

Synthese von im Cholinteil deuterierten 3-sn- und 2-  
Phosphatidylcholinen

Thomas Laube und Harry Kurreck <sup>+</sup>

Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin,  
Takustr. 3, D-1000 Berlin 33

Key Words: 3-sn-Phosphatidylcholin, 2-Phosphatidylcholin,  
Deuterium, NMR, FD mass spectroscopy.

Die Synthese des im Cholinteil deuterierten 3-sn-Phosphatidylcholins 15 und des isomeren 2-Phosphatidylcholins 17 wird beschrieben. Ausgangsprodukte sind die entsprechenden Di-O-acylglycerine 8 bzw. 10, aus denen 15 bzw. 17 über die 1,3,2-Dioxaphospholane in reiner Form aufgebaut werden. Die Bestimmung des Deuterierungsgrades durch kombinierte Auswertung von <sup>1</sup>H-NMR-Spektren und FD-Massenspektren wird eingehend diskutiert.

Synthesis of 3-sn- and 2-Phosphatidylcholins, Deuterated in the  
Cholin Part

The synthesis of 3-sn-phosphatidylcholin 15 and of 2-phosphatidylcholin 17 is described. The synthetic pathways start from the respective di-O-acylglycerols 8 and 10 yielding 15 and 17 via the 1,3,2-dioxaphospholanes 14 and 16, respectively. The combination of the data from <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and FD mass spectroscopy allows an accurate determination of the degree of deuteration.

Ein bedeutendes Merkmal der belebten Natur besteht in ihrer Fähigkeit, gegeneinander abgegrenzte Bereiche, wie z.B. Zellen, auszubilden, wobei auch deren Inneres wiederum in verschiedene Kompartimente aufgeteilt ist. Die Trennung der einzelnen Reaktionsräume wird durch biologische Membranen bewirkt, deren wichtigste und allgemeinste Aufgabe in der Einschränkung des Stoffaustausches zwischen den verschiedenen Kompartimenten besteht.

Ein hervorragendes Modellsystem für biologische Membranen sind lyotrope flüssige Kristalle, die aus 1,2-Di-O-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (einem 'L- $\alpha$ -Lecithin') und Wasser aufgebaut sind. Eine wesentliche Methode zur Untersuchung von Änderungen der Molekülstruktur an Phasenübergängen in Lipid/Wasser-Systemen ist die magnetische Resonanzspektroskopie. Für NMR-spektroskopische Studien benötigt man partiell deuterierte Verbindungen, die möglichst selektiv und mit hohem Markierungsgrad deuteriert sind, und die darüber hinaus auch eine hohe chemische und enantiomere Reinheit besitzen.

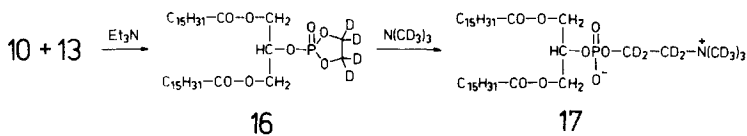
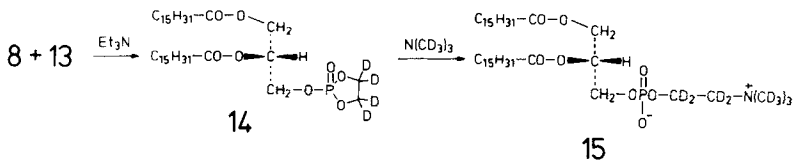
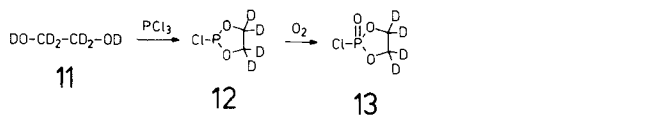
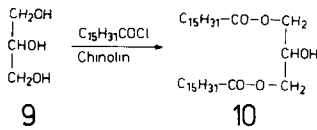
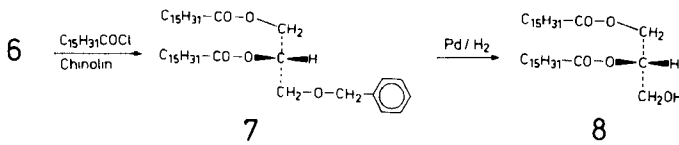
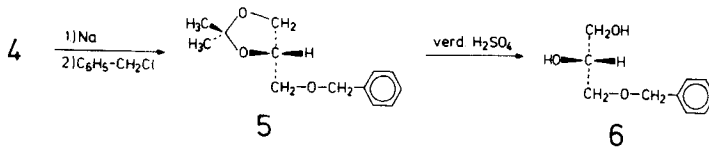
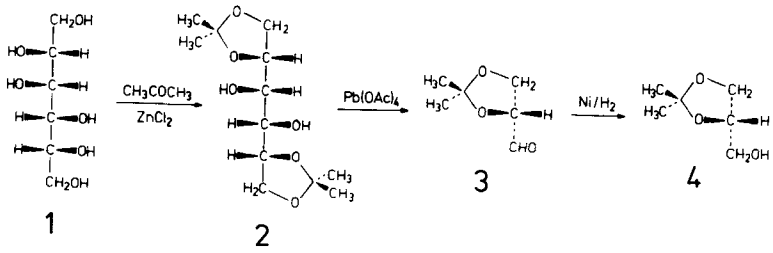
In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Synthese eines im Cholinteil deuterierten 3-sn-Phosphatidylcholins <sup>1</sup> und die eines Isomeren. Besonderes Augenmerk richten wir auf die Bestimmung des Deuterierungsgrades, die nur durch die kombinierte Auswertung von <sup>1</sup>H-NMR-Spektren und FD-Massenspektren durchgeführt werden konnte.

A. Synthese

Für die Synthese der teildeuterierten Verbindungen 15 und 17 haben wir den in Schema 1 dargestellten Weg gewählt, der für nicht markierte Verbindungen bereits beschrieben ist. Er erschien uns im Vergleich zu anderen bekannten Synthesewegen <sup>2-11</sup> für die Darstellung von 3-sn-Phosphatidylcholinen am günstigsten, da die Markierung erst auf den letzten Stufen erfolgt, die benötigten deuterierten Reagentien relativ preiswert sind, die Ausbeuten auf den markierten Stufen hoch sind und die Gefahren der Racemisierung (mit Ausnahme der Darstellung von 8) und des H/D-Austausches gering sind. Außerdem sollte der für die Darstellung von 15 eingeschlagene Weg ohne großen Mehraufwand auch für die Darstellung von 17 nutzbar sein.

B. Bestimmung der Deuterierungsgrade der Verbindungen 13, 15 und 17

Bei der Bestimmung von Deuterierungsgraden aus den Massenzahlverteilungen in einem Massenspektrum ist man bemüht, im Molekülpeakbereich Fragmentierungen und Protonierungen soweit wie möglich zu unterdrücken (bei Elektronenstoßmassenspektren durch Aufnahme bei verminderter Elektronenenergie) <sup>12</sup>. Im CI-Massenspektrum des Säurechlorids 13 (Reaktandgas Isobutan) registriert man allerdings nur Ionen des Typs  $[M+H]^+$ . Da keine Molekülradikalkationen auftreten, können die üblichen Verfahren zur Bestimmung von Markierungsgraden angewandt werden (wir führten die Bestimmung gemäß der in Lit. <sup>13</sup> beschriebenen Methode durch).



Wesentlich komplizierter ist die Bestimmung der Deuterierungsgrade der Verbindungen 15 und 17. Da die Analyse des Felddesorptionsmassenspektrums der zu 15 analogen, nicht deuterierten Verbindung ergibt, daß der Molekülpeakbereich durch eine Überlagerung der Massenspektren von dehydrierten Molekül-Ionen  $[M-H]^+$ , Molekül-Ionen  $M^{+\cdot}$  und protonierten Molekül-Ionen  $[M+H]^+$  zustande kommt, muß man bei den teildeuterierten Substanzen 15 und 17 noch zusätzlich den Einfluß dedeuterierter Molekül-Ionen  $[M-D]^+$  und deuterierter Molekül-Ionen  $[M+D]^+$  berücksichtigen. Außerdem ist es nicht zulässig, aus den für die undeuterierte Substanz gefundenen Koeffizienten für die Anteile der Ionen  $[M-H]^+$ ,  $M^{+\cdot}$  und  $[M+H]^+$  Rückschlüsse auf die Koeffizienten in den Massenspektren von 15 und 17 zu ziehen, da die undeuterierte Substanz unter anderen Bedingungen vermessen werden mußte als die beiden deuterierten. Nach mehreren erfolglosen Versuchen, die Massenzahlverteilung für  $M^{+\cdot}$  und die Koeffizienten für die Anteile dedeuterierter, dehydrierter usw. Molekül-Ionen (von jetzt an  $x_{j1}$  bis  $x_{j5}$  genannt; siehe auch Abb. 1, rechte Hälfte) gleichzeitig aus nicht-linearen Gleichungssystemen zu berechnen, wurde folgender Weg eingeschlagen:

1. Man macht eine Annahme über den Satz individueller Deuterierungsgrade für die markierten Positionen des Moleküls, die in Einklang mit den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren steht (für jede neue Annahme wird ein anderer Index  $j$  festgelegt).

2. Man löst das überbestimmte lineare Gleichungssystem

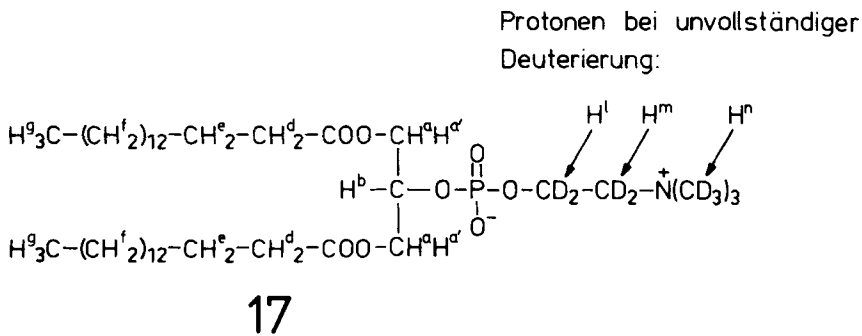
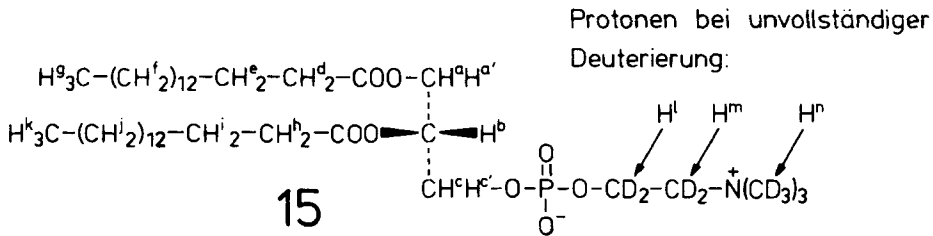
$\underline{A}_j \cdot \underline{X}_j = \underline{B}$  unter Anwendung der ersten Gaußschen Transformation auf:

$$\underline{X}_j = (\underline{A}_j^T \cdot \underline{A}_j)^{-1} \cdot \underline{A}_j^T \cdot \frac{1}{|\underline{B}|} \cdot \underline{B};$$

Die Elemente der ersten Spalte von  $\underline{A}_j$  stellen die Massenzahlverteilung für die Ionen  $[M-D]^+$  dar, die der zweiten Spalte von  $\underline{A}_j$  die Massenzahlverteilung der Ionen  $[M-H]^+$ , die der dritten Spalte die Massenzahlverteilung der Ionen  $M^+$ , die der vierten Spalte die Massenzahlverteilung der Ionen  $[M+H]^+$  und die der fünften und letzten Spalte von  $\underline{A}_j$  die Massenzahlverteilung der Ionen  $[M+D]^+$ . Der Spaltenvektor  $\underline{B}$  enthält die experimentell gefundenen Häufigkeiten im Molekülpeakbereich (siehe Abb. 1, linke Hälfte); einander entsprechende, d.h. in derselben Zeile stehende Elemente von  $\underline{A}_j \cdot \underline{X}_j$  und  $\underline{B}$  gehören zur gleichen Massenzahl.

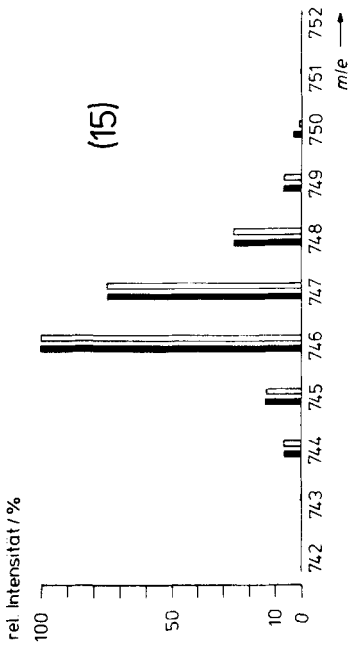
3. Falls die Elemente von  $\underline{X}_j$  die Bedingungen  $\sum_{i=1}^5 x_{ji} = 1$  und  $0 \leq x_{ji} \leq 1$  für alle  $i \in \{1, \dots, 5\}$  erfüllen, stellt der Satz von individuellen Deuterierungsgraden, mit dem die Massenzahlverteilungen in den Spalten von  $\underline{A}_j$  berechnet wurden, ein zulässiges Ergebnis dar. Die erste der obengenannten Bedingungen wird i. allg. nur näherungsweise erfüllt, da eine vermittelnde Ausgleichung durchgeführt wird. Falls die Elemente von  $\underline{X}_j$  die Bedingungen nicht erfüllen, muß man mit einem anderen Satz individueller Deuterierungsgrade wieder bei 1. beginnen.

Die drei Fälle (mit  $\underline{j} = 1, 2, 3$  bezeichnet), die die besten Ergebnisse lieferten, sollen hier kurz diskutiert werden (siehe auch Abb. 1).



Der mit  $\underline{j} = 1$  bezeichnete Fall stützt sich auf die Mindestdeuterierungsgrade der bei der Synthese eingesetzten Ausgangsverbindungen (Herstellerangaben); es resultiert ein Gesamtdeuterierungsgrad von 99.0 %. Bei dem mit  $\underline{j} = 2$  gekennzeichneten Fall wurde berücksichtigt, daß das Restsignal der neun Methylprotonen  $\text{H}^n$  (siehe Abb. 1)

Abb. 1 (siehe nächste Seite). Interpretation der experimentell gefundenen Massenzahlverteilungen in den Molekülpeakbereichen der FD-Massenspektren von 15 und 17 als Überlagerung der Massenzahlverteilungen der Ionen  $[\text{M}-\text{D}]^+$ ,  $[\text{M}-\text{H}]^+$ ,  $\text{M}^{+\cdot}$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  und  $[\text{M}+\text{D}]^+$ .

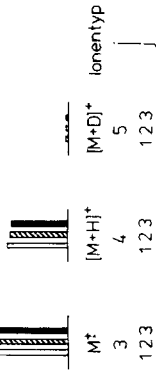


(15)

Koeffizienten  $x_{ji}$



(15)



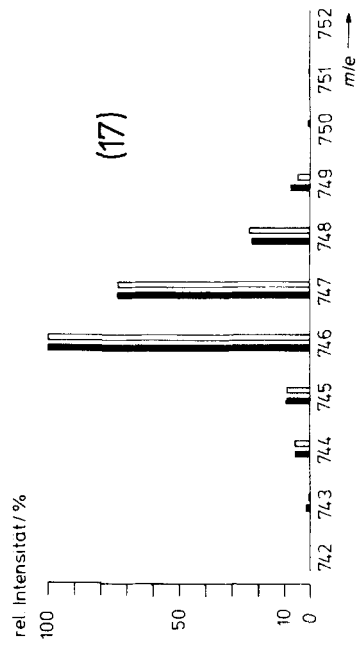
Schwarze Balken: experimentell gefundene Intensitäten in den Molekularbereichen der FD-Massenspektren (Komponenten von B).  
 Weiße Balken: durch Ausgleichung angepasste Intensitäten (Komponenten von  $D_j$ , für  $j=1,2,3$  im Rahmen der Zeichengenauigkeit keine Unterschiede)

$$X_j = (A_j^T A_j)^{-1} A_j^T \frac{1}{|B|} \cdot B$$

$$C_j = A_j \cdot X_j$$

$$D_j = \frac{1}{\max_k |c_{jk}|} \cdot C_j$$

j	Annahmen über die 13 D-Atome
1	13 D-Atome mit je 99.0 % Deut-grad
2	" " " " 99.0 % " "
3	4 " " " " 99.6 % " "
4	9 " " " " 99.5 % " "
5	4 " " " " 99.6 % " "

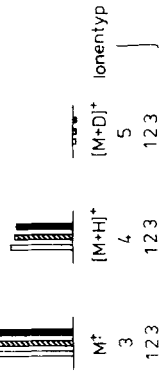


(17)

Koeffizienten  $x_{ji}$



(17)





in den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 15 und 17 einem Durchschnittsdeuterierungsgrad von 99.6 % in den Methyldeuteronen entspricht, während für die vier Methyldeuteronen weiterhin ein Durchschnittsdeuterierungsgrad von 99.0 % angenommen würde, so daß insgesamt ein Durchschnittsdeuterierungsgrad von 99.4 % resultiert. (Für die Methylenprotonen  $\text{H}^1$  und  $\text{H}^m$  findet man in den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren keine meßbaren Restsignale.) In dem mit  $j = 3$  gekennzeichneten Fall wurde schließlich die Annahme gemacht, daß sich der durchschnittliche Deuterierungsgrad von 99.5 % in der  $[\text{D}_4]$ Ethylengruppe von 13 auf die  $[\text{D}_4]$ Ethylengruppen in den Cholinteilen von 15 und 17 übertragen hat, d.h. daß die Reaktionen ohne jeden H/D-Austausch verliefen. In diesem Fall resultiert ein Durchschnittsdeuterierungsgrad von 99.6 % für die 13 Deuteronen. In Abb. 1 sind in der linken Hälfte die angepaßten Linearkombinationen (Komponenten von  $\underline{D}_j$ ; weiße Balken) mit den experimentell gefundenen Massenzahlverteilungen (Komponenten von  $\underline{B}$ ; schwarze Balken) verglichen worden. Die Summe der Abweichungsquadrate ist beim Vergleich der experimentell gefundenen mit der durch Ausgleichung angepaßten Verteilung allein kein gutes Kriterium für die Entscheidung, ob die zugrunde gelegte Massenzahlverteilung die experimentellen Daten erklärt oder nicht erklärt, da eigentlich eine Extremwertaufgabe mit Nebenbedingungen vorliegt; die Summe der Abweichungsquadrate soll minimal werden unter den Nebenbedingungen  $\sum_{i=1}^5 \underline{x}_{ji} = 1$  und  $0 \leq \underline{x}_{ji} \leq 1$  für alle  $i \in \{1, \dots, 5\}$ . Es ist also notwendig, auch die Erfüllung der Nebenbedingungen zu überprüfen. In der rechten Hälfte der Abb. 1 wurden die Koeffizienten  $\underline{x}_{j1}$  bis  $\underline{x}_{j5}$  für  $j = 1, 2, 3$  für die beiden Verbindungen 15 und 17 dargestellt. Man erkennt, daß  $\underline{x}_{j5}$  für  $j = 1, 2, 3$  bei 15 klein und positiv, bei 17 klein und negativ ist. Offensichtlich sind derart kleine Abwei-

chungen von den Nebenbedingungen wie bei  $x_{j5}$  für 17 auf die Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Peakflächen in den Massenspektren zurückzuführen. Charakteristisch ist das Anwachsen von  $x_{j2}$  bei steigendem Deuterierungsgrad. Für  $j = 1$  liegt bei 17 noch eine deutliche Nichterfüllung der Nebenbedingung  $0 < x_{12} < 1$  vor. Erst bei den noch höheren Durchschnittsdeuterierungsgraden in den mit  $j = 2$  und  $j = 3$  gekennzeichneten Fällen werden die Nebenbedingungen erfüllt. Auch bei 15 erkennt man ein ähnliches Verhalten des Koeffizienten  $x_{j2}$  bei steigendem Deuterierungsgrad. Zwar kann man annehmen, daß bei 15 schon bei einem Durchschnittsdeuterierungsgrad von 99.2 % alle Nebenbedingungen näherungsweise erfüllt wären, doch läßt sich vermuten, daß bei den Synthesen von 15 und 17 für beide Verbindungen derselbe Deuterierungsgrad gefunden werden müßte, da die Reaktionsbedingungen übereinstimmen. Unter Berücksichtigung der Fehler bei der Bestimmung der Peakflächen in den Massenspektren ergibt sich für die Verbindungen 15 und 17 ein Deuterierungsgrad von  $(99.3 \pm 0.3)\%$ .

Die Autoren danken Herrn Dr. W. Lubitz, Institut für Organische Chemie der FU Berlin, für die Anregung zu dieser Arbeit.

Herrn Dr. Höhne, Institut für Organische Chemie der TU Berlin, danken wir für die Aufnahme der FD-Massenspektren. H.K. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft, T.L. der Studienstiftung des deutschen Volkes für finanzielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

<sup>1</sup>H-NMR-Spektren: Bruker WH 270-Gerät (innerer Standard TMS,  $\delta = 0.00$  ppm). FD-Massenspektren: Varian MAT 311 A (6 kV Saugblendspannung, 3 kV Beschleunigungsspannung, 18 - 25 mA Heizstrom). CI-Massenspektren: Varian MAT 112 S (Reaktandgas Isobutan). Drehwerte: Polarimeter Perkin-Elmer 141, temperierbare 1-dm-Küvetten. Schmelzpunkte: unkorrigiert. Sichtbarmachung der Substanzflecken in den Dünnschichtchromatogrammen: Bronthymolblau.

1,2;5,6-Di-O-isopropyliden-D-mannit (2): Darstellung aus D-Mannit (1) gemäß Lit. <sup>3, 14</sup>. Das Produkt wurde zweimal aus absol. Di-n-buthylether umkristallisiert.

1,2-O-Isopropyliden-sn-glycerinaldehyd (3): Darstellung gemäß Lit. <sup>3, 14</sup>. Das unter Inertgas fein pulverisierte Bleitetraacetat wurde mit Hilfe eines Feststoffdosiertrichters zugegeben.

1,2-O-Isopropyliden-sn-glycerin (4): Darstellung gemäß Lit. <sup>3, 14</sup>. Das Raney-Nickel wurde gemäß Lit. <sup>15</sup> dargestellt.

3-O-Benzyl-1,2-O-isopropyliden-sn-glycerin (5): Darstellung gemäß Lit. <sup>16</sup>, wobei unter trockenem Reinst-N<sub>2</sub> gearbeitet wurde.

3-O-Benzyl-sn-glycerin (6): Darstellung gemäß Lit. <sup>16, 17</sup>, wobei unter trockenem Reinst-N<sub>2</sub> gearbeitet wurde.

3-O-Benzyl-1,2-di-O-palmitoyl-sn-glycerin (7): Darstellung in Anlehnung Lit. <sup>16, 17</sup>, wobei unter trockenem Reinst-N<sub>2</sub> gearbeitet wurde. Das Palmitoylchlorid wurde gemäß Lit. <sup>18</sup> mit Oxalylchlorid dargestellt. Das Rohprodukt 7 wurde viermal aus absol. Ether um-

kristallisiert, wobei die Lösungen zum Auskristallisieren der Substanz auf  $-25^{\circ}\text{C}$  gekühlt wurden und die kalt abgesaugte Kristallmasse mit kaltem absol. Ether nachgewaschen wurde.

1,2-Di-O-palmitoyl-sn-glycerin (8): Darstellung in Anlehnung an Lit. <sup>16, 17</sup>, wobei eine Hydrierapparatur nach Marhan (Fa. Normag) eingesetzt wurde, die mit Hilfe eines Umwälzthermostaten auf  $20^{\circ}\text{C}$  gehalten wurde. Als Sperrflüssigkeit diente Quecksilber p.a., der Wasserstoff wurde mit gesättigter  $\text{KMnO}_4$ -Lösung gewaschen und dann über  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{P}_2\text{O}_5$  (auf Glaswolle) getrocknet. Zum Spülen der Apparatur vor und nach der Hydrierung wurde trockener Reinst- $\text{N}_2$  verwendet. Die Zugabe des Palladiumschwarzes (Fa. Fluka) zu der Lösung von 7 in absol. Cyclohexan und die Abtrennung des Produktes durch vielfaches Auswaschen des Katalysators mit absol. Ether wurde unter trockenem Reinst- $\text{N}_2$  durchgeführt. Die Hydrierung wurde vorzeitig abgebrochen, um Racemisierung und Isomerisierung so weit wie möglich zu unterbinden. Das Rohprodukt wurde aus absol. Petrolether ( $40-60^{\circ}\text{C}$ ) umkristallisiert; man erhielt aus 5.00 g 7 (7.59 mmol) 3.22 g Produkt und 1.01 g Mutterlaugenrückstand, der einen großen Anteil an nicht umgesetztem Benzylether 7 enthielt. Das auskristallisierte Produkt wurde durch SC bei  $-13^{\circ}\text{C}$  gereinigt, wobei auch die letzten Spuren nicht abgetrennten Palladiumschwarzes auf der Säule zurückgehalten wurden. Adsorptionsmittel 450 g Kieselgel reinst (Fa. Merck), Elutionsmittel absol.  $\text{CHCl}_3$ /absol.  $\text{CH}_3\text{OH}$  (95:5), Säulendurchmesser 40 mm, Füllhöhe 900 mm. Es wurde unter Lichtausschluß und unter Reinst- $\text{N}_2$  gearbeitet. Ausb. 2.86 g eines Produktes, das eine sehr geringe Menge des zu 8 isomeren 1,3-Di-O-palmitoylglycerins enthielt und aus 0.35 g eines DC-einheitlichen Produktes (zusammen 3.21 g oder 74 %). Beide Fraktionen wurden aus absol. Petrolether ( $40-60^{\circ}\text{C}$ )

umkristallisiert und besaßen den Schmelzpunkt 68-69°C.

1,3-Di-O-palmitoylglycerin (10): Nach Darstellung gemäß Lit. <sup>19</sup> wurde das Rohprodukt zweimal aus absol. Petrolether (40-60°C) und einmal aus absol. Methanol umkristallisiert.

2-Chlor-[4,4,5,5-D<sub>4</sub>]-1,3,2-dioxaphospholan (12): 11.8 g [D<sub>6</sub>] - Ethylenglycol (11, Hersteller C.E.A., Mindestdeuterierungsgrad 99%) wurden 12 d über 1.33 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p.a., das kurz vorher für einige h bei 300°C im Feinvak. entwässert worden war, getrocknet. Das so vorgetrocknete 11 wurde schnell durch eine D3-Fritte in den Sumpfkolben einer Mikroganzglasdestillationsapparatur mit Vigreuxkolonne gesaugt und bei einem Druck von 7.5 mbar fraktioniert. Die Darstellung von 12 wurde in Anlehnung an Lit. <sup>20</sup> durchgeführt. In einem 100-ml-Zweihalskolben mit Magnetrührkern, einem Tropftrichter mit Druckausgleich und N<sub>2</sub>-Zuleitung und einem Halbmikrokolonnenkopf mit Ableitung zum Abzugskamin wurde eine Mischung aus 19.38 g PCl<sub>3</sub> (0.141 mol) und 30 ml absol. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gerührt. Unter Durchleiten von trockenem N<sub>2</sub> (zum Entfernen von gebildetem HCl) wurden innerhalb 1 h 9.32 g 11 (0.137 mol) zugetropft. Die Destillatleitung im Kolonnenkopf blieb geschlossen, so daß der Kolonnenkopf nur als Rückflußkühler diente. Danach wurde noch 15 min unter Rückfluß und N<sub>2</sub>-Durchleiten gekocht. Im Verlauf weiterer 15 min wurde das Lösungsmittel in die Vorlage des Kolonnenkopfes destilliert. Der Rückstand wurde unter Inertgasschutz in den Sumpfkolben einer Ganzglasmikrodestillationsapparatur übergeführt und unter N<sub>2</sub> i.Vak. destilliert. Ausb. 13.69 g (77%), Sdp. 38-38.5°C/13 mbar,  $n_D^{25} = 1.4868$ .

2-Chlor-[4,4,5,5-D<sub>4</sub>]-1,3,2-dioxaphospholan-2-oxid (13): Darstellung in Anlehnung an Lit. <sup>21</sup>. In einem 50-ml-Zweihalskolben mit Gaseinleitungsrohr und Rückflußkühler mit Gasableitung zum Abzugskamin wurde durch eine Lösung von 13.6 g 12 (0.104 mol) in 20 ml absol. Benzol 8 h trockener Sauerstoff geleitet, der vorher mit gesättigter KMnO<sub>4</sub>-Lösung gewaschen und mit KOH, konz. Schwefelsäure und P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet wurde. Danach wurde das gesamte Reaktionsgemisch in den Sumpfkolben einer Mikroganzglasdestillationsapparatur mit Vigreuxkolonne übergeführt. Zuerst wurde das Lösungsmittel langsam im Grobvakuum in eine Kühlfalle destilliert, danach wurde der Rückstand im Feinvakuum destilliert. Ausb. 10.34 g (68%), Sdp. 72-74°C/0.2 mbar, Deuterierungsgrad 99.5% (2% D<sub>3</sub>, 98% D<sub>4</sub>).

2-(1,2-Di-O-palmitoyl-3-sn-glyceryl)-[4,4,5,5-D<sub>4</sub>]-1,3,2-dioxaphospholan-2-oxid (14): Darstellung in Anlehnung an Lit. <sup>22</sup>. In einem 100-ml-Dreihalskolben mit Magnetrührkern, Innenthermometer, Dosiertrichter mit Druckausgleich, N<sub>2</sub>-Zuleitung und Rückflußkühler mit aufgesetztem Blasenähler wurde unter trockenem Reinst-N<sub>2</sub> zur Lösung von 2.66 g 8 (4.68 mmol) und 0.62 g absol. Triethylamin (6.13 mmol) in 40 ml absol. Benzol unter Rühren im Verlauf von 5.5 h eine Lösung von 0.82 g 13 (5.60 mmol) in 15 ml absol. Benzol getropft, wobei der Stickstoff nur noch direkt unter dem Blasenähler in die Apparatur geleitet wurde, um ein Herausschleppen des Triethylamins zu verhindern. Die Geschwindigkeit der Zugabe wurde so geregelt, daß die Temp. des Reaktionsgemisches 26°C nicht überstieg. Das Gemisch wurde noch bis zum nächsten Tag gerührt und dann einen weiteren Tag stehengelassen, wobei stets ein geringer N<sub>2</sub>-Überdruck in der Apparatur aufrecht erhalten wurde. Das

Gemisch wurde unter  $N_2$  durch eine D4-Fritte gesaugt und in einem Schlenk Kolben gesammelt. Durch langsames Abdestillieren des Lösungsmittels bei Raumtem. in eine Kühlfalle (Ölpumpenvak.) wurde das Filtrat bis zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt wurde unter  $N_2$  aus absol. Ether umkristallisiert und zur Auskristallisation über Nacht bei  $-25^\circ C$  aufbewahrt. Die Kristalle wurden bei  $-26^\circ C$  unter trockenem  $N_2$  in einer inertgasgeschützten D3-Umkehrfritte abgesaugt und mit absol. Ether nachgewaschen. Bei allen Operationen tauchte die Absaugapparatur in ein Aceton/ $CO_2$ -Bad, das auf  $-26^\circ C$  gekühlt wurde. Das Produkt wurde unter  $N_2$  in ein Schlenkrohr übergeführt, bei  $4^\circ C$  im Feinvakuum getrocknet und danach bei  $-25^\circ C$  aufbewahrt. Ausb. 2.74 g (86%), Schmp.  $63-64^\circ C$ .

1,2-Di-O-palmitoyl-sn-glycero-3-phospho( $[D_{13}]$ cholin) ( $\underline{15}$ ): Für die Darstellung (in Anlehnung an Lit. <sup>22</sup>) wurde eine Hochvakuumapparatur eingesetzt. Ein 300-ml-Edelstahlautoklav wurde zur Entfernung absorbierten Wassers 5 h im Hochvak. ausgeheizt. Der bei laufender Diffusionspumpe abgekühlte Autoklav wurde mit trockenem Reinst- $N_2$  gefüllt, verschlossen und in eine mit trockenem Reinst- $N_2$  gefüllte Glove-Box eingeschleust. In der Box wurde der Autoklav geöffnet, mit 2.55 g 14 (3.76 mmol, unter  $N_2$  fein pulverisiert) beschickt, mit einem Magnetrührkern versehen und wieder verschlossen. In eine Kühlfalle der Hochvak.-Apparatur wurden 25 ml absol. Aceton gefüllt, das kurz vorher mit einer Molekularsiebsäule getrocknet wurde, und durch dreimaliges Abpumpen bei  $-196^\circ C$  wurden die nicht kondensierbaren Anteile entfernt. In einer anderen Kühlfalle der Hochvak.-Apparatur wurden 2.0 g  $[D_9]$ Trimethylamin (29.4 mmol; Hersteller MSD, Mindestdeuterierungsgrad 99%) bei ca.  $-50^\circ C$  über blankem, unter  $N_2$  hergestelltem Na-Draht getrocknet

(ca. 1 d). Der mit dem Dioxaphospholan 14 beschickte Autoklav wurde an die Hochvak.-Apparatur angeschlossen und evakuiert. Zum Einkondensieren des Acetons und des  $[D_9]$ Trimethylamins wurde der Autoklav mit flüssigem  $N_2$  gekühlt, wobei eine Heizmanschette, die aus vier Windungen Gummischlauch bestand und von  $60^\circ C$  warmem Wasser durchflossen wurde, den Autoklavenkopf mit den PTFE-Dichtungen vor dem Abkühlen bewahrte. Nach dem Einkondensieren des Acetons wurde der Autoklav noch einmal auf das bestmögliche Vakuum evakuiert, dann wurde das  $[D_9]$ Trimethylamin in den Autoklaven destilliert. Danach wurde der Autoklav verschlossen, von der Hochvak.-Apparatur getrennt und 48 h unter Rühren auf  $53^\circ C$  erwärmt. Nach Abkühlen wurde der Autoklav geöffnet, das ausgefallene 15 abgesaugt und gründlich mit absol. Ether nachgewaschen. Das Rohprodukt war DC-einheitlich. Ausb. 2.47 g (88%), Schmp. des Monohydrats:  $232-234^\circ C$  (Zers.),  $[\alpha]_D^{23} = +6.6^\circ$  ( $c = 4.2$  g/100  $cm^3$  Lösung,  $CHCl_3/CH_3OH$  1:1), Deuterierungsgrad  $(99.3 \pm 0.3)\%$ .

IR (KBr): 2960 ( $CH_3$ ), 2920, 2850 ( $CH_2$ ), 1735 (C=O), 1465 ( $CH_3$ ,  $CH_2$ ), 1260, 1090 ( $PO_2^-$ , gemäß Lit. <sup>23</sup>), 1180 (C—O), 1060 ((P)—O—C, gemäß Lit. <sup>23</sup>),  $815\text{ cm}^{-1}$  ((C)—O—P—O, gemäß Lit. <sup>23</sup>). -

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , Bezeichnung der Protonen siehe Schema):  $\delta = 0.90$  (t,  $\underline{J} = 6.5$  Hz; 6H,  $CH_3^g$  und  $CH_3^k$ ), 1.29 (m; 48 H,  $(CH_2^f)_{12}$  und  $(CH_2^j)_{12}$ ), 1.59 (m; 4 H,  $CH_2^e$  und  $CH_2^i$ ), 2.28 und 2.31 (2 t,  $\underline{J} = 7.0$  Hz; 4 H,  $CH_2^d$  und  $CH_2^h$ ), 3.33 (s;  $H^n$ -Restsignal), 3.93 (m; 2H,  $CH^cH^{c'}$ ), 4.12 und 4.39 (2 dd,  $\underline{J} = 12.0/7.0$  Hz und  $\underline{J} = 12.0/2.5$  Hz; 2H,  $CH^aH^{a'}$ ), 5.18 (m; 1 H,  $H^b$ ). - MS (FD):  $m/e = 746$  (Molekülpeakbereich, siehe Abb. 1).



2-(1,3-Di-O-palmitoyl-2-glyceryl)-[4,4,5,5-D<sub>4</sub>]-1,3,2-dioxaphospholan-2-oxid (16): Darstellung analog zu 14, allerdings mußte wegen der geringen Löslichkeit ein 250-ml-Dreihalskolben verwendet werden, in dem eine Lösung von 2.66 g 10 (4.68 mmol) und 0.62 g absol. Triethylamin (6.13 mmol) in 115 ml absol. Benzol vorgelegt wurde, zu der im Verlauf von 6 h eine Lösung von 0.82 g 13 (5.60 mmol) in 15 ml absol. Benzol getropft wurde. Ausb. 2.65 g (83%), Schmp. 76-77.5°C.

1,3-Di-O-palmitoylglycero-2-phospho([D<sub>13</sub>]cholin) (17): Darstellung analog zu 15. Es wurden folgende Mengen eingesetzt: 2.51 g 16 (3.70 mmol), 2.0 g [D<sub>9</sub>]Trimethylamin (29.4 mmol) und 45 ml absol. Aceton. Ausb. 2.08 g (75%), Schmp. 182-185°C (Zers.), Deuterierungsgrad (99.3 ± 0.3)%. IR (KBr): 2960 (CH<sub>3</sub>), 2920, 2850 (CH<sub>2</sub>), 1735 (C=O), 1465 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>), 1270, 1090 (PO<sub>2</sub><sup>-</sup>, gemäß Lit. <sup>23</sup>, 1180 (C—O), 1060 ((P)—O—C, gemäß Lit. <sup>23</sup>), 815 cm<sup>-1</sup> ((C)—O—P—O, gemäß Lit. <sup>23</sup>). - <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, Bezeichnung der Protonen siehe Schema 2): δ = 0.89 (t, J = 6.5 Hz; 6 H, 2 CH<sub>3</sub><sup>g</sup>), 1.26 (m; 48 H, 2 (CH<sub>2</sub><sup>f</sup>)<sub>12</sub>), 1.58 (m; 4 H, 2 CH<sub>2</sub><sup>e</sup>), 2.30 (t, J = 7.5 Hz; 4 H, 2 CH<sub>2</sub><sup>d</sup>), 3.35 (s; H<sup>n</sup>-Restsignal), 4.24 (m; 4 H, 2 CH<sup>a</sup>H<sup>a'</sup>), 4.50 (m; 1 H, H<sup>b</sup>) - MS (FD): m/e = 746 (Molekülpeakbereich, siehe Abb. 1).

1. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature,  
Eur. J. Biochem. 2, 127 (1967); Chem. Phys. Lipids 21,  
141 (1978), 21, 159 (1978).
2. Baer, E., Prog. Chem. Fats Other Lipids 6, 31 (1963).
3. Jensen, R.G. und Pitas, R.E., Adv. Lipid Res. 14, 213 (1976).
4. van Deenen, L.L.M. und de Haas, G.H., Adv. Lipid Res. 2, 167  
(1964).
5. Jensen, R.G., Top. Lipid Chem. 3, 1 (1972).
6. Jensen, R.G. und Gordon, D.T., Lipids 7, 611 (1972).
7. Baer, E., J. Am. Oil Chem. Soc. 42, 257 (1965).
8. Slotboom, A.J., Verheij, H.M. und de Haas, G.H., Chem. Phys.  
Lipids 11, 295 (1973).
9. Gunstone, F.D. in Comprehensive Organic Chemistry  
(Barton-Ollis), Bd. 5, S. 633, Pergamon Press, Oxford,  
New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt 1979.
10. Buchnea, D., Lipids 6, 734 (1971).
11. Slotboom, A.J. und Bosen, P.P.M., Chem. Phys. Lipids 5,  
301 (1970).
12. Hesse, M., Meier, H. und Zeeh, B. Spektroskopische Methoden  
in der organischen Chemie, S. 343, Thieme, Stuttgart 1979.
13. Sukharev, Yu.N. und Nekrasov, Yu.S., Org. Mass Spectrom.  
11, 1239 (1976).

14. Baer, E., *Biochem. Prep.* 2, 31 (1952).
15. *Organikum*, 9. Aufl. S. 719, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1969.
16. Sowden, J.C. und Fischer, H.O.L., *J. Am. Chem. Soc.* 63, 3244 (1941).
17. Baer, E. und Kates, M., *J. Am. Chem. Soc.* 72, 942 (1950).
18. Bauer, S.T., *Oil Soap (Chicago)* 23, 1 (1946).
19. Gordon Rose, W., *J. Am. Chem. Soc.* 69, 1384 (1947).
20. Lucas, H.J., Mitchell, F.W. und Scully, C.N., *J. Am. Chem. Soc.* 72, 5491 (1950)
21. Edmundson, R.S., *Chem. Ind. (London)* 1962, 1828.
22. Chabrier de Lassauniere, P.E., Nguyen, T.T. und Nguyen, H.P., *Franz. Pat.* 2 270 887 (16. Mai 1974) [*Chem. Abstr.* 85, P20605j (1976)].
23. Lammers, J.G., Liefkens, Th.J., Bus, J. und van der Meer, J., *Chem. Phys. Lipids* 22, 293 (1978).