

Synthese des Lecithin-analogen Fluorochroms {2-[3,6-Bis(dimethylamino)-10-acridinio]ethyl}- (2,3-di-O-palmitoyl-D,L-1-glyceryl)-phosphat

Uwe Erbrich und Herbert W. Zimmermann *

Institut für Physikalische Chemie der Universität Freiburg,
Albertstr. 21, D-7800 Freiburg i.Br.

Eingegangen am 19. Februar 1981

3,6-Bis(dimethylamino)acridin (**1**) reagiert mit 2-Bromethanol unter Bildung von 3,6-Bis(dimethylamino)-10-(2-hydroxyethyl)acridinium-bromid. Das Chlorid **2** dieser Verbindung wird nacheinander mit Tosylchlorid, Natriumiodid und Pikrinsäure umgesetzt. Das resultierende 3,6-Bis(dimethylamino)-10-(2-iodoethyl)acridinium-pikrat (**4**) bildet mit Silber-benzyl-2,3-di-O-palmitoyl-D,L-glycerin-1-phosphat (**5**) das gewünschte Lecithin-Analogon **6**. Der Strukturbeweis wurde ¹H-NMR-spektroskopisch erbracht. Über Fluorochromierungsversuche von LM- und HeLa-Zellen wird berichtet.

Synthesis and Properties of the Lecithin Analogous Fluorochrome {2-[3,6-Bis(dimethylamino)-10-acridinio]ethyl} 2,3-Di-O-palmitoyl-D,L-1-glyceryl Phosphate

The reaction of 3,6-bis(dimethylamino)acridine (**1**) with 2-bromoethanol yields 3,6-bis(dimethylamino)-10-(2-hydroxyethyl)acridinium bromide. Successive treatment of the corresponding chloride **2** with tosyl chloride, sodium iodide, and picric acid results in the formation of 3,6-bis(dimethylamino)-10-(2-iodoethyl)acridinium picrate (**4**). By means of silver benzyl 2,3-di-O-palmitoyl-D,L-glycerol 1-phosphate (**5**), **4** is transformed into the lecithin derivative (**6**). The structure was determined by ¹H NMR spectroscopy. The results of some staining tests with LM-and HeLa cells are reported.

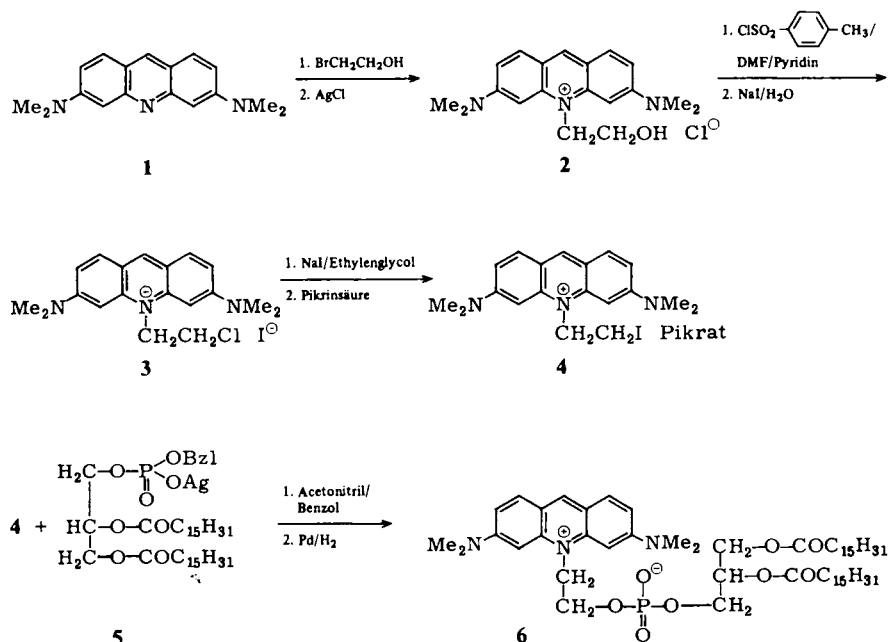
Für die Untersuchung von biologischen Membranen *in vivo* und *in vitro* und von künstlichen Phospholipid-Mono- bzw. -Doppelschichten, die als Modelle für Membranen dienen, sind Lecithin-analoge Fluoreszenzmarker von Interesse, die sich von Lecithinen durch Ersatz des Cholins durch strukturell ähnliche Fluorochrome ableiten lassen. Solche Verbindungen könnten in Membranen eingebaut werden und – bei Verwendung metachromatischer Fluorochrome – über Wechselwirkungen innerhalb der Membran Auskunft geben.

Ein seit langem bekanntes metachromatisches Fluorochrom, das von der lebenden Zelle relativ gut vertragen wird¹⁾, ist Acridinorange (AO) (**1**) bzw. sein in neutralem Medium vorliegendes Kation. Wir haben deshalb als Lecithin-Analogon das Fluorochrom **6** synthetisiert, bei dem das Stickstoffatom des Cholinrestes durch den quartären, heterocyclisch gebundenen Stickstoff ersetzt ist.

Synthese von **6**

Die Anwendung der gängigen Verfahren zur Synthese von Lecithinen stieß zunächst auf große Schwierigkeiten, die in erster Linie auf die schlechte Löslichkeit der quartären

AO-Derivate **2** bis **4** zurückzuführen sind. So mißlang die direkte Umsetzung von **2** mit Dipalmitin und Phenylphosphonyldichlorid (oder POCl_3) analog zur Vorschrift von *Baer* und *Kates*²⁾. Auch die Verknüpfung der Dipalmitoylphosphatidsäure mit **2** durch Zusatz von 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid³⁾ war nicht erfolgreich. Zum Erfolg führte schließlich eine Modifikation der Vorschrift von *de Haas* und *v. Deenen*⁴⁾, nämlich die Umsetzung des Dipalmitoylphosphatidsäure-benzylesters **5** mit dem 2-Iodethyl-Derivat **4**. Der Konstitutionsbeweis für **6** wurde NMR-spektroskopisch erbracht.



Die Schlüsselverbindung **4** ließ sich weder durch Umsetzung von **1** mit Diiod- (oder auch Dibrom)ethan noch durch direkte Iodierung (oder Bromierung) von **2**, beispielsweise durch Reaktion mit Thionylbromid, gewinnen. Daher wurde der Umweg über das 2-Chlorethyl-Derivat **3** gewählt. Dieses läßt sich auch durch Umsetzung von **2** mit POCl_3 gewinnen. Das resultierende Produkt ist zwar reiner, aber die Ausbeute geringer als bei Verwendung von Tosylchlorid. Der Alkohol **2** wurde analog zur Vorschrift von *Vitaigliano et al.*⁵⁾ durch Quartärisierung von **1** hergestellt.

Die Verbindung **5** wurde nach modifizierten Literaturvorschriften synthetisiert⁶⁻¹⁰⁾.

Eigenschaften

6 ist eine oberflächenaktive Substanz, die sich auf Wasser gut spreiten läßt. Die Messung von Schub-Flächendiagrammen ergab in Analogie zu anderen Lecithinen¹¹⁾ einen Phasenübergang zwischen „flüssig-kondensiert“ und „flüssig-expandiert“. Dieser läßt sich durch ein Temperaturintervall charakterisieren, das dem anderer Lecithine¹¹⁾ ähnlich ist. Über diese Messungen wird an anderer Stelle berichtet.

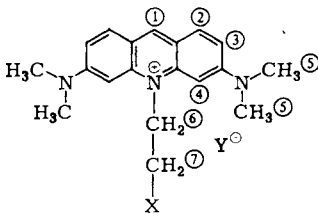
Alkoholfixierte LM- und Hela-Zellen wurden mit **6** fluorochromiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennt man die grün fluoreszierende Kernmembran und den Nucleolus (bzw. die Nucleoli) im Zellkern. Die Chromosomen mitotischer Zellen werden gut dargestellt.

Versuche zur Vitalfluorochromierung mit **6** wurden durch die schlechte Löslichkeit der Substanz erschwert. Unter speziellen Versuchsbedingungen sind unter dem Fluoreszenzmikroskop filamentöse Strukturen im Cytoplasma von Helazellen angedeutet, bei denen es sich wahrscheinlich um Mitochondrien handelt. Wesentlich deutlicher erkennt man diese Strukturen bei der Vitalfluorochromierung mit den Chloriden von **3** und **4**. Weiterführende Versuche sind im Gange.

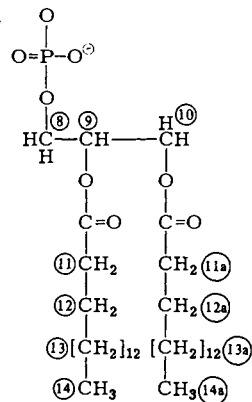
Für die Messung von NMR-Spektren danken wir den Herren Prof. Dr. H. Fritz, Dr. D. Hunkler und Dr. H. H. Limbach, für die Durchführung von Fluorochromierungen Frau A. Naujok. Dem Bundesministerium für Forschung und Technologie sind wir für finanzielle Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Kofler-Block, nicht korrigiert. – Die Reinheit der Reaktionsprodukte wurde dünnschichtchromatographisch auf Silicagelplatten (DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F 254, Merck) überprüft. Laufmittel I: Chloroform/Methanol/Wasser (60:35:8), Laufmittel II: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser/Ethanol (50:15:25:10). – VIS-UV-Spektren: Perkin-Elmer 555. – ¹H-NMR: Bruker HX 360 und WM 250, interner Standard TMS. Der Einfachheit halber wurde das Kohlenstoffgerüst entsprechend dem Schema durchnummeriert.



X = Cl, I,



3,6-Bis(dimethylamino)acridin (1): Ausgehend von dem im Handel erhältlichen Hydrochlorid (Acridinorange zur Mikroskopie, Ferak) wurde die Rohbase nach Zanker gefällt¹²⁾. Diese wird anschließend in viel Methanol gelöst. Nach Zusatz einiger Tropfen konz. Ammoniak wird die Lösung filtriert und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgezogen.

3,6-Bis(dimethylamino)-10-(2-hydroxyethyl)acridinium-chlorid (2): 11 g (0.040 mol) **1** werden mit 70 g (0.56 mol) frisch destilliertem 2-Bromethanol und 600 ml Benzol 16 h unter Rückfluß gekocht. Der ausgefallene dunkelrote Niederschlag wird abgesaugt und in einer Mischung von 50 ml Methanol und 300 ml Wasser in der Hitze gelöst. Man versetzt die Lösung mit 14 g (0.10 mol)

frisch gefälltem Silberchlorid, rührt die Aufschlämmung 15 h, filtriert und zieht das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer ab. Der Rückstand wird in 500 ml Wasser gelöst, die Lösung mit konz. Ammoniak auf pH = 10 eingestellt und filtriert. Die nicht umgesetzte Base **1** läßt sich im Perforator mit Benzol extrahieren. Anschließend fällt man **2** durch Zugabe einer konzentrierten Natriumchlorid-Lösung aus. Der Niederschlag wird abfiltriert, über Silicagel getrocknet, aus Ethylenglycol-monomethylether umkristallisiert und erneut i. Vak. getrocknet. Ausb. 3.2 g (23%), braune Nadeln vom Schmp. 303 – 304 °C (Zers.). **2** ist gut wasserlöslich. In organischen Lösungsmitteln, besonders in unpolaren aprotischen, löst es sich nur wenig.

$C_{19}H_{24}ClN_3O$ (345.9) Ber. C 65.98 H 6.99 N 12.15 Gef. C 65.70 H 6.78 N 12.09

10-(2-Chlorethyl)-3,6-bis(dimethylamino)acridinium-iodid (**3**): 2.77 g (8.0 mmol) **2** werden mit einer Mischung von 60 ml trockenem DMF (Uvasol, Merck) und 6 ml trockenem Pyridin (Merck) unter Stickstoffatmosphäre auf 120 – 130 °C erhitzt. Man versetzt mit 3.0 g (16 mmol) Tosylchlorid, rührt 30 min, gibt abermals 3.0 g Tosylchlorid zu und läßt weitere 30 min reagieren. Nach Abkühlen wird unter Stickstoff mit 50 ml Wasser versetzt, das Hydrolysat in 1 l Wasser gegossen und das Reaktionsprodukt nach Zusatz von 6 g festem Natriumhydrogencarbonat mit einer wäßrigen Kaliumiodidlösung ausgefällt. Man saugt ab, löst den roten Niederschlag unter leichtem Erwärmen in 80 ml DMF, gießt in 2 l Wasser, fällt abermals mit einer Kaliumiodidlösung, saugt ab und trocknet das Produkt über Silicagel. Ausb. 3.1 g (65%) rote Kristalle vom Schmp. 264 – 265 °C. Zur weiteren Charakterisierung wurde das Chlorid verwendet. Schmp. (aus Wasser) 259 °C. Das Chlorid löst sich ebenso wie das Iodid etwas in Wasser, mäßig in Ethylenglycol und relativ gut in hochsiedenden dipolar aprotischen Lösungsmitteln. – ¹H-NMR ($[D_6]DMSO$): δ = 8.84 (s, 1H, 1-H), 7.96 (d, 2H, 2-H), 7.30 (dd, 2H, 3-H), 6.80 (d, 2H, 4-H), 3.23 (s, 12H, 5-H), 5.24 (t, 2H, 6-H), 4.26 (t, 2H, 7-H), $J_{2,3}$ = 9.5, $J_{3,4}$ = 2, $J_{6,7}$ = 6.5 Hz.

$C_{19}H_{23}Cl_2N_3$ (365.3) Ber. C 62.64 H 6.36 N 11.53 Gef. C 62.23 H 6.51 N 11.80

3,6-Bis(dimethylamino)-10-(2-iodethyl)acridinium-pikrat (**4**): 2.70 g (4.56 mmol) **3** und 13.5 g Natriumiodid (90 mmol) werden mit 100 ml getrocknetem Ethylenglycol unter Stickstoff auf 120 °C erhitzt. Wenn sich beide Komponenten vollständig gelöst haben, läßt man weitere 5 h reagieren. Beim Abkühlen kristallisiert das gewünschte Produkt aus. Man saugt ab, löst die Kristalle unter Erwärmen in 600 ml Methanol und fällt das Pikrat durch Zusatz von methanolischer Pikrinsäurelösung. Nach Absaugen wird aus Methanol umkristallisiert. Ausb. 2.2 g (74%), orangefarbene Kristalle vom Schmp. 231 – 232 °C (Zers.), löslich in dipolar aprotischen Lösungsmitteln. – ¹H-NMR (CF_3CO_2D): δ = 9.30 (s, 2H, Aryl-H der Pikrinsäure), 8.90 (s, 1H, 1-H), 8.27 (d, 2H, 2-H), 7.76 (d, 2H, 3-H), 3.62 (s, 12H, 5-H), 5.22 (t, 2H, 6-H), 3.70 (t, 2H, 7-H), $J_{2,3}$ = 9.5, $J_{6,7}$ = 8.5 Hz. Die Deuteriotrifluoressigsäure bewirkt an der Position 4 eine quantitative Deuterierung¹³⁾.

$C_{25}H_{25}IN_6O_7$ (648.4) Ber. C 46.30 H 3.89 N 12.96 Gef. C 46.60 H 4.07 N 12.92

{2-[3,6-Bis(dimethylamino)-10-acridinio]ethyl}-(2,3-di-O-palmitoyl-D,L-1-glycerol)-phosphat (**6**): 1.17 g (1.8 mmol) trockenes **4** und 3.05 g (3.6 mmol) trockenes **5** werden mit einer Mischung aus 180 ml trockenem Acetonitril¹⁴⁾ und 50 ml trockenem Benzol (Merck) versetzt. Man erhitzt unter Stickstoff 25 h im Dunkeln auf 110 – 120 °C, filtriert die heiße Lösung, zieht das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer ab und kristallisiert das Reaktionsprodukt zweimal aus Acetonitril um. Das Pikrat-Anion läßt sich durch Ionenaustausch entfernen. Bei Verwendung eines stark basischen Anionenaustauschers läßt sich die Bildung der unerwünschten Pseudobase nicht ausschließen¹⁵⁾. Daher wird das Pikrat-Ion zunächst durch Chromatographie über Lewatit M 5080 (Merck) gegen Chlorid ausgetauscht. Dieses wiederum läßt sich als Anion einer starken Säure durch den schwach basischen Ionenaustauscher Lewatit MP 7080 (Merck) entfernen. Als Elutionsmittel verwendet man in beiden Fällen Laufmittel I. Nach Abziehen des Lösungsmittels im

Rotationsverdampfer wird die Substanz über Phosphorpentoxid getrocknet. Die restlichen fluoreszierenden Verunreinigungen (DC, Laufmittel II) lassen sich durch Gelchromatographie entfernen (Sephadex LH 20, mobile Phase Chloroform). Nach Abtrennung des gewünschten Produktes (fluoreszierender Streifen mit der kürzesten Elutionszeit) läßt sich die Säule durch Waschen mit Methanol regenerieren. Für die Chromatographie von jeweils 200 mg Rohprodukt wurden 180 g trockenes Sephadex eingesetzt.

Zur Reduktion löst man die Substanz in 50–100 ml absol. Ethanol, versetzt mit 1 g einer 5proz. Palladium/Aluminiumoxid-Mischung (Engelhard Katalysator, Roth), rührt kräftig und leitet Wasserstoff bei Normaldruck ein. In Abständen von 2 h wird jeweils ein weiteres Gramm Katalysator zugesetzt. Die Reaktion ist nach ca. 6 h beendet (DC, Laufmittel II). Anschließend saugt man den Katalysator ab, wäscht gründlich mit absol. Ethanol nach und verdünnt das Filtrat mit etwas destilliertem Wasser auf 99 Vol.-%. Das Cadmiumchlorid-Addukt der gesuchten, Lecithin-analogen Verbindung läßt sich jetzt durch Zusatz einer gesättigten Lösung von Cadmiumchlorid in wäßrigem Ethanol (96 Vol.-%) ausfällen¹⁶⁾. Man saugt ab, löst das Produkt in 50 ml Chloroform („zur Analyse“) und entfernt das Cadmiumchlorid, indem man viermal mit jeweils 50 ml wäßrigem Ethanol (30 Vol.-%) ausschüttelt¹⁷⁾. Die Chloroformphase wird abgetrennt und filtriert. Man destilliert das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer ab und wäscht den Feststoff mit absol. Ether. Ausb. 478 mg (28%), orangefarbenes Pulver, das sich oberhalb 220°C zersetzt. – UV (CH₂Cl₂): λ_{max} (log ϵ) = 507 nm (4.321).

6 ist unlöslich in Wasser, schlecht löslich in unpolaren organischen Lösungsmitteln wie z. B. Benzol und ausgezeichnet löslich in Ethanol, Methylenchlorid und Chloroform. – ¹H-NMR: s. Tabelle.

C₅₄H₉₀N₃O₈P · 2H₂O (976.3) Ber. C 66.36 H 9.81 N 4.30 Gef. C 66.18 H 10.28 N 4.29

Tab.: ¹H-NMR-Spektrum von 6 (δ -Werte, Lösungsmittel CDCl₃)

	1-H	2-H	3-H	4-H	5-H	6-H			
δ	8.37 s	7.71 d	6.99 d	7.04 ^{b)}	3.35 s	5.03 t			
δ' a)	–	–	–	–	–	3.82			
Zahl der Protonen	1	2	2	2	12	2			
	7,10-H	8-H	9-H	10'-H	11-H	11a-H			
δ	4.42 m	4.09 t	5.25 m	4.18 d,d	2.25 t	2.24 t			
δ' a)	4.31 (4.40)	3.95	5.20	4.13	2.29	2.27			
Zahl der Protonen	3	2	1	1	2	2			
	12,12a-H	13,13a-H	14,14a-H	H ₂ O					
δ	1.54 m	1.3–1.2	0.88 t	2.17					
δ' a)	1.58	1.26	0.88						
Zahl der Protonen	4	48	6						
Kopplungskonstanten									
<i>i, j</i>	2,3	3,4	6,7	7,P	8,P	8,9	9,10	9,10'	10,10'
<i>J</i> _{<i>i,j</i>} in Herz	9.5	1.5	6.5	12	6.5	6.5	6.5	3.0	12

a) Zum Vergleich wurden die chemischen Verschiebungen des D,L-Dipalmitoyllecithins unter denselben Bedingungen vermessen. – b) Das Dublett ist kaum zu erkennen.

- 1) *A. Albert*, The Acridines, 2. Aufl., S. 493, Edward Arnold Publishers Ltd., London 1966.
- 2) *E. Baer* und *M. Kates*, J. Am. Chem. Soc. **72**, 942 (1950).
- 3) *R. Aneja*, *J. S. Chadha* und *P. A. Davis*, Biochim. Biophys. Acta **218**, 102 (1970).
- 4) *G. H. de Haas* und *L. L. M. von Deenen*, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **80**, 951 (1961).
- 5) *V. Vitagliano*, *L. Costantino*, *N. Staiano*, *O. Ortona* und *S. Wurzbürger*, Adv. Mol. Relax. Proc. **12**, 251 (1978).
- 6) *L. W. Hessel*, *O. E. van Lohuizen* und *P. E. Verkade*, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **72**, 842 (1954).
- 7) *L. W. Hessel*, *I. D. Morton*, *A. R. Todd* und *P. E. Verkade*, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **73**, 150 (1954).
- 8) *P. R. Bird* und *J. S. Chadha*, Tetrahedron Lett. **1966**, 4541.
- 9) *F. Lynen*, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **73**, 367 (1940).
- 10) *J. W. Gielkens*, *M. A. Hoefnagel*, *L. J. Stegerhoek* und *P. E. Verkade*, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **77**, 656 (1958).
- 11) *A. Blume*, Biochim. Biophys. Acta **557**, 32 (1979).
- 12) *V. Zanker*, Acta Histochem., Suppl. **XIII**, 281 (1973).
- 13) *J. R. Grezes* und *W. Seiffert*, persönliche Mitteilung.
- 14) *R. Süttinger*, Dissertation, Univ. Freiburg 1980.
- 15) *P. Ehrlich* und *L. Benda*, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **46**, 1931 (1913).
- 16) *F. Kögl*, *G. H. de Haas* und *L. L. M. von Deenen*, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **79**, 671 (1960).
- 17) *M. C. Pangborn*, J. Biol. Chem. **188**, 471 (1951).

[62/81]