

Synthesen von Cholinphosphatiden, II¹⁾**¹⁴C-Markierte Lecithine und Lysolecithine**

von Hansjörg Eibl und Otto Westphal

Aus dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg

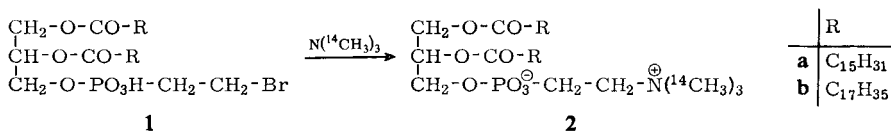
Eingegangen am 18. Mai 1967

Durch die Reaktion von Diacylglycerin- α -phosphorsäure- β -bromäthylestern (**1**) mit ¹⁴C-markiertem Trimethylamin erhält man in der Base radioaktiv markierte Lecithine (**2**), die mit Phospholipase A zu den entsprechenden ¹⁴C-markierten Lysolecithinen abgebaut werden können.

Die von uns beschriebene Synthese von Lecithinen¹⁾ ermöglicht eine einfache Darstellung in der Base ¹⁴C-markierter Lecithine und Lysolecithine. Ausgangsprodukte dazu waren Diacylglycerin- α -phosphorsäure- β -bromäthylester (**1**), die in Chloroform gelöst mit Trimethylaminhydrochlorid-¹⁴C und Triäthylamin versetzt wurden. In einer Gleichgewichtsreaktion:



bildet sich in der Lösung freies Trimethylamin-¹⁴C, das mit **1** unter Bildung von Lecithin (**2**) reagiert. Triäthylamin gibt unter den Bedingungen der Reaktion keine nachweisbare Umsetzung mit **1**.



Wir haben Dipalmito-L- α -lecithin-¹⁴C (**2a**) und Distearo-DL- α -lecithin-¹⁴C (**2b**) dargestellt. Neben unverändertem Trimethylaminhydrochlorid-¹⁴C, das zurückgewonnen werden konnte, fanden sich jeweils 50% der ursprünglichen ¹⁴C-Aktivität des Trimethylaminhydrochlorids in den Präparaten **2a** und **2b**. — Einwirkung von Phospholipase A aus *crotalus adamanteus* auf solche Lecithine führte in bekannter

¹⁾ I. Mitteilung: H. Eibl, D. Arnold, H. U. Weltzien und O. Westphal, Liebigs Ann. Chem. 709, 226 (1967), voranstehend.

Weise²⁻⁴⁾ zu den entsprechenden Lysolecithinen. Aus **2a** entsteht quantitativ 1-Palmito-L- α -lysolecithin-¹⁴C und aus **2b** ein Gemisch aus 1-Stearo-L- α -lysolecithin-¹⁴C und Distearo-D- α -lecithin-¹⁴C, die papierchromatographisch getrennt werden konnten.

Beschreibung der Versuche

Die Synthese von Distearo-DL- α -lecithin-¹⁴C gilt analog für die Darstellung von Dipalmito-L- α -lecithin-¹⁴C.

1,2-Distearoyl-glycerin-phosphorsäure-(3)-[mono-2-brom-äthyl-ester] (1b). — 2.5 g (10 mMol) β -Bromäthylphosphorsäuredichlorid⁵⁾, 2.5 g (25 mMol) wasserfreies Triäthylamin und 2 g (3.2 mMol) DL-1,2-Distearoyl-glycerin⁶⁾ in insgesamt 30 ccm absol. Chloroform werden in beschriebener Weise¹⁾ umgesetzt. Dann hydrolysiert man die Phosphorsäurechloride durch Zusatz von 15 ccm 0.1 *n* KCl unter Rühren und Eiskühlung, fügt nach 1 Stde. 25 ccm Methanol zu, gibt das Reaktionsgemisch in einen Scheidetrichter, säuert die wäßr. Phase mit konz. Salzsäure bis auf pH 3 an und schüttelt gut durch. Nach Eindampfen der lipoiden Phase i. Vak. bei 35° und Trocknen i. Hochvak. über Phosphorpentoxid kristallisiert man den dunkelbraunen Rückstand, im wesentlichen **1b**, aus absol. Äther um und erhält 1.8 g (70%) eines dünnstschichtchromatographisch fast reinen Präparates in weißen Kristallen, die bei 50—52° schmelzen.

C₄₂H₈₆BrO₈P (811.8) Ber. C 60.6 H 9.9 Br 9.9 P 3.8 Gef. C 60.1 H 9.8 Br 9.7 P 3.7

Distearo-DL- α -lecithin-¹⁴C (2b). — 40 mg (50 μ Mol) **1b** in 1 ccm absol. Chloroform werden mit 2.32 mg (25 μ Mol) Trimethylaminhydrochlorid-¹⁴C (4.1 mC/mMol — von der Fa. New England Corp.) in 0.446 ccm Äthanol versetzt. Nach Zugabe von 0.1 ccm (80 μ Mol) Triäthylamin erwärmt man unter Rühren 5 Tage auf 50°. Dann zieht man das Lösungsmittel ab, nimmt den Rückstand in wenig Chloroform auf und chromatographiert an Kieselgel-imprägniertem Papier⁷⁾ in Diisobutylketon/Eisessig/Wasser (8 : 5 : 1). Bei Autoradiographie des trockenen Papierchromatogramms (24—48 Std.) an einem Röntgenfilm (Doneo-Tageslichtpackung, Fa. Schleussner, Frankfurt/M.) werden 2 radioaktive Banden sichtbar, die mit Hilfe unmarkierter Vergleichssubstanzen als Trimethylaminhydrochlorid-¹⁴C (R_F = 0) und Lecithin-¹⁴C (R_F = 0.6) erkannt werden. Die radioaktiven Zonen werden ausgeschnitten; man eluiert **2b** mit Chloroform/Methanol (1 : 1) und Trimethylaminhydrochlorid mit absol. Äthanol. Die Eluate werden bei 0° (monatelang unzersetzt) aufbewahrt. Die Ausbeute betrug 10 mg (50%, bez. auf Trimethylaminhydrochlorid-¹⁴C).

2) C. Long und I. F. Penny, Biochem. J. **65**, 382 (1957).

3) D. J. Hanahan, H. Brockerhoff und E. J. Barron, J. biol. Chemistry **235**, 1917 (1960).

4) L. L. M. Van Deenen und G. H. De Haas, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **70**, 538 (1963).

5) R. Hirt und R. Berchtold, Pharmac. Acta Helvetiae **33**, 249 (1958) [C. A. **53**, 9282g (1959)].

6) R. J. Howe und T. Malkin, J. chem. Soc. [London] **1951**, 2663.

7) G. V. Marinetti, J. Erbland und J. Kochen, Federat. Proc. **16**, 837 (1957).

1-Stearo-L- α -lysolecithin- ^{14}C und Distearo-D- α -lecithin- ^{14}C . — 2 mg **2b** werden in 0.4 ccm Calciumborat-Puffer (pH 7.0—0.1 *m* Borat-Puffer, der $2.5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Calciumacetat enthält) und 0.4 ccm einer Lösung von 5 mg *Phospholipase A*/1 ccm Calciumborat-Puffer aufgenommen, mit 8 ccm Äther versetzt und 12 Std. kräftig geschüttelt. Durch Zusatz von 24 ccm Äthanol stoppt man die Reaktion, filtriert und dampft ein. Der Rückstand wird in wenig Chloroform/Methanol (1 : 1) aufgenommen und, wie für **2b** beschrieben, chromatographiert. Man erhält 2 radioaktive Zonen etwa gleicher Strahlungsintensität, die mit Hilfe unmarkierter Vergleichssubstanzen eindeutig als *Lecithin* und *Lysolecithin* erkannt werden. Eluieren der Phospholipoide mit Chloroform/Methanol (1 : 1) ergibt 0.7 mg 1-Stearo-L- α -lysolecithin- ^{14}C und 1 mg Distearo-D- α -lecithin- ^{14}C . Die Lösungen werden bei 0° aufbewahrt. Erwartungsgemäß wurden 50% des Substrates **2b** gespalten⁴⁾.

[100/67]