



УДК 547.593.261'118

СИНТЕЗ ФОСФАТИДИЛ-*сцилло*-ИНОЗИТА

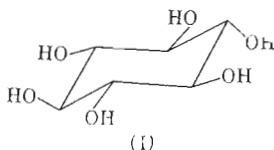
Шевченко В. П., Лазуркина Т. Ю., Молотковский Ю. Г.,
Бергельсон Л. Д.

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

Из *DL*-1,4,5,6-тетра-*O*-бензил-3-*O*-бензоил-*мио*-инозита окислением с помощью CrO_3 получен соответствующий кетон, после боргидридного восстановления которого был получен *DL*-1,2,3,4-тетра-*O*-бензил-5-*O*-бензоил-*сцилло*-инозит. Конденсация последнего с 1,2-дистеароил-*гас*-глицерофосфатом в присутствии триизопропилбензол-сульфохлорида и удаление защитных групп привели к 1-*O*-(1,2-дистеароил-*гас*-глицеро-3-фосфорил)-*сцилло*-инозиту.

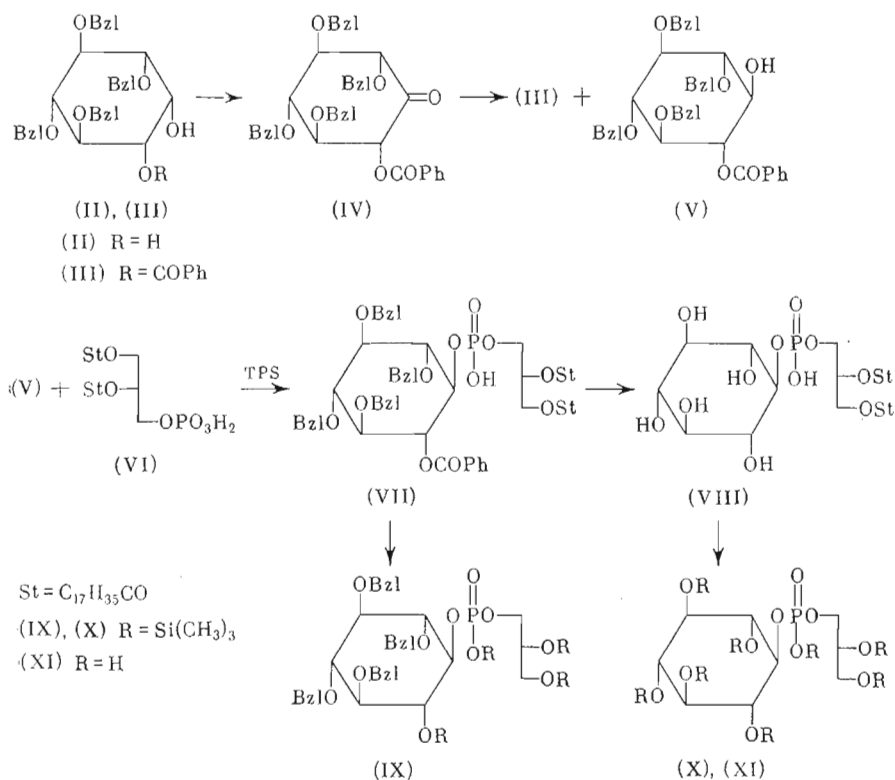
Как известно, в составе природных фосфатидилинозитов найден только *мио*-инозит, однако не исключено присутствие в них и других инозитов (при обычных методах анализа полярных компонентов липидов изомерные инозиты неотличимы друг от друга). Для изучения свойств таких фосфоинозитидов, а также для получения субстратов, необходимых для исследования метаболизирующих фосфоинозитиды ферментов, мы предприняли синтез ряда фосфатидилинозитов, содержащих циклиты, изомерные *мио*-инозиту. В предыдущем сообщении мы описали получение фосфатидил-*муко*-инозита [1]. В настоящей работе описывается синтез фосфатидил-*сцилло*-инозита (1-*O*-(1,2-дистеароил-*гас*-глицеро-3-фосфорил)-*сцилло*-инозита) (VIII).

Характерная особенность *сцилло*-инозита (I) состоит в том, что все гидроксильные группы этого гексита равноценны и находятся в *транс*-положении друг к другу. Он был обнаружен в ряде источников животного и растительного происхождения [2—5], однако его биологическая роль остается неясной.



Для получения производного *сцилло*-инозита мы окислили хромовым ангидридом в уксусной кислоте *DL*-1,4,5,6-тетра-*O*-бензил-3-*O*-бензоил-*мио*-инозит (II), полученный из *DL*-1,4,5,6-тетра-*O*-бензил-*мио*-инозита (I) [6]; образовавшийся кетон (IV) был восстановлен в смесь *DL*-1,2,3,4-тетра-*O*-бензил-5-*O*-бензоил-*сцилло*-инозита (V) и исходного *мио*-изомера (II). Среди испытанных восстанавливающих агентов (амальгама натрия в спирте, алюмогидрид лития и боргидрид натрия) последний дал лучшие

результаты: соотношение *мио*- и *цилло*-изомеров в смеси продуктов реакции составляло 3 : 2; *цилло*-изомер (V) был выделен с выходом 30% (продукты реакции анализировали с помощью ГЖХ после превращения их в смесь гексаацетатов).



Препаративно *цилло*-изомер (V) выделен кристаллизацией и хроматографированием на силикагеле, образец его был превращен в известный гексаацетат *цилло*-инозита [7].

Конденсация эфира (V) с 1,2-дистеароил-*гас*-глицерофосфатом (VI) [8] в присутствии триизопропилбензолсульфохлорида (TPS) с выходом 29% привела к производному фосфатидил-*цилло*-инозита (VII). В результате удаления бензильных групп гидрогенолизом над палладием и последующего дебензоилирования действием гидразингидрата в этаноле был получен фосфатидил-*цилло*-инозит (VIII), выделенный в виде аммониевой соли.

В синтезированном инозитиде (VIII) соотношение жирные кислоты — фосфор составляло 2 : 0,95. Структура соединения (VIII) была подтверждена масс-спектром его октакис-триметилсилильного производного (X), полученного щелочным метанолизом липида (VIII) с последующим силилированием образовавшегося *гас*-глицеро-1-фосфорил-*цилло*-инозита (XI), как описано для соответствующего *мио*-производного [9, 10]. Оба триметилсилильных производных отличались друг от друга при ГЖХ (*мио*-изомер выходит при 236°, *цилло*-— при 227° в условиях, описанных в работе [1]).

В защищенном фосфолипиде (VII) соотношение жирные кислоты — фосфор составляло 2 : 0,97. Это вещество было также подвергнуто дезацилированию и затем превращено в тетракис-триметилсилильное производное (IX), охарактеризованное с помощью масс-спектрометрии.

Экспериментальная часть

Точки плавления определены на блоке Кофлера. Масс-спектры сняты на приборе LKB-9000 (Швеция); масс-спектрометрирование высокого разрешения проводили на приборе MS-9 (Англия), ГЖХ — на хроматографе Pye 104, серия 24 (Англия), с пламенно-ионизационным детектором. Условия анализа метиловых эфиров жирных кислот и триметилсилильных производных глицерофосфоинозитов описаны ранее [1]. Для ТСХ применяли силикагель КСК (фракция менее 150 меш) с добавкой 6% гипса и силикагель без гипса фирмы Woelm (ФРГ); системы растворителей: бензол — эфир, 6 : 1 (А); хлороформ — метанол — конц. NH_4OH , 90 : 10 : 1 (Б); хлороформ — метанол — конц. NH_4OH — вода, 65 : 25 : 4 : 4 (В); хлороформ — метанол — вода, 65 : 35 : 8 (Г); обнаружение веществ на пластинках — обугливанием с конц. H_2SO_4 , для фосфолипидов — также специфическим реагентом [11]. Для колоночной хроматографии использовали силикагель КСК (100—150 меш). DL-1,4,5,6-Тетра-О-бензил-мио-инозит (II) приготовлен как описано ранее [6]. 1,2-Дистеароил-гас-глицерофосфат (VI) синтезирован по методу [8].

DL-1,4,5,6-Тетра-О-бензил-3-О-бензоил-мио-инозит (III). К раствору 1 г тетраэфира (II) в 10 мл пиридина при -5° прибавляли 0,27 мл хлористого бензола и оставляли на 40 ч при комнатной температуре. Смесь разбавляли эфиром, промывали 1 н. HCl , водой, насыщ. NaHCO_3 , снова водой, высушивали MgSO_4 , фильтровали и упаривали в вакууме; остаток кристаллизовали из кипящего метанола, затем из эфира — петр. эфира, получали 900 мг (84%) хроматографически чистого (ТСХ в системе А) монобензоата (III), т. пл. $143-145^\circ$. $M - 91\ 553,2231$; $M\ 644,2740$. $\text{C}_{41}\text{H}_{40}\text{O}_7$. Вычислено $M\ 644,2774$; $M - 91\ 553,2226$.

DL-1,4,5,6-Тетра-О-бензил-3-О-бензоил-цилло-инозит (V). К раствору 600 мг бензоата (III) в 35 мл ацетона и 20 мл CH_3COOH при 30° добавляли 1,2 мл окисляющей смеси (раствор 6,85 г CrO_3 и 5 мл конц. H_2SO_4 в 20 мл воды), смесь перемешивали 2 ч, добавляли 1 г NaHCO_3 , фильтровали, фильтрат упаривали; остаток кристаллизовали из хлороформа — эфира, получали 450 мг неочищенной инозоxy (IV). К раствору 280 мг последней в 6 мл смеси диоксан — метанол (1 : 1) при -5° прибавляли раствор 50 мг NaNH_4 в метаноле, смесь оставляли на 18 ч при 0° , добавляли HCOOH и упаривали в вакууме, остаток растворяли в 20 мл этилацетата, промывали водой до нейтральной реакции, сушили Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали. Полученная смесь, по данным ТСХ в системе А, содержала два основных компонента: производное мио-инозита (II) с $R_f\ 0,7$ и его *цилло*-изомер (V) ($R_f\ 0,6$). Смесь кристаллизовали из метанола — эфира при 0° , кристаллы (200 мг) хроматографировали на колонке с 30 г силикагеля в градиенте бензол — эфир (контроль фракций с помощью ТСХ в системе А), получали 84 мг (30%) производного *цилло*-инозита (V), т. пл. $136-138^\circ$. $M - 91\ 553,2247$. $\text{C}_{41}\text{H}_{40}\text{O}_7 - \text{C}_7\text{H}_7$. Вычислено $M - 91\ 553,2226$; $M\ 644,2774$. 2 мг бензоата (V) растворяли в 0,2 мл смеси диоксан — метанол (1 : 4), обрабатывали 0,2 мл 1% метанольного KOH (1,5 ч при 40°) и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 0,2 мл смеси уксусный ангидрид — 70% HClO_4 (200 : 1) и оставляли на 24 ч при 20° . Смесь разбавляли 5 мл этилацетата, промывали водой, 1 н. NaHCO_3 , водой, сушили MgSO_4 и упаривали. Остаток кристаллизовали из хлороформа — эфира, затем метанола, получали 0,3 мг гексаацетата *цилло*-инозита с т. пл. $345-348^\circ$; лит. данные [7]: т. пл. 352° . При ГЖХ (180° , колонка 2000×4 , заполненная 3% SE-30 на 80/100 хромосорбе W, скорость газ-носителя, Ar, 40 мл/мин) отношение удерживаемых объемов гексаацетатов *цилло*-инозита и мио-инозита — 1,32.

DL-2-О-(1,2-Дистеароил-гас-глицеро-3-фосфорил)-1,4,5,6-тетра-О-бензил-3-О-бензоил-цилло-инозит (VII). Смесь 30 мг бензоата (V), 20 мг 1,2-дистеароил-гас-глицерофосфата (VI) и 24 мг трипропилбен-

золсульфохлорида в 0,5 мл пиридина выдерживали 1 ч при 70° и 5 ч при комнатной температуре (контроль реакции — ТСХ в системе Б). Реакционную массу выливали в 5 мл воды со льдом и оставляли на ночь, затем экстрагировали CHCl_3 . Экстракт промывали 1 н. HCl , водой, 1 н. NaHCO_3 , водой (фазы разделяли центрифугированием) и упаривали. Фосфодиэфир (VII) очищали препаративной ТСХ в системе Б; на пластинке после высушивания в токе воздуха и опрыскивания водой видны две основные зоны. Верхнюю (R_f 0,6—0,7) отделяли и экстрагировали смесью хлороформ — метанол (2 : 1), получали 11,2 мг (29%) хроматографически чистой аммониевой соли соединения (VII) в виде аморфного порошка. Найдено, %: P 2,2. $\text{C}_{80}\text{H}_{118}\text{O}_{14}\text{PN}$. Вычислено, %: P 2,3.

1-O-(1,2-Дистеароил-гас-глицеро-3-фосфорил)-сцилло-инозит (VIII). К раствору 4 мг производного (VII) в 5 мл CH_3COOH добавляли 10 мг Pd-черни, гидрировали 3 ч на протоке, добавляли 10 мг катализатора и гидрировали еще 7 ч (контроль — ТСХ в системе В). Смесь фильтровали, фильтрат упаривали, сушили 12 ч в вакууме над твердым KOH . Остаток растворяли в 2 мл этанола, содержащего 0,3 мг гидразингидрата, и оставляли на 12 ч при комнатной температуре (контроль — ТСХ в системе В). К реакционной массе добавляли несколько капель CH_3COOH , упаривали, остаток кристаллизовали из хлороформа — метанола, получали 0,9 мг (35%) аммониевой соли фосфолипида (VIII) в виде бесцветного порошка, т. пл. 202—204° (с разл., смокает при 130°). Вещество хроматографически однородно в системах В (R_f 0,40) и Г (R_f 0,56). Соответствующие величины R_f фосфатидил-мио-инозита — 0,35; 0,53. Найдено, %: P 3,3. $\text{C}_{45}\text{H}_{90}\text{O}_{13}\text{PN}$. Вычислено, %: P 3,5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шевченко В. П., Лазуркина Т. Ю., Молотковский Юл. Г., Бергельсон Л. Д. (1976) Биоорг. химия, 2, 923—926.
2. Sherman W. R., Stewart M. A., Kurien M. M., Coodwin S. L. (1968) Biochim. et biophys. acta, 158, 197—205.
3. Seamark 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. Posternak Th. (1966) in Cylitolis and Phosphoinositides (Kindl H., ed.), pp. 31—40. Pergamon Press, Oxford.
6. Angyal S. J., Tate M. E. (1965) J. Chem. Soc., 6949—6955.
7. Posternak Th. (1941) Helv. chim. acta, 24, 1045—1053.
8. Baer E. (1951) J. Biol. Chem., 189, 235—247.
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. E., Kostetsky E. J. (1968) J. Lipids Res., 9, 396.

Поступила в редакцию
20.VII.1976

THE SYNTHESIS OF PHOSPHATIDYL-SCYLLO-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*

DL-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-3-*O*-benzoyl-*myo*-inositol gave after CrO_3 treatment the respective ketone which was reduced with NaBH_4 into the mixture of starting alcohol and its *scyllo*-isomer. The latter was condensed with 1,2-distearoyl-*rac*-glycero-3-(dihydrogen phosphate) in the presence of triisopropylbenzenesulfonyl chloride and formed phosphodiester which, by removing of protective groups, was transformed into title compound.