

В. М. МАРГІТИЧ, О. Д. ЖУКОВ, М. В. АРТАМОНОВ, Н. М. ГУЛА

ЗРУЧНИЙ СПОСІБ ЛАБОРАТОРНОГО СИНТЕЗУ МІЧЕНОГО ЗА ЖИРНОЮ КИСЛОТОЮ N-([1-¹⁴C]ПАЛЬМІТОІЛ)ЕТАНОЛАМІНУ

В работе представлены данные по лабораторному синтезу биологически активного соединения липидной природы — меченого по жирной кислоте N-([1-¹⁴C]пальмитоил)этанолamina. Метод основан на способности этаноламина и жирной кислоты к химической конденсации при температуре 180°C с образованием N-пальмитоилэтанолamina. Двукратная перекристаллизация неочищенного конечного продукта реакции в этиловом спирте-ректификате позволяет получить хроматографически чистое соединение — N-([1-¹⁴C]пальмитоил)этанолamin. Метод лабораторного синтеза N-([1-¹⁴C]пальмитоил)-этанолamina является простым и недорогостоящим, поэтому может найти широкое применение в области исследования биологически активных соединений.

К л ю ч е в ы е с л о в а: N-ацилэтанолamины, жирные кислоты, изотопная метка, анандамид.

N-ацилетанолamіни (NAE) належать до біологічно активних сполук ліпідної природи. Останнім часом інтерес до них істотно підвищився у зв'язку з ідентифікацією N-арахідоноїлетанолamіну як ендogenous лиганду для канабіноїдних рецепторів [1]. На сьогодні показано, що й інші поліненасичені NAE можуть виступати в ролі агоністів канабіноїдних рецепторів 1-го та 2-го типу [2,3]. Що стосується насичених N-ацилетанолamінів, то вони також проявляють досить значні мембранотропні властивості [4]. Так, нашими дослідженнями доведено виражений мембранопротекторний ефект насичених NAE [5] та їх здатність модулювати декотрі функції мембран [6,7]. Загалом, цими дослідженнями відкрито нову сторінку в дослідженні біологічних властивостей сполук класу NAE. Безперечно, для глибокого вивчення шляхів метаболізму NAE існує нагальна потреба в лабораторному синтезі міченого NAE.

Згідно з літературними даними, існує декілька способів синтезу NAE. Серед них слід зазначити реакцію хлорангідридів жирних кислот з етанолamіном [8], реакцію складних ефірів жирних кислот з етанолamіном [9]. Крім того, описано метод отримання NAE за допомогою взаємодії моноетанолamіну з жирною кислотою [10]. Однак у доступній літературі ніяких вказівок стосовно лабораторного синтезу мічених NAE нами не знайдено.

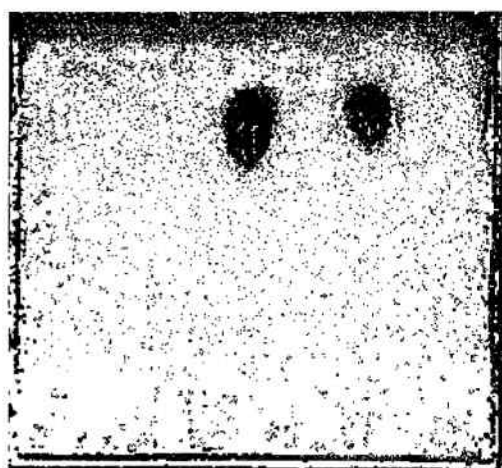
У зв'язку з цим за мету роботи було покладено розробити доступний, дешевий та нетрудомісткий метод отримання високоочищеного міченого за жирною кислотою NAE.

Матеріали і методи

Для лабораторного синтезу міченого препарату N-ацилетанолamіну використовували етанол-

амін, та пальмітинову кислоту [1-¹⁴C]16:0 активністю 1000 мкКі і масою 5,7 мг, яку змішували зі 100 мг холодної пальмітинової кислоти. Цю суміш поміщали в ампулу відповідного об'єму, додавали до неї приблизно 75 мкл етанолamіну, ампулу продували аргоном та запаювали. Далі її нагрівали на електричній пісочній бані при 180 °C протягом 1,5 години. Потім ампулу охолоджували, відкривали, реакційну суміш розчиняли у мінімальній кількості етанолу під час нагрівання до 60 °C. Розчин охолоджували, кристали, що випали, відфільтровували на скляному фільтрі, промивали невеликою кількістю холодного етанолу та знову перекристалізовували з етанолу. Висушували на повітрі протягом 12 год. Одержували приблизно 40 мг N-([1-¹⁴C]-пальмітоїл)етанолamіну. Потім вимірювали питому радіоактивність препарату.

Оцінку чистоти та відповідність одержаного продукту реакції N-([1-¹⁴C]-пальмітоїл)етанолamіну проводили двома методами: 1) одновимірної мікротонкошарової хроматографії на силікагелі КСК-2, який було нанесено на скляну платівку 6 × 6 см та закріплено гіпсом, з використанням системи розчинників хлороформ : метанол : 25% аміак (80 : 20 : 2) [11] та 2) газорідинної хроматографії за допомогою хроматографа Carlo Erba (Італія), що був оснащений полум'яно-іонізаційним детектором та скляною колонкою (довжина 2,5 м, внутрішній діаметр 3 мм), яку було заповнено 10 %-ю фазою SP 2300 (Silar 5CP) на «Chromosorb W/HP» при запрограмованій температурі 140-250 °C (2 °C/хв). Перед проведенням газорідинної хроматографії очищений кінцевий продукт реакції метилювали в 5%-у розчині HCl у метанолі.



---- N-([1-¹⁴C]-пальмітоїл)етаноламін

--- стартова зона

Рис. 1. Мікротонкошарова хроматограма очищеного продукту реакції одержання N-([1-¹⁴C]-пальмітоїл)етаноламіну.

Результати та обговорення

Хімічний синтез NAE проводили за реакцією:

$$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-^{14}\text{COOH} + \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \rightarrow \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-^{14}\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$$

під час якої відбувається проста хімічна конденсація жирної кислоти (у даному випадку [1-¹⁴C]-пальмітинової) з моноетаноламіном, внаслідок чого утворюється N-([1-¹⁴C]-пальмітоїл)етанола-

амін та вода. Для зміщення рівноваги процесу вправо, та зменшення утворення аміноєфірів додають надлишок етаноламіну.

N-пальмітоїлетаноламін — кристалічний порошок білого кольору, без специфічного запаху, з температурою плавлення 97—99 °С. З метою оцінки ступеня чистоти та відповідності отриманого кінцевого продукту N-([1-¹⁴C]-пальмітоїл)етаноламіну було проведено його мікротонкошарову хроматографію, що дозволило виявити зону N-ацилетаноламіну в системі розчинників хлороформ : метанол : 25%-й аміак (80 : 20 : 2).

Після обприскування платівки 50%-м розчином концентрованої сірчаної кислоти в метанолі та нагрівання її на плитці до 200 °С виявляється пляма N-ацилетаноламіну (рис. 1).

Наявність однієї плями на хроматографічній платівці засвідчує високу чистоту і відповідність синтезованого продукту N-пальмітоїлетаноламіну. На газорідній хроматограмі (рис. 2) виявлено два піки — метиловий ефір стеаринової кислоти, який слугує внутрішнім стандартом, а також метиловий ефір пальмітинової кислоти — хімічної складової частини препарату N-пальмітоїлетаноламіну. Наявність лише цих двох піків засвідчує високу хроматографічну чистоту препарату N-ацилетаноламіну.

Отже, запропонований метод синтезу міченого NAE, який може бути легко відтворено у біохімічній лабораторії, є зручним та дешевим. Ймовірно, він знайде широке застосування в галузі дослідження метаболізму біологічно активних сполук.

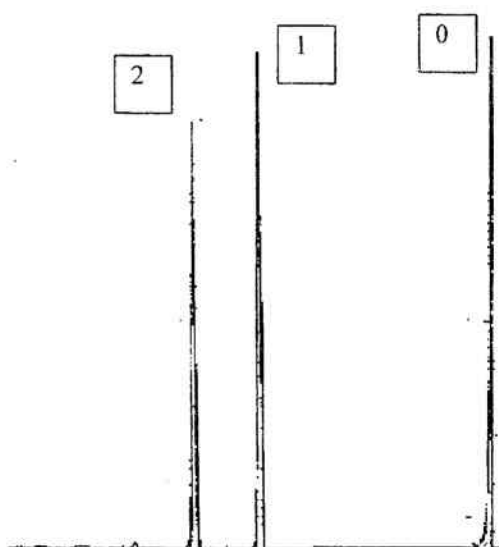


Рис. 2. Хроматограма продукту метилювання, одержана на газорідному хроматографі: 0 — розчинник; 1 — метилпальмітат — дериват продукту реакції; 2 — метилстеарат — внутрішній стандарт.

Автори висловлюють щирю подяку за цінні поради проф. В.Є.Васьковському та д.х.н. М.В.Ви-соцькому (Росія).

Робота виконана за рахунок коштів гранту ДФФД № 5.4.154.

*V. M. Margitich, A. D. Zhukov,
M. V. Artamonov, N. M. Gulaya*

**CONVENIENT LABORATORY METHOD
OF THE LABELED N-([1-¹⁴C]-
PALMITOYL)ETHANOLAMINE
SYNTHESIS**

S u m m a r y

Data concerning the synthesis of bioactive lipid compound N-([1-¹⁴C]-palmitoyl)ethanolamine labeled by ¹⁴C fatty acid are reported. The method is based on the ability of ethanolamine and fatty acid to the direct chemical condensation at 180 °C with yielding of N-acylethanolamine. The purification of the end product by the double crystallization in ethanol allows to obtain chromatographically pure substance. The presented method of the labeled N-([1-¹⁴C]-palmitoyl)ethanolamine synthesis is simple and inextensive that's why it might be used in the area of biologically active compounds investigation.

K e y w o r d s: N-acylethanolamines, fatty acids, radioactive isotope label, anandamide.

O.V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

1. Devane W. A., Hanus L., Breuer A. et al. // *Science*. 1992. **258**. P. 1946—1949.
2. Felder Ch., Briley E. M., Axelrod J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. **90**. P. 7656—7660.
3. Schmid H. H. O., Schmid P. C., Natarajan V. // *Chem. Phys. Lipids*. 1996. **80**. P. 133—142.
4. Skaper, S. D., Buriani, A., Dal Toso, R. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (1996 Apr 30). **93(9)**. P. 3984—3989.
5. Gulaya N. M., Kuzmenko A. I., Margitich V. M., et al. // *Chem. Phys. Lipids*. 1998. **97**. P. 49—54.
6. Gulaya N. M., Melnik A. A., Balkov D. I., et al. // *Biochim. et biophys. acta*. 1993. **1152**. P. 280—288.
7. Гулая Н. М., Бабич Л. Г., Шлыкков С. Г. и др. // *Укр. біохім. журн.* 1997. **69**, № 5—6. С. 75—84.
8. Ropuszynsky S. // *Przem. Chem.* 1969. **48**, N 1. P. 22—24.
9. Arida V. P. // *Phillp. J. Coconut Study*. 1979. **4**, N 3. P. 17—24. *CA* **92**:112621j.
10. Ranny M., Prachar J. // *Promysl. Potrav. 1961*. **12**. P. 520—523. *CA* **56**:3581b.
11. Schmid H. H. O., Schmid P. C., Natarajan V. // *Prog. Lipid Res.* 1990. **29**. P. 1—43.

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

Одержано 01.05.99