

## 24. Ad. Grün und R. Limpächer: Synthese der Kephaline.

[Aus d. Hauptlaborat. d. Firma Georg Schicht A.-G., Außig a. d. E.]

(Eingegangen am 29. November 1926.)

Nachdem es uns gelungen war, Cholin-Lecithine oder Lecithine im engeren Sinne des Wortes zu synthetisieren, versuchten wir selbstverständlich, die Methode auf die Darstellung der Amino-äthanol-Lecithine oder Kephaline<sup>1)</sup> zu übertragen. Diese Verbindungen sind weniger bekannt als die Cholin-Lecithine, ihre Erforschung hat ja auch viel später begonnen, sie wurde eigentlich erst 1911 durch Trier auf eine sichere Basis gestellt<sup>2)</sup>. Aus den Ergebnissen der bisherigen Untersuchungen<sup>3)</sup> kann man aber doch schon den allgemeinen Schluß ziehen, daß die Kephaline in den Zellen der Lebewesen nicht weniger verbreitet sein dürften als die analogen Cholin-Derivate, und daß sie demzufolge nicht weniger wichtig sind.

Die erste Phase der Synthese ist, wie bei der des Lecithins, die Veresterung von Diglycerid mit der äquimolekularen Menge Phosphor-pentoxyd, wobei entweder nach a (S. 152) ein Diglycerid-metaphosphorsäure-ester (I) und freie Metaphosphorsäure entstehen, oder nach b ein Diglycerid-ester der hypothetischen Anhydro-pyrophosphorsäure (II) erhalten wird.

Eine sichere Entscheidung, welches Zwischenprodukt entsteht, ist noch nicht möglich. Für den Verlauf der Reaktion nach a spricht vielleicht Folgendes: Die einschlägigen Vorarbeiten von Grün und Wittka<sup>4)</sup> ergaben, daß bei primärer Einwirkung eines Moleküls Alkohol R<sup>1</sup>.OH auf P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, und sekundärer Einwirkung zweier Moleküle eines anderen Alkohols R<sup>2</sup>.OH auf das erste Veresterungsprodukt, immer ein Monoalkyl-orthophosphorsäure-ester mit dem Alkyl R<sup>2</sup> (III) und ein Dialkyl-orthophosphorsäure-ester mit den beiden Alkylen R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> (IV) entstehen. Das ist ohne weiteres verständlich, wenn man annimmt, daß die erste Reaktionsphase nach a verlief. Aus einem Gemisch von Metaphosphorsäure und Metaphosphorsäure-monoalkylester (I) können ja nur III und IV entstehen. Verläuft aber die erste Phase nach b, so ist nicht einzusehen, warum die weitere Veresterung nur die Verbindungen III und IV ergibt; die Aufspaltung des Zwischenproduktes II durch 2 Mol. Alkohol R<sup>2</sup>.OH könnte dann wie zu III und IV, auch zu den beiden Verbindungen V und VI führen; man sollte demnach ein Gemisch aller 4 Verbindungen erhalten können. Es wurde aber nicht beobachtet, daß sich ein Dialkyl-phosphorsäure-ester mit 2 gleichen Alkylen wie VI direkt bildet.

1) Wie in vielen Verbindungs-Klassen der Eigenname des zuerst bekannt gewordenen Vertreters zum Gattungsnamen wurde, so hat man auch die Bezeichnung „Lecithin“ vom Phosphatid des Eigelbs ohne weiteres auf alle Cholin-ester der Diglycerid-phosphorsäuren übertragen können. Die weitere Ausdehnung des Begriffs auch auf die Colamin als Baustein enthaltenden Verbindungen, scheint uns aber nicht praktisch; man ist sonst zwecks Unterscheidung der Gruppen zu so schleppenden Bezeichnungen wie Amino-äthanol-Lecithin genötigt. Es scheint uns erlaubt und zweckmäßig, die Colamin-Derivate nach dem Glycero-phosphatid (bzw. Glycero-phosphatid-Gemisch) der Gehirn-Substanz, das bekanntlich als basische Komponente nur Colamin enthält, einfach „Kephaline“ zu nennen.

2) Ztschr. physiol. Chem. **73**, 383 [1911].

3) siehe z. B. Guggenheim, Die biogenen Amine, Berlin 1924, S. 57.

4) Unveröffentlichte Untersuchung.

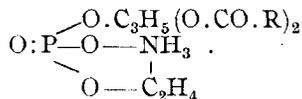


man aus beiden Distearinen dasselbe Kephalin oder dasselbe Gemisch von symmetrischem und unsymmetrischem Kephalin erhält. Vorläufig haben wir aber keinen Anhaltspunkt dafür, daß nebeneinander zwei Isomere entstehen.

Das Kephalin ist in den gleichen Solvenzien wie Lecithin löslich, nur schwerer; insbesondere löst es sich auch, nach Quellung, praktisch klar in Wasser. In alkohol. Lösung reagiert es gegen Lackmoid neutral, gegen Phenol-phthalein kann es als einbasische Säure titriert werden. Das allein beweist schon, daß der Colamin-Ester der Distearin-phosphorsäure vorliegt, nicht deren Colamin-Salz, das sich bei der Titration gegen Phenolphthalein als zweibasische Säure erwies<sup>5)</sup>.

Kephalin ist gegen Säuren und Alkalien viel empfindlicher als Lecithin; besonders in alkohol. Lösung ist es ziemlich unbeständig. Alkohol. Lauge spaltet auch in der Kälte schnell, alkohol. Salzsäure bewirkt ebenso schnell Umesterungen (siehe experimenteller Teil). Es scheint fraglich, ob dieses Verhalten der Kephaline bei der Aufarbeitung natürlicher Phosphatid-Gemische immer nach Gebühr berücksichtigt wurde. In manchen Fällen genügt vielleicht die gewählten Bedingungen, um die beständigeren Lecithine ohne große Verluste zu fassen, während sie für die Kephaline zu wenig schonend waren.

Man könnte das Kephalin, um die Analogie mit seinem Methylierungsprodukt Lecithin hervortreten zu lassen, wie dieses als Endosalz formulieren:



Das Äthanol-amin oder richtiger das Äthanol-ammoniumhydroxyd ist aber bekanntlich eine viel schwächere Base als das Cholin. Die Diglycerid-phosphorsäure-Komponente dominiert deshalb sozusagen im Kephalin, so daß dieses unter den in Betracht kommenden Umständen sauer reagiert; bei der Titration mit starken Basen gegen Phthaleine verhält es sich sogar als einbasische Säure. Lecithin reagiert dagegen in organischen Solvenzien absolut neutral, in wäßriger Lösung alkalisch und gibt mit Säuren recht beständige Salze. Während somit Lecithin und Kephalin in anderer Beziehung als Analoga von gleicher Funktion erscheinen, wirken sie in Bezug auf den Neutralisations-Zustand antagonistisch. Es scheint uns daher höchst wahrscheinlich, um nicht zu sagen selbstverständlich, daß in den natürlichen Glycero-phosphatid-Gemischen Lecithine und Kephaline nicht oder nicht nur als individuelle Endosalze vorliegen, sondern daß sie auch zum größeren oder geringeren Teil salzartig aneinander gebunden sind. Übrigens ist es vielleicht von geringem oder keinem Belang, ob in einem Phosphatid-Gemisch Lecithin und Kephalin miteinander verbunden sind, wenn dieses nur überhaupt Phosphatide beider Arten nebeneinander enthält, also nicht nur aus Lecithinen allein besteht. Daß Lecithin und Kephalin kombiniert sind, muß sich auf jeden Fall auswirken. Beide werden einander gewissermaßen ergänzen, zum mindesten durch die Herbeiführung eines bestimmten Neutralisations-Zustandes des Gemisches, der sich wiederum anderweitig

<sup>5)</sup> Grün und Limpächer, B. 59, 1349 [1926].

auswirkt, wie z. B. in Bezug auf den kolloiden Zustand, das Quellungsvermögen usw. Es scheint uns nicht überflüssig, darauf hinzuweisen; denn man verwendet für systematische Versuche oft reines Lecithin oder ein Gemisch von Lecithinen, d. h. nur die Cholin-Verbindungen, zieht aber aus den Ergebnissen Schlüsse auf das Verhalten von Lecithin-Kephalin-Gemischen, wie sie in den meisten sog. Lecithinen der Naturprodukte vorliegen.

### Beschreibung der Versuche.

$\alpha, \beta$ -Distearoyl-glycerin- $\alpha'$ -[phosphorsäure-colamin-ester] (IX).

Zur Schmelze von 31.2 g  $\alpha, \beta$ -Distearin ( $\frac{1}{20}$  Mol.) setzt man bei konstant gehaltener Temperatur von  $71-72^{\circ}$  auf einmal 7.1 g Phosphorsäure-anhydrid ( $\frac{1}{20}$  Mol.) zu und verrührt 5 Min. energisch. Um zu verhindern, daß währenddessen Feuchtigkeit angezogen wird — die Reaktion muß ja in einer offenen Schale ausgeführt werden —, stülpt man einen großen Trichter so weit über, als für das Manipulieren zugänglich ist, und leitet in denselben einen lebhaften Strom von trockenem Kohlendioxyd oder Luft. Hierauf werden 6.1 g Colamin in Form des rohen, noch ein wenig freie Base enthaltenden Carbonats<sup>6)</sup> zugesetzt. Beim Verrühren entsteht eine homogene, durchscheinende Masse, die in wenigen Minuten sehr zähe, kaum mehr knetbar wird, worauf man sie im Vakuum erkalten läßt und dann pulvert. Nun wird in der 10-fachen Menge heißen Benzols aufgenommen und von ungelöst bleibendem Colamin-phosphorsäure-ester dekantiert. Die Lösung enthält neben etwas unverändertem Distearin das Kephalin, anscheinend größtenteils an Colamin-phosphorsäure gebunden. Zur Zerlegung dieser Verbindung und Abscheidung des Kephalins wird  $\frac{1}{2}$  Stde. gekocht und dann auf  $0^{\circ}$  abgekühlt. Die reichlich abgeschiedenen Krystalle werden abgenutscht und mit  $45^{\circ}$  warmem Alkohol ausgezogen, wobei die Hauptmenge des Kephalins und ein wenig freier Colamin-phosphorsäure-ester in Lösung gehen. Beim Abkühlen der alkohol. Lösung auf  $-20^{\circ}$  krystallisiert das Kephalin aus. Den in Alkohol unlöslichen Rückstand löst man wieder in Benzol, kocht die Lösung auf und behandelt in der angegebenen Weise weiter, wodurch noch eine kleinere Menge Kephalin gewonnen wird. Ausbeute ungefähr 60% der Theorie.

Das Rohprodukt wird aus Benzol, allenfalls auch aus Alkohol und Benzol-Alkohol, umkrystallisiert. Zur Entfernung der letzten Verunreinigungen bewährt sich auch Umkrystallisieren aus Pyridin besonders gut; es darf aber nicht oft wiederholt werden, weil sonst partielle Aufspaltung der Ester-Bindung eintritt.

Die Verbindung bildet, aus Pyridin krystallisiert, schneeweiße Nadeln; in der evakuierten Capillare sintern sie bei  $78-80^{\circ}$  zu durchscheinenden Tröpfchen, die sich bei  $176^{\circ}$  auf einmal unter Meniscus-Bildung vereinigen und sich oberhalb  $185^{\circ}$  unter Trübung der Schmelze zersetzen. Eine Mischprobe mit Kephalin aus  $\alpha, \alpha'$ -Distearin (siehe unten) sintert schon bei  $75^{\circ}$ , während Meniscus-Bildung und Zersetzung wieder bei den angegebenen Temperaturen eintreten.

Die Substanz ist sehr hygroskopisch. In warmem Wasser quillt sie auf und gibt beim weiteren Erwärmen eine im durchscheinenden Licht klare Lösung, die auf Zusatz von Salzsäure sofort ausflockt. Die Löslichkeit in sämtlichen Solvenzien ist geringer, als die des entsprechenden Lecithins;

<sup>6)</sup> Grün und Limpächer, a. a. O.

sie ist in Äther, Petroläther (Siedegrenzen 20–65°) und Aceton minimal, in warmem Methyl- und Äthylalkohol, Benzol, Xylol, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff und Pyridin gut, bei 0° sehr gering.

Die Analysen zeigen, daß der gesuchte Distearoyl-glycerin-phosphorsäure-colamin-ester vorliegt. (Die Präparate A und B sind mittels Pyridins gereinigt, C ist ein weniger sorgfältig gereinigtes Präparat.)

A. 0.1976 g Stbst.: 0.4752 g CO<sub>2</sub>, 0.1955 g H<sub>2</sub>O. — 0.4121 g Stbst.: (nach Kjeldahl 5.44 ccm n/10-Schwefelsäure = 7.63 mg N. — 0.2078 g Stbst.: 0.0312 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

B. 0.1966 g Stbst.: 0.4741 g CO<sub>2</sub>, 0.1961 g H<sub>2</sub>O.

C. 0.1991 g Stbst.: 0.4771 g CO<sub>2</sub>, 0.1985 g H<sub>2</sub>O. — 0.3580 g Stbst.: (nach Kjeldahl 4.90 ccm n/10-Schwefelsäure = 6.87 mg N. — 0.1522 g Stbst.: 0.0221 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

C<sub>41</sub>H<sub>82</sub>O<sub>8</sub>PN (747.67). Ber. C 65.80, H 11.05, N 1.87, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 9.50.

(A) Gef. „ 65.60, „ 11.07, „ 1.85, „ 9.58.

(B) „ „ 65.77, „ 11.16, „ —, „ —.

(C) „ „ 65.37, „ 11.15, „ 1.91, „ 9.27.

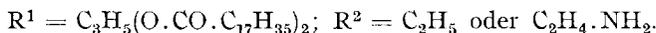
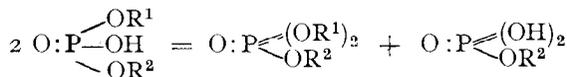
Wie nach dem Verhalten der Komponenten zu erwarten war, reagiert das Kephalin (in alkoholischer und benzol-alkoholischer Lösung) gegen Lackmoid neutral, gegen Phenol-phthalein sauer. Gegen freies Alkali ist es sehr empfindlich, weshalb sich die beim Lecithin bewährte Entsäuerung des Rohproduktes mittels Bariumhydroxyds nicht übertragen ließ und durch die Behandlung mit Pyridin ersetzt werden mußte. Auch beim vorsichtigen Titrieren erfolgt schon teilweise Spaltung der Colamin-Phosphorsäure-Bindung; man findet deshalb immer zu hohe Neutralisationszahlen (um 90 statt 75). Immerhin genügt die Übereinstimmung nach der Größenordnung zur Unterscheidung des Kephals als einbasische Säure vom Colamin-Salz der Distearoyl-glycerin-phosphorsäure, das sich (durch die mit der Theorie sehr genau übereinstimmende Neutralisationszahl von 146.3) als zweibasische Säure erweist<sup>7)</sup>.

Auch gegen Minersäure ist das Kephalin empfindlicher als Lecithin. Versetzt man die mäßig warme, benzolisch-alkoholische Lösung mit einer gemessenen Menge alkohol. n/10-Salzsäure (Variation von 1/2–2 Mol. HCl) und titriert nach 1 Min. mit alkohol. n/10-Lauge zurück, so verbraucht man allerdings nur so viel Lauge, als sich zur Neutralisation der Salzsäure und des Kephals berechnet; es hat also den Anschein, als ob (im Gegensatz zur direkten Titration mit Alkali) überhaupt keine Ester-Spaltung erfolgt wäre. Daß dem nicht so ist, zeigt sich aber bei der präparativen Aufarbeitung (sofortiges Abkühlen der salzsauren Lösung auf –20°, Abnutschen der ausgeschiedenen Krystallmasse, Ausziehen mit warmem Aceton, Umkrystallisieren aus Benzol usw.). Wir fanden viel Colamin-Hydrochlorid, Distearin-phosphorsäure-äthylester und sekundären Distearin-phosphorsäure-ester, daneben wenig primären Distearin-phosphorsäure-ester als Colamin-Salz und unverändertes Kephalin. Die Hauptmenge des Kephals wurde somit gespalten, aber durch Umesterung. Einerseits erfolgte Umesterung durch Alkohol (Äthanolyse) nach dem Schema:



<sup>7)</sup> Grün und Limpächer, B. 59, 1350 [1926].

Andererseits muß der sekundäre Ester durch eine Selbst-umesterung entstanden sein; vielleicht hat sich die (als Nebenprodukt nachgewiesene) freie Distearin-phosphorsäure selbst umgeestert, zu welcher Umlagerung sie ja die größte Neigung hat<sup>8)</sup>, vielleicht auch ein Teil des Äthylesters oder des Kephalsins. Schema:



Mit Platinchlorwasserstoffsäure in Alkohol gibt die alkoholisch-chloroformische Lösung von Kephalin keine Fällung. Bei 0° krystallisiert aus der Lösung ein Gemisch von Colamin-Chloroplatinat und einer zweiten Platinverbindung, die durch Ausziehen mit Chloroform vom Colamin-Salz vollständig getrennt und durch Umkrystallisieren aus Aceton gereinigt werden kann. Gelbes, mikro-krystallinisches Pulver, in Chloroform und Aceton leicht löslich.

0.0177 g Sbst.: 1.17 mg Pt. — Gef. Pt 6.61.

Kephalin-Chloroplatinat, für das sich ein Platin-Gehalt von 10.25% berechnet, liegt demnach nicht vor. Dagegen stimmt der gefundene Wert mit dem für das Chloroplatinat des [Bis-distearoyl-glycerin]-phosphorsäure-colamin-esters berechneten (Mol.-Gew. 3118.7, Pt 6.26). Daß sich unter den Versuchs-Bedingungen der tertiäre Ester durch Umesterung des Kephalsins bildet, ist nach dessen Verhalten gegen alkohol. Salzsäure (siehe oben) wahrscheinlich.

$\alpha, \alpha'$ -Distearoyl-glycerin- $\beta$ -[phosphorsäure-colamin-ester] (X).

Zur Darstellung dieser Verbindung wurden je  $\frac{1}{20}$  Mol. reinstes  $\alpha, \alpha'$ -Distearin,  $\frac{1}{20}$  Mol. Phosphorpentoxyd und  $\frac{1}{10}$  Mol. Colamin in Form des Carbonats umgesetzt. Die Versuchs-Bedingungen wichen von den oben beschriebenen nur so weit ab, daß die Temperatur, dem höheren Schmelzpunkt des symmetrischen Diglycerids (79.1°) entsprechend, bei etwa 81–82° gehalten wurde. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches erfolgte in der bewährten Weise. Das so erhaltene Kephalin stimmt in allen physikalischen Eigenschaften mit der Verbindung aus  $\alpha, \beta$ -Distearin fast genau überein, wie Sintern der Krystalle um 80°, Meniscus-Bildung bei 177°, Zersetzung bei 185°, Löslichkeiten wie angegeben. Auch im Verhalten gegen Basen, Säuren und Salze zeigten sich, soweit unsere Beobachtungen bisher reichen, keine merklichen Unterschiede.

0.1971 g Sbst.: 0.4760 g CO<sub>2</sub>, 0.1963 g H<sub>2</sub>O. — 0.2159 g Sbst. verbraucht. 2.62 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 0.003675 g N. — 0.1741 g Sbst.: 0.0255 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

C<sub>41</sub>H<sub>82</sub>O<sub>8</sub>PN (747.67). Ber. C 65.80, H 11.05, N 1.87, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 9.50.

Gef. „ 65.86, „ 11.14, „ 1.70, „ 9.35.

<sup>8)</sup> Grün und Kade, B. 45, 3359 [1912]; Grün und Limpächer, B. 59, 1346 [1926].