

Ю. Г. МОЛОТКОВСКИЙ, член-корреспондент АН СССР Л. Д. БЕРГЕЛЬСОН

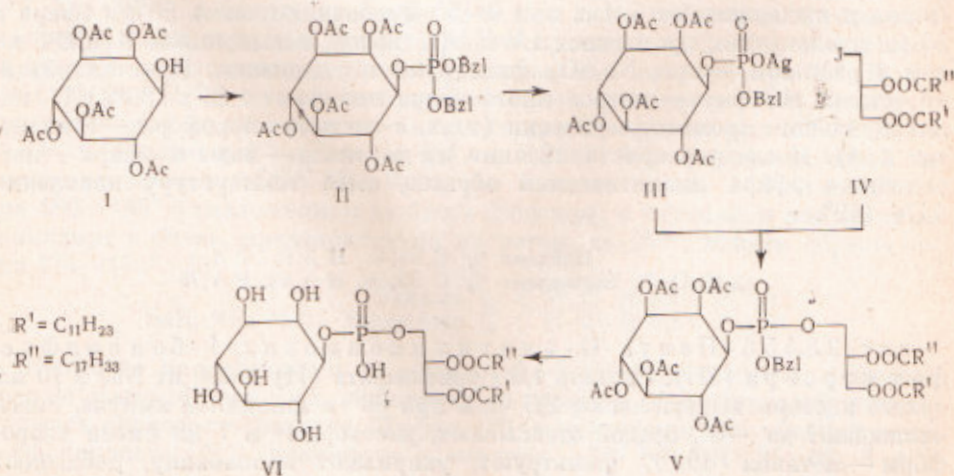
СИНТЕЗ НЕНАСЫЩЕННОГО ФОСФАТИДИЛИНОЗИТА

Фосфатидилинозит — один из важнейших фосфолипидов, присутствующий почти во всех животных и во многих растительных тканях. Особенно много фосфатидилинозита, наряду с полифосфоинозитами, в мозге и нервах.

Фосфатидилинозит играет существенную роль в организации и функции биологических мембран. Предполагается, что он участвует в регуляции проницаемости мембран⁽¹⁾, в процессах сокращения митохондрий⁽²⁾ и «обратного пиноцитоза»⁽³⁾, способствует ферментативному расщеплению фосфолипидов⁽⁴⁾.

Полный синтез фосфатидилинозита осложняется трудностью получения защищенных производных миоинозита со свободной оксигруппой в 1 положении. Поэтому Дэвис и Малкин, исходя из 1,3,4,5,6-пентаацетата миоинозита, смогли синтезировать лишь изомер природного фосфатидилинозита, в котором остаток фосфатидовой кислоты был присоединен к C₍₂₎ инозита⁽⁵⁾. Позднее Н. А. Преображенский и сотрудники синтезировали рацемический фосфатидилинозит природного типа из 1,4,5,6-тетраацетата инозита⁽⁶⁾. Однако этот синтез включает стадию гидролиза защитной фенильной группы, что делает его непригодным для получения фосфатидилинозитов с остатками ненасыщенных жирных кислот. Между тем именно ненасыщенные фосфатидилинозиты являются компонентами метаболически активных мембран и поэтому наиболее интересны для биохимических исследований.

Подробное изучение производных миоинозита Аньялом и сотрудниками существенно облегчило задачу синтеза фосфатидилинозита; полученный этими исследователями *rac*-2,3,4,5,6-пента-*O*-ацетилмиоинозит (I)⁽⁷⁾ мы и применили в качестве исходного вещества для синтеза ненасыщенного фосфатидилинозита.



Самым трудным моментом синтеза оказалось присоединение дибензилфосфатной группировки к пентаацетату миоинозита (I). Попытки провести эту реакцию действием дибензилхлорфосфата с пиридином или 2,6-лутидином и бис-*n*-нитробензилхлорфосфатом в присутствии имидазола не привели к желаемым веществам. Добиться необходимого результата удалось при последовательном действии на I хлорокиси фосфора с хинолином и затем бензилового спирта с пиридином; выход *rac*-1-дибензилфосфорил-2,3,4,5,6-пента-*O*-ацетилмиоинозита (II) составил 39%.

Отщепление одной бензильной группы действием иодистого натрия в ацетоне и превращение натриевой соли в серебряную привели к *rac*-2,3,4,5,6-пента-*O*-ацетилмиоинозит-1-бензилфосфату серебра (III), который был введен в реакцию с 1-лауроил-2-олеоил-*sn*-глицерин-3-иодгидрином (IV). Следует отметить, что конденсацию серебряной соли с иодгидрином удалось провести с удовлетворительным выходом лишь при длительном кипячении в толуоле. Образовавшийся трифосфат (V) после удаления бензильной группы иодистым натрием в ацетоне и последующего отщепления ацетильных групп гидразиолизом в этаноле дал *rac*-1-(1'-лауроил-2'-олеоил-*sn*-глицерил-3'-фосфорил)-миоинозит (фосфатидилинозит) (VI), аммониевая соль которого была выделена в виде бесцветного порошка с резкой температурой плавления.

Синтетический фосфатидилинозит по своему хроматографическому поведению оказался идентичным природному веществу, выделенному из дрожжей.

Экспериментальная часть

Температуры плавления определены на блоке Кюфлера и исправлены. Тонкослойная хроматография (т.с.х.) проводилась на силикагеле КСК (фракция менее 150 меш) с добавкой 5% гипса, пятна обнаруживались обугливанием с концентрированной H_2SO_4 ; для т.с.х. фосфатидилинозита использовался силикагель без связующего вещества (*) фирмы «Woelm». Для колоночной хроматографии был взят силикагель КСК (фракция 100—150 меш). *rac*-2,3,4,5,6-Пента-*O*-ацетилмиоинозит был получен по методу Аньяла и сотр. (7). 1-Лауроил-2-олеоил-*sn*-глицерин-3-иодгидрин, масло с $[\alpha]_D + 2,5^\circ$ ($C 9,4; CHCl_3$), был синтезирован по методу (8).

rac-1-Дибензилфосфорил-2,3,4,5,6-пента-*O*-ацетилмиоинозит (II). К раствору 0,72 г $POCl_3$ в 1 мл сухого хлороформа прибавляют при комнатной температуре за 30 мин. раствор 1,8 г *rac*-2,3,4,5,6-пента-*O*-ацетилмиоинозита (I) и 0,65 г хинолина в 5 мл сухого хлороформа, смесь оставляют стоять сутки, затем охлаждают до 5° и прибавляют за 30 мин. раствор 1,1 г бензилового спирта и 1 мл пиридина в 2 мл сухого хлороформа и выдерживают 5 час. при $0-5^\circ$. Разбавляют смесь 50 мл эфира и 50 мл этилацетата, промывают 1*N* H_2SO_4 , водой, насыщенным $KHCO_3$, водой и рассолом, сушат Na_2SO_4 , фильтруют и упаривают. Кристаллизацией остатка из эфира — петролейного эфира получают 1,16 г (39%) II, индивидуального хроматографически (т.с.х. в системе хлороформ — этилацетат 2:1). После перекристаллизации из метанола — воды и эфира — петролейного эфира аналитический образец имел температуру плавления $147-149^\circ$.

Найдено %: С 55,4; Н 5,6; Р 4,8
С₃₀H₄₅O₁₄P. Вычислено %: С 55,38; Н 5,42; Р 4,76

rac-2,3,4,5,6-Пента-*O*-ацетилмиоинозит-1-бензилфосфат серебра (III). Раствор 1,8 г трифосфата (II) и 450 мг NaI в 10 мл сухого ацетона выдерживают 2,5 часа при 80° в запаянной ампуле, смесь охлаждают до -5° , осадок отсасывают, растворяют в 7 мл смеси хлороформ — метанол 19:1, фильтруют, упаривают наполовину, добавляют

15 мл ацетона и выдерживают ночь при -5° . Осадок отсасывают, промывают холодным ацетоном и сушат над P_2O_5 , получают 1,4 г (87%) *rac*-2,3,4,5,6-пента-О-ацетилмиоинозит-1-бензилфосфата натрия, индивидуального по данным т.с.х. (система хлороформ — метанол — 7N NH_4OH 70 : 20 : 1,5), т. пл. 264—265°.

Найдено %: С 47,3; Н 5,2; Na + P 9,2
С₂₃H₂₈O₁₄NaP. Вычислено %: С 47,43; Н 4,85; Na + P 9,27

К раствору 1,52 г натриевой соли в 7 мл метанола прибавляют раствор 0,45 г $AgNO_3$ в 1 мл воды и 3 мл метанола, смесь разбавляют 20 мл ацетона и выдерживают ночь при 0° , выпавшую серебряную соль (III) отсасывают, получают 1,47 г бесцветного порошка, т. пл. 264—249° с разложением (при быстром нагреве $5-6^{\circ}$ в 1 мин.). Из маточного раствора выделяют еще 0,15 г III, общий выход 93%.

rac-1-(1'-Лауроил-2'-олеоил-*sn*-глицерил-3'-бензилфосфорил)-2,3,4,5,6-пента-О-ацетилмиоинозит (V). Смесь 700 мг 1-лауроил-2-олеоил-*sn*-глицерин-3-подгидрина (IV), 700 мг серебряной соли (III) и 5 мл сухого толуола кипятят в темноте 12 час. при интенсивном перемешивании, осадок AgJ отсасывают, фильтрат упаривают, остаток хроматографируют на колонке с 120 г силикагеля, применяя градиентное элюирование системой бензол — этилацетат. Контроль — т.с.х. в системе бензол — диоксан 4 : 1. Бензолом с 20—25% этилацетата вымывают 640 мг (56%) трифосфата в виде бесцветной смолообразной массы, $[\alpha]_D + 2,2^{\circ}$ (С 9,5, диоксан; снято на поляриметре «Hilger»).

Найдено %: С 62,4; Н 8,1; P 2,6
С₅₆H₈₀O₁₈P. Вычислено %: С 62,20; Н 8,29; P 2,87

rac-1-(1'-Лауроил-2'-олеоил-*sn*-глицерил-3'-фосфорил)-миоинозит (фосфатидилинозит) (VI). Трифосфат (V) (120 мг) дебензилируют действием NaJ в ацетоне (см. получение III), смесь упаривают в вакууме, остаток в хлороформе наносят на колонку с 4 г силикагеля, адсорбент промывают 20 мл хлороформа. Затем 15 мл смеси хлороформ — метанол 4 : 1 вымывают *rac*-1-(1'-лауроил-2'-олеоил-*sn*-глицерин-3'-фосфорил)-2,3,4,5,6-пента-О-ацетилмиоинозит, который растворяют в 5 мл 95% спирта, добавляют 40 мг гидразингидрата и оставляют на ночь при комнатной температуре. Подкисляют смесь CH_3COOH до рН 4, упаривают в вакууме; остаток, по данным т.с.х. в системе хлороформ — метанол — вода — 7N NH_4OH 130 : 70 : 7 : 7, содержит 3 основных компонента: фосфатидилинозит и два менее полярных вещества, которые в дальнейшем не исследовались. Смесь хроматографируют на колонке с 15 г силикагеля в градиентной системе хлороформ — смесь метанол — 20% NH_4OH 9 : 1 (контроль с помощью т.с.х.). Во избежание возможного деацилирования вещества хроматографию проводят за 2—2,5 часа (подача элюента микропипеткой), элюаты упаривают в вакууме при 20° . Получают 40 мг (44%) аммониевой соли фосфатидилинозита (VI), которую кристаллизуют из хлороформа — ацетона при 0° и сушат при 20° / 0,05 мм над P_2O_5 . Бесцветный порошок с $[\alpha]_D + 2,3^{\circ}$ (С 0,3, хлороформ, снято на спектрополяриметре СПУ-М). Вещество смокает около 110° и плавится при $180-185^{\circ}$ с разложением на блоке Кофлера; в запаянном под аргоном капилляре в блоке, предварительно нагретом, до 150° , мениск образуется при $174-175^{\circ}$.

Найдено %: С 57,1; Н 9,6; P 3,8
С₅₉H₇₆NO₁₃·H₂O. Вычислено %: С 57,40; Н 9,63; P 3,80

Вещество не отличается от природного фосфатидилинозита, выделенного из дрожжей, при т.с.х. в системах (в качестве обнаружителей использовались периодат — реактив Шиффа ⁽¹⁰⁾ и специфический обнаружитель фосфолипидов ⁽¹¹⁾): хлороформ — метанол — 7N NH_4OH 35 : 60 : 5 ⁽¹²⁾

(R_f 0,64); хлороформ — метанол — вода — 7N NH_4OH 130 : 70 : 7 : 1 (R_f 0,35); хлороформ — метанол — вода 65 : 35 : 8 (R_f 0,42); хлороформ — метанол — вода — CH_3COOH 25 : 15 : 4 : 2 (R_f 0,50).

Институт химии природных соединений
Академии наук СССР
Москва

Поступило
23 III 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Kai, J. N. Hawthorne, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **165**, 761 (1969). ² P. M. Vignais, P. V. Vignais, A. L. Lehninger, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2011 (1964). ³ L. E. Hokin, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **165**, 695 (1969). ⁴ H. Weiss, H. E. Spiegel, E. Titus, *Nature*, **183**, 1393 (1959). ⁵ J. H. Davies, T. Malkin, *Chem. and Ind.*, **1959**, 1155. ⁶ А. В. Лукьянов, А. И. Лютик и др., *ДАН*, **165**, 121 (1965). ⁷ A. S. Angyal, M. H. Randall, M. E. Tate, *J. Chem. Soc.*, **1967**, 919. ⁸ V. P. Skipski, R. F. Peterson et al., *J. Lipid Res.*, **4**, 227 (1963). ⁹ G. H. de Haas, L. L. M. van Deenen, *Rec. trav. chim., Pays-Bas*, **80**, 951 (1961). ¹⁰ N. Shaw, *Biochim. et biophys. acta*, **164**, 435 (1968). ¹¹ V. E. Vaskovsky, E. Y. Kostetsky, *J. Lipid Res.*, **9**, 396 (1968). ¹² C. R. Bunn, B. B. Keele, G. H. Elkan, *J. Chrom.*, **45**, 326 (1969).