. et al. // Lipids. 1975. V. 10. № 4. P. 215—219.
16. Joseph J. D. // Lipids. 1975. V. 10. № 7. P. 395—403.
17. Куклев Д. В. и др. // Тез. IV Всес. конф. «Синтез и исслед. простагландинов». Минск, 1989.

Поступила в редакцию 1.III.1991

D. V. KUKLEV, V. P. SHEVCHENKO, I. Yu. NAGAIEV, N. A. LATYSHEV, V. V. BEZUGLOV

THE SYNTHESIS OF 4,5-DEHYDRODOCOSAHENXAENOIC AND 5,6- [DEHYDROEICOSAPENTAENOIC ACIDS AND THEIR SELECTIVELY TRITIUM LABELED DERIVATIVES

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

4,5-Dehydrodocosahexaenoic and 5,6-dehydroeicosapentaenoic acids have been synthesized from the corresponding natural fatty acids. The obtained acetylenic fatty acids have been used for producing selectively radiolabelled derivatives of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids with the natural configuration of the double bonds and the molar radioactivity of 1,5—1,8 PBq/mol. Formation of allenic structures and bromo lactones as by-products in the synthesis is described.