

Bollalipid-Hydrogele

Selbstaggregation in einem
bipolaren Phospholipid-Wasser-System:
die Bildung von Nanofasern und Hydrogelen

Karen Köhler, Günter Förster, Anton Hauser,
Bodo Dobner, Ulrich F. Heiser, Friederike Ziethe,
Walter Richter, Frank Steiniger, Markus Drechsler,
Heiko Stettin und Alfred Blume*

Bipolare Lipide mit einer langen Alkylkette und zwei polaren Kopfgruppen sind Modellverbindungen für die komplizierten Strukturen der Bollalipide von *Archea*-Bakterien, zum Beispiel der Bis(diphytanyl)diglyceroltetraether.^[1] Im Bollalipid Docosan-1,22-diyl-bis[2-(trimethylammonio)ethylphosphat] (Irlbacholin) aus *Irlbachia alata* und *Anthocleista djalensis* verbindet eine C₂₂-Alkylkette zwei polare Phosphocholin-Gruppen. Irlbacholin wird in der Pflanzenmedizin genutzt. Es wirkt auch gegen *Trichophyton rubrum*, einen Pilz, der die Haut befällt, sowie gegen andere Pilzerkrankungen.^[2]

Im Zuge von Untersuchungen zu Einsatzmöglichkeiten ähnlicher Bollalipide als Membranstabilisatoren wurde Dotriacontan-1,32-diyl-bis[2-(trimethylammonio)ethylphosphat] (PC-C32-PC, **1**) mit einer C₃₂-Alkylkette hergestellt (Abbildung 1).^[3] Bei der Charakterisierung von **1** beobachteten wir ein ungewöhnliches Aggregationsverhalten, das weitere physikochemische Untersuchungen lohnenswert erscheinen ließ. Um ausreichende Mengen von **1** bereitzustellen, musste eine effizientere Synthese der Verbindung entwickelt werden.

Durch eine neue, einfache Methode kann das Lipid **1** in Grammengen erhalten werden. Der Aufbau der C₃₂-Kette gelingt durch kupferkatalysierte Kupplung von Undec-10-en-1-ylmagnesiumbromid mit 1,10-Dibromdecan im Verhältnis 2:1 (siehe *Experimentelles*). Dotriacontan-1,31-dien wird durch Hydroborierung mit Disiamylboran und durch anschließende Oxidation in Dotriacontan-1,32-diol umgewandelt. Diese neue Zwischenstufe kann gezielt in 1- und 32-

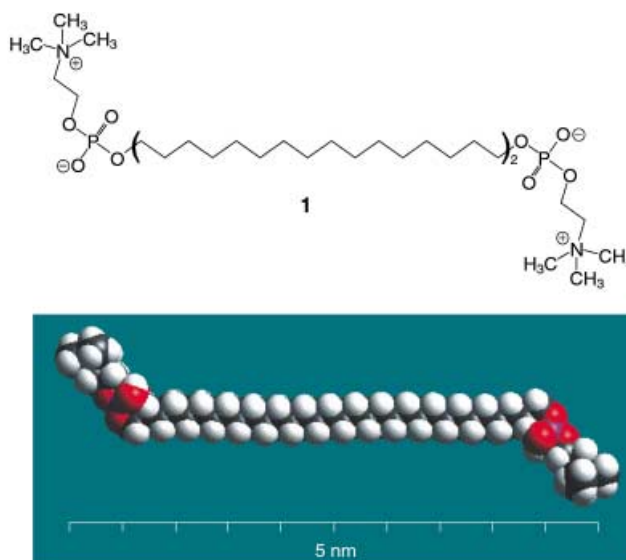


Abbildung 1. Struktur von **1** mit zwei sterisch anspruchsvollen polaren Phosphocholin-Kopfgruppen und einer unpolaren C₃₂-Alkylkette.

Position funktionalisiert werden. Die Phosphocholin-Gruppen wurden durch Umsetzung mit dem Dichlorid von Phosphorsäure(2-bromethyl)ester in Chloroform eingeführt. Dieses klassische Phosphorylierungsreagens war effektiver als moderne Varianten. Anschließend wurden die Trimethylammoniumgruppen von **1** durch ein etabliertes Verfahren eingeführt.^[4]

Das Vorliegen einer langen, unpolaren Alkylkette und zweier großer polarer Kopfgruppen führt dazu, dass **1** Aggregate bildet. Dabei entstehen Strukturen, die bisher noch nicht beobachtet wurden. Wir untersuchten die Aggregation der bipolaren Verbindung in wässriger Lösung durch DSC, Elektronenmikroskopie, Röntgenbeugung, Viskosimetrie und FT-IR-Spektroskopie.

In hoch verdünnter wässriger Lösung ($c < 0.5$ Gew.-%) wird ein hoch viskoses, fast transparentes Gel erhalten. Abbildung 2 zeigt eine Probe mit $c = 0.1$ Gew.-%, in der das Molverhältnis Wasser/**1** etwa 45000:1 beträgt – im Gel von **1** ist folglich eine enorme Menge Wasser „immobilisiert“. Bei Temperaturen über 50°C oder mechanischer Beanspruchung sinkt die Viskosität um den Faktor 10⁵, und aus dem Gel wird eine flüssige Lösung. Erste Viskositätsmessungen an einer 0.8%igen Lösung bei Raumtemperatur zeigten Anzeichen für eine Fließgrenze bei $\tau_0^* = 7.2$ Pa (Abbildung 3). Temperaturabhängige Viskositätsmessungen ergaben einen Wert von etwa 5×10^3 Pa s bei Raumtemperatur. Bei $T > 70^\circ\text{C}$ sinkt die Viskosität unter 5×10^{-4} Pa s, vergleichbar mit dem Wert von Wasser bei derselben Temperatur. Das rheologische Verhalten dieses Systems ist kompliziert und in mancher Hinsicht verwandt mit demjenigen von



Abbildung 2. Hydrogel einer wässrigen Lösung von **1** (0.1 Gew.-%) bei Raumtemperatur.

[*] Dipl.-Chem. K. Köhler, Dr. G. Förster, Dr. A. Hauser, Prof. Dr. A. Blume
MLU Halle-Wittenberg
Institut für Physikalische Chemie
Mühlpforte 1, 06108 Halle/Saale (Deutschland)
Fax: (+49) 345-5527157
E-mail: blume@chemie.uni-halle.de
Prof. Dr. B. Dobner, Dr. U. F. Heiser, Dr. F. Ziethe
MLU Halle-Wittenberg
Institut für Pharmazeutische Chemie
Wolfgang-Langenbeck-Straße 4, 06120 Halle/Saale (Deutschland)
Dr. W. Richter, F. Steiniger
FSU Jena, Institut für Ultrastrukturforschung
Zieglmühlenweg 1, 07740 Jena (Deutschland)
Dr. M. Drechsler
FSU Jena, Institut für Pharmazie
Philosophenweg 14, 07743 Jena (Deutschland)
Dr. H. Stettin
Physica Messtechnik GmbH
Helmuth-Hirth-Straße 6, 73760 Ostfildern (Deutschland)

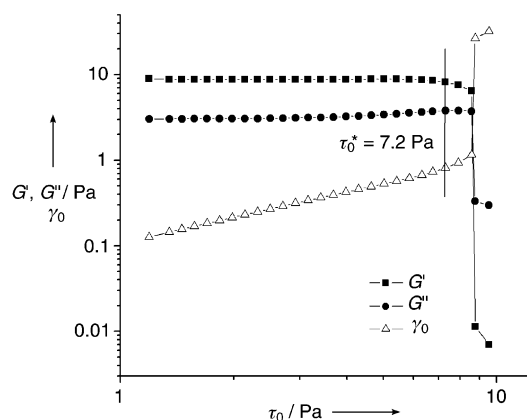


Abbildung 3. Rheologische Messung mit konstanter Schubspannung an einer wässrigen Lösung von **1** (kontrollierte Spannungsschwingung). Doppelt logarithmische Auftragung von G' , G'' und γ_0 gegen τ_0 . Die charakteristische Beziehung zwischen den Speicher- und Verlustmoduln $G' > G''$ kennzeichnet den linear-viskoelastischen Bereich; die Schubspannungsschwingung γ_0 wächst linear bis zur Fließgrenze bei $\tau_0^* = 7.2$ Pa. $T = 23^\circ\text{C}$, $\omega = 10$ Hz, $c = 0.8$ Gew.-%.

anderen Assoziationskolloiden wie wurmartigen Micellen.^[5]

Der Gelzustand kann durch das Vorliegen eines dichten dreidimensionalen Netzes von Fibrillen erklärt werden, das schon in hoch verdünnten wässrigen Lösungen (0.03 Gew.-%) durch Kryo-Elektronenmikroskopie gefunden wurde. Alle Fibrillen sind 6–7 nm dick (Abbildung 4), was ungefähr der

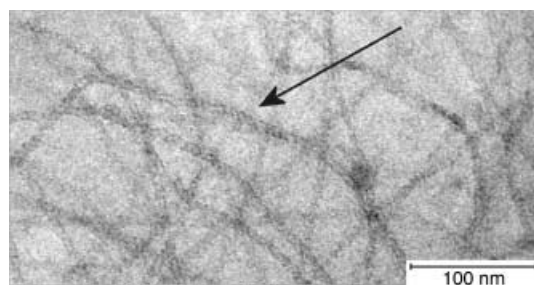


Abbildung 4. Kryo-TEM-Bild einer wässrigen Suspension von **1** (0.03 Gew.-%). Pfeil: Nanofaser mit helicaler Struktur.

Moleküllänge von **1** entspricht (Abbildung 1). Die Fibrillen scheinen helicale Strukturen zu haben, eine eindeutige Aussage darüber ist wegen der Auflösung der kryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen jedoch nicht möglich. Da **1** nicht chiral ist, müssten gleich viele rechts- und linksgängige Helices vorhanden sein. Tatsächlich scheinen einige Aufnahmen Fibrillen mit entgegengesetzter Chiralität zu zeigen, der geringe Durchmesser der Fasern erlaubt jedoch keine quantitativen Aussagen. Die Bildung von Helices könnte folgendermaßen erklärt werden: Zwei oder mehr Moleküle ordnen sich in einer Kette Seite an Seite nebeneinander an, wegen der sperrigen Kopfgruppen können die Ketten aber keine parallele Packung in senkrechter Richtung bilden. Um die hydrophoben Wechselwirkungen zu optimieren, müssen sich die Längsachsen benachbarter Moleküle gegeneinander verdrehen. Aus fortgesetzten Verdrehungen in einer Kette von

Molekülen würde eine Helix mit einem Durchmesser von ungefähr einer Moleküllänge resultieren.

Dass die Bildung von Gelen in wässriger Lösung durch organische Verbindungen, besonders durch Polymere, induziert werden kann, ist hinlänglich bekannt. Gele, die durch die Aggregation kleiner Moleküle gebildet werden, können sich jedoch deutlich von anderen Gelen unterscheiden, da ein Selbstassoziationsprozess an ihrer Bildung beteiligt ist. Nicht nur **1**, sondern auch andere Bolaamphiphile bilden Gele, z. B. Nucleotid-Bolaamphiphile oder Verbindungen, die über Harnstoffeinheiten gebundene Carbonsäurefunktionen als Kopfgruppen enthalten.^[6] In diesen Beispielen wird die Gelbildung hauptsächlich durch polare Wechselwirkungen verursacht, namentlich durch Wasserstoffbrücken. Daher sind die Faserdurchmesser viel größer. In Gelen von **1** sollten polare intermolekulare Wechselwirkungen keine Rolle spielen, und die Aggregation wird ausschließlich durch den hydrophoben Effekt getrieben, d. h. die Kontaktfläche zwischen den langen Alkylketten und dem polaren Lösungsmittel Wasser soll möglichst klein sein.

Durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie wurde die Lipidselbstaggregation in konzentrierteren Proben in Gegenwart von Glycerol untersucht. Wurden diese Proben schnell von Raumtemperatur auf -196°C abgekühlt, so zeigten die Bruchflächen orientierte Fibrillen von 7 nm Dicke, die mit einem bestimmten Winkel aus der Oberfläche herausragen (Abbildung 5, oben). Schreckt man von 45°C ab, so ist diese

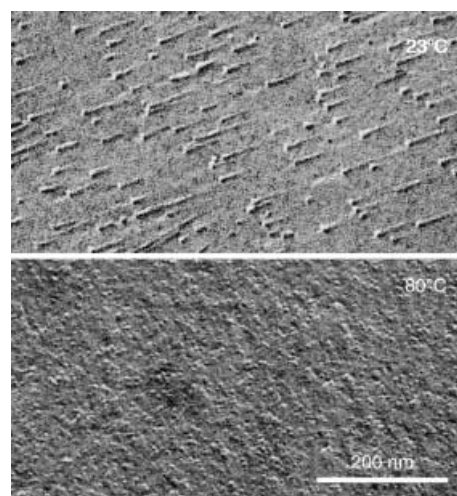


Abbildung 5. Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Bilder einer Lösung von **1** (2 Gew.-% in $\text{H}_2\text{O}/\text{Glycerol}$ (4:1)). Oben: Die Probe wurde einen Tag bei 23°C gelagert und schnell eingefroren. Unten: Die Probe wurde auf 80°C erhitzt und schnell eingefroren.

Struktur noch erkennbar, aber bei Starttemperaturen von 50°C oder sogar 80°C verschwindet die fibrilläre Struktur, und nur noch Aggregate oder kleinere Partikel mit Durchmessern von 3–10 nm sind zu sehen (Abbildung 5, unten). Wir haben Lösungen, die von 80°C schnell eingefroren wurden, außerdem mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) untersucht. Hier zeigt sich, dass die Proben teilweise aus kleinen, monodispersen Partikeln (Radius 2–5 nm) bestehen, aber

auch größere Aggregate vorliegen. Werden die Proben längere Zeit bei Raumtemperatur aufbewahrt, so nimmt die Viskosität wieder stark zu – durch den Aufbau von Nanofibrillen bildet sich erneut ein Gel.

Die Temperatur, bei der Nanofibrillen in kleinere Aggregate übergehen, wurde durch DSC-Messungen genau bestimmt. Beim Aufheizen sind drei endotherme Peaks zu sehen. Das Umwandlungsverhalten zeigt eine starke Hysterese; um die Daten des ersten Aufheizzyklus zu reproduzieren, musste ein definiertes Temperprogramm eingehalten werden. Bei allen Konzentrationen wird bei $T \approx 48^\circ\text{C}$ eine Hauptumwandlung mit der größten latenten Wärme beobachtet, bei der auch ein ungewöhnlich großer Sprung der Wärmekapazität auftritt. Das könnte auf eine Änderung der Wechselwirkung der Alkylkette mit Wasser zurückzuführen sein, d. h. auf eine stärkere Benetzung dieser hydrophoben Einheit. Als Folge löst sich das Gel bei $T \approx 48^\circ\text{C}$ auf.

Die latente Wärme der Hauptumwandlung ist dann am größten, wenn die Probe vor dem Heizen acht Stunden bei 2°C gelagert wurde, um die vollständige Bildung des Gels zu gewährleisten. Bei Raumtemperatur können offensichtlich metastabile kleinere Aggregate auftreten, die sich nur langsam in den Gleichgewichts-Aggregationszustand (Nanofasern) umwandeln. In den Aufheizkurven sieht man außerdem eine endotherme Umwandlung bei $T \approx 40^\circ\text{C}$, bei $T = 73^\circ\text{C}$ gibt es einen weiteren sehr breiten Peak, der seine Lage und Form im Gegensatz zu den anderen Peaks unter verschiedenen experimentellen Bedingungen nicht ändert.

Um herauszufinden, ob bei den unterschiedlichen Umwandlungstemperaturen Konformationsänderungen in den Alkylketten stattfinden, wurden FT-IR-spektroskopische Messungen durchgeführt. Die symmetrische und asymmetrische CH_2 -Streckschwingung sind verlässliche Parameter, anhand derer die Anordnung von Alkylketten bestimmt werden kann. FT-IR-Spektren wurden zwischen 2°C und 85°C aufgenommen: Zwei Erhöhungen der Streckschwingungsfrequenzen bei $T = 47^\circ\text{C}$ und 72°C weisen darauf hin, dass sich stufenweise *gauche*-Konformere bilden. Diese Temperaturen stimmen mit denen der Peaks im DSC-Experiment gut überein ($T \approx 48^\circ\text{C}$ und 72°C).

Wegen seiner Bola-Form zeigt das Phospholipid **1** eine verringerte Tendenz zur Bildung lamellarer Phasen. In verdünnten wässrigen Lösungen entstehen bei Raumtemperatur Gele mit Fibrillen aus starren Molekülketten, die ausschließlich durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten werden und nicht durch Wasserstoffbrücken. Die Fasern erreichen Längen bis zu einigen Mikrometern; bei höheren Konzentrationen scheinen sie Lagen aus parallelen Fibrillen zu bilden. Die Struktur der Fasern ist nicht stabil, mechanische Einflüsse führen zu Längenänderungen. Bei $T \approx 48^\circ\text{C}$ verlieren die langen Molekülketten der Fasern ihre Ordnung, und Aggregatgröße und Morphologie ändern sich drastisch. Die erneute Bildung von Fibrillen nach dem Abkühlen ist zeit- und konzentrationsabhängig.

Experimentelles

Dotriacontan-1,31-dien: In einer Argonatmosphäre wurde eine Lösung von 11-Bromundec-1-en (14 g, 60 mmol) in wasserfreiem

Et_2O (50 mL) tropfenweise unter Rühren zu Magnesiumspänen (2.1 g, 85 mmol) zugegeben. Nach dem Ende der exothermen Reaktion wurde die Mischung 2 h zum Rückfluss erhitzt. Der Magnesiumüberschuss wurde abgetrennt, und die Grignard-Lösung wurde unter reduziertem Druck bei 10°C eingengt. Der ölige Rückstand wurde bei 0°C in 180 mL wasserfreiem THF gelöst. Dann wurde 1,10-Dibromdecan (6 g, 20 mmol) in 20 mL wasserfreiem THF auf einmal zugegeben, zwei Minuten gerührt und Dilithiumtetrachlorocuprat (3.5 mL, 1 M Lösung in THF) bei 0°C tropfenweise zugegeben. Innerhalb weniger Minuten wurde die Reaktionsmischung trübe. Nach 20 min bei 0°C wurde die Reaktionsmischung mit 20 mL wasserfreiem THF verdünnt und weitere 3 h gerührt. Nach Zugabe von 100 mL Et_2O wurde die Mischung in eine kalte gesättigte NH_4Cl -Lösung gegossen. Die wässrige Phase wurde mit 50 mL Et_2O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Lösen des Rückstands in 100 mL $\text{Et}_2\text{O}/\text{THF}$ (1:1) und Zugabe von 70 mL Aceton ergab einen Niederschlag, der durch Filtration isoliert wurde. Die Fällung wurde einmal wiederholt, um das reine Produkt als weißen wachsartigen Feststoff zu erhalten. Ausbeute: 7.8 g (87%). Smp. $59\text{--}61^\circ\text{C}$ (unkorrigiert). ESI-MS: 446 $[\text{M}^+]$. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, 298 K): $\delta = 1.18\text{--}1.37$ (m, 52 H, $-\text{CH}_2-$), 1.99–2.05 (m, 4 H, $=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 4.89–4.99 (m, 4 H, $=\text{CH}_2$), 5.75–5.85 ppm (m, 2 H, $=\text{CH}-$). Elementaranalyse: ber. für $\text{C}_{32}\text{H}_{62}$: C 86.10, H 13.90%; gef.: C 86.01, H 13.96%.

Die übrigen Stufen der Synthese von **1** sind in Lit. [3,4] beschrieben.

Eingegangen am 23. April 2003,
veränderte Fassung am 28. Juli 2003 [Z51731]

Stichwörter: Amphiphile · Gele · Nanomaterialien · Phospholipide

- [1] G. D. Sprott, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1992**, 24, 555–566; M. Kates, *The Biochemistry of Archaea* (Hrsg.: M. Kates, D. J. Kushner, A. T. Matheson), Elsevier, Amsterdam, **1993**, S. 261–295; M. Nishihara, H. Morii, Y. Koga, *J. Biochem.* **1987**, 101, 1007–1015.
- [2] D. E. Bierer, R. E. Gerber, S. D. Jolad, R. P. Ubillas, J. Randle, E. Nauka, J. Latour, J. M. Dener, D. M. Fort, J. E. Kuo, W. D. Inman, L. G. Dubenko, F. Ayala, A. Ozioko, C. Obialor, E. Elisabetsky, T. Carlson, T. V. Truong, R. C. Bruening, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7022–7026; Q. Lu, R. P. Ubillas, Y. Zhou, L. G. Dubenko, J. M. Dener, J. Litvak, P.-W. Phuan, M. Flores, Z. J. Ye, R. E. Gerber, T. Truong, D. E. Bierer, *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 824–828.
- [3] F. Ziethe, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2003**; U. F. Heiser, B. Dobner, *Chem. Commun.* **1996**, 2025–2026; U. F. Heiser, B. Dobner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 809–815.
- [4] H.-J. Eibl, A. Nicksch, BRD-Patent 23 45 060, **1975**.
- [5] H. Rehage, H. Hoffmann, *Mol. Phys.* **1991**, 74, 933–973.
- [6] T. Shimizu, R. Iwaura, M. Masuda, T. Hanada, K. Yase, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5947–5955; R. Iwaura, K. Yase, M. Masuda, K. Yase, T. Shimizu, *Chem. Mater.* **2002**, 14, 3047–3053; L. A. Estroff, L. Leiserowitz, L. Addadi, S. Weiner, A. D. Hamilton, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 38–42; I. W. Hamley, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 1730–1752; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1692–1712.