



УДК 547.593.261'546.185

СИНТЕЗ ФОСФАТИДИЛ-*муко*-ИНОЗИТА

Шевченко В. И., Лазуркина Т. Ю., Молотковский Ю. Г.,
Бергельсон Л. Д.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Впервые осуществлен синтез 3-О-(1',2'-дистеаронил-*гас*-глицеро-3'-фосфорил)-*муко*-инозита, полученного в результате фосфорилирования хлорокисью фосфора 1,2; 4,5-ди-О-изопропилиден-6-О-ацетил-*муко*-инозита с последующей конденсацией с рацемическим 1,2-дистеаронилглицерином и удалением защитных групп кислотным гидролизом и гидразинолизом.

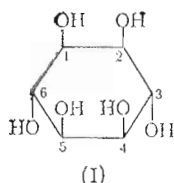
Хотя биологическая роль фосфоинозитидов до сих пор не выяснена, важность их функции не подлежит сомнению. На это указывает высокое содержание фосфоинозитидов во многих растительных и животных тканях (прежде всего в мозге и нервах) и их быстрый метаболизм (см. обзор [1]). Особенно интересна, по-видимому, роль фосфоинозитидов в процессах нервной проводимости: многочисленные авторы отмечают резкое увеличение включения ^{32}P в фосфоинозитиды нервных волокон после прохождения импульса [1].

Считается само собой разумеющимся, что в состав природных липидов входит только один из восьми изомерных инозитов — *мио*-инозит, хотя из животных тканей и их гидролизатов были выделены *цилло*-инозит [2—4], *хиро*-инозит [4], *нео*-инозит [5]; в растениях же и микробах найдены все инозиты, кроме *цис*-изомера (см., например, обзор [6]). Поскольку в подавляющем большинстве работ аналитические данные по фосфоинозитидам приводятся обычно без проверки конфигурации полной части молекулы, не исключено, что в состав фосфоинозитидов входят и другие инозиты; исследования в этом направлении не проводились.

В связи с этим мы предприняли синтез фосфоинозитидов, содержащих остатки стереоизомеров *мио*-инозита, имея в виду, что такие синтетические образцы облегчают поиск подобных соединений в природных источниках. Кроме того, эти вещества представляют интерес для исследования субстратной специфичности и механизма действия ферментных систем, участвующих в биосинтезе и метаболизме природных фосфоинозитидов.

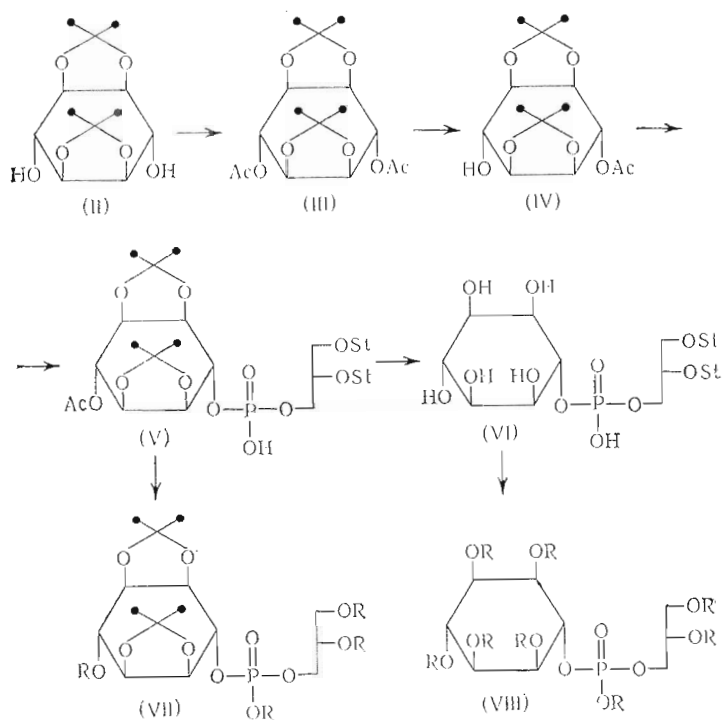
В настоящей работе мы описываем синтез одного из двух возможных изомеров фосфатидил-*муко*-инозита — 3-О-(1',2'-дистеаронил-*гас*-глицеро-3'-фосфорил)-*муко*-инозита (VI). *муко*-Инозит (I) — симметричный циклит, молекула которого содержит две пары равноценных оксигрупп в *цис*-

положении друг к другу (1,2; 4,5) и две другие равноценные оксигруппы (3,6) в *транс*-положении к остальным.



Он привлек наше внимание потому, что гексахлорциклогексан с аналогичным *муко*-инозиту расположением Cl-атомов (γ -гексахлорциклогексан, гаммексан) является сильным ингибитором некоторых процессов метаболизма фосфатидилинозита [7].

Для синтеза фосфатидил-*муко*-инозита в качестве исходного соединения мы использовали 1,2; 4,5-ди-О-изопропилиден-*муко*-инозит (II) [8] (см. схему). Исчерпывающее ацетилирование уксусным ангидридом в пиридине и последующее частичное деацетилирование гидразингидратом в этаноле



Синтез фосфатидил-*муко*-инозита

привели к образованию моноацетата (IV), который в результате фосфорилирования хлоркислотой фосфора и конденсации с рацемическим 1,2-дистеарилглицерином образовал производное фосфатидил-*муко*-инозита (V). После снятия кетальной защиты кислотным гидролизом и деацетилирования действием гидразингидрата в этаноле был получен синтетический фосфатидил-*муко*-инозит (VI), выделенный в виде аммониевой соли.

В инозитиде (VI) отношение жирные кислоты — фосфор составляло 1,92 : 1,00. Структура фосфатидил-*муко*-инозита (VI) была подтверждена газожидкостной хроматографией и масс-спектрометрией его октатриметилсилильного производного (VIII), полученного щелочным мета-

нолизом фосфолипида (VI) с последующим силилированием образовавшегося глицерофосфорил-*муко*-инозита. Триметилсилильное производное (VIII) отличалось от соответствующего производного глицерофосфорил-*мио*-инозита при ГЖХ, но имело совпадающий с ним масс-спектр [9, 10].

В защищенном фосфолипиде (V) отношение жирные кислоты — фосфор составляло 2,08 : 1,00. Это вещество было также подвергнуто деацилированию и затем превращено в тетракис-триметилсилильное производное (VII), охарактеризованное с помощью ГЖХ и масс-спектра $[M - 15]^+ = 687$.

Экспериментальная часть

Точки плавления определены на блоке Кофлера. Масс-спектры сняты на приборе LKB-9000 (Швеция). ГЖХ проводили на хроматографе «Руе-104» серии 24 (Англия) с пламенно-ионизационным детектором; для метиловых эфиров жирных кислот использовали колонку 2000×4 мм, заполненную 10% полиэтиленгликольсукцинатом на хромосорбе W, при 180° ; для триметилсилилированных фосфоглицериновых эфиров — колонку 1000×4 мм с 2,0% полисилоксана JXR, с программированием температуры (140 — 260°). ТСХ проводили на готовых пластинках фирмы «Eastman» (США) и на силикагеле без гипса фирмы «Woelm» (ФРГ) в системах растворителей: бензол — диоксан, 5 : 1 (А); хлороформ — метанол — конц. NH_4OH , 65 : 25 : 4 (Б); хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 50 : 25 : 8 : 4 (В); хлороформ — метанол — вода, 65 : 35 : 8 (Г); пятна обнаруживали сжиганием с конц. H_2SO_4 , а также реагентом Васильковского [11]. Для колоночной хроматографии использовали силикагель КСК (100—150 меш). 1,2,4,5-Ди-О-изопропилиден-*муко*-инозит (II) приготовлен как описано ранее [8]. 1,2-Дистеароил-*rac*-глицерин синтезировали по методу [12]. Соотношение жирные кислоты — фосфор определено по методу [10].

1,2,4,5-Ди-О-изопропилиден-3,6-ди-О-ацетил-*муко*-инозит (III). К раствору 94 мг дикетала (II) в 1 мл абс. пиридина при 0° добавили 0,5 мл уксусного ангидрида и оставили на ночь при 20° . Смесь разбавили метанолом и упарили в вакууме, остаток растворили в этилацетате, промыли 1 н. HCl , водой, насыщенным раствором NaHCO_3 , снова водой, высушили над Na_2SO_4 , отфильтровали и упарили в вакууме; остаток кристаллизовали из этилацетата — эфира, получили 120 мг (97%) хроматографически индивидуального (ТСХ в системе А) диацетата (III), т. пл. 109 — 110° . Найдено, %: С 55,86; Н 7,13. $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_8$. Вычислено, %: С 55,80; Н 7,03.

1,2,4,5-Ди-О-изопропилиден-6-О-ацетил-*муко*-инозит (IV). Раствор 117 мг диацетата (III) в 15 мл 96%-ного этанола обработали 50 мг гидразингидрата (3 сут при комнатной температуре). Смесь упарили, остаток хроматографировали на колонке с 10 г силикагеля в градиентной системе бензол — эфир (контроль ТСХ в системе А). Выделили 82 мг диацетата (III) и 26 мг моноацетата (IV) (85%, считая на вступивший в реакцию диацетат) в виде хроматографически чистого бесцветного масла. Вычислено: $(M - 15)^+ = 287,1110$. $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_7$. Найдено: 287,1127.

3-О-(1',2'-Дистеароил-*rac*-глицеро-3'-фосфорил)-1,2,4,5-ди-О-изопропилиден-6-О-ацетил-*муко*-инозит (V). К раствору 26 мг моноацетата (IV) в 5 мл абс. эфира при 0° прибавили 9 мкл хлорокиси фосфора и через 1 мин 7 мкл пиридина, смесь выдержали 5 ч при 20° , затем добавили 57,2 мг 1,2-дистеароил-*rac*-глицерина, 0,01 мл пиридина, а через 3 ч еще 1 мл пиридина и оставили на ночь. Затем эфир отогнали в токе аргона, смесь выдержали 1 ч при 50° , упарили в вакууме, остаток растворили в хлороформе, промыли водой, 1 н. HCl , водой, 1 н. NaHCO_3 , водой (фазы разделяли центрифугированием) и упарили. Остаток нанесли на колонку с 10 г силикагеля, элюировали 100 мл смеси бензол — эфир (3 : 1), затем градиентной системой хлороформ против смеси метанол — конц. NH_4OH

(19 : 1) до соотношения компонентов 3 : 1. Состав фракций контролировали ТСХ в системе Б. Получили 33,1 мг (38%) аммониевой соли фосфодиэфира (V) в виде белого воскообразного вещества, нерезко плавящегося при 70—75° (смакает около 50°). Найдено, %: P 3,0. C₅₃H₁₀₀O₁₄PN. Вычислено, %: P 3,1.

3-О-(1',2'-Дистеароил-гас-глицеро-3'-фосфорил)-муко-инозит (фосфатидил-муко-инозит) (VI). Раствор 20 мг diketала (V) в 20 мл 80%-ного CH₃COOH выдержали 5 ч при 50° и упарили в вакууме. Остаток растворили в 30 мл смеси этанол — вода (10 : 1), прибавили 10 мг гидразин-гидрата и перемешивали 12 ч при 20°. Добавили к смеси каплю CH₃COOH и упарили в вакууме, остаток хроматографировали на 6 г силикагеля в системе хлороформ — метанол — конц. NH₄OH (см. выделение фосфата (V)). Состав фракций контролировали ТСХ в системе В. Получили 8,8 мг (50%) аммониевой соли фосфатидил-муко-инозита в виде бесцветного порошка, т. пл. 183—185° (с разл., смакает около 90°). Вещество хроматографически однородно в системах В (R_f 0,53) и Г (R_f 0,49). Найдено, %: P 3,7. C₁₃H₂₀O₁₃PN. Вычислено, %: P 3,5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Michell R. H. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **415**, 81—147.
2. Sherman W. R., Stewart M. A., Kurien M. M., Goodwin S. L. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, **158**, 197—205.
3. Seemark R. F., Tate M. E., Smeaton T. C. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 2424—2428.
4. Hipps P. P., Holland W. H., Sherman W. R. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1903—1908.
5. Sherman W. R., Goodwin S. L., Gunnell K. D. (1971) *Biochemistry*, **10**, 3491—3499.
6. Posternak Th. (1966) in *Cyclitols and Phosphoinositides* (Kindl, H., ed.), pp. 31—40, Pergamon Press, Oxford.
7. Hokin M. R., Brown D. F. (1969) *J. Neurochem.*, **16**, 475—481.
8. Angyal S. J., Hoskinson R. M. (1962) *J. Chem. Soc.*, 2985—2991.
9. Cicero T. J., Sherman W. J. (1971) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **42**, 428—433.
10. Shevchenko V. P., Tsirenina M. L., Molotkovsky Jul. G., Bergelson L. D. (1975) *Chem. Phys. Lipids*, **15**, 95—104.
11. Vaskovsky V. F., Kostetsky E. J. (1968) *J. Lipids Res.*, **9**, 396.
12. Sowden J. C., Fischer H. O. (1941) *J. Amer. Chem. Soc.*, **63**, 3244—3249.

Поступила в редакцию
29.XII.1975

SYNTHESIS OF PHOSPHATIDYL MUCO-INOSITOL

SHEVCHENKO V. P., LAZURKINA T. Yu., MOLOTKOVSKY Jul. G.,
BERGELSON L. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The synthesis of 3-O-(1',2'-distearoyl-*rac*-glycero-3'-phosphoryl)-*muco*-inositol was accomplished, which involves phosphorylation of 1,2:4,5-di-O-isopropylidene-6-O-acetyl-*muco*-inositol with phosphorus oxychloride followed by condensation with racemic 1,2-distearoyl glycerol and subsequent removal of protective groups by acidic hydrolysis and hydrazinolysis.