

Efnasmíðar á stöðubundnum eterlípiðum með ómega-3 fjölómettuðum fitusýrum

Carlos D. Magnússon, Arnar Halldórsson og Guðmundur G. Haraldsson

Raunvísindastofnun Háskólans

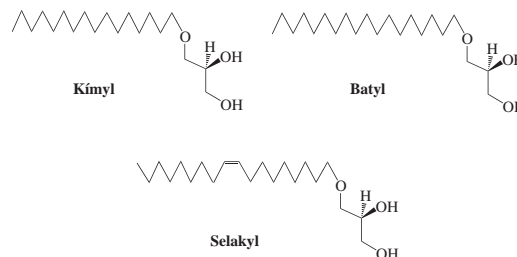
Vefútgáfa: 16. ágúst 2004

Ágrip Stöðubundin eterlípið af gerð 1-O-alkyl-2,3-díasyglýseróla, skipuð hreinu EPA eða DHA í miðstöðu og hreinni miðlungslangri mettaðri fitusýru í endastöðu, hafa verið smíðuð í fjórum skrefum úr sólketali, þar sem tvinnuð var saman hefbundnum lífrænum aðferðum og líftækni með lípasa. Þrjú afbrigði af 1-O-alkylglýseróli voru útbúin með því að innleiða hexadekyl, oktadekyl og *cis*-9-oktadekenyl hópa inn á sólketal með Williamson etersmíði. Í kjölfarið fylgdi svo sýruhvatað vatnsrof á ísóprópyliðen verndarhópi sólketalsins. Í þriðja skrefinu var staðvendni kyrrsetts *Candida antarctica* lípasa notuð til að innleiða miðlungslanga fitusýru í endastöðu og loks EDCI tengimiðill til að innleiða hreint EPA eða DHA í miðstöðu glýserólsins. Frábær staðvendni (regioselectivity) fékkst í þessum ferlum og voru heimtur allra myndefna og milliefna með miklum ágætum.

Inngangur

Óskautuð eterlípið af gerð 1-O-alkyl-2,3-díasyglýseróla koma fyrir í umtalsverðu magni í lýsi ýmissa tegunda brjósksfiska, t.d. hákarla og háfa, og nemur magn þeirra oft á tíðum tugum prósentu [1–3]. Bygging þessara lípiða er skyld byggingu blóðflöguvirkja (platelet activating factors) og hafa komið fram ýmsar vísbendingar um margvísleg jákvæð áhrif þeirra á heilsu manna. Má þar nefna ýmis áhrif á ónæmiskerfið, ofnæmi, astma, liðagigt, húðsjúkdóma og brottflutning þungmálma úr líkamanum [4]. Þá hafa rannsóknir sænskra vísindamanna bent til jákvæðra áhrifa slíkra efna á ónæmiskerfi krabbameinssjúklinga í tengslum við geislameðferð [5]. Þessi jákvæðu áhrif eru rakin til virkni 1-O-alkyl-*sn*-glýseróla, sem eru eftirsótt og verðmæt efni og einangra má úr hinum ósápanlega hluta lýsis hákarla og háfa. Alkyl hluti eterlípiðanna er upprunninn úr fitusýru alkohólum og eru algengustu eterlípiðin í hákarla- og háfalýsi kímyl, batyl og selakyl alkohól, skipuð $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ og $C_{18:1}$ alkyl keðjum [3]. Mynd 1 sýnir byggingu þessara eterlípiða. Eins og sést á myndinni eru þetta hendin (chiral) efni og er raunskipanin um hendna kolefnið í glýseról hlutanum S, sem er hin náttúrulega skipan þessara efna.

Fita sjávarfangs einkennist af n-3 fitusýrum (einnig nefndar ómega-3 fitusýrur) og kveður þar langmest að eikósapentaensýru (EPA) og dókósa-hexaensýru (DHA) [6]. Báðar hafa þessar fitu-

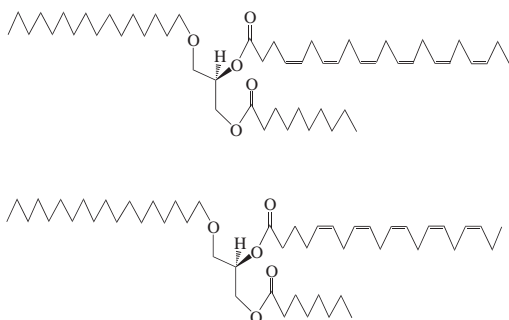


Mynd 1. Kímyl, Batyl og Selakyl alkohól

sýrur margvísleg jákvæð lífefna- og lífeðlisfræðileg áhrif á hjarta- og æðasjúkdóma [7]. EPA er forveri eikósanóíða, t.d. prostaglandína, og hefur þannig margvísleg áhrif á ónæmiskerfið, blóðstorknun, ýmsa bólgutengda sjúkdóma o.þ.h. [8]. Nýverið hafa komið í ljós jákvæð áhrif EPA á ýmsa geðsjúkdóma [9] og geðklofa [10]. Sértek áhrif DHA tengjast hlutverki þeirrar fitusýru í heila- og taugavef [11], öldrun, þungun og þroskun ungvíðis [12].

Í greininni hér að framan var fjallað um mikilvægi og ýmsa áhugaverða eiginleika stöðubundinna þríglýseríða. Markmið þeirra rannsókna sem hér er lýst var að smíða stöðubundin eterlípið af ofangreindri gerð, þar sem n-3 fjölómettuðu fitusýrurnar EPA og DHA skipa miðstöðuna og miðlungslangar fitusýrur endastöðuna. Hugmyndin var þannig að tvinnu öll þessi jákvæðu áhrif saman í stöðubundnum eterlípiðum með því að útbúa hrein

1-O-alkylglýseról og hengja inn á þau hreina n-3 fjölmættaða fitusýru (PUFA) í miðstöðu og hreina miðlungslanga fitusýru (MCFA) í endastöðu. Til að stjórna staðvendni þessara ferla var notast við lípasa, en þeir taka að öllu jöfnu eingreind alkohól í endastöðu glýseróla fram yfir þau tvígreindu í miðstöðu [13, 14]. Með notkun lípasanna má þannig sneiða framhjá hefðbundnum aðferðum lífræna efnasmíða er byggja á notkun verndarhópa, innleiðslu þeirra og afverndun, en slíkt kostar a.m.k tvö viðbótarskref með þeim töpum og fyrirhöfn sem því fylgir [14]. Þrjú afbrigði 1-O-alkylglýseróla voru útbúið sem rasemísk blanda ($C_{16:0}$, $C_{18:0}$ og $C_{18:1}$), í endastöðu þeirra var komið fyrir hreinum miðlungslöngum fitusýrum (C_8 , C_{10} eða C_{12}) og loks hreinu EPA eða DHA í miðstöðu. Nú er unnið að því að smíða slík afbrigði stöðubundinna eterlípiða á handhverfuhreinu formi (enantiomerically pure), þ.e. sem kímil, batyl og selakyl afleiður, og er þess vænst að slíkar afleiður kunni m.a. að reynast áhugaverðar til skimunar fyrir ýmsum áhugaverðum áhrifum á lífsstarfsemina. Dæmi um slíkar hendnar stöðubundnar eterlípiðafleiður af náttúrulegri skipan R gefur að líta á mynd 2.

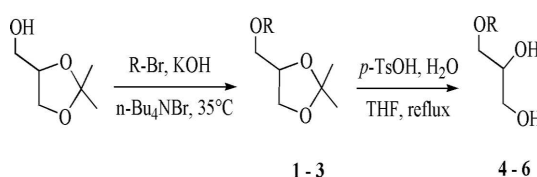


Mynd 2. (R)-2-dókósaheksaenóyl-3-dekanóyl-1-O-hexadekylglýseról (efri) og (R)-2-eikósaheksaenóyl-3-oktanóyl-1-O-oktadekylglýseról (neðri)

Niðurstöður og umræður

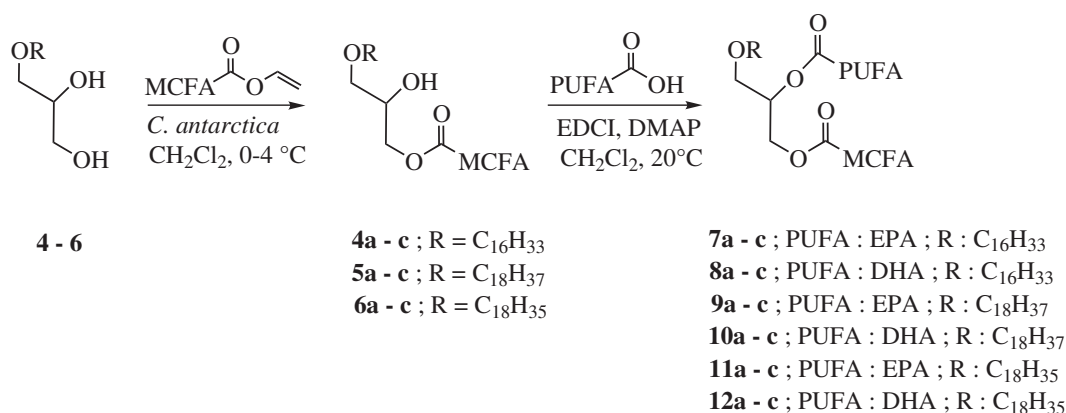
Hin stöðubundnu 1-O-alkyl-2,3-díasyglýseról eterlípið voru smíðuð í fjögurra skrefa efnasmíði. Í fyrsta skrefinu var Williamson etersmíði beitt, þar sem 1-O-alkylglýseról eterafleiðurnar **1-3** voru smíðaðar á vernduðu formi með því að hvarfa ísóprópyliden verndað glýseról, öðru nafni sólketal, við hexadekylbrómíð (**1**), oktadekylbrómíð (**2**) eða cis-9-oktadekenylbrómíð (**3**) í viðurvist malaðs kalíum hydroxíðs sem basa, ásamt tetra-n-bútylammoníum brómíð sem

ferjuhvata, án notkunar leysis við 35°C . Bygging 1-O-alkylísóprópylidenglýseról milliefnanna **1-3** var sannkend, en þau voru yfirleitt ekki einangruð, heldur vatnsrofin beint með súrri vatnslausn í THF. Þannig fengust hrein kímil, batyl og selakyl alkohól **4-6** á rasemísku formi í 80-82% heimtum. Þetta jafngildir ágætisheimtum (um og yfir 90%) í hvoru þessara skrefa. Þessi atburðarás er sýnd á mynd 3.



Mynd 3. Fyrstu tvö skref efnasmíðinnar

Í þriðja skrefinu var kyrrsettum *Candida antarctica* lípasa beitt til að hvata estrun hinna miðlungslöngu fitusýra í endastöðu með vínýl esterum af kaprýlsýru (**a**, $C_{8:0}$), kaprísýru (**b**, $C_{10:0}$) og lársýru (**c**, $C_{12:0}$) í díklórmetani við $0-4^\circ\text{C}$. Þannig fengust 1-O-alkyl-3-asyglýserólin **4a-c**, **5a-c** og **6a-c** á hreinu formi í 90-92% heimtum eftir kristöllum úr n-hexani. Í fjórða og síðasta skrefi voru EPA og DHA fitusýrunnar innleiddar inn í miðstöðu afbrigðanna af efnunum **4-6** og til þess var 1-(3-dímetylamínóprópyl)-3-etylkarbódímíð (EDCI) tengimiðill notaður ásamt dímetylamínóprídíni (DMAP) í díklórmetani við herbergishita. Hin hreinu stöðubundnu 1-O-alkyl-2,3-díasyglýseról lokaefni **7a-c**, **8a-c**, **9a-c**, **10a-c**, **11a-c** og **12a-c** fengust sem gulleitar olíur í 90-96% heimtum eftir að myndefnablöndunni hafði verið rennt gegnum stutta kísilgelsúlu með hreinu díklórmetani sem ferðafasa. Mynd 4 sýnir efnaferlin sem koma við sögu í þriðja og fjórða skrefinu og tafla 1 sýnir heimturnar sem fengust í þessum ferlum. Sannkenning á byggingu allra efna og milliefna er koma við sögu í þessum ferlum og staðfesting á hreinleika þeirra allra fengust með hágæða ^1H og ^{13}C kjarnarósmælingum (NMR), IR litrófsgreiningu og massagreiningu. Auk þess voru öll föst efni og milliefni frumefnagreind, en hin vökvakennu voru greind með nákvæmri massagreiningu. Undantekning frá þessu eru milliefnin **1-3** úr fyrsta skrefinu þar sem litrófsmælingarnar voru látnar nægja. Ljóst er að tekist hefur með prýðilegum árangri að smíða 1-O-alkylglýserólin **4-6** í ágætum heimtum með því að nota malað kalíum hydroxíð sem basa, ásamt ferjuhvatanum tetra-n-bútylammoníum brómíði ($n\text{-Bu}_4\text{NBr}$). Malað kalíum hydroxíð býður upp á miklu meira yfirborð held-



MCFa = C₇H₁₅ (**a**) ; C₁₀H₂₁ (**b**) ; C₁₂H₂₃ (**c**)

PUFA = EPA eða DHA

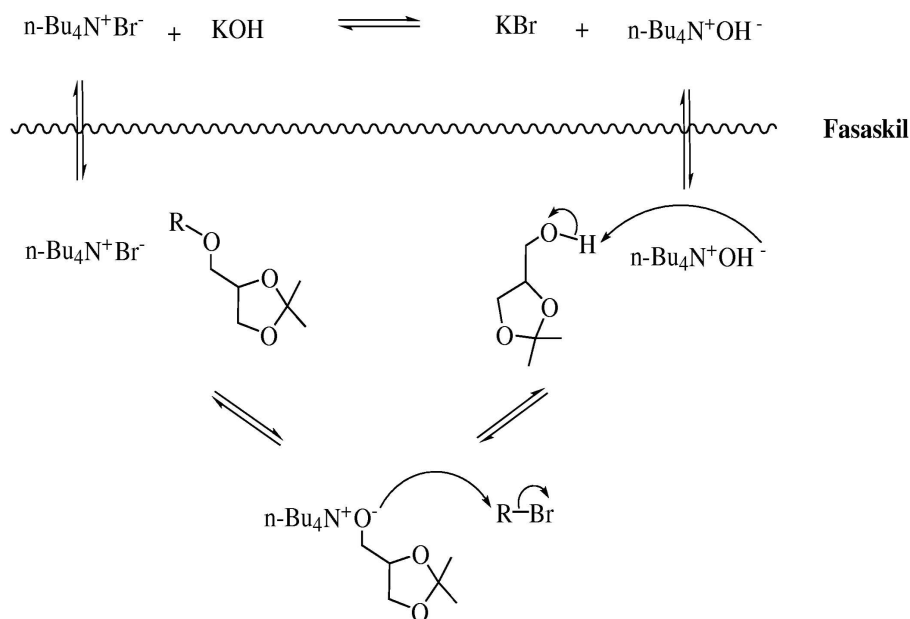
Mynd 4. Seinni hluti efnasmíðinnar

ur en ómalað og er þar af leiðandi miklu öflugri basi. Ammoníum brómíðið þjónar þeim tilgangi að vera fasaferja sem verkar á fasaskilum hins fasta kalíum hydroxíðs og hinna fljótandi lífrænu efna. Verkanin er með þeim hætti að ferjan, sem fyrir tilstilli hinna fjögurra lífrænu bútylhópa, er leysanleg í lífræna fasanum og nær að ferja hydroxíð anjónina yfir í lífræna fasann þar sem hún afprótónar alkohólið og S_N2 skiptihvarfið á sér stað. Síðan ferjar hvatinn farhópinn, brómíð anjónina sem losnar, til baka yfir í fasta fasann, skiptir henni út fyrir hydroxíð anjón, og svo koll af kolli uns hvarfið er yfirstaðið. Þetta er sýnt á mynd 5. Í þessu fyrirkomulagi er fólgin veruleg endurbót, því hefðbundnari aðferðir með hinum ýmsu tegundum basa, t.d. natríum og kalíum hydriði, natríum málmi og dimsyl anjón í lífrænum leysum, t.d. THF og DMSO, og án leysis, gáfu af sér miklu lakari heimtur, þar sem verulega kvað að E2 brotnámi í samkeppni við S_N2 skiptihvarfið.

Candida antarctica lípasinn sýndi óvenjulega mikla staðvendni gagnvart endastöðu 1-O-alkylglýserólanna **4-6** við þessar aðstæður þar sem hinir hvarfgjörnu og hraðvirku ógagnhverfu vínýl esterar miðlungslöngu fitusýranna ásamt hinu lága hitastigi 0-4°C léku stórt hlutverk [14]. Hvarfið er ógagnhverft, þar sem enól farhópurinn sem myndast ráphverfist yfir í ókjarnsækið asetaldhýð. Sterkar vísbendingar eru fyrir því að með hækkandi hitastigi efnahvarfsins aukist líkurnar á asýluröðun (acyl migration), sem felur í sér að fitusýran getur færst á milli nærliggjandi hydroxyl hópa í glýseról hluta efnanna **4a-c**, **5a-c** og **6a-c**, og myndað ranga staðhverfu. Slíkt dregur að sjálfstöðu úr staðvendni

Tafla 1. Heimturnar fyrir síðustu tvö skrefin

Efni	MCFa	PUFA	Heimtur
4a	C ₇ H ₁₅	-	90%
4b	C ₉ H ₁₉	-	92%
4c	C ₁₁ H ₂₃	-	90%
7a	C ₇ H ₁₅	EPA	90%
7b	C ₉ H ₁₉	EPA	93%
7c	C ₁₁ H ₂₃	EPA	92%
8a	C ₇ H ₁₅	DHA	90%
8b	C ₉ H ₁₉	DHA	94%
8c	C ₁₁ H ₂₃	DHA	95%
5a	C ₇ H ₁₅	-	90%
5b	C ₉ H ₁₉	-	92%
5c	C ₁₁ H ₂₃	-	90%
9a	C ₇ H ₁₅	EPA	90%
9b	C ₉ H ₁₉	EPA	93%
9c	C ₁₁ H ₂₃	EPA	92%
10a	C ₇ H ₁₅	DHA	90%
10b	C ₉ H ₁₉	DHA	94%
10c	C ₁₁ H ₂₃	DHA	95%
6a	C ₇ H ₁₅	-	90%
6b	C ₉ H ₁₉	-	90%
6c	C ₁₁ H ₂₃	-	90%
11a	C ₇ H ₁₅	EPA	95%
11b	C ₉ H ₁₉	EPA	94%
11c	C ₁₁ H ₂₃	EPA	91%
12a	C ₇ H ₁₅	DHA	96%
12b	C ₉ H ₁₉	DHA	93%
12c	C ₁₁ H ₂₃	DHA	91%



Mynd 5. Hlutverk fasaferjunnar $n\text{-Bu}_4\text{NBr}$

lípasans, sem er með því allra besta sem þekktist, og um leið hinni staðvænda stjórnun efnasmíðanna.

EPA or DHA into the remaining mid-position of the glycerol.

Þakkir

Rannsóknasjóði Háskólans er þakkað fjárstuðning við verkefnið, Novozyme í Danmörku er þakkað fyrir lípasann og Pronova Biocare í Noregi fyrir hin hreinu EPA og DHA. Sigríði Jónsdóttur á Raunvísindastofnun Háskólans er þakkað fyrir NMR mælingar, Sigurði V. Smárasyni hjá Íslenskri erfðagreiningu og Trine Þorsgaard hjá DTU í Danmörku fyrir massagreiningarnar og Karin Linthoe hjá Háskólanum í Kaupmannahöfn fyrir frumefnagreiningarnar.

Summary: Positionally labelled structured ether lipids of 1-O-alkyl-2,3-diaclylglycerol type, possessing pure EPA or DHA at the mid-position and pure medium-chain fatty acid at the end-position, were synthesized in four steps from solketal by combined conventional synthetic organic chemistry methods and biocatalysis involving lipase. Three adducts of 1-O-alkylglycerol were prepared by introducing hexadecyl, octadecyl, and cis-9-octadecenyl groups into solketal by Williamson ether synthesis. This was followed by acid-catalysed deprotection of the isopropylidene protective group of the solketals. The third step involved a superb regioselectivity of an immobilized *Candida antarctica* lipase to introduce the medium-chain fatty acyl moiety exclusively into the end-position of the glycerol backbone. Finally, EDCI coupling agent was used to bring about the introduction of pure

Heimildir

- [1] M. Kayama and M. Mankura, *Inform* **9** (1998), 794.
- [2] J.R. Sargent, in *Marine Biogenic Lipids, Fats and oils*, ed. R.G. Ackman, CRC Press, Boca Raton, 1989, Vol. 1, pp. 175-197.
- [3] H.K. Mangold and F. Paltauf, eds. *Ether Lipids. Biochemical and Biomedical Aspects*, Academic Press, New York, 1983.
- [4] P.T. Pugliese, K. Jordan, H. Cederberg, and J. Brohult, *J. Alt. Compl. Med.* **4** (1998), 87.
- [5] A. Brohult, J. Brohult, and S. Brohult, *Acta Chem. Scand.* **24** (1970), 730.
- [6] G.G. Haraldsson and B. Hjaltason, in *Structured and Modified Lipids*, F.D. Gunstone, ed., Marcel Decker, Inc., New York, 2001, pp. 313-350.
- [7] M.E. Stansby, in *Fish Oils in Nutrition*, ed. M.E. Stansby, van Nostrand Reinhold, New York, 1990, Chapter 10, pp. 268-288.
- [8] J.A. Nettleton, *Omega-3 Fatty Acids and Health*, Chapman and Hall, New York, 1995.
- [9] A.L. Stoll, *The Omega-3 Connection: The Groundbreaking Anti-depression Diet and Brain Program*, Simon & Schuster, New York, 2001.
- [10] D.F. Horrobin, *Schizophr. Res.* **30** (1998), 193.
- [11] J. Jumpsen and M. T. Clandinin, *Brain Development: Relationship to Dietary Lipid and Lipid Metabolism*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 1995.
- [12] B.F. Haumann, *Inform* **8** (1997), 428.
- [13] G.G. Haraldsson, B.Ö. Gudmundsson, and Ö. Almarsson, *Tetrahedron* **51** (1995), 941.

- [14] A. Halldorsson, C.D. Magnusson, and G.G. Haraldsson, *Tetrahedron* **59** (2003), 9101.
- [15] G.G. Haraldsson, A. Halldorsson, and E. Kulás, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77** (2000), 1139.
- [16] A. Halldorsson, C.D. Magnusson, and G.G. Haraldsson, *Tetrahedron Lett.* **42** (2001), 7675.

Um höfundana:

Carlos Davíð Magnússon er doktorsnemi í efnafræði við Háskóla Íslands.

Arnar Halldórsson lauk doktorsprófi í efnafræði frá Háskóla Íslands 2003 og starfar nú sem sérfræðingur á Raunvísindastofnun Háskólans og hjá Pronova Biocare í Noregi.

Guðmundur G. Haraldsson er prófessor í lífrænni efnafræði við Háskóla Íslands.

Raunvísindastofnun Háskólans
Dunhaga 3, IS-107 Reykjavík
carlos@raunvis.hi.is
arnarha@raunvis.hi.is
gghar@raunvis.hi.is

Móttekin: 21. apríl 2004

