

Die Vorteile des 2-Naphthoatchromophors sind somit die leichte Derivatisierung, die hohe Nachweisempfindlichkeit, das gute chromatographische Verhalten sowie die Möglichkeit einer weiteren Charakterisierung der Derivate durch CD-Spektroskopie.

Experimentelles

Synthese von **1**: Imidazol (0.71 g) wurde in Benzol (40 mL) suspendiert und auf 8°C gekühlt. Eine Lösung von 2-Naphthoylechlorid (1.0 g) in Benzol (10 mL) wurde in 10 min zugetropft und das Reaktionsgemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde durch Celite filtriert und zur Isolierung des Produkts lyophilisiert (1.2 g, quantitativ).

Mannose, Fucose, Arabinose, Galactose, Glucose, Chinovose, Xylose, Glucosaminhydrochlorid und Galactosaminhydrochlorid (jeweils 5 µmol) wurden 2 h bei Raumtemperatur mit NaBH₄ (10 mg) in H₂O (1 mL) gerührt. Nach der Zugabe wässriger HCl wurde die entstandene Lösung sechs Mal unter Zugabe von Methanol eingedampft. Ein Aliquot (10 nmol eines jeden Zuckers) wurde zusammen mit **1** (10 µmol) und DBU (10 µmol) 2 h bei Raumtemperatur in CH₃CN (2 mL) gerührt. Nach der Hydrolyse mit H₂O wurde ein Aliquot (2 nmol) in einem silanisierten Reagensglas eingedampft. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen, und Aliquote davon wurden zur HPLC-Analyse [11] verwendet (Perkin-Elmer Series 4 Liquid Chromatograph mit 7500 Data Station, Shimadzu RF-551 Fluorescence HPLC Monitor).

Eingegangen am 11. Januar 1992 [Z 5115]

CAS-Registry-Nummern:

1, 141903-34-6; Imidazol, 288-32-4; Mannose, 3458-28-4; Fucose, 2438-80-4; Arabinose, 147-81-9; Galactose, 59-23-4; Glucose, 50-99-7; Chinovose, 7658-08-4; Xylose, 58-86-6; Glucosaminhydrochlorid, 66-84-2; Galactosaminhydrochlorid, 1772-03-8; 2-Naphthoylechlorid, 2243-83-6.

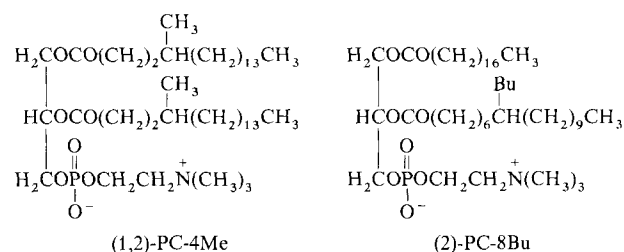
- [1] T. J. Bruno, P. D. N. Svoronos, *CRC Handbook of Basic Tables for Chemical Analysis*, CRC, Boca Raton, FL, USA, 1989, S. 118, zit. Lit.
- [2] P. F. Daniel, D. F. De Feudis, I. T. Lott, R. H. McCluer, *Carbohydr. Res.* **1981**, 97, 161.
- [3] N. Jentoft, *Anal. Biochem.* **1985**, 148, 424.
- [4] J. Golik, H.-W. Liu, M. Dinovi, J. Furukawa, K. Nakanishi, *Carbohydr. Res.* **1983**, 118, 135.
- [5] K. Kakehi, S. Honda in *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS* (Hrsg.: C. J. Beirmann, G. D. McGinnis), CRC, Boca Raton, FL, USA, 1989, S. 43, zit. Lit.
- [6] G. R. Schonbaum, B. Zerner, M. L. Bender, *J. Biol. Chem.* **1961**, 236, 2930.
- [7] P. Zhou, N. Berova, K. Nakanishi, M. Knani, M. Rohmer, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4040.
- [8] Reaktionen in kleinerem Maßstab (<0.5 nmol), HPLC-Trennungen sowie CD-Messungen wurden erfolgreich mit mehreren Serien von hydroxygruppenhaltigen Verbindungen biologischen Ursprungs durchgeführt.
- [9] Die isolierte Ausbeute betrug ca. 32%, wenn die Naphthoylierung im kleineren 0.6nmol-Maßstab durchgeführt wurde.
- [10] N. Harada, K. Nakanishi, *Circular Dichroic Spectroscopy: Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, USA, 1983, S. 38.
- [11] Sofern erwünscht, können die stark polaren, vom Reagens herrührenden Verunreinigungen durch Vorschalten einer C18-Säule entfernt werden. Siehe [3].

Synthetische kettensubstituierte Phospholipide; Ionentransport durch die Doppelschichtmembran**

Von F. M. Menger* und Patricia Aikens

Die Natur hat die Mittel zur Kontrolle der passiven Diffusion durch ihre Membranen den jeweiligen Bedingungen entsprechend entwickelt. Zum Beispiel enthalten die Membranen von Kaltwasser-Meereslebewesen hohe Anteile an „fluiditätserhöhenden“ (d. h. mehrfach ungesättigten) Lipiden. Die Steuerung der Permeabilität ist jedoch auch für Systeme zur Medikamentenfreisetzung wichtig, die auf Li-

pidmembranen mit definierten Freisetzungsgeschwindigkeiten beruhen^[1]. Daher ist es wünschenswert, den Einfluß der Lipidstruktur auf die Permeabilität systematisch zu untersuchen. Die Gelegenheit dazu ergab sich, nachdem wir eine Reihe von Phospholipiden für calorimetrische und Filmstudien synthetisiert hatten^[2, 3]. Die neuen Lipide enthielten Ketten aus 18 Kohlenstoffatomen mit Alkylsubstituenten unterschiedlicher Größe, Position und Zahl. Zwei Beispiele solcher Distearoylphosphatidylcholines (mit selbsterklärenden Namens Kürzeln) zeigt Schema 1. An diesen Lipiden un-



Schema 1. Zwei Beispiele für Phospholipide mit alkylsubstituierten Ketten.

tersuchten wir nun den Ionenfluß durch die Doppelschichtmembran. Dabei stellten wir fest, daß die Alkylverzweigung die Packung der Lipidketten, die mehr oder weniger parallel innerhalb der Membran angeordnet sind, stört. Diese Störung erleichtert in Abhängigkeit von der Größe und der Position der Alkylsubstituenten die Passage von Ionen.

Der Ionenfluß wurde mit derselben Methode gemessen, die in einer früheren Arbeit über synthetische Ionenkanäle beschrieben ist^[4]: Ein verzweigtes Phospholipid und ein Fluoreszenzfarbstoff^[5] wurden in einem schwachen Puffer (pH = 7.7, 0.1 M KCl) gemeinsam beschallt^[6]. Dabei entstanden unilamellare Vesikel mit Farbstoff innerhalb und außerhalb der Vesikel. Letzterer wurde durch Gelfiltration entfernt. Wurde der externe pH-Wert plötzlich auf 6.7 gesenkt, wanderten Protonen in die Vesikel und protonierten dort den Farbstoff, so daß die Fluoreszenz abnahm. Aus der quasielastischen Lichtstreuung ergab sich für die Vesikel ein Durchmesser von 35 ± 5 nm.

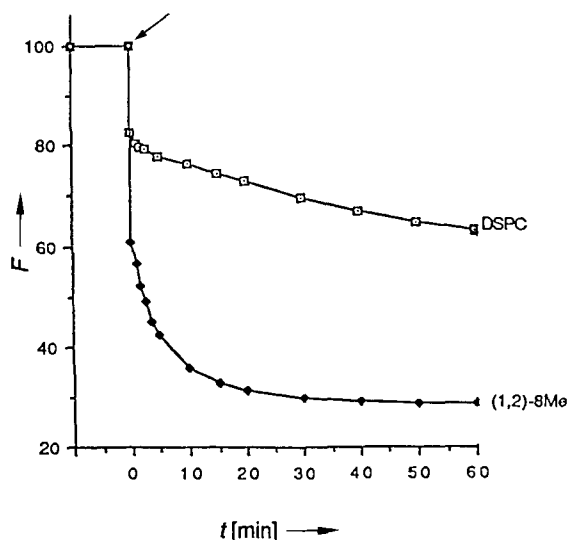


Abb. 1. Fluoreszenz-Zeit-Diagramm nach der Zugabe von HCl (Pfeil) zu Vesikeln, die einen pH-empfindlichen Farbstoff enthalten. Die Auftragungen zeigen, daß Methylsubstituenten an Position 8 der Phosphatidylketten den Eintritt von Protonen relativ zum unverzweigten DSPE erleichtern. Man erkennt deutlich, daß es sich um einen zweiphasigen Prozeß handelt (die Fluoreszenzabnahme ist dabei am Anfang zu schnell, um mit konventionellen Methoden gemessen zu werden).

[*] Prof. F. M. Menger, P. Aikens
Department of Chemistry
Emory University
Atlanta, GA 30322 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health gefördert.

Typische Auftragungen der Fluoreszenz F gegen die Zeit für das Distearoylphosphatidylcholin (DSPC) selbst und das verzweigte Derivat (1,2)-PC-8Me zeigt Abbildung 1. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen von Clement und Gould^[7] erhält man nach HCl-Zugabe zum externen Wasser eine zweiphasige Fluoreszenzabnahme. Der Abfall der Fluoreszenz unmittelbar nach der HCl-Zugabe resultiert aus einer elektrisch nicht kompensierten Diffusion von Protonen in die Vesikel^[8]. Dieser für konventionelle Messungen zu schnell ablaufende Eintritt der Protonen erzeugt ein Transmembranpotential, das den nachfolgenden langsameren Schritt antreibt: die Diffusion von Kalium-Ionen nach außen. In dem Maß, in dem Kalium-Ionen austreten, können weitere Protonen eintreten^[9]. Das elektrische Anfangspotential wird dadurch aufrechterhalten. Der K^+ -Fluß ist zwar bekanntermaßen um Größenordnungen langsamer als der H^+ -Fluß^[10], dieser Unterschied wird jedoch durch unser Arbeiten mit 0.1 M KCl und pH = 7 und dem daraus folgenden 10⁶-fachen Überschuß an Kalium verringert.

Da der K^+ -Austritt unter unseren Bedingungen ein Prozeß erster Ordnung ist, sind Auftragungen von $\log(F - F_\infty)$ gegen die Zeit linear (Abb. 2–4). Die Achsenabschnitte repräsentieren das maximale Protonen-induzierte Potential, das die jeweilige Membran zuläßt. Die Geschwindigkeiten des K^+ -Austritts sind durch die Steigungen der Geraden gegeben. Unsere Auswahl an synthetischen Lipiden war ausreichend groß, daß wir ohne weiteres Vergleiche anstellen konnten von Lipiden, die sich alle unterhalb, alle oberhalb oder zum Teil ober- und zum Teil unterhalb ihrer Phasenumwandlungstemperatur T_c befanden (Abb. 2, 4 bzw. 3).

Abbildung 2 zeigt die Transportdaten bei 20 °C (unterhalb T_c) für DSPC und drei in Position 4 alkylierte Lipide^[11]. Aus den unterschiedlichen Achsenabschnitten folgt, daß das Ausmaß des Protoneneintritts etwas von der Größe des Substituenten in Position 4 abhängt. Die Verzweigung kann die Kopfgruppenregion aufweiten und so den Eintritt von Wasser und damit eine Erhöhung der Membran-Dielektrizitätskonstanten ermöglichen^[12]. Als Folge davon würde ein größeres elektrisches Potential, d.h. ein stärkerer Eintritt von Protonen, tolerierbar. Alternativ können die Substituenten die Membran verdicken (in der Reihenfolge Bu > Et > Me > H) und so deren Fähigkeit erhöhen, den unkompenzierten Protonenfluß zu tolerieren.

Man beachte, daß die Steigungen der vier Auftragungen in Abbildung 2 ähnlich sind. Eine Verzweigung hat also offenbar

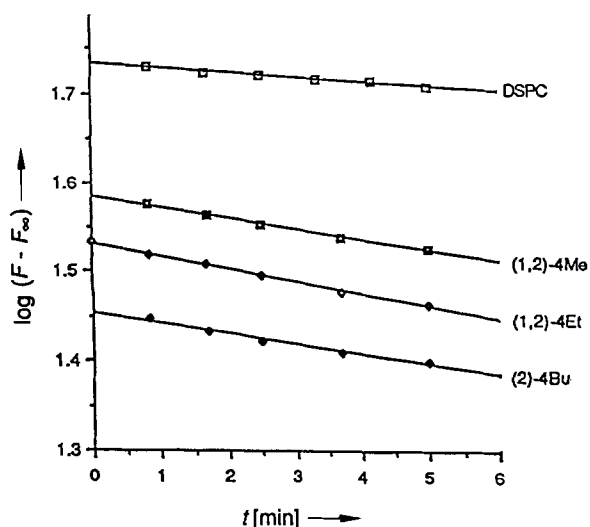


Abb. 2. Vergleich der Protoneneintrittsgeschwindigkeiten von Vesikeln aus verzweigten Lipiden und aus unverzweigtem DSPC. Die Messungen wurden unterhalb T_c durchgeführt. F_∞ = Fluoreszenz für $t \rightarrow \infty$.

einen geringen Einfluß auf die K^+ -Austrittsgeschwindigkeit, wenn die Membran in der Gelphase vorliegt. Des weiteren ist offensichtlich, daß trotz der ein oder zwei Alkylsubstituenten pro Lipid, die vermutlich die Seite-an-Seite-Packung innerhalb der Doppelschicht stören, keine Kalium-leitenden Kanäle in der Membran gebildet werden.

Abbildung 3 zeigt einen zusätzlichen Aspekt der Vesikel-permeabilität als Funktion der Struktur: Eine Methylsubstitution an den Positionen 8 und 10 erhöht den K^+ -Fluß beträchtlich (15- und 18fach relativ zu DSPC), während dieser Effekt bei einer Substitution an den Positionen 4 und 16 nicht auftritt. Die einfachste Erklärung liegt in der Tatsache,

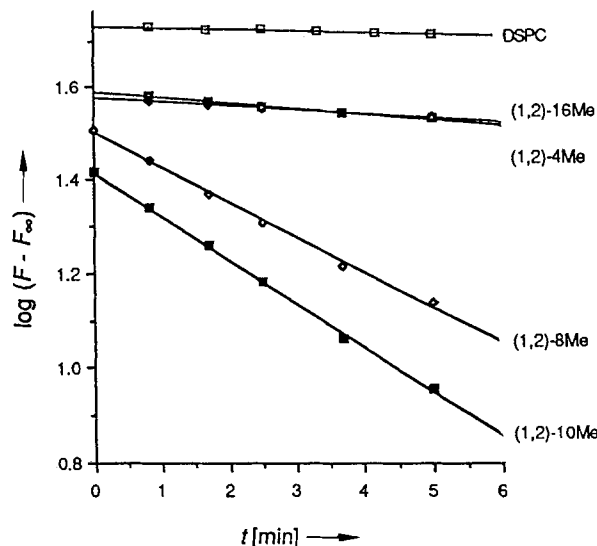


Abb. 3. Abhängigkeit der Protoneneintrittsgeschwindigkeit von der Position der Methylsubstituenten in den Lipidketten.

daß unsere Arbeitstemperatur von 20 °C unter den T_c -Werten von 30.1 °C und 26.9 °C für (1,2)-PC-4Me bzw. (1,2)-PC-16Me liegt, während die 8-Me- und 10-Me-Derivate mit T_c -Werten unter 0 °C in der fluiden Phase vorliegen. Dies bedeutet, daß aus einem ortsempfindlichen T_c -Wert direkt ein ortsempfindlicher K^+ -Fluß folgt^[13]. Dieses Verhalten ist in Einklang mit dem Befund, daß der H^+ - und K^+ -Fluß bei

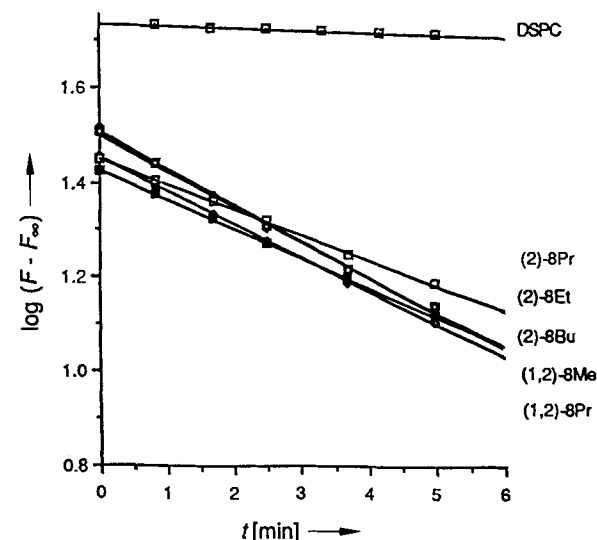


Abb. 4. Abhängigkeit der Protoneneintrittsgeschwindigkeit von der Größe und der Zahl der Substituenten an Position 8. Die Messungen wurden oberhalb T_c durchgeführt.

der Erwärmung von Dipalmitoylphosphatidylcholin-Vesikeln von 32 °C auf den T_c -Wert von 42 °C zunimmt. Um die Membranpermeabilität zu erhöhen, kann man demnach entweder erwärmen oder alkylieren. Wie früher schon detailliert diskutiert wurde^[2, 3], haben Störungen der Konformation in der Nähe des Kettenmittels einen besonders starken Effekt auf einige Membraneigenschaften; die Permeabilität muß nun dieser Liste hinzugefügt werden.

Auch eine Reihe von C-8-substituierten Lipiden wurde bei einer Temperatur von 20 °C untersucht, bei der alle in ihrer fluiden Phase vorliegen (Abb. 4). Der Ionenfluß ist bei allen viel schneller als bei DSPC, in der Reihe jedoch – unabhängig von der Substituentengröße und -zahl – innerhalb der Fehlergrenzen gleich schnell. Rotationsfehlordnung im kritischen Mittelbereich des Lipids, die durch eine Alkylierung hervorgerufen wird, begünstigt die Ionenbewegung ebenso wie ein einfacher Phasenübergang. Die beiden Prozesse scheinen daher eine gemeinsame molekulare Basis zu haben.

Eingegangen am 13. Januar 1992 [Z 5116]

- [1] G. Gregoriadis, *Liposomes as Drug Carriers: Recent Trends and Progress*, Wiley, Chichester, England, 1988.
- [2] F. M. Menger, M. G. Wood, Jr., Q. Z. Zhou, H. P. Hopkins, J. Fumero, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6804.
- [3] F. M. Menger, M. G. Wood, Jr., S. Richardson, Q. Z. Zhou, A. R. Elington, M. J. Sherrod, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6797; siehe auch die Übersicht F. M. Menger, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1104; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1086.
- [4] F. M. Menger, D. S. Davis, R. A. Persichetti, J.-J. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2451.
- [5] Der Farbstoff war das Trianion von 8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure ($pK_a = 7.2$, $\lambda_{abs} = 460$ nm, $\lambda_{em} = 510$ nm).
- [6] Alle Vesikelpräparationen enthielten 10% anionische Distearoylphosphatidsäure, um die Vesikelaggregation zu verhindern.
- [7] N. R. Clement, J. M. Gould, *Biochemistry* **1981**, *20*, 1534.
- [8] G. Krishnamoorthy, P. C. Hinkle, *Biochemistry* **1984**, *23*, 1640.
- [9] D. W. Deamer, J. W. Nichols, *J. Membr. Biol.* **1989**, *107*, 91.
- [10] S. Grzesiek, N. A. Dencher, *Biophys. J.* **1986**, *50*, 265.
- [11] T_c -Werte beziehen sich auf lamellare Phasen [2] und sind somit nur qualitativ auf kleine unilamellare Vesikel anwendbar.
- [12] D. S. Cafiso, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1987**, *19*, 444.
- [13] K. Elamrani, A. Blume, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *727*, 22.

„Reinigungstemplate“: Synthese und Electrospray-Massenspektrometrie eines linearen Porphyrin-Octamers**

Von Sally Anderson, Harry L. Anderson und Jeremy K. M. Sanders*

Wir haben kürzlich berichtet^[1], daß bestimmte Aminliganden beim Aufbau cyclischer Porphyrin-Oligomere als Template fungieren, wobei zwei zueinander komplementäre Wirkungsweisen auftreten: Ein „positives“ Template bewirkt die Annäherung zweier reaktiver Endgruppen in einem Molekül und unterstützt damit die intramolekulare Cyclisierung. Ein „negatives“ Template dagegen hält die reaktiven Endgruppen auf Distanz, inhibiert damit die intramolekulare Cyclisierung und führt bevorzugt zur intermolekularen Reaktion (Abb. 1).

[*] Dr. J. K. M. Sanders, S. Anderson, Dr. H. L. Anderson
Cambridge Centre for Molecular Recognition
University Chemical Laboratory
Lensfield Road, GB-Cambridge CB2 1EW (Großbritannien)

[**] Diese Arbeit wurde vom Science and Engineering Research Council (Großbritannien), der Rhone-Poulenc-Rorer Ltd. und dem Magdalene College, Cambridge, gefördert.

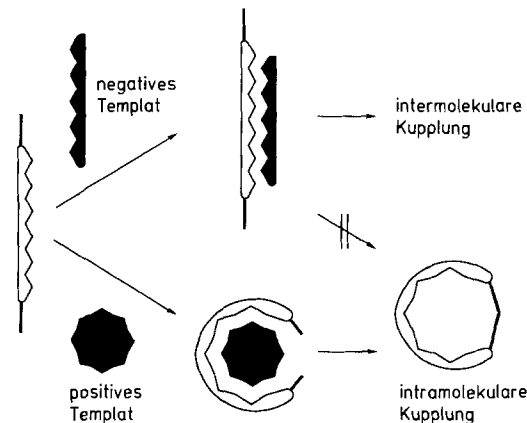
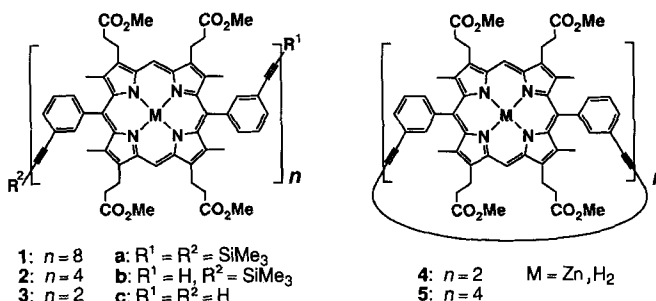


Abb. 1. Reaktionssteuerung durch positive und negative Template.

Wir beschreiben hier eine neue Anwendungsmöglichkeit für positive Template: Sie können die cyclisierbaren Komponenten eines komplexen Gemisches dem Reaktionsgeschehen entziehen und damit die Synthese linearer Oligomere erleichtern^[2]. Im folgenden wird zunächst dieses Konzept der „Reinigungstemplate“ allgemein erläutert und anschließend die Anwendbarkeit mit einer effizienten Synthese des linearen Porphyrin-Octamers **1a** demonstriert. Dieses wird ausgehend vom linearen Dimer **3a** über das lineare Tetramer **2a** erhalten. Es wird ebenfalls gezeigt, wie mit der Electrospray-Massenspektrometrie (ES-MS)^[3] die Bestimmung von Molmasse und Reinheit dieser anders nur schwer charakterisierbaren Verbindungen gelingt.



Ein übliches Vorgehen beim Aufbau linearer Oligomere ist die Abspaltung einer von zwei terminalen Schutzgruppen eines Oligomers mit n Monomereinheiten und anschließende Kupplung des Produkts zu einem Oligomer mit $2n$ Monomereinheiten und zwei terminalen Schutzgruppen. Die partielle Abspaltung der Schutzgruppen führt jedoch in der Regel zu einem statistischen Gemisch aus Produkten mit zwei, einer oder keiner Schutzgruppe und verursacht damit Probleme im anschließenden Kupplungsschritt: Während das verbleibende Ausgangsmaterial mit zwei terminalen Schutzgruppen inert ist und damit vor der weiteren Umsetzung nicht abgetrennt werden muß, kann das „freie“ Oligomer (in dem beide Schutzgruppen abgespalten sind) mit einfach geschütztem Oligomer kuppeln, was zu einem neuen reaktiven Oligomer und letztlich zu einem komplexen Produktgemisch führt. Konventionell wird dieses Problem umgangen, indem man das freie Oligomer vor dem Kupplungsschritt abtrennt. Diese Trennung wird jedoch mit zunehmender Länge der Oligomere schwieriger und ist so der limitierende Faktor für die maximale erreichbare Kettenlänge.

Reinigungstemplate lösen das Problem, indem sie die intermolekulare Reaktion des freien Oligomers inhibieren