

Э. П. Серебряков¹, Г. В. Крышталь¹, Г. М. Жданкина¹, А. Г. Нугматов¹,
В. В. Тертов², Л. В. Филатова²

СИНТЕЗ АНАЛОГОВ ФИТАНОВОЙ КИСЛОТЫ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ВЛИЯНИЯ НА ХОЛЕСТЕРИНЭСТЕРАЗУ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА *in vitro*

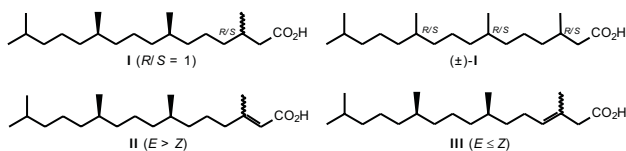
¹ Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва;

² Институт экспериментальной кардиологии МЗСР РФ, Москва (ИЭК МЗСР РФ)

Синтезированы и протестированы *in vitro* десять ациклических изопреноидных кислот как регуляторы соотношения “холестерин/холестерилалканоат” в липопротеинах плазмы крови. Рацемические C₂₀-аналоги (3*R*/5*S*,7*R*,11*R*)-3,7,11,15-тетраметилгексадекановой (фитановой) кислоты оказались мощными активаторами холестеринэстеразы печени человека (ХЭПЧ) *in vitro*. Ахиральная (*E,E*)-5,9,13-триметилтетрадека-4,8,12-триеновая (фарнезилуксусная) кислота (противоопознательное вещество) тоже достоверно ускоряет катализируемый ХЭПЧ гидролиз холестерилпальмитата.

Одна из перспективных стратегий медикаментозной терапии атеросклероза состоит в оптимизации соотношения холестерина (ChOH) и его эфиров (ChOCOR) в липопротеинах крови [1, 2]. Это достигается регулированием активности ферментов, катализирующих гидролиз ChOCOR. Из трех видов этих ферментов только холестеринэстеразы (ХЭ, КФ 3.1.1.13) не нуждаются в энергии АТФ [3].

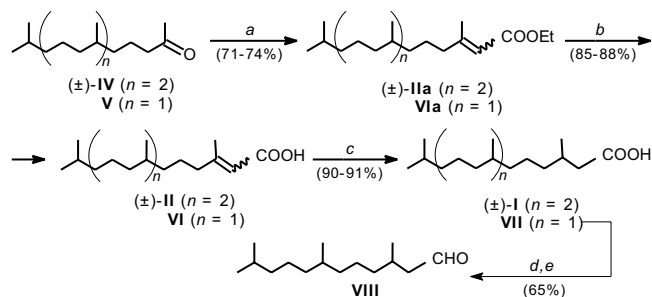
(3*R*/5*S*,7*R*,11*R*)-Тетраметилгексадекановая (фитановая) кислота I тормозит *in vitro* поздние стадии биосинтеза ChOH в гомогенатах печени крысы [4]. Это побудило нас исследовать возможность использования кислоты I и ее аналогов как активаторов гидролиза ChOCOR, катализируемого холестеринэстеразой печени человека (ХЭПЧ), так как высвобождаемый при этом ChOH расходуется по “не-атерогенным” метаболическим каналам [5]. Применение самой кислоты I (метаболита диетарного хлорофилла у млекопитающих) опасно из-за вызываемого ею поражения нервной системы у людей с генетически заблокированным окислительным катаболизмом кислоты I (Refsum's disease) [6–8], но ее кометаболиты — кислоты II и III [9, 10], и аналоги с иным типом катаболизма могли бы стать приемлемыми регуляторами ХЭПЧ и баланса ChOH/ChOCOR в крови.



Нами синтезированы и протестированы *in vitro* ряд ациклических изопреноидных кислот как возможных регуляторов соотношения ChOH/ChOCOR в липопротеинах крови. Вместо кислоты I и ее кометаболитов использовали более доступные рацемические смеси этих кислот. Так, all-*rac*-фитановая кислота ((±)-I) содержит, по способу получения, восемь стереоизомеров (из них кислоте I соответствует два).

Синтез all-*rac* фитановой ((±)-I), 2(*E/Z*)-фитеновой и 3(*Z*)-фитеновой кислот и их C₁₅-аналогов. Кислоты (±)-I и (±)-II получали, комбинируя и опти-

мизируя известные отдельные стадии (см. [9–14]). Конденсацией all-*rac*-(±)-6,10,14-триметилпентадекан-2-она (±)-IV с триэтилфосфонацетатом был получен эфир 3,7,11,15-тетраметилгексадец-2-еновой кислоты (±)-IIa с соотношением *E/Z* ~ 80:20. Его омыление привело к соответствующей кислоте (±)-II, гидрирование которой дало кислоту (±)-I. Тем же путем из (±)-6,10-диметилундекан-2-она V были последовательно получены (±)-этил-3,7,11-триметилдодец-2-еноат VIa, соответствующая ему 2-фарнезеновая кислота VI и all-*rac*-фарнезановая кислота VII (сравнить [11, 15, 16]). Последнюю в две стадии превратили в all-*rac*-3,7,11-триметилдодеканаль VIII, использованный далее при получении кислоты (±)-(*Z*)-III



a. (EtO)₂P(O)CH₂COOEt/NaH/DMF, 30 ч, 20–25 °C;

b. KOH/EtOH-H₂O, 2 ч, Δ;

c. H₂-Pd/C, 50 атм., 4 ч, 70 °C;

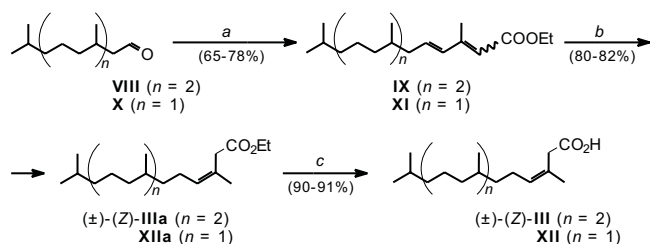
d. LiAlH₄/Et₂O, 0,5 ч, ~ 20 °C;

e. PCC/CH₂Cl₂, 0 → 20 °C, 3ч.

Реакция альдегида VIII с эфиром 3-метил-4-диэтоксифосфонилкротоновой кислоты (XIII) в условиях межфазного катализа привела к эфиру all-*rac*-(2*E/Z*,4*E*)-3,7,11,15-тетраметилгексадека-2,4-диеновой кислоты (IX). Гомогенное 1,4-*цис*-гидрирование диена IX в присутствии (η⁶-PhCO₂Me)Cr(CO)₃, обеспечившее превращение обоих геометрических изомеров диена в один *Z*-алкен (см. [17]), привело к эфиру (±)-(*Z*)-IIIa. Омыление эфира (±)-(*Z*)-IIIa в кислоту (±)-(*Z*)-III удалось лишь в очень мягких условиях; при повышении температуры или концентрации щелочи β,γ-двойная связь переходит в α,β-положение. Для спектров ПМР соединений (±)-(*Z*)-IIIa и (±)-(*Z*)-III

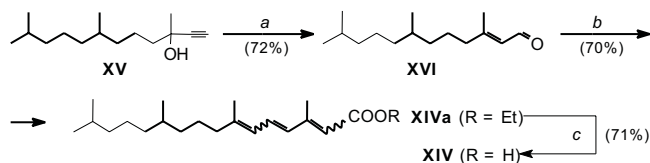
характерны сигнал при $\delta \sim 3,1$ (CH_2 -звено во фрагменте $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$) и сдвиг сигнала $\text{C}(4)\text{-H}$ в сильное поле ($\sim 0,2$ м.д.) по сравнению с сигналом $\text{C}(2)\text{-H}$ у соединений (\pm)-IIIa и (\pm)-II.

По той же схеме из (\pm)-3,7,11-диметилоктанояля X были последовательно получены эфир 3,7,11-триметилдодeca-2,4-диеновой кислоты XI, эфир (*Z*)-3,7,11-триметилдодeca-3-еновой кислоты (*Z*)-XIIa и соответствующая кислота (*Z*)-XII



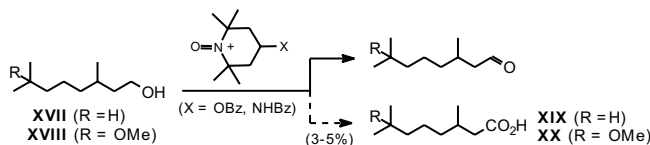
a. $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{Me})=\text{CHCOOEt}$ (XIII) – KOH (тв., 2 экв.)/PhH/18-краун-6 (кат.), 1,5 ч, $\sim 20^\circ\text{C}$;
b. H_2 -(PhCOOMe)Cr(CO) $_3$ /Me $_2$ CO, 60 атм., 3 ч, 125°C ; c. KOH/MeOH-H $_2$ O, 20 ч, $\sim 20^\circ\text{C}$.

Прочие аналоги. Полиеновый аналог кислоты I, (\pm)-3,7,11,15-тетраметилгексадека-2,4,6-триеновая кислота XIV, была получена из (\pm)-3,7,11-триметилдодeca-1-ин-3-ола XV. Его перегруппировка в среде поли(ванадилдифенилсилоксан) – Ph $_2$ Si(OH) $_2$ /ксилол (см. [18]) дала (\pm)-3,7,11-триметилдодeca-2-еналь XVI (*E/Z* ≈ 1), который при конденсации с фосфонатом XIII был превращен в триеновый эфир XIVa. Мягкое омыление эфира XIVa привело к кислоте XIV с общим выходом $\sim 36\%$. Структура триенов XIVa и XIV подтверждена данными спектров.



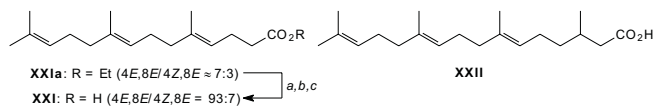
a. Поли(ванадилдифенилсилоксан) – Ph $_2$ Si(OH) $_2$ /o-ксилол, 1,5 ч, 145°C ;
b. Фосфонат XIII – KOH (тв.)/PhH/18-краун-6, 4,5 ч, $\sim 20^\circ\text{C}$; c. KOH/EtOH-H $_2$ O, 2 ч, Δ .

(\pm)-3,7-Диметилоктановая кислота (XIX) и ее 7-метокси-аналог XX были получены как побочные продукты электрохимического окисления спиртов XVII и XVIII (см. [19]) оксоаммониевыми солями, генерируемыми из 4-замещенных 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксидов.



В эту группу кислот включена и (*E,E*)-5,9,13-триметилтетрадека-4,8,12-триеновая (фарнезилуксусная) кислота (XXI). Это антиульцерогенное вещество [20, 21] интересно как структурный аналог 3,7,11,15-тетраметилгексадека-6,10,14-триеновой кислоты

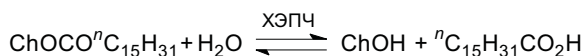
(XXII), которая сопутствует кислоте I в сыворотке крови человека [22]. Кислоту XXI получали из синтезированного по способу [23] эфира фарнезилуксусной кислоты (XXIa, 4*E*,8*E*/4*Z*,8*E* $\approx 7:3$), который ректифицировали на эффективной колонке. Фракцию *E,E*-изомера омыляли, калиевую соль кристаллизовали, и при подкислении выделяли кислоту XXI с соотношением 4*E*,8*E*/4*Z*,8*E* $\approx 93:7$ (сравнить [24]).



a. Ректификация (90 т.т.); b. KOH-H $_2$ O-EtOH; c. H $_3$ O $^+$.

Влияние all-*rac*-фитановой кислоты и ее аналогов на гидролитическую активность ХЭПЧ. Способность кислоты (\pm)-I и ее аналогов ускорять ферментативный гидролиз ChOCOR определяли по упрощенной методике Стокке [25, 26], используя сумму ХЭПЧ, остающихся в цитоплазматическом экстракте печени человека после отделения ядерной фракции и клеточных осколков.

Контролируемый ХЭПЧ гидролиз изотопно-меченого холестерилпальмитата



проводили при pH 4,5 (пик ацилирующей активности ХЭПЧ, [25]) и 6,0 (сразу за пиком гидролитической активности ХЭПЧ [25, 26]). Активность ХЭПЧ определяли по количеству ChOH, образовавшегося за время инкубации субстрата с гомогенатом печени, и оставшегося ChOCO n C $_{15}$ H $_{31}$ (нмоль/мкг белка \cdot ч $^{-1}$) в отсутствие и в присутствии изопреноидных кислот ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

Были проведены две серии парных опытов (при pH 4,5 и 6,0).

Как видно из таблицы, рацемические C $_{20}$ -аналоги фитановой, 2-фитановой и 3(*Z*)-фитановой кислот вызывают мощное ускорение гидролиза ChOCO n C $_{15}$ H $_{31}$. Наличие трех сопряженных связей в кислоте XIV снижает активность ХЭПЧ почти до уровня контроля. Все три кислоты из группы C $_{15}$ (VII, VI и XII) при pH 6,0 мало влияют на гидролитическую активность ХЭПЧ. В группе C $_{10}$ кислота XIX оказывает ингибиторное действие, тогда как кислота XX сильно активизирует ХЭПЧ.

При pH 4,5 гидролиз ChOCO n C $_{15}$ H $_{31}$ в присутствии всех полностью насыщенных кислот ((\pm)-I, VII, XIX, XX) в разной степени, но статистически достоверно снижается. В присутствии же ненасыщенных кислот ((\pm)-II, (\pm)-(Z)-III, VI, (Z)-XII, XIV, XXI) активность ХЭПЧ остается на уровне контроля или заметно выше.

Из всех тестированных кислот наиболее эффективна практически независимая от pH среды кислота (\pm)-II, all-*rac* аналог природной кислоты II. Однако частичное превращение последней *in vivo* в I [6–10] делает перспективу медикаментозной терапии на

основе кислот II или (\pm)-II проблематичной. Ввиду этого заслуживает внимания фарнезилуксусная кислота XXI. Она вызывает статистически значимое $\sim 40\%$ -ное увеличение активности ХЭПЧ при pH 6,0 и 4,5, а ее биотрансформация у млекопитающих протекает быстро и без образования токсичных продуктов [20, 21].

Экспериментальная химическая часть

ГЖХ-Анализ: прибор ЛХМ-8 МД-5, колонка (стекло, $1,4 \times 0,003$ м), 5% SE-30 на хроматоне N-AW-DMCS, пламенно-ионизационный детектор, газ-носитель — N_2 . ТСХ-анализ: пластины Silufol с твердым слоем SiO_2 , проявитель — пары I_2 . Колончатая хроматография: силикагель L (40–100 мкм, Чехия). ПМР-спектры (для растворов в $CDCl_3$): прибор “Bruker WM-250” (250 МГц).

Эфиры Па и VIa. К суспензии NaN (0,24 г, 10 ммоль) в 20 мл абс. ДМФА при $\sim 20^\circ C$ добавили по каплям $(EtO)_2P(O)CH_2COOEt$ (2,24 г, 10 ммоль). Перемешивали под аргоном 15 мин, добавляли по каплям кетон (\pm)-IV или V (10 ммоль), и продолжали перемешивание при $\sim 20^\circ C$ (Ar) в течение 24–30 ч (контроль по ГЖХ). По завершении реакции смесь выливали в ледяную воду и экстрагировали эфиром. Объединенные эфирные вытяжки промывали водой и сушили ($MgSO_4$), растворитель удаляли в вакууме. Хроматографией остатка на колонке с SiO_2 (элюирование гексаном) выделяли продукты Па или VIa в виде бесцветного прозрачного масла. **Эфир Па:** Смесь *E*- и *Z*-изомеров (80:20). Выход 71%. Т. кип. $158–160^\circ C/0,2$ мм; n_D^{20} 1,4560. $C_{22}H_{42}O_2$. ПМР-спектр (δ , м.д., *J*, Гц): 0,85 д (12H, $4CH_3$, *J* = 7); 1,1–1,62 м (24 H = $9CH_2 + 3CH + CH_3CH_2O$); 1,85 д ($\sim 0,6$ H, *Z*-изомер) и 2,15 д ($\sim 2,4$ H, *E*-изомер) ($CH_3C=$, *J* = 1,5); 4,12 кв (2H, CH_2O , *J* = 7); 5,65 уш.с (1H, $CH=$). Лит. [13]: n_D^{20} 1,4590. **Эфир VIa:** Смесь *E*- и *Z*-изомеров (85:15). Выход 74%. Т. кип. $107–111^\circ C/0,3$ мм; n_D^{20} 1,4545. $C_{17}H_{32}O_2$. ПМР-спектр (δ , м.д., *J*, Гц): 0,83 д (9H, $3CH_3$, *J* = 7); 1,1–1,55 м (17H = $6CH_2 + 2CH + CH_3CH_2O$); 1,85 д (*Z*-изомер) и 2,13 д (*E*-изомер) (3H, $CH_3C=$, *J* = 1,5); 4,12 кв (2H, CH_2O , *J* = 7); 5,63 уш.с (1H, $CH=$).

Кислоты (\pm)-II и VI. К раствору KOH (1,68 г, 30 ммоль) в 40 мл 96%-ного EtOH прибавляли эфир Па или VIa (10 ммоль), раствор кипятили 2 ч, остывшую реакционную смесь сконцентрировали в вакууме. Остаток разбавили водой, нейтральные примеси экстрагировали (Et_2O). Водный слой подкисляли конц. HCl до pH 1 (при $0–4^\circ C$), насыщали сухим NaCl и экстрагировали (Et_2O). Объединенные эфирные вытяжки сушили ($MgSO_4$), растворитель удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с SiO_2 (элюент — $CHCl_3$). Получали продукт в виде бесцветной прозрачной жидкости. **Кислота II.** Смесь *E*- и *Z*-изомеров (80:20). Выход 85%. Т. кип. $174–176^\circ C/0,4$ мм; n_D^{20} 1,4640. $C_{20}H_{38}O_2$. ПМР-спектр (δ , м.д., *J*, Гц): 0,9 д (12H, $4CH_3$, *J* = 7); 1,1–1,56 м (21H = $9CH_2 + 3CH$); 1,95 д (*Z*-изомер) и 2,2 д (*E*-изомер) (3H, $3H_3C=$,

J = 1,5 Гц); 5,7 уш.с (1H, $CH=$); 10,5 уш.с (1H, CO_2H). Лит. [12]: n_D^{20} 1,4656. **Кислота VI.** Смесь *E*- и *Z*-изомеров (85:15). Выход 88%. Т. кип. $123–125^\circ C/0,3$ мм; n_D^{20} 1,4615. $C_{15}H_{28}O_2$. ПМР-спектр (δ , м.д., *J*, Гц): 0,9 д (9H, $3CH_3$, *J* = 7); 1,1–1,5 м (14H = $6CH_2 + 2CH$); 1,95 д (*Z*-изомер) и 2,15 д (*E*-изомер) (в сумме 3H, $CH_3C=$, *J* = 1,5), 5,7 уш.с (1H, $CH=$); 11,8 уш.с (1H, CO_2H).

Кислоты (\pm)-I и VII. Кислоты (\pm)-II или VI (20 ммоль) гидрировали во вращающемся автоклаве емкостью 125 мл над 2%-ным Pd/C (1,5 г) в 45 мл $iPrOH$ при $70–90^\circ C$ и давлении 50 атм (4–5 ч, контроль проб методом ТСХ). Катализатор отделяли фильтрованием, фильтрат концентрировали в вакууме, остаток наносили на колонку с SiO_2 и элюировали хлороформом. Получали продукт в виде бесцветной прозрачной жидкости. **Кислота (\pm)-I.** Выход 91%. Т. кип. $169–170^\circ C/0,5$ мм, n_D^{20} 1,4510. $C_{20}H_{40}O_2$. ПМР-спектр (δ , м.д., *J*, Гц): 0,9 д (12H, $4CH_3$, *J* = 7); 1,0 д (3H, CH_3 , *J* = 7); 1,08–1,48 м (21H, $9CH_2 + 3CH$); 1,95 м (1H, CH); 2,15–2,35 м (2H, CH_2); 11,8 уш.с (1H, $COOH$). Лит. [9, 14]: см. ПМР-спектры. **Кислота VII.** Выход 90%. Т. кип. $122–126^\circ C/0,25$ мм; n_D^{20} 1,4440. $C_{15}H_{30}O_2$. ПМР-спектр 1H (δ , м.д., *J*, Гц): 0,85 д (9H, $3CH_3$, *J* = 7); 0,98 д (3H, CH_3 , *J* = 7); 1,1–1,45 м (14H = $6CH_2 + 2CH$); 1,88 м (1H, CH); 2,15–2,35 м (2H, CH_2); 11,6 уш.с (1H, CO_2H). Лит. [11, 15]: Т. кип. $146–147^\circ C/0,9$ мм, n_D^{19} 1,4429.

3,7,11-Триметилдодеканаль (VIII). К суспензии $LiAlH_4$ (1,0 г, 26,2 ммоль) в 35 мл абс. Et_2O добавляли по каплям раствор кислоты (\pm)-I (5,0 г, 20,6 ммоль) в 30 мл абс. Et_2O и перемешивали в течение 30 мин при $\sim 20^\circ C$. Реакционную смесь разложили прибавляемой по каплям водой (90 мл) и далее 10% H_2SO_4 до исчезновения эмульсии (20 мл). Осторожно по каплям до-

Влияние изопреноидных кислот на гидролитическую активность холестеринэстеразы печени человека

Кислота	Активность ХЭПЧ, % от контроля	
	pH 4,5	pH 6,0
<i>Группа C₂₀</i>		
(\pm)-I	89 \pm 8	289 \pm 33*
(\pm)-II	183 \pm 12*	449 \pm 34*
(\pm)-(Z)-III	132 \pm 9	173 \pm 25*
XIV	112 \pm 5	118 \pm 8
<i>Группа C₁₅</i>		
VII	91 \pm 4	117 \pm 8*
VI	116 \pm 13	115 \pm 6
XII	113 \pm 8	123 \pm 11*
<i>Прочие аналоги</i>		
XIX	75 \pm 12*	65 \pm 15*
XX	90 \pm 11	284 \pm 15*
XXI	139 \pm 13*	143 \pm 16*
Контроль	100 \pm 5 ^a	100 \pm 10 ^a
	100 \pm 7 ^b	100 \pm 9 ^b

Примечание. Все кислоты использовались в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль \cdot л⁻¹. Каждое значение — среднее из трех определений \pm стандартная ошибка измерения. Индекс * — достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$. Индексы ^a и ^b относятся к двум сериям опытов.

бавляли 90 мл воды и далее 10 % H_2SO_4 до исчезновения эмульсии (~ 20 мл), водный слой оставался белым. Отделяли эфирный слой, водный дополнительно экстрагировали эфиром. Объединенные органические вытяжки промывали раствором Na_2CO_3 , водой и сушили (MgSO_4). После упаривания растворителя в вакууме выделили 4,53 г 3,7,11-триметилдодеканол (выход 96 %, n_D^{20} 1,4973), который сразу без дополнительной очистки использовали в следующей стадии синтеза.

К суспензии пиридиний-хлорохромата (6,5 г, 30 ммоль) в 70 мл сухого CH_2Cl_2 при перемешивании и охлаждении ледяной водой добавили полученный спирт (4,4 г, 19,3 ммоль) в 5 мл сухого CH_2Cl_2 . Реакционную смесь перемешивали 3 ч при ~ 20 °С (контроль реакции по ТСХ). По завершении реакции к смеси добавили 70 мл сухого Et_2O , полученный экстракт отделили декантацией, а черный остаток трижды промыли эфиром. Объединенный экстракт упарили, остаток перегнали в вакууме. Получили 2,9 г (выход 68 %) альдегида VIII. Т кип. 102 – 105 °С/0,3 мм, n_D^{20} 1,4455. $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}$. ПМР-спектр (δ , м.д., J , Гц): 0,82 д (12H, 4 CH_3 , $J=6$); 1,1 – 1,3 м (15H, 6 $\text{CH}_2 + 3\text{CH}$); 2,25 м (2H, CH_2); 9,7 д (1H, CHO , $J=1,5$).

Эфиры IX и XI. К смеси этилового эфира 3-метил-4-диэтоксифосфонилбут-2-еновой кислоты XIII (2,24 г, 10 ммоль), порошкового KOH (1,12 г, 20 ммоль) и 0,2 г 18-краун-6 эфира в 20 мл сухого бензола при ~ 20 °С прибавляли 10 ммоль альдегида VIII или (\pm)-3,7-диметилотоктаналя (X). Реакционную массу энергично перемешивали до полной конверсии фосфоната (20 °С, 1,5 – 2 ч, контроль проб методом ГЖХ), разбавляли водой, органический слой промывали водой, сушили (MgSO_4) и концентрировали в вакууме. Остаток пропускали через короткую колонку с SiO_2 (элюент — гексан), элюат концентрировали в вакууме при 40 мм рт. ст. и получали этил-2,4-алкадиеноаты IX или XI в виде бесцветного масла. **Эфир IX:** смесь 2*E*,4*E*- и 2*Z*,4*E*-изомеров (60:40). Выход 65 %. Т кип. 150 – 157 °С/0,2 мм рт. ст., n_D^{20} 1,4805. $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{O}_2$. ПМР-спектр (δ , м.д., J , Гц): 0,85 д (12H, 4 CH_3); 1,1 – 1,5 м (18H = 6 $\text{CH}_2 + 3\text{CH} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 2,0 д (2*Z*-изомер, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$) и 2,3 д (2*E*-изомер, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), в сумме 3H, 4*J*=1,4; 4,15 кв (2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, 3*J*=7); 5,6 с (1H, $\text{CH}=\text{}$); 6,1 м и 7,6 д (2H, 3*J*=16, $\text{CH}=\text{}$). **Эфир XI:** синтез и свойства диена XI (Гидропрена) описаны в работе [27].

Эфиры (\pm)-(Z)-IIIa и XIIIa. В автоклав емкостью 50 мл из нержавеющей стали помещали в атмосфере аргона эфир (\pm)-(Z)-IIIa или эфир XIIIa, (2,2 ммоль), комплекс ($\eta^6\text{-PhCO}_2\text{Me}$)Cr(CO)₃ (0,3 г) и 7 – 8 мл не содержащего O_2 абс. ацетона. Автоклав трижды продували сухим H_2 (при 10 атм.), создавали начальное давление 60 атм., и проводили гидрирование при 120 – 125 °С в течение ~ 3 ч. Спустив давление H_2 , автоклав открывали, отгоняли ацетон, к остатку прибавляли 20 мл гексана, надосадочный раствор фильтровали через колонку с SiO_2 . Упариванием фильтрата в вакууме получали эфиры (\pm)-(Z)-IIIa или XIIIa в виде бесцветного масла. **Эфир (\pm)-(Z)-IIIa:** Выход 82 %;

n_D^{21} 1,4555. $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{O}_2$. ПМР-спектр (δ , м.д., J , Гц): 0,87 д (12H, 4 CH_3 , $J=7$); 1,15 – 1,5 м (20H = 7 $\text{CH}_2 + 3\text{CH} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 1,77 с (3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{}$); 2,0 м (2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$); 3,05 с (2H, = $\text{CCH}_2\text{CO}_2\text{R}$); 4,2 к (2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $J=7$); 5,35 уш.т (1H, = CH , $J=7$). **Эфир XIIIa:** Выход 80 %, n_D^{21} 1,4560. $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_2$. ПМР-спектр (δ , м.д., J , Гц): 0,85 д (9H, 3 CH_3 , $J=7$); 1,15 – 1,46 м (13H, 4 $\text{CH}_2 + 2\text{CH} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 1,78 с (3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{}$); 2,0 м (2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$); 3,02 с (2H, = $\text{CCH}_2\text{CO}_2\text{R}$); 4,12 к (2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $J=7$); 5,32 уш.т (1H, = CH , $J=7$).

Кислоты (\pm)-(Z)-III и XII. К раствору KOH (73 мг, 1,3 ммоль) в 3 мл смеси MeOH– H_2O (3:1) добавляли эфир (\pm)-(Z)-IIIa или XIIIa (1 ммоль) и перемешивали 10 – 12 ч при 20 °С, следя за ходом омыления (ТСХ). По завершении реакции раствор разбавили ледяной водой и экстрагировали эфиром для удаления нейтральных примесей. Водный слой при 0 °С подкислили разбавленной HCl (1:1) до pH 2 и экстрагировали эфиром. Объединенные эфирные вытяжки сушили (MgSO_4), растворитель удаляли в легком вакууме и получали продукт в виде прозрачного бесцветного масла. **Кислота (\pm)-(Z)-III.** Выход 71 %. $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$. ПМР-спектр (δ , м.д., J , Гц): 0,9 д (12H, 4 CH_3 , $J=7$); 1,15 – 1,5 м (17H = 7 $\text{CH}_2 + 3\text{CH}$); 1,80 с (3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{}$); 2,0 м (2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$); 3,10 с (2H, = $\text{CCH}_2\text{CO}_2\text{R}$); 5,45 уш.т (1H, = CH , $J=7$); 11,8 уш.с (1H, CO_2H). **Кислота XII.** Выход 75 %. $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{O}_2$. ПМР-спектр (δ , м.д., J , Гц): 0,90 д (9H, 3 CH_3 , $J=7$); 1,1 – 1,5 м (10H = 4 $\text{CH}_2 + 2\text{CH}$); 1,8 с (3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{}$); 2,0 м (2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$); 3,1 с (2H, = $\text{CCH}_2\text{CO}_2\text{R}$); 5,4 уш.т (1H, = CH , $J=7$); 11,5 уш.с (1H, CO_2H).

3,7,11-Триметилдодец-2-еналь (XVI). Смесь ацетиленового спирта XV (6,72 г, 30 ммоль), поли(ванадилдифенилсилоксана) (0,67 г) и дифенилсиландиола (0,67 г) в 40 мл о-ксилола нагревали и перемешивали при 145 °С в атмосфере аргона в течение 1 – 1,5 ч (контроль проб методом ГЖХ). По завершении реакции растворитель отогнали при 20 мм рт. ст., а остаток перегнали в вакууме. Получили 4,85 г продукта (смесь *E*- и *Z*-изомеров, ~ 1:1) в виде прозрачной жидкости. Выход 72 %. Т кип. 115 – 125 °С/0,5 мм рт. ст., n_D^{20} 1,4645. ПМР-спектр (δ , м.д., J , Гц): 0,82 д (9H, 3 CH_3 , $J=7$); 1,1 – 1,4 м (12H, 5 $\text{CH}_2 + 2\text{CH}$); 1,9 д (*Z*-изомер) и 2,15 д (*E*-изомер) (в сумме 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{}$, $J=1,5$); 2,5 м (2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$); 5,8 м (1H, $\text{CH}=\text{}$); 9,9 дд (1H, CHO , $^2J=6$, $^3J=1,5$).

Эфир XIVa. Получен по методике, приведенной выше для эфиров IX и XI. Продолжительность реакции еналя XVI с фосфонатом XIII (до полной конверсии XIII, контроль методом ГЖХ) составила 4 – 5 ч. После стандартной обработки получили 2,3 г продукта XIVa (смесь изомеров). Выход 70 %. Т кип. 155 – 160 °С/0,3 мм рт. ст., n_D^{20} 1,4770. ПМР-спектр (δ , м.д., J , Гц): 0,85 д (9H, 3 CH_3 , $J=6$); 1,1 – 1,5 м (14H, 6 $\text{CH}_2 + 2\text{CH}$); 1,25 т (3H, $J=7$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 1,8 – 2,3 м (8H, 2 $\text{CH}_3\text{C}=\text{}$ и $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$); 4,15 кв (2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $J=7$); 5,7 м, 5,9 – 6,2 м, 6,75 – 6,9 м (4H, 4 $\text{CH}=\text{}$).

Кислота XIV. К раствору KOH (1,12 г, 20 ммоль) в 30 мл 96 % EtOH добавили эфир XIVa (2,3 г, 7 ммоль),

и раствор кипятили 2 ч. Реакционную массу сконцентрировали в вакууме, остаток разбавили водой и экстрагировали эфиром. Водный слой подкислили HCl до pH 1 (0 – 4 °C), насытили NaCl и трижды экстрагировали эфиром. Объединенный экстракт сушили (MgSO₄), растворитель удалили в вакууме, остаток нанесли на колонку с SiO₂ и элюировали хлороформом. Упариванием элюата получили 1,5 г кислоты XIV (смесь изомеров). Выход 71 %. Т.кип. 165 – 170 °C/0,2 мм рт. ст., n_D^{20} 1,4973. C₂₀H₃₄O₂. ПМР-спектр (δ, м.д., J, Гц): 0,83 д (9H, 3CH₃, J = 6); 1,0 – 1,35 м (14H = 6CH₂ + 2CH); 1,8 – 2,3 м (8H, 2CH₃C= и CH₂C=); 5,1 – 5,4 м, 5,75 м, 5,9 – 6,2 м, 6,9 м (4H, 4CH=); 10,6 уш.с (1H, CO₂H).

Кислоты XIX и XX выделены при фракционировании продуктов электрохимического окисления спиртов XVII и XVIII и любезно предоставлены Ю. Н. Огибиным (ИОХ РАН). **Кислота XIX.** ПМР-спектр (δ, м.д., J, Гц): 0,87 д (6H, 2CH₃, J = 7); 0,98 д (3H, CH₃, J = 7); 1,12 – 1,36 м (6H, 3CH₂); 1,52 м (1H, CH); 1,95 м (1H, CH); 2,14 – 2,36 м (2H, CH₂CO); 11,5 уш.с (1H, CO₂H). **Кислота XX.** ПМР-спектр (δ, м.д., J, Гц): 0,9 д (3H, CH₃, J = 7); 1,08 с (6H, 2CH₃); 1,12 – 1,40 м (6H, 3CH₂); 1,9 м (1H, CH); 2,08 – 2,28 м (2H, CH₂CO); 3,12 с (3H, OCH₃); 11,05 уш.с (1H, CO₂H).

(E,E)-Фарнезилуксусная кислота (XXI). Эфир XXIa с соотношением 4E,8E/4Z,8E ≈ 7:3 (30 г) фракционировали на колонне фирмы Fisher (90 т.т., температура куба 160 °C, остаточное давление 0,02 мм рт. ст., флегмовое число 20). После отгонки фракции (4Z,8E)-XXIa и перегонки кубового остатка получили фракцию эфира XXIa с соотношением 4E,8E/4Z,8E = 93:7 (данные ГЖХ и ПМР-спектра). Часть ее (15 г, 51 ммоль) растворили в EtOH (65 мл), содержащем 3,14 г KOH (56 ммоль). Прозрачный раствор соли упарили в вакууме, остаток (17,2 г) азеотропно высушили бензолом, осадок кристаллизовали трижды из сухого AcOEt (200, 150 и 50 мл). Калиевую соль (9,7 г) растворили в воде, подкислили 10 %-ной H₂SO₄ до pH 2, кислоту экстрагировали эфиром. Экстракт сушили (MgSO₄), сконцентрировали в вакууме, и получили 8 г кислоты (E,E)-XXI. Т. кип. 130 – 131 °C/0,03 мм, n_D^{19} 1,4870. Лит. [28]: Т. кип. 148 °C/0,2 мм рт. ст.

Экспериментальная биологическая часть

Биоптаты печени (1 – 1,5 г) были взяты у пяти пациентов, перенесших операции на органах брюшной полости под общим наркозом. Морфологическое исследование и микроскопический анализ не выявили патологических изменений тканей печени. Капсулу и прилежащий слой удаляли, и кусочек печени (100 мг) растирали в гомогенизаторе с раствором сахарозы (0,25 моль · л⁻¹), к которому добавляли фосфатный буфер с нужным pH из расчета 1 мл буфера на 100 мг печени. Надосадочную фракцию (цитоплазматический экстракт) отделяли от ядер и фрагментов клеточ-

ных мембран центрифугированием при 4000 об · мин⁻¹ и хранили при – 18 °C.

Растворы [7-³H]- и [4-¹⁴C]-холестерилпальмитата (Amersham, Англия) в гексане (25 мкл) смешивали с гомогенатом печени (50 мкл) и фосфатным буфером (50 мкл), и встряхивали в вортексе до образования тонкой эмульсии, к которой прибавляли раствор изопреноидной кислоты в фосфатном буфере (pH 7) до конечной концентрации активатора 1 · 10⁻⁴ моль · л⁻¹. Инкубацию вели при 37 °C в тампонируемых пробирках (газовая фаза — воздух), каждое значение опыта определялось как среднее для трех пробирок. Контрольные опыты проводили так же, но без активатора. Инкубацию прерывали, добавляя в пробирку калий-боратный буфер (pH 10) и несколько капель 4-хлормеркурфенилсульфоновой кислоты. Продукты инкубации, ChOH и ChOCOⁿC₁₅H₃₁, экстрагировали гексаном (3 мл на 1 мл инкубата), экстракт концентрировали в вакууме, и остаток хроматографировали на пластинах с SiO₂, элюируя смесью гексан–Et₂O–AcOH (85:12:3). Верхнюю (ChOCOⁿC₁₅H₃₁) и нижнюю зону (ChOH) собирали в отдельные пробирки и экстрагировали гексаном в вортексе (1 мин), после чего центрифугировали (4000 об · мин⁻¹). Экстракт декантировали, упаривали до объема 0,5 мл и добавляли во флаконы с сцинтиллятором ЖС-8. Количество образовавшегося ChOH и остаточного ChOCOⁿC₁₅H₃₁ определяли на жидкостном сцинтилляционном спектрометре RACBETA II (LKB, Финляндия).

Статистическую обработку данных проводили по t-критерию Стьюдента.

Работа выполнена на средства Государственной программы поддержки ведущих научных школ (гранты Президента РФ № 00 – 15 – 97347 и № НШ-1802.2003.3) и Комплексной программы приоритетных научных исследований Президиума РАН на 2001 – 2002 и 2003 – 2004 годы. Часть работы проводилась по Государственному контракту № 41.1.1.401 с Министерством науки и социального развития РФ.

Соавторы статьи приносят благодарность А. Н. Орехову (Институт атеросклероза РАЕН) за ценные замечания и любезно предоставленные изотопно-меченые субстраты.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Pekkanen, S. Linn, G. Heiss, C. M. Suchindran, et al., *New Engl. J. Med.*, **322**, 1700 – 1707 (1990).
2. M. J. Legato, *Am. J. Cardiol.*, **86**(12A), 15L – 18L (2000).
3. Х. Брокерхоф, Р. Дженсен, *Липолитические ферменты*, Мир, Москва (1978), сс. 219 – 241.
4. M. Kuroda and A. Endo, *Biochim. Biophys. Acta*, **486**, No. 1, 70 – 81 (1977).
5. J. Shepherd and C. J. Packard, *Trends in Pharm. Sci. (TIPS)*, **9**(9), 326 – 329 (1988).
6. A. K. Lough, in: *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, R. T. Holman. (Ed.), Vol. XIV, Par 1. Pergamon Press, Oxford / UK (1973), 1 – 48.
7. P. P. Van Veldhoven, G. P. Mannaerts, M. Casteels, and K. Croes, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **466** (Current views on fatty acid oxidation and ketogenesis), Kluwer / Academic / Plenum Publ. (1999), pp 273 – 281.

8. N. M. Verhoeven and C. Jakobs, *Progr. Lipid Res.*, **40**(6), 453 – 466 (2001).
9. J. H. Baxter and G. W. Milne, *Biochim. Biophys. Acta*, **176**(2), 265 – 277 (1969).
10. S. Kitareewan, L. T. Burka, K. B. Tomer, C. L. Parker, et al., *Mol. Biol. Cell*, **7**(8), 1153 – 1166 (1996).
11. J. W. K. Burrell, R. E. Garwood, L. M. Jackman, et al., *J. Chem. Soc. (C)*, (23), 2144 – 2154 (1966).
12. A. Bhati and K. Lloyd, *Perfum. Essent. Oil. Res.*, **57**(11), 699 – 701 (1966).
13. K. Sato, S. Mizuno, and M. Hirayama, *J. Org. Chem.*, **32**(1), 177 – 180 (1967).
14. L. R. Sita, *J. Org. Chem.*, **58**(19), 5285 – 5287 (1993).
15. K. K. Chan, N. Cohen, J. P. De Noble, et al., *J. Org. Chem.*, **41**(22), 3497 – 3505 (1976).
16. T. Fujisawa, T. Sato, T. Kawara, and K. Ohashi, *Tetrahedron Lett.*, **22**(48), 4823 – 4826 (1981).
17. А. А. Васильев, Э. П. Серебряков, *Изв. АН, Сер. хим.*, **8**, 1237 – 1255 (2002).
18. M. B. Erman, I. S. Aul'chenko, L. A. Kheifitz, et al., *Tetrahedron Lett.*, **34**, 2981 – 2984 (1976).
19. Г. Д. Гамалевич, Г. М. Жданкина, Г. В. Крышталь и др., *Журн. орган. химии*, **33**(4), 525 – 532 (1997).
20. Y. Kajiwara, S. Yokoi, H. Shimomura, T. Kizaki, et al., *Rinsho Yakuri*, **11**(3), 263 – 265 (1980); *Chem. Abstr.*, **94**, No. 58264 (1981).
21. Y. Kajiwara, *Toho Igaku Zasshi*, **32**(1), 108 – 119 (1985); *Chem. Abstr.*, **103**, No. 206151, (1985).
22. J. K. Yao and P. J. Dick, *Lipids*, **22**(2), 69 – 75 (1987).
23. А. Г. Нигматов, Э. П. Серебряков, Л. А. Яновская, *Хим.-фарм. журн.*, **21**(7), 854 – 858 (1987).
24. Ger. Offen. DE 2,904,162 (C1 C07C 57/02); *Chem. Abstr.*, **94**(7), P:47558 (1981).
25. K. T. Stokke, *Biochim. Biophys. Acta*, **270**(1), 156 – 166 (1972).
26. K. T. Stokke, *Biochim. Biophys. Acta*, **280**(2), 329 – 335 (1972).
27. Г. В. Крышталь, Г. М. Жданкина, Э. П. Серебряков, *Изв. АН, Сер. хим.*, (6), 1095 – 1098 (1993).
28. Ger. Offen. DE 2,538,532 (C1 C07C 69 / 52); *Chem. Abstr.*, **85**, P:46895 (1976).

Поступила 06.12.04

SYNTHETIC ANALOGS OF PHYTANIC ACID AND THEIR EFFECT UPON HUMAN HEPATIC CHOLESTEROL ESTERASE *in vitro*

E. P. Serebryakov¹, G. V. Kryshthal¹, G. M. Zhdankina¹, A. G. Nigmatov¹, V. V. Tertov², and L. V. Filatova²

¹ Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

² Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiological Scientific and Practical Center, Ministry of Public Health, Moscow, Russia

Ten acyclic isoprenoid fatty acids were synthesized and tested *in vitro* as plausible regulators of the cholesterol/cholesteryl alcanoate ratio in the blood serum lipoproteins. Racemic C₂₀-analogs of (3*R*/5*R*,7*R*,11*R*)-3,7,11,15-tetramethylhexadecanoic (phytanic) acid proved to potential *in vitro* activators of the human liver cholesterol esterase (HLCE). Achiral (*E*, *E*)-5,9,13-trimethyltetradeca-4,8,12-trienoic (farnesylacetic) acid, a non-toxic anti-ulcer substance, also significantly accelerates the hydrolysis of cholesteryl palmitate catalyzed by HLCE.