



УДК 547.396:577.152.1

## О НЕКОТОРЫХ ОСОБЕННОСТЯХ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ЛИНОЛЕНОВОЙ КИСЛОТЫ ЛИПОКСИГЕНАЗОЙ СЕМЕНИ ЛЬНА

© 1996 г. В. Б. Берзин<sup>#</sup>, Е. В. Наненина, А. И. МирошниковИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 25.04.95 г. После доработки 19.10.95 г.

Превращения линоленовой кислоты при действии системы ферментов, выделенной из проросшего семени льна, и дальнейшие преобразования возникших продуктов в кислой (рН 3) среде приводят к  $\gamma$ -кетолу, а также к гидроксильрованным производным 12-оксофитодиеновой кислоты с одной или двумя восстановленными двойными связями. Эти соединения вызывают индукцию устойчивости проростков подсолнечника к поражению грибом *Sclerotinia sclerotiorum*.

*Ключевые слова:* липоксигеназа, (10E,15Z)-9-гидрокси-12-оксо-10,15-октадекадиеновая кислота ( $\gamma$ -кетол), 12-оксофитодиеновая кислота (12-оксо-PDA), подсолнечник, патогенный паразитарный гриб *Sclerotinia sclerotiorum*.

Исследования последних лет показали, что жасмоновая кислота или ее метиловый эфир (метилжасмонат) играют существенную роль в регуляции развития растений. Выяснено, что биосинтез жасмоновой кислоты из линоленовой под действием липоксигеназ протекает по пути, напоминающему биотрансформацию арахидоновой кислоты в животных клетках [1].

Ранее было показано, что жасмоновая кислота либо ее предшественник, 12-оксофитодиеновая кислота (12-оксо-PDA) (III), стимулируют образование вторичных метаболитов как в интактных растениях, так и в культурах растительных клеток, что способствует их толерантности [2, 3].

Продолжая исследования по изучению 12-оксо-PDA (III) или ее производных на индукцию вторичных метаболитов в растениях [4], мы предприняли попытку разобраться в превращениях этого биорегулятора, протекающих при изменении известной методики его биосинтеза [5]. Такое изменение обусловлено увеличенным на порядок масштабом реакции ферментативного окисления линоленовой кислоты и в связи с этим вынужденным проведением экстракции разбавленной растворителями реакционной смеси спустя 14 ч после ее подкисления до рН 3. Чтобы избежать неферментативного окисления образовавшихся продуктов, реакционную смесь хранили без доступа воздуха при 7°C.

Известно, что окислительная трансформация линоленовой кислоты липоксигеназой из семени льна приводит как к ациклическим изомерным

$\alpha$ - (I) и  $\gamma$ -кетолам (II), так и к биологическому предшественнику жасмоновой кислоты 12-оксо-PDA (III) (схема 1), которые образуются из алленового эпоксида (IV) [6]. Предполагается, что выделенные в последние годы некоторые аналоги 12-оксо-PDA, в том числе окисленные по  $\alpha$ -непредельной боковой цепи, получены в результате постферментативных процессов [2].

Мы установили строение некоторых производных 12-оксо-PDA (III), возникших в результате ферментативных и последующих гидролитических превращений линоленовой кислоты, а также исследовали метиловые эфиры выделенных соединений в качестве индукторов устойчивости проростков подсолнечника.

Основным компонентом полученной сложной смеси C<sub>18</sub>-производных оказался известный  $\gamma$ -кетол (II) (выход 12%), очищенный в виде соответствующего метилового эфира (IIa). Строение этого соединения было подтверждено спектральными методами. Так, в спектре ПМР присутствуют сигналы протонов двух олефиновых связей, одна из которых (при C10) сопряжена с карбонильной группой и в соответствии с величиной константы спин-спинового взаимодействия обладает E-конфигурацией, а вторая (при C15) – Z-конфигурацией ( $\delta$ , м. д.: 6.8 (дд, J<sub>1</sub> 15.7, J<sub>2</sub> 5.3, 10-H), 6.31 (дд, J<sub>1</sub> 15.7, J<sub>2</sub> 1.7, 11-H), 5.40 (дт, J<sub>1</sub> 9.8, J<sub>2</sub> 7.4, 16-H), 5.32 (дт, J<sub>1</sub> 9.8, J<sub>2</sub> 7.0, 15-H)). Смещенный в слабое поле сигнал протона, связанного с углеродом, несущим гидроксильную группу (4.3 м. д., уширенный квартет), согласуется с расположением последней при C9 [7]. Следует отметить и

<sup>#</sup> Автор для переписки.

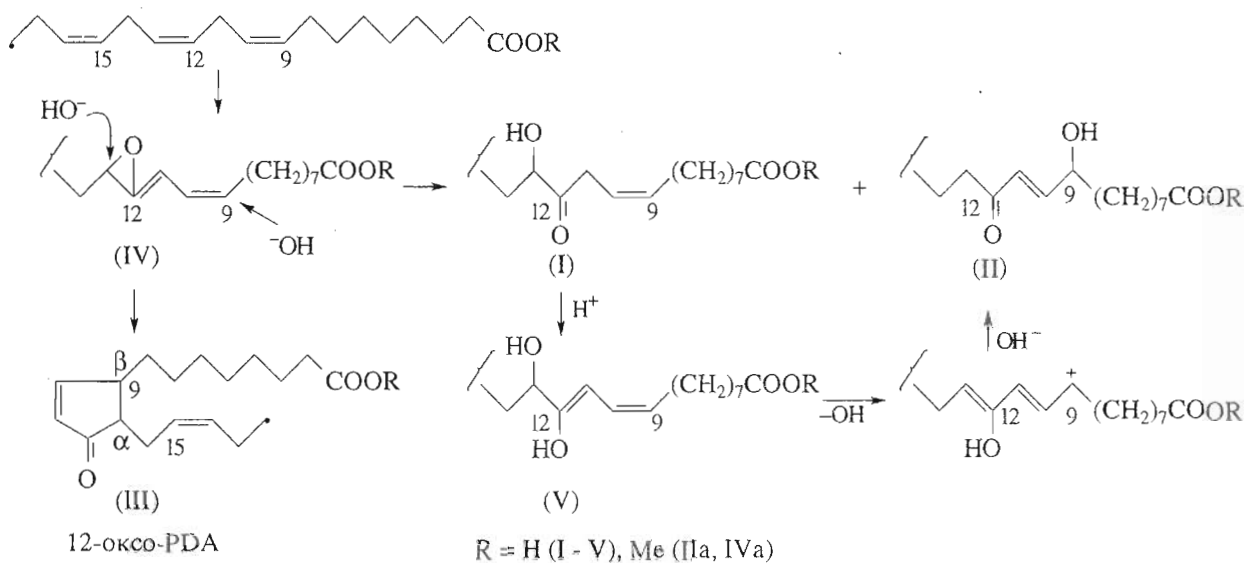


Схема 1. Ферментативное преобразование линоленовой кислоты. Изамеризация  $\alpha$ -кетона (I) в  $\gamma$ -кетол (II).

характерный синглет сложноэфирной группировки (3.67 м. д.).

Применение метода двойного резонанса позволило идентифицировать двухпротонные сигналы 13- $H_2$ , 14- $H_2$ , 2- $H_2$  и 17- $H_2$  ( $\delta$ , м. д.: 2.6 (т, J 7.0), 2.36 (кв, J<sub>1</sub> 12.5, J<sub>2</sub> 7.0), 2.30 (т, J 7.9) и 2.01 (т, J 7.4) соответственно). Протонами при C17 обусловлено расщепление сигнала концевой метильной группы 0.996 (т, J 7.4, 18- $H_3$ ).

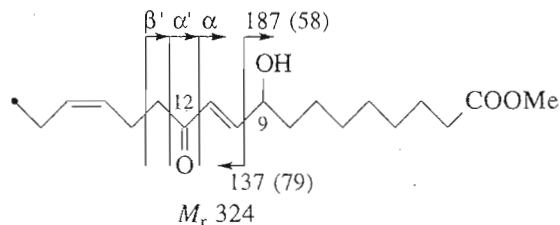
В масс-спектре метилового эфира  $\gamma$ -кетона (IIa) пик молекулярного иона имеет низкую интенсивность ( $M^+$  324 (I 2.88)). Более заметны ионы, возникающие при отщеплении гидроксильной группы и метанола – в различной последовательности, а также сложноэфирной группировки совместно с одним или двумя протонами (табл. 1). Дальнейший распад этих ионов по  $\alpha$ -,  $\alpha'$ - или

$\beta'$ -связям к кетонной группе, в том числе расщепление иона  $M^+$  по связи C9–C10, приводит к ионам высокой интенсивности. Фрагментации вторичного иона с  $m/z$  137 по указанным направлениям отвечают ионы с  $m/z$  111, 83, 69.

Отсутствие в продуктах реакции  $\alpha$ -кетона (I), по-видимому, вызвано его превращением в  $\gamma$ -изомер (II), протекающим через стадии енолизации карбонильной группы и аллильной перегруппировки образовавшегося диенового карбинола (V) (схема 1). Такая трансформация имеет аналогии с известными превращениями  $\alpha$ -кетолов, протекающими под воздействием кислот [8].

Хотя производные  $\alpha, \beta$ -алкиламещенного циклопентенона преобладали в продуктах реакции (схема 2), выделить их предшественник – 12-оксо-PDA (III) – не удалось. Ранее [9] на примере аналога

Таблица 1. Характерные направления фрагментации метилового эфира  $\gamma$ -кетона (IIa),  $m/z$  (относительная интенсивность)



Первичные ионы	Направление распада		
	$\alpha$	$\alpha'$	$\beta'$
$(M - OH)^+$ , 307(4.1)	196(28)	224(25)	238(11)
$(M - MeOH)^+$ , 292(8.4)	181(76)	209(50)	223(31)
$(M - MeOH, OH)^+$ , 275(7)	164(50)	192(24)	–
$(M - COOMe)^+$ , 265(7)	154(46)	182(55)	196(28)

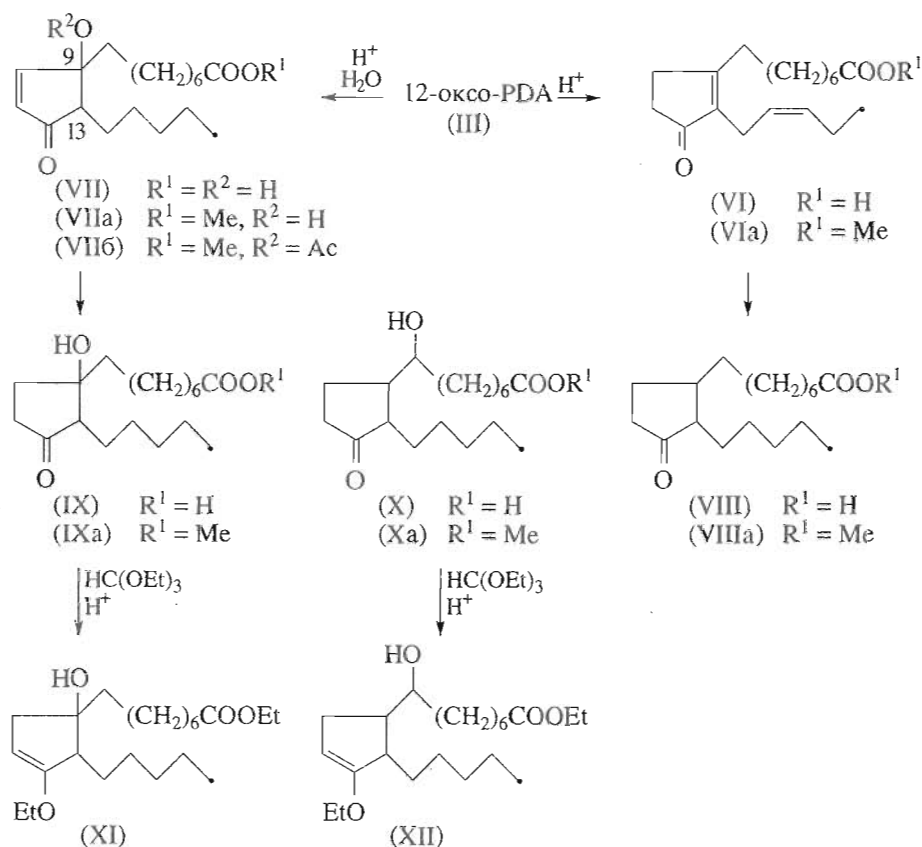


Схема 2. Ферментативные и постферментативные превращения 12-оксо-PDA (III).

последней, содержащего двойные связи при C6 и C10, было показано, что при действии оснований происходит миграция двойных связей в сопряженное положение и при этом двойная связь в цикле занимает наиболее замещенное положение (C9 - C13). Для того же аналога попытки осуществить избирательное перемещение лишь двойной связи цикла в условиях кислотного катализа оказались безуспешными. Однако мы обнаружили, что подобная изомеризация 12-оксо-PDA протекает при pH 3, о чем свидетельствует выделение изомерной кетокислоты (VI).

Строение кетокислоты (VI) подтверждено спектральными данными. Масс-спектры этого соединения и 12-оксо-PDA (III) совпадают лишь частично, что обусловлено различными направлениями фрагментации. Распад последней начинается с отщепления  $\alpha$ -алкильной цепи, а затем деградации подвергается карбоксиалкильный заместитель при C9 [4]. Весьма вероятно, что при фрагментации кислоты (VI) (рис. 1) подобной деградации иона  $[M]^+$  ( $m/z$  292) предшествует распад циклической части молекулы (ионы с  $m/z$  264 и 237), после чего  $\alpha$ -алкильная цепь иона с  $m/z$  237

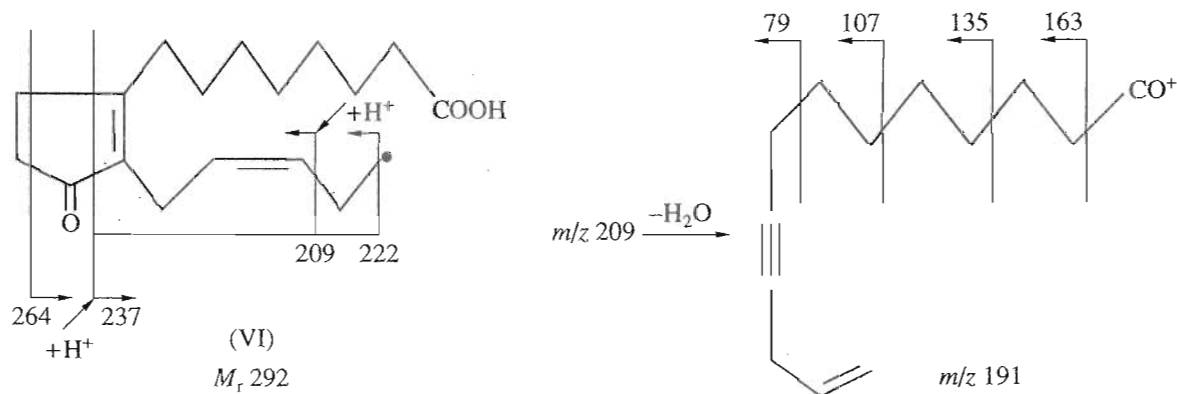


Рис. 1. Основные направления фрагментации 10,11-дигидро-9,13-дегидро-12-оксо-PDA (VI).



теряет метильную группу или этилен (ионы с  $m/z$  222, 209 соответственно). Ион с  $m/z$  209 затем дегидратируется, что приводит к иону с  $m/z$  191. Такое направление фрагментации отвечает указанному расположению кратных связей в соединении (VI).

ПМР-спектр метилового эфира (VIa), идентифицированный сравнением с образцом, полученным из кислоты (VI) обработкой диазометаном, содержит одну пару олефиновых протонов с центром перекрывающихся мультиплетных сигналов при 5.37 м. д., что согласуется с Z-конфигурацией кратной связи в  $\alpha$ -алкильной цепи; расположение этой связи при C15 подтверждается сигналом диаллильных протонов  $14-H_2$  при 2.83 м. д. [9]. Присутствие тетразамещенной кратной связи в цикле при C9 - C13 определяет положение сигналов  $10-H_2$  при 2.78 и 2.30 м. д. (AB-система протонов при C10). Остальные сигналы – метоксильной группы, аллильных, метиленовых и метильных протонов (3.66, 2.30, 2.06, 1.62, 1.31 и 0.95 м. д. соответственно) – также проявляются в ожидаемых областях спектра.

Характерные ионы, присутствующие в масс-спектре эфира (VIa) (рис. 2), так же как и в масс-спектре кислоты (VI), отвечают известному направлению распада циклопентенона  $[M - 55]^+$ , которому в случае эфира (VIa) предшествует отщепление фрагментов алкильных заместителей из иона  $[M]^+$  ( $m/z$  306): либо этилена из  $\alpha$ -цепи, либо иона  $MeOOC(CH_2)_3$  из  $\beta$ -цепи (ионы с  $m/z$  278, 223 либо 205, 150). Образовавшийся таким образом ион с  $m/z$  223 затем теряет группировки  $\beta$ -цепи:  $-OMe$ ,  $-COOMe$ ,  $-CH_2COOMe$  (ионы с  $m/z$  192, 164, 150 соответственно).

Нельзя исключить и другое направление изомеризации 12-оксо-PDA, приводящее к сопряженному производному (VIb) (схема 3). Поскольку экзоциклическая кратная связь легко мигрирует, превращаясь в эндоциклическую, можно предположить образование диенона (VIb). При протонировании последний трансформируется в карбокатион (VIr), который в результате присоединения гидроксильной группы образует  $\beta$ -гидроксикетокислоту (VII) (см. схему 2). Действительно, соединение (VII) доминирует в одной из выделенных фракций, тогда как изомерный  $\alpha$ -кетол с гидроксильной группой при C13 не обнаружен.

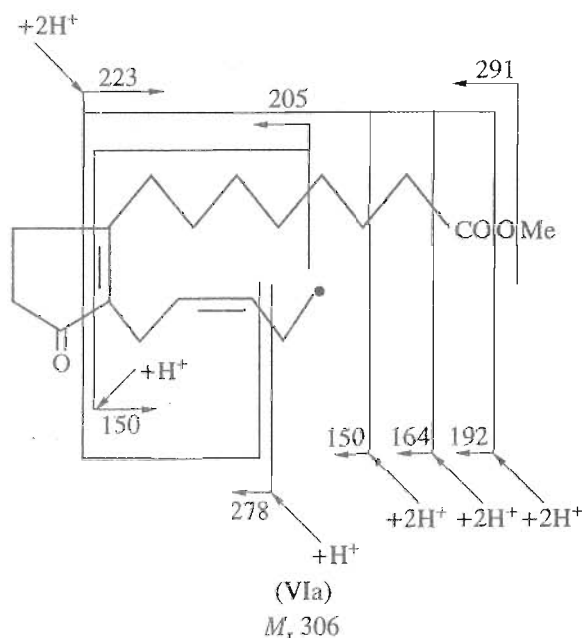


Рис. 2. Основные направления фрагментации метилового эфира 10,11-дигидро-9,13-дегидро-12-оксо-PDA (VIa).

В масс-спектре эфира 9-гидроксикетокислоты (VIIa) помимо пика  $[M + H]^+$  с  $m/z$  325 присутствуют пики ионов  $[M - OH]^+$ ,  $[M - OMe]^+$ ,  $[M - OH - OMe]^+$  ( $m/z$  307, 293, 276 соответственно). Однако основное направление фрагментации эфира (VIIa) (рис. 3) вызвано распадом циклической части молекулы как по  $\alpha$ -связям к третичной гидроксильной группе ( $m/z$  199, 167), так и по  $\alpha$ - и  $\beta$ -связям к карбонильной группе ( $m/z$  227, 213), причем в последнем случае распад сопровождается миграцией протона к заряженной частице. Наличие гидроксильной группы в ионах с  $m/z$  213, 199 подтверждается присутствием соответствующих дегидратационных ионов ( $m/z$  195, 181). Интенсивный пик иона с  $m/z$  167 (43%) в значительной степени обусловлен отщеплением  $MeOH$  из иона  $m/z$  199, а не только выбросом  $\beta$ -алкильной цепи из молекулярного иона, что согласуется с меньшей интенсивностью пика вторичного дегидратационного иона с  $m/z$  149 (10%).

Для дальнейшего доказательства строения гидроксиэфира (VIIa) последний превращали в ацетат (VIIб) действием  $Ac_2O$  в присутствии  $n-TsOH$  [10].

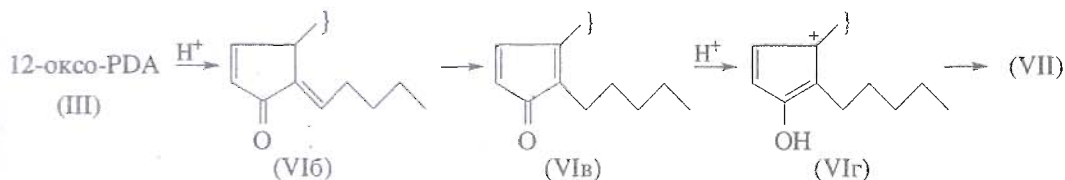


Схема 3. Изомеризация 12-оксо-PDA (III) в 9-гидрокси-15,16-дигидро-12-оксо-PDA (VII).

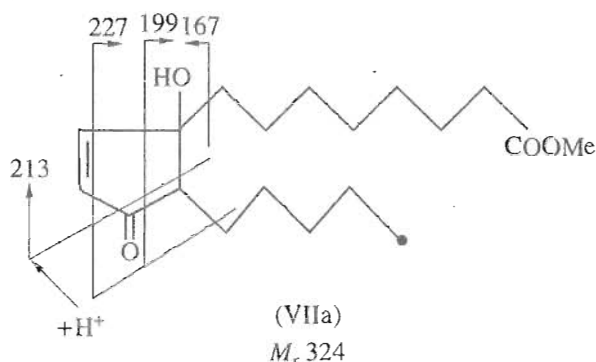


Рис. 3. Основные направления фрагментации метилового эфира 9-гидрокси-15,16-дигидро-12-оксо-PDA (VIIa).

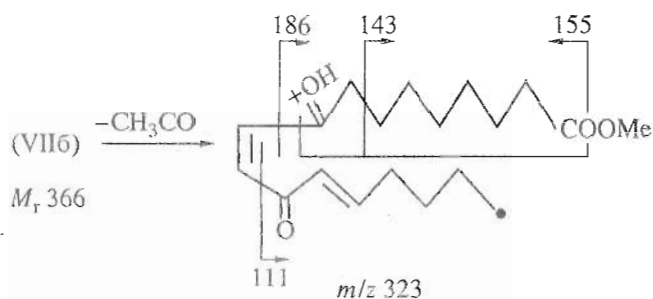


Рис. 4. Основные направления фрагментации метилового эфира 9-ацетокси-15,16-дигидро-12-оксо-PDA (VIIb).

Как и следовало ожидать, ацетилирование соединения (VIIa) в пиридине было безуспешным, что подтверждает расположение гидроксильной группы у третичного атома углерода. В спектре ПМР ацетата (VIIб) присутствуют сигналы метильных протонов как оксиметильной, так и ацетатной групп (3.76, 2.48 м. д. соответственно), причем наблюдаемый сдвиг последних в слабое поле, вероятно, обусловлен их пространственной близостью с карбонильной группой и кратной связью цикла. В отличие от олефинового протона при C10 олефиновый протон при C11 и метиновый протон при C13 оказались также дезэкранированы (7.84, 7.30 и 3.49 м. д. соответственно), что скорее всего вызвано анизотропией карбонильной группы в уплощенном фрагменте структуры (с центром при C12) замещенного циклопентенона.

В масс-спектре ацетоксиэфира (VIIб) присутствует пик молекулярного иона  $[M]^+$  ( $m/z$  366), а также пики ионов, отвечающие отщеплению как функциональных группировок  $[M - \text{Ac}]^+$ ,  $[M - \text{AcO}]^+$ ,  $[M - \text{AcO} - \text{CO}]^+$ , так и алкильных групп  $[M - \text{Me}]^+$ ,  $[M - \text{C}_5\text{H}_{11}]^+$  ( $m/z$  323, 307, 279 и 351, 295 соответственно). С расположением ацетильной группы при C9 согласуются пики ионов с  $m/z$  186, 155, 143, которые можно ожидать при разрыве  $\alpha$ - и

$\beta$ -связей к образовавшейся при C9 протонированной карбонильной группе сопряженного дикетона ( $m/z$  323, рис. 4).

Исследование продуктов биосинтеза жасмоновой кислоты позволило выявить ее аналоги с насыщенным  $\alpha$ -боковой цепью [2, 11, 12]. Мы установили, что продуцированию предельных производных 12-оксо-PDA способствует использование липоксигеназы, выделенной из проросшего семени льна. Так, одним из компонентов смеси  $\text{C}_{18}$ -производных, полученной в результате воспроизведения описанной методики [5], оказалась предельная кетокислота (VIII). В ПМР-спектре метилового эфира этой кислоты (VIIa) присутствуют сигналы метоксильной группы, метинового протона 13-H, метиленовых протонов 11-H<sub>2</sub> и 2-H<sub>2</sub> и метильной группы 18-H<sub>3</sub>. В масс-спектре соединения (VIIa), содержащем достаточно интенсивные пики ионов  $[M]^+$ ,  $[M - \text{H}]^+$  ( $m/z$  310, 309), наблюдаются также пики, обусловленные фрагментацией циклопентанона и отщеплением  $\alpha$ -алкильной цепи  $[(M + \text{H}) - \text{C}_2\text{H}_4]^+$ ,  $[M - \text{COCH}=\text{CH}_2]^+$ ,  $[M - \text{C}_5\text{H}_{10} - \text{COCH}=\text{CH}_2]^+$ ,  $[M - \text{C}_5\text{H}_{11}]^+$ ,  $[M - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{C}_5\text{H}_{11}]^+$  ( $m/z$  283, 255, 185 и 239, 211 соответственно). С расщеплением  $\beta$ -алкильной цепи, сохранившейся в ионе с  $m/z$  211, согласуются депротонированные ионы с  $m/z$  178, 151, 150, 137, 109, 81 (рис. 5).

Предельные гидроксиэфиры (IXa, Xa) удалось выделить в виде их соответствующих енолэфиров (XI, XII), полученных при действии на смесь производных с  $R_f$  0.48 триэтилортоформиата в условиях кислотного катализа [13], приводящего и к переэтерификации сложноэфирной группировки (схема 2). ПМР-спектры соединений (XI, XII) различаются лишь дополнительным сигналом протона при вторичной гидроксильной группе в соединении (XII), перекрывающимся сигналами метиленовых групп  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ . В остальных спектрах соединений (XI, XII), включая сигналы олефиновых протонов, практически совпадают.

Масс-спектры соединений (XI, XII) содержат пики ионов  $[M]^+$ ,  $[(M + \text{H}) - \text{C}_2\text{H}_4]^+$ ,  $[M - \text{OEt}]^+$ ,  $[M - \text{COOEt}]^+$ ,  $[M - \text{C}_5\text{H}_{11} - \text{H}_2\text{O}]^+$  ( $m/z$  368, 341, 323, 295, 279 соответственно), что свидетельствует об идентичности основных направлений их фрагментации. Ионы с  $m/z$  256, 228, 213, 200 согласуются с последовательной деградацией протонированного циклического гидроксикетона ( $m/z$  341), возникающего при разрыве связей C9-C13 и отщеплении этилена из иона  $[M^+]$  (рис. 6). Ионы с  $m/z$  200 и 155 (причем последний соответствует дальнейшему распаду сложноэфирной группировки) значительно интенсивнее в спектре соединения (XI), чем в спектре его изомера (XII). Напротив, в спектре последнего более интенсивны ионы с  $m/z$  185, 129. Первый из них согласуется с  $\alpha$ -распадом по отщеплению к гидроксильной группе

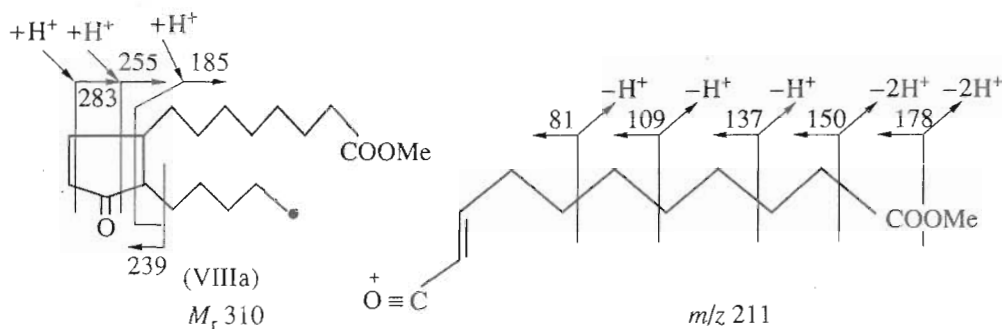


Рис. 5. Основные направления фрагментации метилового эфира 10,11,15,16-тетрагидро-12-оксо-PDA (VIIa).

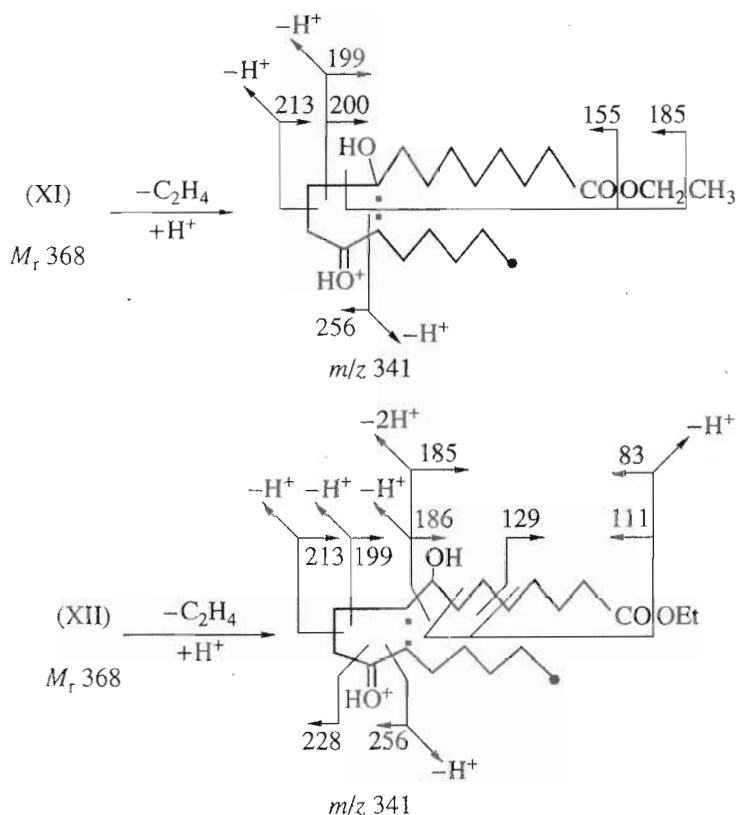


Рис. 6. Основные направления фрагментации этиловых эфиров 10,11,15,16-тетрагидро-11,12-дегидро-12-этокси-9-гидрокси-PDA (XI) и 10,11,15,16-тетрагидро-11,12-дегидро-12-этокси-8-гидрокси-PDA (XII).

при C8, а второй – с разрывом связей C5–C6 β-цепи. Ион с  $m/z$  157, который можно было бы ожидать при расположении гидроксильной группы при C6, в спектре соединения (XII) отсутствует. Ион с  $m/z$  171 скорее всего обусловлен потерей этилена из иона с  $m/z$  199 (аналогично немного более интенсивному иону с  $m/z$  172 в спектре соединения (XI)), а не α-распадом гидроксильированного при C7 вероятного изомера соединения (XII). Таким образом, масс-спектры производных (XI, XII) согласуются с их строением.

Образование гидроксиметилированного производного (XII) в отличие от его изомера (XI)

трудно представить как результат неферментативной гидратации кратной связи непредельного кетона. Таким образом, ферменты, выделенные из проросшего семени льна, индуцируют не только окислительную циклизацию линоленовой кислоты и последующее восстановление кратных связей, но и гидроксильирование, по-видимому, аллильных метиленовых групп в промежуточных продуктах реакции.

Исследовано влияние выделенных производных линоленовой кислоты на иницирование устойчивости проростков подсолнечника к поражению грибом *Sclerotinia scl.* Для этого семени



Таблица 2. Зависимость элиситорной активности метилового эфира  $\gamma$ -кетола (IIa) от его концентрации\*

Концентрация, мг/мл	0.1	0.05	0.025	0.012	0.006
Устойчивость к поражению, %	59	41	58	35	19
	59	55	52	34	0

\* Приведены данные, полученные через 24 (верхняя строка) и 48 ч (нижняя строка) после заражения.

подсолнечника, инкубированные в течение 16 ч в растворах испытуемых соединений, выращивали в течение 5 сут, а затем всходы заражали культурой гриба. Устойчивость определяли как процентную разность неповрежденных растений в опыте и контроле спустя 24 и 48 ч после заражения. Предварительные результаты, полученные при оценке активности выделенных ТСХ соединений (II), (VIa) - (Ха), показали, что метиловые эфиры как линоленовой кислоты, так и аналогов 12-оксо-PDA (VIa), (VIIa) повышают устойчивость проростков на 10 - 15%; гидроксированные производные (VIIa) - (Ха) активнее в 2 - 3 раза, а максимальная активность свойственна метилово-му эфиру  $\gamma$ -кетола (IIa). Исследовано влияние концентрации эфира (IIa) при предпосевной обработке семян на иницирование устойчивости растений. Результаты приведены в табл. 2.

Оказалось, что обработка семян раствором соединения (IIa) в концентрации 0.1 - 0.025 мг/мл повышает устойчивость проростков к поражению грибом *Sclerotinia scl.* не менее чем в 2 раза и лишь при концентрации 0.006 мг/мл воздействие этого соединения существенно уменьшается. Подобные эксперименты проведены и с раствором жасмоновой кислоты, которая, как известно, стимулирует активацию защитных генов растений в ответ на стрессовые ситуации [2, 14]. Оказалось, что результаты в опыте и контроле идентичны, и, таким образом, жасмоновой кислоте не свойственна индукция фитоалексинов на интактном исследуемом растении, хотя прямой эффект ее применения - ингибирование роста, неравномерное развитие листьев и связанное с этим искривлением стебля - проявляется вполне отчетливо.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ПМР регистрировали на приборе Bruker WT-500 (ФРГ); приведены химические сдвиги ( $\delta$ ) в миллионных долях по отношению к  $\text{Me}_4\text{Si}$ , константы спин-спинового взаимодействия даны в герцах. Масс-спектры электронного удара получали на спектрометре Mat-44-S.

Хроматографические разделения производных линоленовой кислоты осуществляли препаративной ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F<sub>254</sub> с толщиной слоя 2 мм (элюент - хлороформ при двукратной экспозиции) и/или с помощью ЛЭЖХ в полупрепаративном масштабе на колонке (0.46 × 25 см) Zorbax CN в системе гексан-изопропанол

(92.5 : 7.5) при скорости потока 0.6 мл/мин, детекция UV<sub>230</sub>. Десорбцию образцов при препаративной ТСХ проводили метанолом.

Линоленовую кислоту (отечественного производства) очищали сначала через соответствующее гексабромпроизводное [15], а затем колоночной хроматографией на силикагеле (Silicagel 60, 0.025 - 0.04 мм) градиентной элюцией эфиром в гексане (0 → 30%). Экстракт обезжиренного порошка семени льна получали из предварительно замоченных в воде и выдержанных в темноте при 20°C в течение 1 сут 100 г семени льна. Семена отфильтровывали, охлаждали жидким азотом, растирали, промывали охлажденным до -10°C ацетоном и высушивали на воздухе. Получали 80 г порошка, который обрабатывали фосфатным буфером по методике [5].

Инкубацию 1.8 г линоленовой кислоты с экстрактом 50 г семени льна, подкисление реакционной смеси до pH 3.0 и ее разбавление смесью хлороформ-метанол проводили по методике [5]. Образовавшуюся эмульсию выдерживали 14 ч при 7°C без доступа воздуха, перемешивали, органическую фазу отделяли, высушивали сульфатом натрия и растворитель упаривали в вакууме при 40°C. Остаток растворяли в 20 мл эфира, обрабатывали эфирным раствором диазометана, промывали водой и упаривали. Получали 1.2 г продукта в виде масла. При хроматографическом разделении выделили:

**Метиловый эфир (10E,15Z)-9-гидрокси-12-оксо-10,15-октадиеновой кислоты (IIa), R<sub>f</sub> 0.19, выход 12%. Спектр ПМР - см. текст. Масс-спектр, m/z (I, %): M<sup>+</sup> 324 (2.8), 307 (4.1), 293 (9.7), 292 (8.4), 276 (12), 275 (7), 265 (7), 264 (11), 263 (12), 238 (11), 224 (25), 223 (31), 209 (50), 196 (28), 192 (24), 187 (58), 182 (55), 181 (76), 164 (50), 163 (58), 155 (51), 154 (46), 153 (53), 149 (46), 137 (79), 125 (57), 123 (51), 121 (58), 111 (75), 109 (76), 107 (71), 99 (53), 97 (68), 95 (89), 93 (74), 83 (74), 81 (83), 79 (85), 69 (78), 67 (97), 55 (100), 53 (96).**

**Метиловый эфир 15,16-дигидро-9-гидрокси-12-оксо-PDA (VIIa), R<sub>f</sub> 0.4, выход 2.5%. Масс-спектр: [M + H]<sup>+</sup>, 325 (1), 308 (4), 307 (3.2), 294 (3), 293 (3), 276 (5), 256 (1), 237 (1.4), 228 (17), 227 (12), 213 (3), 199 (20), 198 (28), 196 (6), 195 (6), 188 (4), 187 (4), 182 (5), 181 (5), 167 (43), 166 (45), 156 (10), 155 (10), 149 (10), 148 (11), 137 (10), 125 (19), 124 (20), 123 (19), 109 (18), 99 (21), 87 (19), 83 (30), 81 (61), 74 (28), 70 (30), 69 (38), 67 (38), 55 (100).**



Взаимодействием 0.1 г фракции с  $R_f$  0.4 с 0.3 мл  $As_2O$  в 3 мл  $AsOH$  в присутствии каталитических количеств  $n$ -TsOH при 20°C в течение 18 ч [10] и очисткой продукта ацетилирования с помощью ВЭЖХ получали метиловый эфир **15,16-дигидро-9-ацетокси-12-оксо-PDA (VIIб)**. Спектр ПМР: 1.21 (3H, т,  $J$  6.7, 18-H<sub>3</sub>), 1.25 (4H, м, 2CH<sub>2</sub>), 1.55 (18H, м, 9CH<sub>2</sub>), 2.48 (3H, с, COCH<sub>3</sub>), 3.49 (1H, т,  $J$  7.3, 13-H), 3.76 (3H, с, COOCH<sub>3</sub>), 7.38 (1H, д,  $J$  9, 11-H), 7.84 (1H, д,  $J$  9, 10-H).

Масс-спектр:  $M^+$  366 (6), 351 (6), 339 (10), 337 (6), 323 (6), 307 (6), 295 (6), 284 (8), 279 (8), 256 (7), 241 (6), 217 (7), 204 (7), 186 (29), 175 (13), 167 (12), 155 (27), 149 (25), 143 (18), 135 (13), 129 (10), 125 (13), 111 (18), 101 (18), 97 (27), 95 (24), 92 (40), 91 (100), 85 (37), 83 (36), 72 (45), 71 (45), 69 (55).

**(15Z)-10,11-Дигидро-9,13-дегидро-12-оксо-15-PDA (VI)**,  $R_f$  0.31 при трехкратной экспозиции в  $CHCl_3$ , выделяли в отдельном опыте ТСХ из смеси производных линоленовой кислоты до их обработки диазометаном. Масс-спектр:  $[M + H]^+$  293 (22),  $M^+$  292 (12), 264 (10), 250 (2), 237 (9), 223 (4), 222 (3), 209 (2), 207 (2), 191 (4), 164 (8), 163 (7), 150 (17), 149 (18), 136 (23), 135 (16), 122 (25), 109 (38), 108 (32), 107 (22), 95 (50), 81 (58), 79 (98), 67 (98), 55 (100).

**Метиловый эфир (15Z)-10,11-дигидро-9,13-дегидро-12-оксо-15-PDA (VIa)**,  $R_f$  0.55, выход 2.1%. Спектр ПМР – см. текст. Масс-спектр:  $[M + H]^+$  307 (3.3),  $M^+$  306 (2.8), 292 (3.9), 291 (3.9), 278 (5.3), 257 (5.7), 256 (5.5), 223 (9.0), 205 (7.0), 192 (5.5), 178 (7.0), 164 (7.0), 150 (52.8), 149 (73.6), 148 (30.7), 123 (13.9), 111 (23.6), 109 (22.1), 97 (37.5), 95 (33.4), 83 (57), 81 (41.6), 69 (80.6), 55 (100).

**Метиловый эфир 10,11,15,16-тетрагидро-12-оксо-PDA (VIIIa)**,  $R_f$  0.78, выход 4%. Спектр ПМР: 0.85 (3H, т,  $J$  7.0, 18-H<sub>3</sub>), 1.30 - 1.60 (23H, м, 11CH<sub>2</sub>, 9-H), 2.30 (4H, м, 2-H<sub>2</sub>, 11-H<sub>2</sub>), 2.34 (1H, м, 13-H), 3.67 (3H, с, OCH<sub>3</sub>).

Масс-спектр:  $M^+$  310 (17), 309 (17), 283 (5.5), 282 (5.5), 256 (4.8), 255 (4.8), 239 (3.8), 227 (2.8), 211 (2.8), 185 (4), 178 (4.1), 177 (4.1), 155 (7.5), 151 (5.4), 150 (6.2), 149 (6.8), 137 (10), 135 (8.9), 122 (11), 121 (11), 110 (17), 109 (19), 96 (34), 95 (36), 83 (39), 81 (45), 71 (56), 69 (66), 57 (100), 55 (98).

**Этиловые эфиры 10,11,15,16-тетрагидро-11,12-дегидро-12-этоксидро-9-гидрокси-PDA (XI) и 10,11,15,16-тетрагидро-11,12-дегидро-12-этоксидро-8-гидрокси-PDA (XII)**. Раствор 0.1 г фракции с  $R_f$  0.48, полученной с выходом 4.1%, кипятили в 5 мл этанола с 1 мл ортомуравьиного эфира в течение 6 ч в присутствии каталитических количеств  $n$ -TsOH [13]. Реакционную смесь охлаждали, разбавляли эфиром, промывали раствором  $Na_2CO_3$ , водой и упаривали. Продукт реакции выделяли ТСХ, а затем очищали ВЭЖХ. Получали:

Соединение (XI); время удерживания 12.06 мин, спектр ПМР: 1.22 (6H, т,  $J$  6.6, 2 × OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.48 (4H, кв,  $J$  6.6, 2 × OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.90 (1H, дд,  $J_1$  14.0,  $J_2$  6.8, 11-H). Масс-спектр:  $M^+$  368 (1.8), 341 (2), 323 (1.4), 295 (1.8), 279 ((7), 256 (5), 239 (3), 213 (5), 200 (20), 199 (6.4), 185 (6), 172 (12), 167 (25), 155 (40), 150 (40), 149 (80), 137 (15), 129 (14), 127 (15), 125 (17), 121 (20), 113 (25), 111 (32), 109 (33), 107 (30), 97 (50), 95 (40), 92 (35), 91 (88), 85 (40), 83 (49), 81 (59), 69 (100), 57 (54), 55 (38).

Соединение (XII); время удерживания 13.18 мин, спектр ПМР: 1.23 (6H, т,  $J$  7.0, 2 × OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.50 (5H, м, 2 × OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 8-H), 5.95 (1H, дд,  $J_1$  14.2,  $J_2$  7.05, 11-H). Масс-спектр:  $M^+$  368 (1.5), 341 (3), 323 (0.5), 295 (1), 279 (5), 256 (11), 242 (3), 228 (3), 213 (7), 199 (4), 186 (11), 185 (12), 171 (8), 167 (21), 155 (16), 150 (27), 149 (50), 137 (22), 129 (30), 127 (10), 125 (14), 121 (22), 111 (30), 109 (28), 107 (20), 97 (51), 95 (53), 91 (48), 83 (56), 81 (69), 70 (61), 69 (100), 57 (43), 55 (46).

По хроматографической подвижности и данным масс-спектра основной компонент фракции с  $R_f$  0.93, выделенной с выходом 11%, соответствовал исходной линоленовой кислоте.

**Исследование биологической активности соединений (II), (VI) - (VIIIa), смеси изомеров (XI)-(Xa)**. Очищенные от оболочки семена подсолнечника сорта "Кавказец" (50 штук) выдерживали 20 ч при 20 - 25°C в 100 мл водного раствора, содержащего 0.5 - 1 мг испытуемого соединения в 1 мл этанола. В контрольном опыте семена замачивали в 1% растворе этанола. В левую часть кюветы, разделенной перегородкой на две части, высаживали обработанные семена, а в правую контрольные. Проростки выращивали 10 сут в условиях световой комнаты при 22 ± 2°C и относительной влажности 90 - 100%. Инокуляцию проростков у основания стебля осуществляли 4-дневным мицелием гриба *Sclerotinia scl.* размером 0.5 - 1 см<sup>2</sup> и толщиной эмульсии до 0.3 см, отделенным вместе с агаром из рабочей культуры. Инокулированные проростки продолжали выращивать в тех же условиях, учитывая количество пораженных растений спустя 24 и 48 ч после заражения. Активность образцов определяли как процентную разность неповрежденных растений в опыте и контроле. Результаты испытаний наиболее активного соединения (IIIa) в зависимости от его концентрации приведены в табл. 2.

**Рабочая культура гриба**. Агаризованную среду получали разведением смеси агар-агара, сахарозы и лимонной кислоты (58 : 40 : 2) в 1 л водного экстракта 50 г измельченных листьев подсолнечника и стерилизовали 15 мин при 110°C. Часть (0.5 × 0.5 см) агаризованной среды с вегетативным мицелием гриба, выделенного из плодовых тел *Sclerotinia scl.*, собранных в Мостовском районе



Краснодарского края, с помощью бактериологической петли переносили в центр чашки Петри, содержащей свежеприготовленную питательную среду с агаром, причем образец помещали мицелием вниз. Посевы инкубировали 3 - 5 сут при 22°C; в течение этого времени стелющийся мицелий белого цвета достигал краев чашки Петри и слегка уплотнялся без заметного образования плодовых тел. Эту эмульсию мицелия и использовали для заражения проростков.

Работа выполнена в рамках Государственной научно-технической программы России "Новейшие методы биоинженерии. VIII направление. Технологии получения продуктов генной, клеточной инженерии и синтетических пептидных препаратов".

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Crombie L., Holloway S.J.* // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1985. P. 1393 - 1400.
2. *Sembdner G., Parthier B.* // Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1993. V. 44. P. 569 - 589.
3. *Dittrich H., Kutchan T.M., Zenk M.H.* // FEBS Lett. 1992. V. 309. P. 33 - 36.
4. *Бычкова Т.П., Наненина Е.В., Берзин В.Б., Мирошников А.И.* // Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. С. 1008 - 1012.
5. *Zimmermann D.C., Feng P.* // Lipids. 1978. V. 13. P. 313 - 316.
6. *Crombie L., Morgan D.O.* // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1988. P. 558 - 560.
7. *Crombie L., Morgan D.O.* // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1988. P. 556 - 557.
8. *Матъе Ж., Панико Р.* Курс теоретических основ органической химии. М.: Мир, 1975. С. 371.
9. *Лис Л.Г., Пан А.А., Желдакова Т.А., Борисов Е.Б., Лахвич Ф.А.* // Журн. орган. химии. 1991. Т. 27. С. 2135 - 2149.
10. *Akisanya A., Bevan C.W.L., Halsall T.G., Powell J.W., Taylor D.A.H.* // J. Chem. Soc. 1961. P. 3705 - 3708.
11. *Miersch O., Sembdner G., Schreiber K.* // Phytochemistry. 1989. V. 28. P. 339 - 340.
12. *Miersch O., Preiss A., Sembdner G., Schreiber K.* // Phytochemistry. 1987. V. 26. P. 1037 - 1039.
13. *Weisblat D.I., Magerlein B.J., Myers D.R., Hanze A.R., Fairburn E.I., Roleson S.T.* // J. Am. Chem. Soc. 1953. V. 75. P. 5893 - 5896.
14. *Weiler E.W., Albrecht T., Groth B., Xia Z.-Q., Luxem M., Lib H., Andert L., Spengler P.* // Phytochemistry. 1993. V. 32. P. 591 - 600.
15. *Kaufmann H.E., Mestern H.E.* // Ber. 1936. V. 69. P. 2684 - 2685.

## Linolenic Acid Biotransformation by Lipoxygenase from Flax Seeds

V. B. Berzin,<sup>1</sup> E. V. Nanenina, and A. I. Miroshnikov

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

**Abstract**—Under the action of the enzymic system from flax seedlings and further chemical transformations of the resulting products in the acidic (pH 3) medium, linolenic acid yields (10*E*,15*Z*)-9-hydroxy-12-oxo-10,15-octadecadienoic acid and hydroxylated derivatives of dihydro- or tetrahydro-12-oxophytodienoic acids. These compounds induce the tolerance of sunflower plantlets to the *Sclerotinia sclerotiorum* infection.

*Key words:* lipoxygenase from flax seedlings; (10*E*,15*Z*)-9-hydroxy-12-oxo-10,15-octadecadienoic acid; 12-oxophytodienoic acid; sunflower (*Helianthus*); pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.