

Synthesen von Cholinphosphatiden, IV *)

O-Methylierte und *O*-acetylierte Lysolecithine

von Hans Ulrich Weltzien und Otto Westphal

Aus dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg

Eingegangen am 18. Mai 1967

Es werden einige einfache Synthesen für racemische 2-substituierte 1-Acyl-glycerin-phosphorsäure-(3)-cholinester (**1–4**) sowie der entsprechenden Diglycerid-Vorstufen (**5–8**) beschrieben.

Untersuchungen verschiedener Autoren^{2,3}) über die Wechselwirkung zwischen Lysophosphatiden und Zellmembranen bzw. Membranenzymen sowie die Frage nach dem Mechanismus der Cytolyse durch diese Substanzklasse waren für uns der Anlaß, einige membranfremde, *Lysolecithin-ähnliche Phospholipide* mit definierten Veränderungen gegenüber dem natürlichen L-Lysolecithin zu synthetisieren. In diesem Zusammenhang schien es uns von Interesse, durch die Blockierung der freien Hydroxylfunktion im Lysolecithin möglicherweise Aufschlüsse über die Rolle dieser funktionellen Gruppe für den Lyse-Mechanismus zu gewinnen. Wir erreichten dies einerseits durch Methylierung, andererseits durch Acetylierung des β -ständigen Hydroxyls am Glycerin. Die Methylierung sollte beispielsweise die enzymatische Acylierung zu Lecithin völlig blockieren, während die Acetylverbindung möglicherweise noch metabolisierbar ist. Unter dem gleichen Gesichtspunkt wurden „Desoxyätherlysolecithine,⁴) dargestellt, in denen die Fettsäure durch einen langkettigen *Alkylrest*, und das Glycerin-Grundgerüst durch Propandiol-(1.3) ersetzt sind. Entsprechende *Ester-desoxy-lysolecithine* werden von *Eibl* und *Westphal*⁵) beschrieben.

Zur Synthese sowohl der acetylierten wie der methylierten Phosphatide diene das Verfahren⁶) für die Darstellung von Lecithinen. Lediglich die Zwischenreinigung des

*) III. Mitteilung: *D. Arnold, H. U. Weltzien und O. Westphal*, Liebigs Ann. Chem. 709, 234 (1967), voranstehend.

1) Auszug aus der Dissertation *H. U. Weltzien*, Univ. Freiburg 1966.

2) *E. Mulder und L. L. M. van Deenen*, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 106, 348 (1965).

3) *P. G. Munder, E. Ferber und H. Fischer*, Z. Naturforsch. 20b, 1048 (1965).

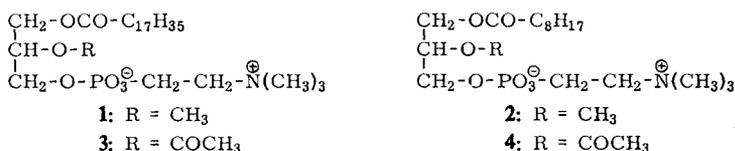
4) *D. Arnold*, Dissertation Univ. Freiburg 1966.

5) *H. Eibl und O. Westphal*, Liebigs Ann. Chem. 709, 244 (1967), nachstehend.

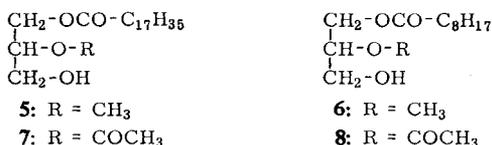
6) *H. Eibl, D. Arnold, H. U. Weltzien und O. Westphal*, Liebigs Ann. Chem. 709, 226 (1967), voranstehend.

nach der Phosphorylierung⁷⁾ anfallenden Glycerin- β -bromäthylphosphorsäureesters (vgl. Lit.⁶⁾) konnte wegen der teilweise erheblichen Wasserlöslichkeit der Verbindungen nicht mehr durch Extraktion mit Chloroform/Methanol/0,1*n* KCl, sondern mußte säulenchromatographisch an Kieselgel (Mallinckrodt) erfolgen.

Die anschließende Umsetzung mit Trimethylamin und erneute Chromatographie führte zu den analysenreinen und dünnschichtchromatographisch einheitlichen racemischen Verbindungen 1-Stearoyl-glycerin-methyläther-(2)-phosphorsäure-(3)-monocholinester (**1**), 1-Nonanoyl-glycerin-methyläther-(2)-phosphorsäure-(3)-monocholinester (**2**), 1-Stearoyl-2-acetyl-glycerin-phosphorsäure-(3)-monocholinester (**3**) und 1-Nonanoyl-2-acetyl-glycerin-phosphorsäure-(3)-monocholinester (**4**).



Die zur Phosphorylierung eingesetzten Diglyceride **5**–**8** konnten auf einfache Weise erhalten werden: **5** und **6** wurden durch Methylierung von 1,3-Benzylidenglycerin⁸⁾ mit Methyljodid und Silberoxid in Dimethylsulfoxid, anschließende



Hydrierung und Acylierung des entstandenen Glycerin-methyläthers-(2) mit Stearoyl- bzw. Nonanoylchlorid erhalten. Analog konnten wir **7** und **8** durch Acetylierung von Benzylidenglycerin⁹⁾, hydrogenolytische Entfernung der Schutzgruppe und partielle Acylierung mit Stearoyl- oder Nonanoylchlorid rein darstellen.

Eine bei **7** und **8** unter Umständen zu befürchtende Wanderung der Acetyl-Gruppe glauben wir auf Grund folgender Beobachtungen ausschließen zu können:

a) 1,2- und 1,3-Diglyceride lassen sich mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie gut nebeneinander nachweisen. Mit Petroläther/Äther (1 : 1) beispielsweise betragen die *R_F*-Werte für 1,2-Dinonanoyl-glycerin 0,4 und für das 1,3-Isomere 0,5. Bei unseren 2-Acetylderivaten **7** und **8** wurde dagegen mit den verschiedensten Laufmitteln stets nur ein einziger Fleck erhalten.

⁷⁾ R. Hirt und R. Berchtold, *Pharmac. Acta Helvetiae* **33**, 349 (1958) [C. A. **53**, 9282g (1959)].

⁸⁾ P. E. Verkade und J. D. Van Roon, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **61**, 836 (1940).

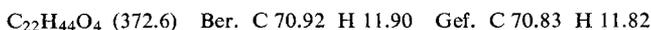
⁹⁾ L. Krabich und L. Borgström, *J. Lipid Res.* **6**, 156 (1965).

b) Bei der Behandlung des gemischten Lecithins **3** mit Phospholipase A aus Schlangengift (*crotalus adamanteus*) konnte dünn-schichtchromatographisch zwar „normales“ Stearo-Lysolecithin, nicht aber ein Acetyl-glycerinphosphorylcholin nachgewiesen werden.

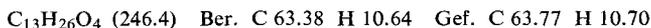
Beschreibung der Versuche

Glycerin-methyläther-(2) (vgl. Lit.¹⁰⁾. — 20 g (0.11 Mol) *1.3-Benzyliden-glycerin*⁸⁾ in 100 ccm Dimethylsulfoxid werden mit 75 g *Methyljodid* versetzt und unter Rühren 2 Stdn. auf 60° gehalten. Man engt i. Vak. ein, gießt in Wasser, filtriert vom ausgefallenen Silberjodid, extrahiert mit Äther und trocknet mit Natriumsulfat. Nach dem Abdampfen des Äthers wird der Rückstand mit Petroläther/Äther (6 : 4) an Kieselgel chromatographiert. Die so gereinigte Substanz wird mit 10-proz. *Palladium/Aktivkohle* bei 50° in Äthanol unter Normaldruck hydriert. Man erhält 5.1 g (46%) reinen *Glycerin-methyläther*, farbloses Öl. $n_D^{20} = 1.4486$ (Lit.¹⁰⁾ $n_D^{17} = 1.4505$.

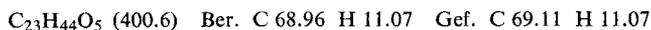
Racem. 1-Stearoyl-glycerin-methyläther-(2) (**5**). — 4.2 g (0.04 Mol) *Glycerin-methyläther-(2)* und 10 ccm trockenes *Pyridin* in 100 ccm Chloroform werden bei 0° mit 12 g (0.04 Mol) *Stearoylchlorid* in 50 ccm Chloroform versetzt. Nach 5 Stdn. bei Raumtemperatur wird mit 0.1 n HCl, Wasser und Bicarbonat gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das nach Eindampfen erhaltene Rohprodukt wird durch Chromatographie an Kieselgel mit Petroläther/Äther (6 : 4) gereinigt. Man erhält **5** als farblose, wachsartige Substanz. Ausbeute 8.0 g (67%); $R_F = 0.2$ auf Dünnschichtplatten mit Kieselgel G (Merck), Schicht 0.25 mm, Laufmittel: Petroläther/Äther (6 : 4).



Racem. 1-Nonanoyl-glycerin-methyläther-(2) (**6**). — Analog zu **5** mit *Nonanoylchlorid*; farbloses Öl, Ausbeute 60% d. Th. — $R_F = 0.18$ (wie oben).



Racem. 1-Stearoyl-2-acetyl-glycerin (**7**). — 2.7 g (0.02 Mol) *2-Acetyl-glycerin*¹⁰⁾ werden mit 6.1 g (0.02 Mol) *Stearoylchlorid*, wie für **5** beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Beim Waschen der Reaktionslösung sollte ein Ansäuern vermieden werden. Man erhält **7** als farblose, wachsartige Substanz. Ausbeute 4.6 g (57%). — $R_F = 0.28$ (wie oben) mit Petroläther/Äther (1 : 1).



Racem. 1-Nonanoyl-2-acetyl-glycerin (**8**). — 4.0 g (0.03 Mol) *2-Acetyl-glycerin* werden mit der äquimolaren Menge *Nonanoylchlorid*, wie oben beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhält **8** als farbloses Öl. Ausbeute 4.7 g (59%). — $R_F = 0.25$ (wie oben).

Racem. 1-Stearoyl-glycerin-methyläther-(2)-phosphorsäure-(3)-monocholinester (**1**). — 4.2 g (17 mMol) β -*Bromäthylphosphorsäuredichlorid*⁷⁾, 4.0 g (40 mMol) *Triäthylamin* und 3.0 g **5** (7 mMol) werden in 90 ccm Chloroform, wie beschrieben⁶⁾, zusammengegeben. Nach 40 Stdn.

¹⁰⁾ W. H. Davies, I. M. Heilbronn und E. W. Jones, J. chem. Soc. [London] **1934**, 1234.

bei Raumtemperatur wird 1 ccm Wasser zugesetzt und 2 Stdn. kräftig gerührt. Es wird i. Vak. eingengt und der Rückstand über P_2O_5 getrocknet. Man nimmt in absol. Benzol auf, filtriert vom ungelösten Ammoniumsalz, dampft i. Vak. ein und reinigt den braunen Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel (Mallinckrodt) mit Chloroform/Methanol (90:15). Ausbeute an *Glycerin-bromäthylphosphat*: 2.8 g (60%). $R_F = 0.7$ auf Dünnschicht mit Chloroform/Methanol (90:15).

500 mg dieses Zwischenproduktes werden mit 3 ccm trockenem *Trimethylamin* in 25 ccm Chloroform gelöst und 15 Stdn. bei Raumtemperatur belassen. Man erhitzt anschließend 3 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden und dampft i. Vak. ein. Der Rückstand wird in 40 ccm wasserhaltigem Methanol 30 Min. mit einem leichten Überschuß an Silberacetat gerührt. Das danach erhaltene halogenfreie Produkt wird an einer Säule mit 40 g Kieselgel (Merck, Darmstadt) mit $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ (65:25:4) chromatographiert und aus Chloroform/Aceton (1:4) umgefällt. Man erhält **1** als farblose Kristalle. Ausbeute 350 mg (70%, bez. auf *Glycerin-bromäthylphosphat* bzw. 44%, bez. auf **5**). — $R_F = 0.15$ auf Dünnschicht mit $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ (65:25:4).

$C_{27}H_{58}NO_8P^{11}$ (555.7) Ber. C 58.36 H 10.52 N 2.52 P 5.57
Gef. 58.08 10.56 2.58 5.60

Racem. 1-Nonanoyl-glycerin-methyläther-(2)-phosphorsäure-(3)-monocholinester (2). — 1.2 g (5 mMol) *Diglycerid 6* werden, wie für **1** beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Farblose, sehr hygroskopische Kristalle. Ausbeute 0.7 g (43%, bez. auf **6**). — $R_F = 0.13$ (wie oben).

$C_{18}H_{40}NO_8P^{11}$ (429.5) Ber. C 50.34 H 9.39 N 3.26 P 7.21
Gef. 50.34 9.36 3.23 7.15

Racem. 1-Stearoyl-2-acetyl-glycerin-phosphorsäure-(3)-monocholinester (3). — 1.0 g (2.5 mMol) *Diglycerid 7* werden, wie für **1** beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Farblose Kristalle. Ausbeute 0.55 g (38%, bez. auf **7**). — $R_F = 0.15$ (wie oben).

$C_{28}H_{58}NO_9P^{11}$ (583.8) Ber. C 57.61 H 9.95 N 2.40 P 5.31
Gef. 57.72 10.73 2.84 5.28

Racem. 1-Nonanoyl-2-acetyl-glycerin-phosphorsäure-(3)-monocholinester (4). — 1.5 g (6 mMol) *Diglycerid 8* werden, wie für **1** beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Farblose bis schwach gelbliche, etwas wachsartige Substanz (äußerst hygroskopisch). Ausbeute 0.8 g (32%, bez. auf **8**). — $R_F = 0.13$ (wie oben).

$C_{19}H_{40}NO_9P^{11}$ (457.5) Ber. C 49.88 H 8.81 N 3.06 P 6.77
Gef. 51.02 9.06 3.15 7.12

Physikochemische und chemische Eigenschaften: Die Lysolecithin-Analoga sind in Wasser, Chloroform oder Methanol leicht löslich. Die langkettigen Verbindungen **1** und **3** lassen sich mit Aceton umfällen, während die beiden kurzkettigen auch in diesem Lösungsmittel löslich sind. Alle Verbindungen sind schwerlöslich in Äther. **1** und **3** sind sowohl in ihrer Grenzflächenaktivität wie in ihrer hämolytischen Wirksamkeit mit natürlichem L-Lysolecithin vergleichbar. **2** und **4** setzen die Grenzflächenspannung von Wasser nur unwesentlich herab und zeigen keinerlei hämolytische Aktivität.

¹¹⁾ Monohydrat.