

- [5] Zusammenfassend berichten über Untersuchungen an Ionenpaaren unter verschiedenartigen Gesichtspunkten z. B. a) J. M. Masnovi, J. Kochi, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 7881; b) E. S. Gould, *Acc. Chem. Res.* 18 (1985) 22; c) W. Kaim, *ibid.* 18 (1985) 160; d) A. Streitwieser, Jr., *ibid.* 17 (1984) 353; e) J. M. Lehn, *Pure Appl. Chem.* 52 (1980) 2303; f) A. Kaifer, D. A. Gustowski, L. Echegoyen, V. J. Gatto, R. A. Schultz, T. P. Cleary, C. R. Mor, D. M. Goli, A. M. Rios, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 1958 und jeweils zit. Lit. Vgl. auch [4].
- [6] Reduzierbare Chelatbildner mit O- oder N-Haftstellen wurden für ESR/ENDOR-Untersuchungen an Radikal-Ionenpaaren bereits mehrfach verwendet; Beispiele sind: a) Kronenether mit reduzierbaren π -Systemen wie Chinonen (vgl. [1]); b) *ortho*-Chinone (vgl. z. B.: J. A. Pedersen: *CRC Handbook of EPR Spectra from Quinols*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1985 oder [2]); c) Semidione (vgl. z. B.: G. A. Russell, C. E. Osuch, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 5979 oder [4]); d) N-Heterocyclen wie α, α' -Bipyridyl (vgl. z. B.: W. Kaim, *ibid.* 104 (1982) 3833 und jeweils zit. Lit.).
- [7] 1-Aminosemianthrachinon-Radikalanion mit $n\text{Bu}_4\text{N}^+$ als weitgehend wechselwirkungsfreiem Gegenkation läßt sich in DMF/TBAP-Lösung elektrochemisch erzeugen. Für die ESR-Untersuchungen wird THF als Lösungsmittel gewählt, weil es relativ zu polaren Solventien wie DMF die Bildung von Kontaktionenpaaren begünstigt (vgl. z. B.: K. A. M. Greber, K. S. Chen, J. K. S. Wan, *Rev. Chem. Intermed.* 5 (1984) 37; E. Lesniewska-Lada, M. K. Kalinowski, *Electrochim. Acta* 28 (1983) 1415 und jeweils zit. Lit.). Die Ionenpaare Alkalimetall-Kation-1-Aminoanthrasemichinon werden in THF durch Reduktion von 1-Aminoanthrachinon an entsprechenden Metallspiegeln hergestellt; zur Präparation von Rb- und Cs-Spiegeln bewährte sich die thermische Zersetzung ihrer Azide in Gegenwart feinkörnigen Eisenpulvers. Die ENDOR-Messungen erfolgten mit einem Spektrometer Bruker 220 D; unter den verwendeten Magnetfeldern von etwa 3.4 kG betragen die Frequenzen ν_x der einzelnen Isotope (rel. Häufigkeit): ^1H 14.46 MHz (99.98%), ^7Li 5.62 MHz (92.6%), ^{23}Na 3.82 MHz (100%), ^{87}Rb 4.73 MHz (27%) und ^{133}Cs 1.90 MHz (100%).
- [8] a) H. McConnell, *J. Chem. Phys.* 24 (1956) 632; b) vgl. beispielsweise J. Bolton, J. Wertz: *Electron Spin Resonance - Elementary Theory and Applications*, McGraw-Hill, New York 1972.

Lactosylceramide mit ungesättigten Fettsäuren - Synthese und Verwendung zur Erzeugung von Doppelschichtmembranen**

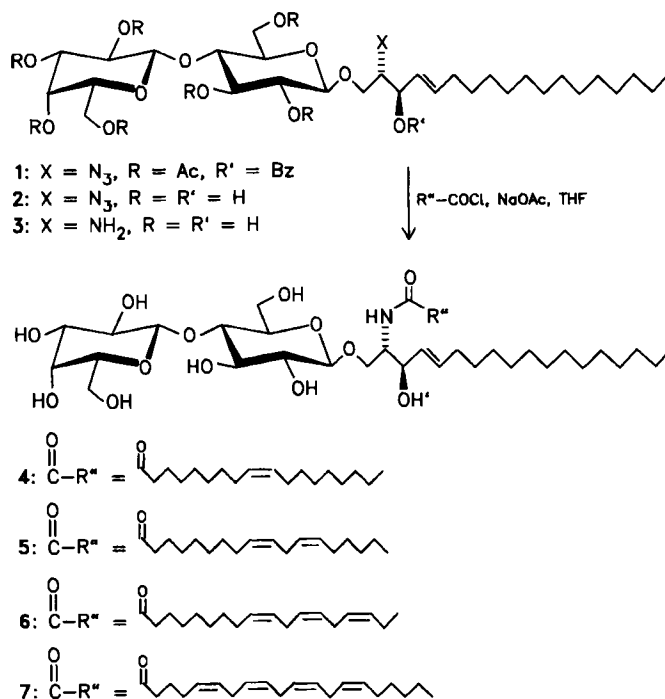
Von Richard R. Schmidt*, Thomas Bär und
Hans-Juergen Apell

Professor Wolfgang Pfeleiderer zum 60. Geburtstag
gewidmet

Glycosphingolipide sind Membranbausteine, die mit ihrem Lipidteil, dem N-acylierten Sphingosin (=Ceramid), am Aufbau der äußeren Plasmamembran-Doppelschicht beteiligt sind. Der hydrophile Kohlenhydrateil wird dadurch auf der äußeren Membranoberfläche lokalisiert, so daß er die Spezifität der Wechselwirkungen mit Zellen und verschiedenen Biofaktoren determinieren kann^[1]. C₁₈-Sphingosin ist die wichtigste Sphingosinbase in den meisten Geweben der Mammalia; beträchtliche Mengen des C₂₀-Homologen werden in den Gangliosiden des Gehirns gefunden. Als N-Acylgruppen werden unsubstituierte und α -Hydroxyfettsäuren angetroffen, die Doppelbindungen enthalten können^[2].

Doppelschichtmembranen konnten mit den bisher zur Verfügung stehenden, chemisch meist uneinheitlichen Glycosphingolipiden nicht erhalten werden. Wir haben kürzlich ein Syntheseverfahren entwickelt, mit dem Glycosphingolipide in sehr guten Ausbeuten rein hergestellt wer-

den können^[3]. Da die Fettsäure erst im letzten Reaktionsschritt mit der Aminogruppe des Sphingosinteils verknüpft wird, ist dieses Syntheseverfahren auch für empfindliche Säuren geeignet. Wir haben es nun genutzt, um Lactosylsphingolipide mit ungesättigten Fettsäuren zu synthetisieren, die die Membranbildung und die Membranfluidität fördern^[4]. Dazu wurden O-acetyliertes O-(α -Lactosyl)trichloracetimidat^[5] als Donor und 3-O-benzoyliertes Azidosphingosin^[6] als Acceptor mit $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ als Katalysator zum Glycosid 1^[7] (Ausbeute 85%) umgesetzt. Bei sukzessiver Zugabe von 0.05 Äquivalenten Katalysator konnte die konkurrierende Orthoesterbildung vollständig zurückgedrängt werden. Desacetylierung mit Natriummethanolat/Methanol ergibt quantitativ 2, und Reduktion der Azidgruppe mit H_2S /Pyridin lieferte das bereits auf anderem Wege erhaltene Lactopsychosin 3^[3]. Für die Anknüpfung von Öl-, Linol-, Linolen- und Arachidonsäure bewährten sich am besten deren Säurechloride, die mit Oxalylchlorid erzeugt wurden. Ihre Reaktion mit 3 in Anwesenheit von Natriumacetat in Tetrahydrofuran (THF)/Wasser führt in guten Ausbeuten (65–74%) zu den Lactosylceramiden 4–7. Diese können durch Peracetylierung und nachfolgende Desacetylierung mit Florisil^[8] (4, 5) oder direkt durch Reversed-Phase-Chromatographie (6, 7; RP₁₈^[8], *n*-Butanol/Methanol/Wasser, 50:32:18) rein erhalten werden^[7].



Um die Komplexität der Zellmembranen zu verstehen, müssen zunächst in einfachen Modellen die Eigenschaften und Wirkungsweisen einzelner Membrankomponenten untersucht werden^[9]. Deshalb haben wir mit der Doppelschicht-Technik von Müller et al.^[9, 10] Doppelschichtmembranen mit den Glycosphingolipiden 4–7 aufgebaut und durch Messungen der elektrischen Kapazität an „schwarzen Filmen“ (black bilayer membrane, BLM) die Dicke der Membranen ermittelt^[11, 12]. Aus 3- bis 4proz. Lösungen von 4–7 in *n*-Decan/1-Butanol (100:1) konnten Doppelschichtmembranen beachtlicher Lebensdauer (bis zu mehreren Stunden) und Stabilität gegen höhere Spannungen (Messungen bis 300 mV) erzeugt werden (Fläche

[*] Prof. Dr. R. R. Schmidt, Dipl.-Chem. T. Bär
Fakultät für Chemie der Universität
Postfach 5560, D-7750 Konstanz
Dr. H.-J. Apell
Fakultät für Biologie der Universität Konstanz

[**] Glycosylimide, 30. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Prof. Dr. P. Läger, Konstanz, für wertvolle Diskussionen. – 29. Mitteilung: R. R. Schmidt, G. Effenberger, *Liebigs Ann. Chem.*, im Druck.

0.15 mm²). Die bei Spannungen von 10–300 mV ermittelten spezifischen Membrankapazitäten (Tabelle 1) liegen um

Tabelle 1. Spezifische Membrankapazität (C_m) und Dicke (d) des Kohlenwasserstoffbereichs der Doppelschicht-Membranen der Lactosylceramide 4–7 [a].

Verbindung	C_m [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$] [b]	d [nm] [c]
4	0.563 ± 0.072	3.30 ± 0.26
5	0.755 ± 0.073	2.46 ± 0.25
6	0.818 ± 0.092	2.27 ± 0.20
7	0.570 ± 0.038	3.26 ± 0.49

[a] Zur Durchführung der Messungen siehe [9–12], zit. Lit. [b] Mittelwert aus zehn Messungen. [c] Zur Berechnung siehe [11].

den Faktor 1.5 über denen von Phosphatidylcholin-Membranen^[12]. Dies kann an den veränderten dielektrischen Eigenschaften der hydrophilen Kopfgruppen bei den Lactosylceramiden liegen, oder die Doppelschicht ist aufgrund stärkerer Knäuelung und Kinkenbildung des Lipidteils dünner. Die spezifischen Membrankapazitäten steigen innerhalb der C₁₈-Säure-Derivate 4–6 mit der Zahl der *cis*-Doppelbindungen, während umgekehrt die ermittelte Schichtdicke für den Lipidteil, vermutlich bedingt durch Kinkenbildung, sinkt. Die spezifische Membrankapazität des Arachidonsäure-Derivats 7 ist ähnlich groß wie die des Ölsäure-Derivates 4, d. h. die Kettenverlängerung um zwei C-Atome wird in etwa durch drei zusätzliche *cis*-Doppelbindungen kompensiert.

Eingegangen am 6. April 1987 [Z 2180]

- [1] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* 98 (1986) 213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 212; R. R. Schmidt in W. Bartmann, K. B. Sharpless (Hrsg.): *Stereochemistry of Organic and Bioorganic Transformations*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1987, S. 169, zit. Lit.
- [2] N. K. Kochetkov, G. P. Smirnova, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 44 (1986) 387, zit. Lit.
- [3] R. R. Schmidt, P. Zimmermann, *Angew. Chem.* 98 (1986) 722; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 725.
- [4] A. K. Akimoto, L. Dorn, H. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Angew. Chem.* 93 (1981) 108; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 90.
- [5] R. R. Schmidt, J. Michel, M. Roos, *Liebigs Ann. Chem.* 1984, 1343; J. Michel, *Dissertation*, Universität Konstanz 1983.
- [6] R. R. Schmidt, P. Zimmermann, *Tetrahedron Lett.* 27 (1986) 481.
- [7] ¹H-NMR: 1 (250 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 7.42–8.06 (m, 5 H, Bz), 5.85–5.96 (m, 1 H, CH₂–CH=), 5.48–5.65 (m, 2 H, =CH–CH–OBz), 5.35 (d, 1 H, H-4', J = 2.7 Hz), 5.07–5.23 (m, 2 H), 4.89–4.98 (m, 2 H), 4.45–4.53 (m, 3 H), 4.02–4.12 (m, 3 H), 3.79–3.97 (m, 4 H), 3.54–3.65 (m, 2 H), 1.96–2.20 (m, 23 H, 7 Ac, =CH–CH₂), 1.24–1.37 (m, 22 H, 11 CH₂), 0.88 (t, 3 H, CH₃). – 4 (250 MHz, [D₆]Dimethylsulfoxid, TMS): δ = 7.54 (d, 1 H, NH, J = 8.8 Hz), 5.49–5.57 (m, 1 H, =CH–CH₂), 5.30–5.39 (m, 3 H, =CH–CHOH, CH=CH), 5.16 (d, 1 H, OH, J = 3.7 Hz), 5.12 (d, 1 H, OH, J = 3.3 Hz), 4.90 (d, 1 H, OH, J = 5.5 Hz), 4.84 (d, 1 H, OH, J = 3.1 Hz), 4.68 (sehr br, 2 H, 2 OH), 4.58 (m, 2 H, 2 OH), 3.29–4.22 (m, 17 H), 3.02–3.09 (m, 1 H), 1.96–2.06 (m, 8 H, COCH₃, 3 =CH–CH₂), 1.23–1.48 (m, 44 H, 22 CH₂), 0.83–0.91 (2t, 6 H, 2 CH₃). Die Verbindungen 5–7 weisen entsprechende ¹H-NMR-Daten auf. – Die UV-spektroskopisch ermittelten Anteile an Fettsäureestern mit konjugierten Doppelbindungen betragen bei 6 < 1% und bei 7 < 3%.
- [8] Florisil (Magnesiumsilicat), 16–30 mesh, Fluka AG; RP₁₈, Merck.
- [9] P. Läger, *Angew. Chem.* 97 (1985) 939; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 905.
- [10] P. Müller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott, *Nature London* 194 (1962) 979.
- [11] P. Läger, W. Lesslauer, E. Marti, J. Richter, *Biochim. Biophys. Acta* 135 (1967) 20.
- [12] R. Benz, O. Fröhlich, P. Läger, M. Montal, *Biochim. Biophys. Acta* 394 (1975) 323; R. Benz, K. Janko, *ibid.* 455 (1976) 721. – In diesen Publikationen werden spezifische Membrankapazitäten von Phospholipiden mitgeteilt.

Strukturaufklärung eines neuen Icosapeptides aus menschlicher Samenflüssigkeit**

Von Klaus Schneider, Josef Reiner und Gerhard Spiteller*

Der nach Chang und Wittmann-Liebold modifizierte Edman-Abbau hat sich zur Strukturaufklärung von Peptiden bestens bewährt^[1]. Einziger Nachteil dieser Methode ist die Unsicherheit bei der Bestimmung des C-Terminus, denn wenn das Peptid bis auf zwei bis drei Reste abgebaut ist, kann bei der Extraktion des Hydantoins ein Teil des Restpeptides verlorengehen. Daher ist zumindest noch eine Aminosäurebestimmung notwendig.

Diese Bestimmung kann wegfallen, wenn das exakte Molekulargewicht des Peptides bekannt ist, das sich durch „weiche Ionisierungsmethoden“ ermitteln läßt^[2]. Allerdings wächst die hierfür erforderliche Probenmenge mit steigendem Molekulargewicht stark an (etwa um den Faktor 10 beim Übergang von Masse 1500 zu Masse 2500). Unserer Erfahrung nach sind die hierfür notwendigen Probenmengen an kleinen unbekannten Peptiden kaum erhältlich.

Zur Untersuchung von Peptiden mit Massen zwischen 2000 und 3000 Dalton, die wir aus biologischem Material gewinnen, wenden wir daher folgende Strategie an: Wir spalten das Peptid tryptisch und chymotryptisch, trennen die Bruchstücke per HPLC (eine möglichst hohe Reinheit der Peptide ist für eine Sequenzierung durch MS essentiell) und bestimmen von diesen Bruchstücken das Molekulargewicht per LSIMS^[3]. Nur in optimalen Fällen – meist dann, wenn das Peptid ein Molekulargewicht < 1000 Dalton hat – ermöglichen im LSIMS auftretende Fragmente eine direkte und sichere Strukturableitung. Von der zur LSIMS-Messung verwendeten Probe (ca. 1 μg) wird nur ein winziger Bruchteil verbraucht. Der Rest der Probe wurde bisher verworfen. Wir fanden nun, daß sich der Probenrest unverändert vom Target eluieren und durch HPLC-Chromatographie von der Matrixsubstanz Glycerin befreien läßt. Ein Teil der Restprobe wird nun mit einem Tropfen CH₃OH/2 N HCl versetzt. Nach 12 h Stehen sind alle COOH- und alle CONH₂-Gruppen in COOCH₃-Gruppen überführt. Eine LSIMS-Aufnahme dieser Probe ergibt die Zahl der ursprünglich vorhandenen COOH- und CONH₂-Gruppen. Der größere Teil der Restprobe wird durch doppelten Edman-Abbau nach Chang und Wittmann-Liebold et al.^[3] sequenziert, wobei jedes abgespaltene Aminosäurefragment sowohl durch Dünnschicht- als auch durch HPLC-Chromatographie (bessere Absicherung!) bestimmt wird. Die wiedergewonnene Probe kann im Bedarfsfall zur Bestimmung des N-Terminus durch Dansylierung verwendet werden, wofür eine LSIMS-Aufnahme des Gesamtpeptides^[4], aber auch eine hydrolytische Spaltung des Peptides und nachfolgende Ermittlung der derivatisierten N-terminalen Aminosäure per HPLC in Frage kommt.

Als Beispiel für die Anwendung des oben skizzierten Verfahrens möge die Sequenzierung eines 20 Aminosäuren umfassenden neuen Peptides dienen, das wir in einer Menge von 300 μg aus menschlicher Samenflüssigkeit iso-

[*] Prof. Dr. G. Spiteller, Dr. K. Schneider, Dr. J. Reiner
Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität
Postfach 10 12 51, D-8580 Bayreuth

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

[***] LSIMS = Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry: Bei diesem Verfahren werden geladene Moleküle durch Beschuß mit Cs⁺ aus einer flüssigen Matrix herausgeschleudert und so der Massenspektrometrie zugänglich gemacht. Ähnlich arbeitet die FAB-Massenspektrometrie, bei der Xe-Atome anstelle von Cs⁺ als Geschosse verwendet werden.