

## 双羟基脂肪酸异构体的合成及谱学特征\*

李 珍<sup>1</sup>, 杨得坡<sup>2</sup>, COLIN DUKE<sup>3</sup>, 董文其<sup>1</sup>

(1. 南方医科大学生物制药系, 广东 广州 510515;

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006;

3. 悉尼大学药学院, NSW2006, 澳大利亚)

**摘要:** 以共轭亚油酸甲酯为原料, 与  $\text{SeO}_2$  反应, 经可能的新的反应机制合成了 4 个新的双羟基衍生物, 分别是 9, 10 (erythro)-双羟基-11 $E$ -十八碳烯酸甲酯, 10, 11 (erythro)-双羟基-12 $E$ -十八碳烯酸甲酯, 11, 12 (erythro)-双羟基-9 $E$ -十八碳烯酸甲酯和 12, 13 (erythro)-双羟基-10 $E$ -十八碳烯酸甲酯, 采用半制备正相高效液相色谱进行分离纯化, 用 LC/MS-MS 和 NMR 对化合物结构进行鉴定, 分析化合物的化学位移变化规律和质谱裂解规律, 阐明其谱学特征。

**关键词:** 共轭亚油酸; 双羟基衍生物; 反应机制; 谱学特征

中图分类号: O621.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2011)05-0075-04

## Synthesis and MS/NMR Characterization of the Isomers of Di-hydroxylated Fatty Acid

LI Zhen<sup>1</sup>, YANG Depo<sup>2</sup>, COLIN DUKE<sup>3</sup>, DONG Wenqi<sup>1</sup>

(1. Faculty of Biopharmaceutical Sciences, Southern Medicine University, Guangzhou 510515, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

3. Faculty of Pharmacy, University of Sydney, NSW 2006, Australia)

**Abstract:** Four di-hydroxy derivatives, including methyl ester of erythro-12, 13-dihydroxy-10 $E$ -octadecenoic acid, erythro-11, 12-dihydroxy-9 $E$ -octadecenoic acid, erythro-10, 11-dihydroxy-12 $E$ -octadecenoic acid and erythro-9, 10-dihydroxy-11 $E$ -octadecenoic acid, were synthesized from methyl ester of conjugated linoleic acid by the reaction of CLA methyl ester with  $\text{SeO}_2$ . The products were purified by semi-normal-phase high-performance liquid chromatography and their chemical structures were characterized by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR).

**Key words:** conjugated linoleic acid; di-hydroxylated derivatives; reaction mechanism; characterization

共轭亚油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 是一类天然来源的功能性脂肪酸, 其主要的活性异构体是 9 $Z$ , 11 $E$ -CLA 和 10 $E$ , 12 $Z$ -CLA<sup>[1]</sup>。它们具有多种重要的生理功能, 如抗肿瘤、抗氧化、提高机体免疫力、减肥增肌、促进骨生长等<sup>[2]</sup>。近年来, 尤其是 CLA 防癌抗癌方面的活性, 备受国内

外学者关注。最新国外研究报道<sup>[3]</sup>, 在双键的邻位引入羟基 (-OH) 基团, 对抗肿瘤活性能起到一个增效的作用。因此, 对其进行结构修饰和改造, 是开发新药的一条重要研究途径。本文采用一种快速、便捷的化学方法合成羟基脂肪酸, 得到了 4 个新的双羟基衍生物。通过对化合物的 NMR 和 MS

\* 收稿日期: 2011-01-17

基金项目: “985 工程” 国际合作基金资助项目 (第三期)

作者简介: 李珍 (1981 年生), 女, 讲师; 通讯作者: 董文其; E-mail: dongwq63@263.net

数据分析, 揭示它们的化学位移变化规律和质谱裂解规律, 阐明其谱学特征, 为双羟基脂肪酸异构体的结构鉴定提供参考。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

美国 Finnigan 公司 Mat TSQ7000 液相色谱-质谱联用仪, 美国 Palo Alto 公司 300 MHz Varian 核磁共振仪, 美国 Beckman 公司半制备高效液相色谱仪。

共轭亚油酸甲酯 ( $\phi = 95\%$ ), 为中山 UNICA-RE 公司生产;

叔丁基过氧化氢溶液 ( $\phi = 70\%$ ), 二氧化硒, DMSO, 正己烷, 二氯甲烷, 乙酸乙酯, 甲醇, 乙醇, 盐酸, 无水硫酸钠等试剂均为分析纯。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 化学合成方法** 在 50 mL 的圆底烧瓶中加入一定量的  $\text{SeO}_2$ , 10 mL 二氯甲烷和适量的 TBHP 溶液在一定温度下搅拌半小时 (600 r/min), 缓慢加入等摩尔比的共轭亚油酸甲酯, 反应 24 h。反应结束后, 加入  $\phi = 10\%$  NaCl 溶液洗涤 2 次, 收集二氯甲烷层, 用旋转蒸发器挥去溶剂, 即得到淡黄色的油状物 a。

**1.2.2 分离纯化方法** 样品溶液的配制: 用正己烷将淡黄色的油状物 a 溶解, 配成浓度为 100 mg/mL 的溶液供半制备色谱分析。半制备 HPLC 色谱条件: Alltech 硅胶柱 (250 mm  $\times$  100 mm  $\times$  10  $\mu\text{m}$ ), 流动相为正己烷/异丙醇 (体积比为 98/2); 流速 8 mL/min; 检测器: 示差折光检测器; 进样量 150  $\mu\text{L}$ 。

**1.2.3 结构鉴定方法** LCMS/MS 分析: LCMS/MS (Finnigan/Mat TSQ7000), Alltech ODS 毛细管柱 (2.1 mm  $\times$  150 mm), 流动相: 40 min 内从  $\phi = 40\%$  乙腈 ( $\phi = 60\%$  水;  $\phi = 0.5\%$  甲酸) 变化到  $\phi = 100\%$  乙腈 ( $\phi = 0.5\%$  甲酸)。Bruker BioApex Fourier transform mass spectrometer ESI-MS。正离子 ESI 模式分析脂肪酸甲酯, 负离子 ESI 模式分析脂肪酸。

$^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 分析: 300 MHz Varian Gemini 300 spectrometer NMR (Palo Alto California, USA), 试剂:  $\text{CDCl}_3$  (Sigma-Aldrich, USA)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应机制

本文首次将  $\text{SeO}_2$  应用于共轭亚油酸甲酯催化

合成双羟基脂肪酸甲酯, 共轭亚油酸甲酯与  $\text{SeO}_2$  反应, 其产物为: 9, 10 (erythro)-双羟基-11E-十八碳烯酸甲酯 (3), 10, 11 (erythro)-双羟基-12E-十八碳烯酸甲酯 (4), 11, 12 (erythro)-双羟基-9E-十八碳烯酸甲酯 (5) 和 12, 13 (erythro)-双羟基-10E-十八碳烯酸甲酯 (6), 如图 1 所示。

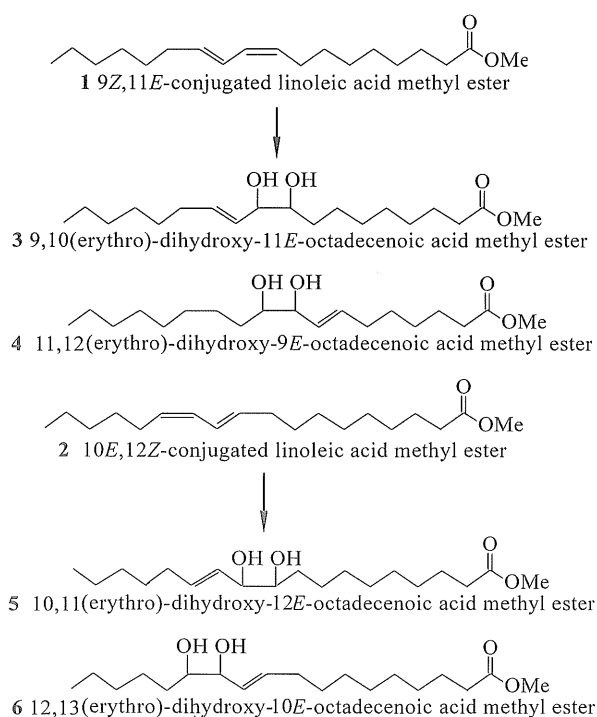


图 1 共轭亚油酸甲酯与  $\text{SeO}_2$  的合成反应

Fig. 1 Synthetic scheme of CLA methyl ester with  $\text{SeO}_2$

由于采用  $\text{SeO}_2$  进行烯丙位加氧是一个经典的方法<sup>[4]</sup>, 本实验最初的目的是用  $\text{SeO}_2$  催化共轭亚油酸合成单羟基共轭亚油酸衍生物。令人感到意外的是, 当 CLA 甲酯与  $\text{SeO}_2/t\text{-BuOOH}$  反应 24 h 后, 得到了 Se 的复合物, 经硅胶柱层析时进行水交换反应, 最后得到 1, 2-双羟基脂肪酸衍生物。 $^1\text{H}$  NMR 数据显示有两组 1, 2-邻氧的质子共振位于  $\delta$  4.81, 4.45 和 4.28, 3.96 处, 过硅胶柱之后, 这两组峰的化学位移发生了变化, 并重叠成一组峰于  $\delta$  3.86, 3.44 处。

经文献检索发现<sup>[5]</sup>, 这是一类关于 1, 3-二烯与  $\text{SeO}_2$  反应产生 1, 2-和 1, 4-二醇产物的新的反应机理, 因此推测该反应的机理如图 2, 并通过反应产物得到了确认。

### 2.2 半制备 HPLC 分离纯化

分离结果如图所示, 通过收集峰 1, 2, 3, 峰

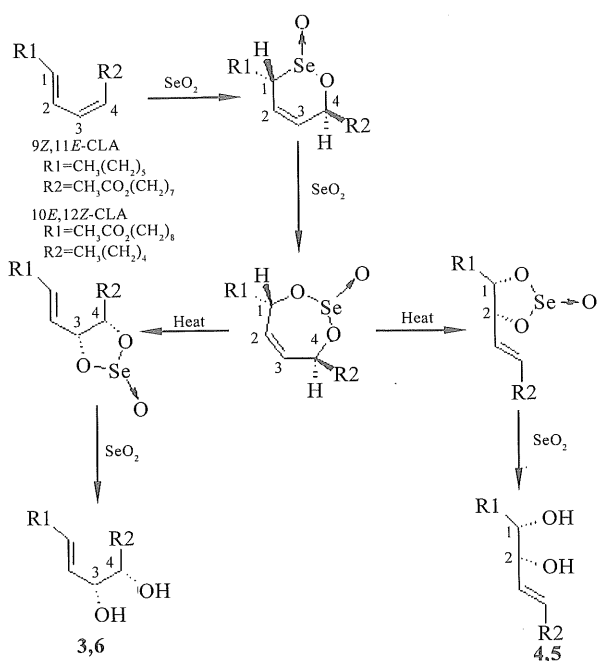


图 2 共轭亚油酸甲酯与 SeO<sub>2</sub> 的反应机理

Fig. 2 Mechanism of the reaction of CLA methyl ester and SeO<sub>2</sub>

1 为两个异构体 5, 6 的混合物, 峰 2 和 3 为纯度较高的化合物 3, 4 (图 3)。

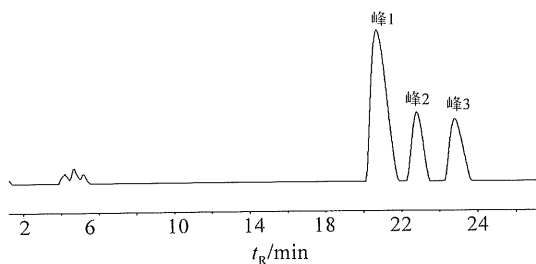


图 3 半制备-HPLC 分析结果

Fig. 3 The trace of semi- HPLC of mono-derivatives

### 2.3 产物结构鉴定及谱学特征

2.3.1 LC-MS/MS 分析 对的化合物 3, 4, 5, 6 进行 LC-MS/MS 分析。对化合物甲酯用 ESI (+) 没有得到分子离子峰, 而得到了 311 [M + 1 - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 的碎片离子峰。由于化合物甲酯正离子信号很弱, 无法得到更多的信息。因此对脂肪酸用 ESI (-) 模式, 得到了各化合物的分子离子峰, 如表 1 所示。化合物 3, 4, 5, 6 是一组几何异构体, 它们的出峰顺序是 6 = 5 > 4 > 3。

通过 MS/MS (-) 分析, 得到各化合物的特征碎片离子 m/z 如下:

6: 313, 295, 277, 213, 183, 129; 5: 313, 295, 277, 199, 169, 113; 4: 313, 295, 277, 215, 185, 127; 3: 313, 295, 277, 201, 171, 141。

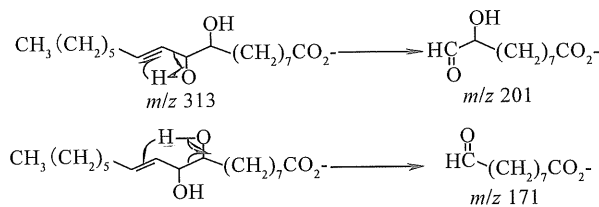
表 1 化合物的 LC-MS/MS 的分析结果

Table 1 LC-MS/MS analysis results of compounds

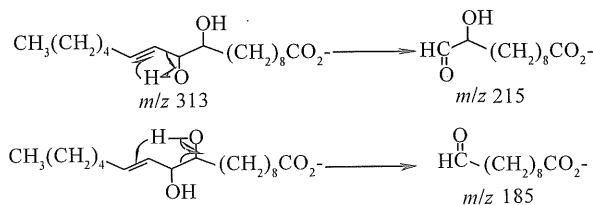
| 化合物 | T <sub>R</sub> /min | 纯度/% | 计算值 [M-1] <sup>-</sup> | 实验值 [M-1] <sup>-</sup> | θ/°C    |
|-----|---------------------|------|------------------------|------------------------|---------|
| 3   | 8.7                 | >97  | 313.238 4              | 313.238 1              | 67 ~ 69 |
| 4   | 8.4                 | 81.3 | 313.238 4              | 313.238 2              | 72 ~ 75 |
| 5   | 8.3                 | /    | 313.238 4              | 313.237 5              | /       |
| 6   | 8.3                 | /    | 313.238 4              | 313.237 5              | /       |

由此推测化合物的裂解机理如下

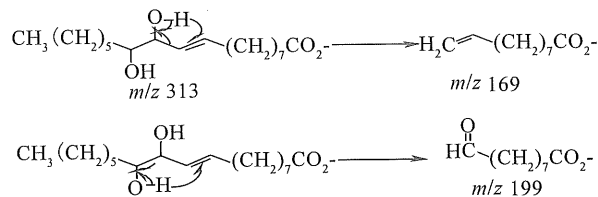
3:



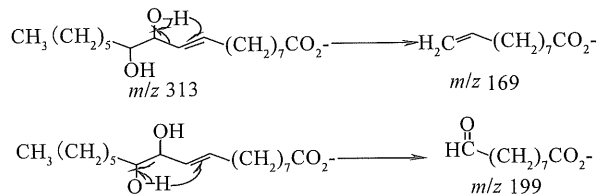
4:



5:



6:



各个化合物<sup>1</sup>H NMR 和<sup>13</sup>C NMR 数据如下。

化合物 (3): 产率 >98%, solid, θ<sub>mp</sub> 39 ~ 40 °C。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 5.76 (dt, J = 15.4, 6.0 Hz, 1H, H-12), 5.44 (ddt, J = 15.4, 7.2, 1 Hz, 1H, H-11), 3.86 (t, J = 6.9 Hz, 1H, H-10), 3.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.43 (m, 1H, H-9), 2.30 (m, 2H, H-2), 2.05 (m, 2H, H-13),

1.72-1.17 (m, 20H), 0.88 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H, H-18)。

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$ : 174.2 (C-1), 135.0 (C-11), 129.3 (C-12), 76.3 (C-10), 74.8 (C-9), 51.3 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 34.1 (C-2), 33.0, 32.3, 31.4, 29.6, 29.3, 29.2, 29.0, 28.8, 25.6, 25.0 (C-16, 15, 14, 13, 8, 7, 6, 5, 4, 3), 22.5 (C-17), 13.0 (C-18)。

化合物(4): 产率 >98%, solid,  $\theta_{\text{mp}}$  36-38 °C。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 5.75 (dt,  $J = 15.6, 6.4$  Hz, 1H, H-13), 5.44 (ddt,  $J = 15.6, 7.2, 1$  Hz, 1H, H-12), 3.85 (t,  $J = 6.6$  Hz, 1H, H-11), 3.67 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.42 (m, 1H, H-10), 2.30 (t, 2H, H-2), 2.05 (m, 2H, H-14), 1.71-1.14 (m, 20H, ), 0.89 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H, H-18)。

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$ : 174.2 (C-1), 134.9 (C-12), 129.4 (C-13), 76.0 (C-11), 74.8 (C-10), 51.3 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 34.1 (C-2), 33.0, 32.3, 31.7, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.8, 25.5, 24.9 (C-16, 15, 14, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3), 22.5 (C-17), 14.0 (C-18)。

由数据分析, 不饱和双键上的两个氢原子的偶合常数为  $J = 15.6$  Hz, 推测不饱和双键为反式 (E) 构型。接羟基的两个氢原子的偶合常数为  $J = 6.9$  Hz, 推测为赤式 (erythro) 构型, 并且按照 1, 3-共轭双键与  $\text{SeO}_2$  的反应机理也可以推测产物都为赤式构型<sup>[5]</sup>。

### 3 结 论

$\text{SeO}_2$  是一种温和的氧化剂, 用  $\text{SeO}_2$  进行烯丙位加氧是一个经典的方法。本文将  $\text{SeO}_2$  扩展用于羟基脂肪酸的合成上,  $\text{SeO}_2$  与共轭亚油酸甲酯反应生成了 4 个新的双羟基衍生物。通过分析推测  $\text{SeO}_2$  与共轭亚油酸甲酯的反应是经一条新的 [4 + 2] 反应机理, 即 1, 3-共轭双烯在一定的反应条件下与  $\text{SeO}_2$  形成 Se 的环状复合物, 再进一步转化为 1, 2-双羟基化合物, 这与我们传统认为 1, 3-共轭双烯与  $\text{SeO}_2$  反应生成 1, 4-双羟基化合物的结论完全不同, 这就为今后  $\text{SeO}_2$  进行烯丙位加氧反应的机理和产物的推测提供了重要的学术参考价值。

#### 参考文献:

- [1] PARIZA W, PARK Y, COOK M E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid [J]. *Prog Lipid Res*, 2001, 40: 283 - 298.
- [2] CAMPBELL B, KREIDER R B. Conjugated linoleic acids [J]. *Curr Sports Med Rep*, 2008, 7(4): 237 - 241.
- [3] RADIN NS. Meta-analysis of anticancer drug structures--significance of their polar allylic moieties [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2007, 7(2): 209 - 222.
- [4] KNOTHE G, BAGBY MO, WEISLEDER D. Fatty alcohols through hydroxylation of symmetrical alkenes with selenium dioxide/tertbutylhydroperoxide [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1995, 72, 1021 - 1026.
- [5] TRUC M N, DAESUNG L. Formation of syn 1,2- and 1,4-diols via a facile C-Se bond oxidation [J]. *Org Lett*, 2001, 20: 3161 - 3163.