

Chemoenzymatische Synthese optisch aktiver Hydroperoxide von Phosphatidylglycerin und -ethanolamin mit Lipase, Lipoxygenase und Phospholipase D^{**}

Von Kenji Yoneda, Keiji Sasakura, Shoichi Tahara, Junkichi Iwasa, Naomichi Baba*, Takao Kaneko und Mitsuyoshi Matsuo

Neuere Studien haben gezeigt, daß die in-vivo-Bildung von Lipidperoxiden einige ernsthafte Erkrankungen und Funktionsstörungen wie Arteriosklerose, Krebs oder den Alterungsprozeß auslöst^[1].

Für Untersuchungen auf diesem Forschungsgebiet werden dringend unterschiedliche Typen reiner, optisch aktiver Lipidhydroperoxide benötigt. Wir haben bereits früher über die Synthese des Phospholipidhydroperoxids 1-Stearoyl-2-[13-(S)-hydroperoxy-(9Z,11E)-octadecadienoyl]-sn-glycero-3-phosphocholin berichtet^[2]. An dieser Stelle möchten wir die Synthese optisch aktiver Hydroperoxide von Phosphatidylethanolamin und von Phosphatidylglycerin mit einer hydroperoxidierten Linolsäurefunktion beschreiben.

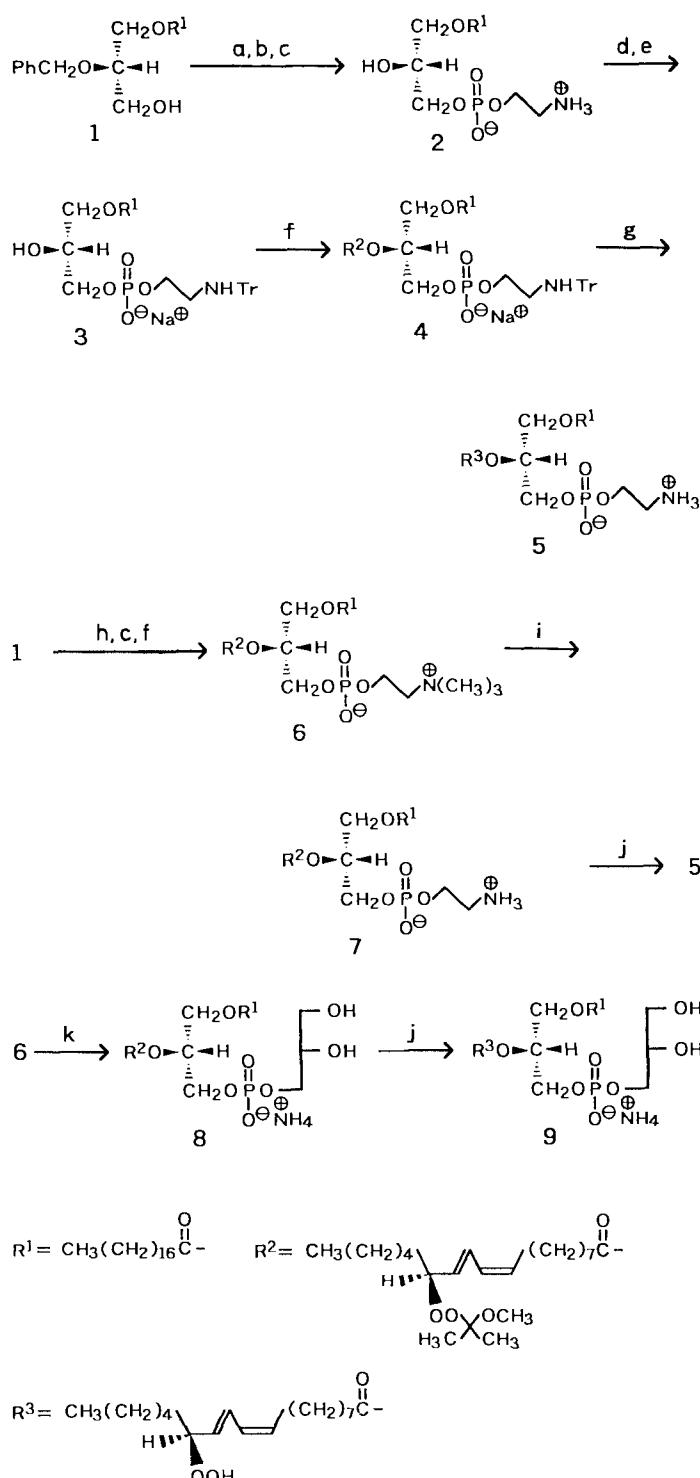
Die Synthesewege zu diesen Produkten zeigt Schema 1. Optisch aktives 1-Stearoyl-sn-glycerin 1 (100% optische Reinheit) wurde durch enantioselektive, Lipase-katalysierte Stearylierung von 2-O-Benzylglycerin mit Stearinäurevinylester hergestellt^[2]. Das resultierende optisch aktive 1-Stearoyl-sn-glycerin wurde nach der Methode von Eible in 1-Stearoyl-sn-lysophosphatidylethanolamin 2 überführt^[3]. Die Nucleophilie der Aminogruppe wurde durch Tritylierung, die zu 3 führte, vermindert. Anschließend veresterte man mit der DCC-Methode (DCC = Dicyclohexylcarbodiimid) die freie Hydroxygruppe des Phosphatidylglycerids 3 mit 13-(S)-α-Methoxyisopropylperoxy-(9Z,11E)-octadecadiensäure (96% optische Reinheit; hergestellt aus Linolsäure durch Reaktion mit Sojabohnen-Lipoxygenase und anschließender Acetalisierung der Hydroperoxygruppe mit 2-Methoxypropen)^[2]. Diese Veresterung ergab 4 (24% Ausbeute bezogen auf 2). Verbindung 4 wurde mit einem Gemisch aus THF, AcOH und H₂O (5:4:1, 24 h) bei 45 °C umgesetzt, wobei sowohl die Acetal- als auch die Tritylgruppe abgespalten wurde. Das angestrebte Hydroperoxid 5 wurde ohne Nebenreaktionen in 83% Ausbeute erhalten und durch préparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit einer Mischung aus Methanol, Chloroform und 28% Ammoniumhydroxid (15:30:2) als Laufmittel ($R_f = 0.6$) gereinigt.

Die Hydroperoxygruppe in 5 wurde durch Kaliumiodid-farbreaktion nachgewiesen und die Struktur von 5 aus ¹H-NMR-Spektren und FAB-Massenspektren abgeleitet^[4].

Ein Reaktionsschritt des zweiten Synthesewegs zu 5 ist eine Phospholipase-D-katalysierte Transphosphatidyllierung. Das Glycerinderivat 1 wurde, wie bereits an anderer Stelle beschrieben^[2], in das Cholinperoxid 6 überführt. 6 wurde in Gegenwart von einem Überschuß an Ethanolamin (58 Mol äquiv.) in Acetatpuffer (0.1 M, pH 5.6) mit Phospholipase D aus *Streptomyces sp.* (153 Einheiten) bei Raumtemperatur 3 h behandelt^[5]. Die übliche Aufarbeitung und Isolierung durch préparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel ergab 7, aus dem das Endprodukt 5 durch Hydrolyse des

Peracetals mit einer Mischung aus THF/AcOH/H₂O (4:2:1) entsteht. Die analytischen und spektroskopischen Daten der Endprodukte 5 die beiden Synthesewege stimmen überein.

In ähnlicher Weise wurde auch das Phosphatidylglycerin-hydroperoxid 9 synthetisiert und durch Dünnschichtchromatographie gereinigt [$R_f = 0.48$, Laufmittel: Methanol, Chloroform und 28% Ammoniumhydroxid (70:130:1)]. Die Struktur von 9 wurde durch ¹H-NMR-Spektroskopie und FAB-Massenspektrometrie ermittelt^[4].



Schema 1. Reagenzien für die Synthese der Phospholipidhydroperoxide 5 und 9. a) POCl_3 , $\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$; b) H_3O^+ ; c) $\text{H}_2/\text{Pd}(\text{OH})_2$; d) TrCl , NEt_3 ; e) Na_2CO_3 ; f) DCC, DMAP, R^2OH ; g) $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{THF}(4:1:5)$; h) POCl_3 , Cholintosylat; i) $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, Phospholipase D; j) $\text{THF}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ (4:2:1); k) Glycerin, Phospholipase D. Tr = Trityl, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin.

[*] Prof. Dr. N. Baba, K. Yoneda, K. Sasakura, S. Tahara, Prof. Dr. J. Iwasa
Bioresources Chemistry, Faculty of Agriculture
Okayama University
1-1 Tsushima-naka, Okayama 700 (Japan)

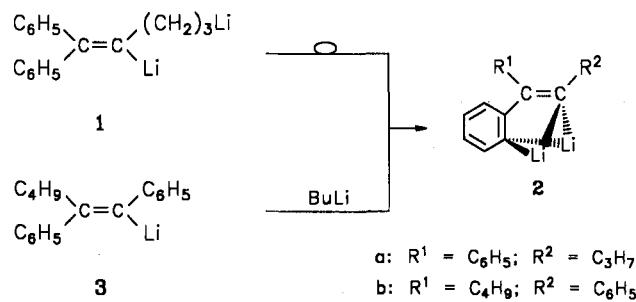
Dr. T. Kaneko, Dr. M. Matsuo
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology
35-2 Sakaecho, Itabashiku, Tokyo 173 (Japan)

[**] Diese Arbeit wurde vom japanischen Bildungsministerium (Grant 04556015) gefördert.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß zwei reine, optisch aktive Phospholipidhydroperoxide **5** und **9** synthetisiert wurden. Die Hydroperoxy- und Aminogruppen wurden zunächst durch Acetalisierung bzw. Tritylierung geschützt, später gleichzeitig entschützt und anschließend Phospholipase-D-katalysiert transphosphatidyliert. Die Toxizität bei der Hydroperoxide gegenüber menschlichen Endothelzellen werden zur Zeit untersucht. Die vorliegenden chemischen und enzymatischen Reaktionen könnten auch bei anderen biologisch bedeutsamen Phospholipidhydroperoxiden bekannter chemischer Struktur Anwendung finden.

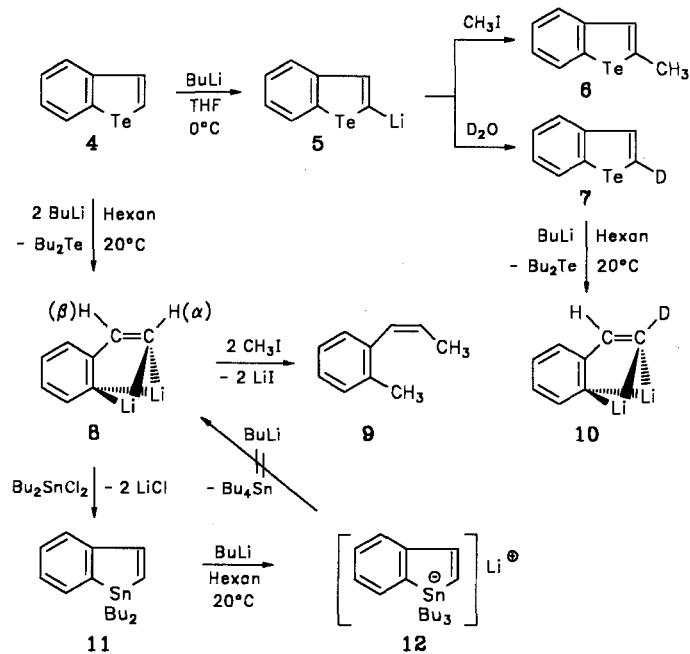
Eingegangen am 14. April 1992 [Z 5304]

- [1] *Lipid Peroxides in Biology and Medicine* (Hrsg.: K. Yagi), Academic Press, New York, 1982.
 [2] N. Baba, K. Yoneda, S. Tahara, J. Iwasa, T. Kaneko, M. Matsuo, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1281–1282.
 [3] H. Eible, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 4074–4077.
 [4] Spektroskopische Daten: **5**, $[\alpha]_D^{25} = +2.01$ ($c = 1.19$ in MeOH/CHCl₃, 1:1 v/v); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.88$ (m, 6H; 2*o*-Me), 1.24 (m, 44H; 22 CH₂), 1.58 (m, 4H; OCOCH₂CH₂ in jeder Kette), 2.18 (m, 2H; C₉ ·H), 2.28 (m, 4H; OCOCH₂ in jeder Kette), 3.13 (m, 2H; CH₂NH₃), 3.94 (m, 2H; -OCH₂-CH-CH₂O-), 4.07 (m, 2H; OCH₂CH₂NH₃), 4.14 (m, 1H; 1H von -OCH₂-CH-CH₂O-), 4.36 (m, 2H; 1H von -OCH₂-CH-CH₂O-, C₁₃ ·H), 5.21 (m, 1H; CHOCO), 5.46 (m, 1H; C₉ ·H), 5.72 (m, 1H; C₁₂ ·H), 6.00 (dd, ³J (H,H) = 10.7 Hz, 1H; C₁₀ ·H), 6.53 (m, ³J (H,H) = 10.7 Hz, 1H; C₁₁ ·H), FAB-MS: *m/z* 775 (MH⁺). **9**, $[\alpha]_D^{25} = +3.76$ ($c = 1.07$ in MeOH/CHCl₃, 1:1 v/v); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.88$ (m, 6H; 2 *o*-Me), 1.28 (m, 44H; 22 CH₂), 1.57 (m, 4H; OCOCH₂CH₂ in jeder Kette), 2.17 (m, 2H; C₉ ·H), 2.28 (m, 4H; OCOCH₂ in jeder Kette), 3.62 (m, 2H; PO-CH₂-CHOH-CH₂), 3.90 (m, 5H; 2 CH₂OP, CHO), 4.15 (m, 1H; 1H-OCH₂-CH-CH₂O-), 4.35 (m, 2H; ein H von -OCH₂-CH-CH₂O-, C₁₃ ·H), 5.22 (br, 1H; CHOCO), 5.46 (m, 1H; C₉ ·H), 5.58 (m, 1H; C₁₂ ·H), 6.00 (m, 1H; C₁₀ ·H), 6.54 (m, 1H; C₁₁ ·H), FAB-MS: *m/z* 805 (M – H)⁺.



Lithiostyryllithium **8**. Als Ausgangsverbindung bot sich das leicht zugängliche Benzo[b]tellurol **4**^[4] an, das durch Tellur-Lithium-Austausch stereospezifisch in **8** übergehen sollte.

Behandelte man jedoch Benzo[b]tellurol **4** unter den üblichen Bedingungen des Tellur-Lithium-Austauschs^[5] mit *n*-BuLi in THF, so konnte bei –78 °C keine Reaktion festgestellt werden, während bei 0 °C – wie auch schon in Diethylether bei Raumtemperatur^[6] – ausschließlich α -Metallierung zu 2-Lithiobenzo[b]tellurol **5** zu beobachten war. Die Umsetzung von **5** mit Methyliodid lieferte **6**^[6] in 88% Ausbeute, und bei der Deuterolyse erhielt man **7** mit einem Deuterierungsgrad von >98 % in α -Position.



Steuerung der Reaktion von *n*-Butyllithium mit Benzo[b]tellurol durch das Lösungsmittel – wahlweise Metallierung oder Tellur-Lithium-Austausch zu einem interessanten Lithiostyryllithium**

Von Adalbert Maercker*, Heinrich Bodenstedt und Lambert Brandsma

Professor Ulrich Schöllkopf zum 65. Geburtstag gewidmet

Bei der reduktiven Spaltung von Diphenylmethylenecyclobutan mit elementarem Lithium entsteht das 2,5-Dilithio-1,1-diphenyl-1-penten **1**, das sich unter 1,7-Protonenverschiebung in die stabile Dilithioverbindung **2a** umlagert^[1]. Nach 2D-NMR-Untersuchungen^[2] liegt **2a** doppelt Lithium-überbrückt vor, ähnlich wie das metallierte Additionsprodukt von *n*-Butyllithium an Diphenylacetylen (Tolan) **2b**^[3].

Es war nun von Interesse, den Grundkörper beider Verbindungen **2** mit R¹ = R² = H herzustellen, d.h. das (Z)-2-

Überraschenderweise verlief die Reaktion von *n*BuLi mit **4** in Hexan als Lösungsmittel völlig andersartig. Rührte man die Komponenten unter Schutzgas bei Raumtemperatur, so bildete sich im Verlaufe von 5–10 Minuten ein feiner, hellbrauner Niederschlag, der sich als reines Dilithiumverbindung **8** erwies (94 % Ausbeute). Das in trockenem Zustand beige Pulver ist stark pyrophor und löst sich in Diethylether mit rotbrauner Farbe. Die Mutterlauge enthielt nach der Hydrolyse außer der theoretisch zu erwartenden Menge Dimethyltellur nur noch Spuren von Styrol.

Die Umsetzung einer Aufschlämmung von **8** in Hexan mit Methyliodid oder – besser – Dimethylsulfat lieferte reines **9**^[7], das identisch mit dem *cis*-Anteil eines als *cis-trans*-Gemisch hergestellten Vergleichspräparats ist. Das mit Di-*n*-butyldichlorstannan entstehende 1,1-Di-*n*-butyl-benzo[b]stannol **11** (82 % Ausbeute, Tabelle 1) ließ sich interessanterweise nicht durch Zinn-Lithium-Austausch in **8** zurückver-

[*] Prof. Dr. A. Maercker, Ing.-grad. H. Bodenstedt
Institut für Organische Chemie der Universität
Adolf-Reichwein-Straße, W-5900 Siegen

Prof. Dr. L. Brandsma
Department of Preparative Organic Chemistry
University of Utrecht, Padualaan 8
NL-3584 CH Utrecht (Niederlande)

[**] Polyliumorganische Verbindungen, 18. Mitteilung. Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. – 17. Mitteilung: A. Maercker, K.-D. Klein, *J. Organomet. Chem.* **1991**, *410*, C35–C38.