

NIET-ENZYMATISCHE HYDROLYSE VAN FOSFOLIPIDEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN
AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN OP GEZAG
VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. D. J. KUENEN,
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER WISKUNDE
EN NATUURWETENSCHAPPEN, TEN OVERSTAAN
VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT TE VERDE-
DIGEN OP WOENSDAG 13 JANUARI 1965 TE 16 UUR

DOOR

CARL PRIES

geboren te 's-Gravenhage in 1932

UITGEVERIJ WALTMAN - DELFT

PROMOTOR: PROF. DR. C. J. F. BÖTTCHER

STELLINGEN

I

Bij de toepassing van opeenvolgende milde alkalische- en zure hydrolyse bij de analyse van fosfolipidenmengsels moet ernstig rekening gehouden worden met nevenreacties waarbij choline en fosforylcholine uit sfigomyelinen worden vrijgemaakt.

II

Het verschil, gevonden tussen de activeringsenergieën voor de totale alkalische deacylering van respectievelijk lecithinen en fosfatidylethanolaminen, zal verklaard moeten worden uit het verschil in ladingstoestand van de aan de glycerofosfaat-rest gebonden „basen”.

III

De tegenstrijdige experimentele resultaten, verkregen bij de bestudering van de invloed van lipidenfracties, in het bijzonder fosfolipiden, op de stollingsactiviteit van plasma in vitro, kunnen verklaard worden uitgaande van het door BANGHAM gevonden verschijnsel dat de oppervlakte-potentiaal van de beproefde lipiden-micellen van overwegende invloed is.

C. CH. TER HAAR ROMENY-WACHTER, Acad. Proefschrift, Leiden 1962, tab. 1.
A. D. BANGHAM, *Nature* **192**, 1197, 1961.

IV

Het is wenselijk in de analytische chemie te komen tot een duidelijke afspraak en een eenduidig gebruik van de voorvoegsels: makro-, semimikro-, mikro-, submikro- en ultramikro-. Daarbij is de meest rationele oplossing de aanduidingen te betrekken op de gewichtshoeveelheden van het element, de atoomgroep of verbinding die geanalyseerd kunnen worden, met als grenzen: > 1 mg: makro-; 0,1–1 mg: semimikro-; 0,01–0,1 mg: mikro-; 0,001–0,01 mg: submikro- en $< 0,001$ mg: ultramikro-.

V

Bij de kwantitatieve bepaling van geringe hoeveelheden vrije vetzuren met lange alifatische ketens is een titratie in niet-waterig milieu te prefereren boven de gangbare kolorimetrische methode met diethyldithiocarbamaat.

W. G. DUNCOMBE, *Biochem. J.* **88**, 7, 1963.
C. PRIES en C. J. F. BÖTTCHER, *Anal. Chim. Acta* **31**, 293, 1964.

VI

Hoewel op grond van de experimenten van DUVAL niet besloten mag worden tot een algehele herziening van de conceptie van het uranyl-ion, moet betwijfeld worden dat UO_2^{++} inderdaad in waterige oplossing voorkomt; een nader onderzoek naar het karakter der bindingen in het gepostuleerde complexe kation $(\text{UO}_3 \cdot \text{H})^+$ is gewenst.

C. DUVAL, *Analytical Chem.* 1962, *Proc. F. Feigl Anniversary Symp.* Birmingham (U.K.) 388.

VII

Het door HOKIN en HOKIN voorgestelde schema van de werking van de „natriumpomp”, waarbij gekoppelde enzymatische cycli van adenosinetrifosfaat en fosfatidezuur betrokken zijn, mag niet als een algemeen model voor het actief natriumionen-transport door biologische membranen beschouwd worden.

L. E. HOKIN en M. R. HOKIN, *Nature* **184**, 1068 (1959); **189**, 836 (1961); **190**, 1016 (1961).

H. YOSHIDA, T. NUKADA en H. FUJISAWA, *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 614 (1961).

H. McILWAIN, *Ann. Rept. Progr. Chem. (Chem. Soc. London)* **57**, 367 (1960).

VIII

Het is een ernstig verzuim dat in een in 1964 verschenen verslag van een in 1962 gehouden internationaal seminarium over atherosclerose de voorwaardelijke aanbeveling van Triparanol (MER 29) als middel om de bloedcholesterolspiegel te verlagen gehandhaafd bleef.

Proc. Intern. Seminar on Atherosclerosis, Asia Publ. House, London, J. F. GOODWIN, D. E. L. WILCKEN, R. HARRISON en V. R. BLOOM, blz. 262 (1964).

IX

Ook na een herziening van de nomenclatuurregels in het gebied der lipidenchemie, zal naast systematische namen, zoals 3-glyceryl-(2-trimethyl-amino-ethyl)fosfaat voor het glycerofosforylcholine (GPC), de behoefte blijven bestaan aan verkorte namen; daarbij ware het te overwegen de aanduiding „fosforyl” in samengestelde namen te vervangen door fosforoyl.

X

De procedure die thans gevolgd wordt bij het aanwijzen van de uitdager van de wereldkampioen-schaken bevoordeelt de professionele schaakgrootmeesters.

Aan mijn moeder

*Door haar zorg werd het pad
voor mijn academische studie
geëffend.*

Voor Annie

INHOUD

Inleiding

HOOFDSTUK 1 **Experimentele methoden en materialen**

1.1	Niet-enzymatische hydrolysemethoden	13
1.1.1	Keuze hydrolytisch milieu	
1.1.2	Uitvoering van de alkalische hydrolyse	
1.1.3	Uitvoering van de zure hydrolyse	
1.2	Scheidings-methoden	15
1.2.1	Vloeistof-vloeistof partitie van hydrolysemengsels	
1.2.2	Papierchromatografische scheidingen	
1.2.3	Kolomchromatografische scheidingen	
1.2.4	Gas-vloeistof verdelingschromatografie	
1.3	Toegepaste analytische methoden	17
1.3.1	Bepaling van fosfor	
1.3.2	Bepaling van stikstof	
1.3.3	Bepaling van choline	
1.3.4	Bepaling van sfingosine	
1.3.5	Bepaling der reducerende suikers in cerebrosiden	
1.3.6	Bepaling van plasmalogenen en vetzuuraldehyden	
1.4	Berekening van de orde der hydrolytische reactie en de snelheidsconstante in één bewerking	20
1.5	Gebruikte preparaten	23

HOOFDSTUK 2 **Niet-enzymatische hydrolyse van lecithinen**

2.1	Alkalische hydrolyse van lecithinen	26
2.1.1	Invloed van de temperatuur	
2.1.2	Invloed van de reagensconcentratie	
2.1.3	Invloed van de ketenlengte en mate van onverzadigdheid der vetzuren van het lecithine op de hydrolysesnelheid	
2.1.4	Invloed van de polariteit van het milieu	
2.1.5	Splitting van de totale hydrolyse in die van eerste en tweede acylestergroep	
2.1.6	Preferentie voor de positie van het eerste te hydrolyseren vetzuur	
2.1.7	Nevenreacties	
2.2	Zure hydrolyse (methanolyse) van lecithinen	37
2.2.1	Invloed van de temperatuur	

- 2.2.2 Invloed van de zuurconcentratie
- 2.2.3 Invloed van de polariteit van het milieu
- 2.2.4 Splitsing van de totale methanolyse in die van eerste en tweede acylestergroep
- 2.2.5 Preferentie voor de positie van het eerste te methanolyseren vetzuur

HOOFDSTUK 3 **Niet-enzymatische hydrolyse van kephalinen**

- 3.1 Alkalische hydrolyse van kephalinen 42
 - 3.1.1 Invloed van de temperatuur
 - 3.1.2 Invloed van de reagensconcentratie
 - 3.1.3 Invloed van de polariteit van het milieu
 - 3.1.4 Splitsing van de totale hydrolyse in die van eerste en tweede acylestergroep
 - 3.1.5 Preferentie voor de positie van het eerste te hydrolyseren vetzuur
 - 3.1.6 Nevenreacties
- 3.2 Zure hydrolyse (methanolyse) van kephalinen 47
 - 3.2.1 Invloed van de temperatuur
 - 3.2.2 Invloed van de zuurconcentratie
 - 3.2.3 Invloed van de polariteit van het milieu

HOOFDSTUK 4 **Niet-enzymatische hydrolyse van sfingolipiden**

- 4.1 Deacylering van sfingolipiden 50
- 4.2 Hydrolytische splitsing van sfingomyelinen in fosforylcholine en ceramiden 52
- 4.3 Hydrolytische splitsing van sfingomyelinen in choline en ceramidefosfaat 53
- 4.4 Hydrolytische afsplitsing van suikers uit cerebrosiden 53

HOOFDSTUK 5 **Niet-enzymatische hydrolyse van andere fosfolipiden**

- Samenvattende discussie 58**
- Summary 64**
- Literatuur 67**

INLEIDING

Bij de aanvang van het in dit proefschrift beschreven onderzoek waren slechts fragmentarische gegevens over de niet-enzymatische hydrolyse van fosfolipiden beschikbaar, zulks in tegenstelling tot de enzymatische hydrolyse waarover al veel systematisch onderzoek was verricht. Bij het beschikbaar komen van synthetische preparaten van nauwkeurig bekende samenstelling was namelijk de aandacht allereerst gericht geweest op onderzoekingen naar de specificiteit van de fosfolipasen, zoals blijkt uit het werk van MARINETTI (1959), HANAHAN (1960) en in het bijzonder van VAN DEENEN (1962) en DE HAAS (1962, 1963). Wel werd ter zelfder tijd voor preparatieve en analytische doeleinden de niet-enzymatische hydrolyse van fosfolipiden regelmatig toegepast, doch een systematische bestudering van de omstandigheden die bij deze hydrolyse een rol spelen had niet plaats gevonden. Bovendien hadden de in de literatuur beschreven waarnemingen vrijwel zonder uitzondering betrekking op natuurlijke mengsels van fosfolipiden, dus niet op goed gedefinieerde preparaten.

Het was dus gewenst, speciaal met het oog op verantwoorde toepassingen, de niet-enzymatische hydrolyse van verschillende soorten fosfolipiden aan een fundamentele studie te onderwerpen.

De omstandigheden waaronder men de niet-enzymatische hydrolyse van fosfolipiden-mengsels voor preparatieve of analytische doeleinden uitvoerde liepen zeer uiteen. Zonder naar volledigheid te streven, zullen hier de belangrijkste gegevens uit de literatuur samengevat worden, waarbij vooral de nadruk zal vallen op wat bij de aanvang van het onderzoek vast stond en wat de controversen en vraagpunten waren.

De *alkalische* hydrolyse, hoe uiteenlopend de experimentele omstandigheden ook waren, was in alle gevallen gericht op een kwantitatieve deacylering der glycerofosfatiden. SCHMIDT e.a. (1946) beschreven een hydrolyse met 1 N KOH in water, gedurende 24 uur bij 37°, met het doel micro-hoeveelheden sfigomyelinen te bepalen. Later pasten SCHMIDT e.a. (1957) met hetzelfde oogmerk, 1 N NaOH in water gedurende 5–16 uur bij 37° toe. Tenslotte keerden zij (SCHMIDT e.a. 1959) weer terug tot tijden van 18–20 uur.

De curve, waarin de hoeveelheid water-oplosbaar fosfaat als functie van de hydrolysetijd werd gegeven (de gedeacyleerde glycerofosfatiden geven goed in water oplosbare glycerofosfaatesters) bleef ook na het twintigste uur nog enigszins stijgen. De auteurs verklaarden dit door de aanname, dat silicaat uit het gebruikte glaswerk in oplossing ging en in de fosforbepaling werd medebepaald. De mogelijkheid dat sfigomyelinen langzaam zouden afbreken bleef buiten beschouwing.

De lange hydrolysetijden waren vooral nodig bij het gebruik van de meest polaire oplosmiddelen, zoals water. In wat minder polaire oplosmiddelen kon bij dezelfde of zelfs bij lagere temperaturen met veel kortere hydrolysetijden worden volstaan. DAWSON (1954 en 1960) paste voor analytische doeleinden een hydrolyse in 0,03 N ethanolische NaOH-oplossing toe. Bij 37 °C werd dan een hydrolysetijd van 20 minuten voldoende geacht. HÜBSCHER e.a. (1960) hydrolyseerden 15 minuten bij 20 °C in methanol-chloroform 1:2, dat NaOH in een concentratie van 0,1 N bevatte. MARINETTI (1962) gebruikte een 0,1 M oplossing van kaliummethoxide in methanol-chloroform 3:2 gedurende 10 minuten bij 20 °C. Van deze auteurs gaf alleen HÜBSCHER aan, hoe de hydrolyse in afhankelijkheid van de tijd verliep; reeds na 5 minuten incuberen werd bij het door hem gebruikte fosfolipidenmengsel geen toeneming van de hoeveelheid water-oplosbaar fosfaat meer waargenomen.

Hoewel door geen van de genoemde onderzoekers vermeld, dringt zich naar aanleiding van deze resultaten de gedachte op, dat de snelheid van deacyleren sterk beïnvloed wordt door de polariteit van het oplosmiddel.

Dat de deacylering van di-acylglycerofosfolipiden over een lyso-verbinding loopt ligt voor de hand, het is immers niet aan te nemen dat beide vetzuren tegelijkertijd worden afgesplitst. Over de maximum hoeveelheid van de intermediair in het reactiemengsel optredende lyso-verbinding, en de preferentie voor de vorming van β -lyso-fosfatiden, werd door MARINETTI (1962) summier en door PRIES en BÖTTCHER (1962)*, vooruitlopende op dit proefschrift, meer gedetailleerde informatie verstrekt.

Uit analytisch oogpunt is niet alleen de deacylering belangrijk. Milde alkalische hydrolyse van een mengsel fosfolipiden zou de sfingolipiden onaangetast laten (DAWSON 1954 en 1960; SCHMIDT 1959) en de mono- en di-acylglycerofosfatiden geheel deacyleren. Doordat de hydrolyseprodukten van deze laatste groep gemakkelijker gescheiden kunnen worden dan de fosfolipiden waaruit ze zijn ontstaan, is het zeer belangrijk dat deze hydrolyseprodukten intact geïsoleerd kunnen worden. Kennis omtrent het optreden van nevenreacties, die de deacylering begeleiden en die aanleiding kunnen geven tot de vorming van artificiële glycerofosfaatesters is daarom zeer gewenst. DAWSON (1960) gaf aan dat vooral glycerofosforylcholine onderhevig is aan afbraak tot cyclische fosfaatesters en ethylglycerofosfaat. MARUO en BENSON (1959) vonden bij korte hydrolysetijd (15 min met 0,1 N KOH in methanol-ethanol 1:1 bij 37 °) geringe maar aantoonbare hoeveelheden cyclische fosfaatesters. Bij voortgezette alkalische methanolysen bedroeg na 20 uur de opbrengst aan cyclische fosfaatesters ongeveer 90%. Werd de hydrolyse uitgevoerd in isobutanol bij 25 ° dan werd na 15 min reeds 74% van het glycerofosforylcholine omgezet in isobutylglycerofosfaat. Kort geleden wees BROCKERHOFF (1963) op het bevor-

* C. PRIES en C. J. F. BÖTTCHER, Vergadering Werkgemeenschap voor Lipidenonderzoek (SON) te Utrecht, 25-4-1962.

deren van deze ongewenste nevenreactie (die altijd gepaard gaat met het afsplitsen van de base van het fosfaat) door apolaire oplosmiddelen. De invloed van de polariteit van het oplosmiddel kwam dus in meerdere opzichten vast te staan.

Over de invloed van de temperatuur waren geen systematische gegevens gepubliceerd. Ook was er in de literatuur weinig te vinden over een mogelijke afbraak van het in sfingomyelinen gebonden fosforylcholine tijdens de alkalische hydrolyse, ondanks het feit dat deze herhaaldelijk gebruikt werd bij het bepalen of isoleren van sfingomyelinen. Alleen DAWSON (1958) vermeldde een niet-geïdentificeerd hydrolyse-produkt met een fosfor-stikstof verhouding van 1:1, wat in de richting van choline afsplitsing wijst.

De *zure* hydrolyse van fosfolipiden wordt voornamelijk voor twee doeleinden gebruikt, namelijk voor de directe methanolysen ter bereiding van methylesters der vetzuren (o.a. ten behoeve van gaschromatografisch onderzoek) en voor het hydrolyseren van plasmalogenen. DAVENPORT en DAWSON (1962) wezen in verband met de laatstgenoemde toepassing op de moeilijkheid dat bij *zure* hydrolyse van lyso-plasmalogenen cyclische acetalen gevormd kunnen worden, die beter bestand zijn tegen *zure* hydrolyse dan semi-acetalen en vinylether-verbindingen.

Samenvattend kan geconcludeerd worden dat bekend was, dat de deacylering van fosfolipiden in waterig milieu, zelfs bij relatief hoge alkali-concentraties, zeer langzaam verloopt; dat de snelheid in minder polaire oplosmiddelen veel groter is, waarbij de alkali-concentratie in het algemeen lager gekozen kan worden; en dat de afbraak van de gevormde glycerofosfaatesters, in het bijzonder glycerofosforylcholine, bij excessief doorgevoerde alcoholysen zeer groot is.

Niets of zeer weinig was uit de literatuur bekend over het gedrag van individuele fosfolipiden, de invloed van de temperatuur op de hydrolysesnelheid en het verloop der nevenreacties. Evenmin waren kwantitatieve gegevens beschikbaar over de invloed van het milieu op de deacyleringssnelheid, de invloed van de reagensconcentratie op de deacylering en de nevenreacties en de stabiliteit van de sfingolipiden tijdens alkalische en *zure* hydrolyse.

Het aantal soorten van fosfolipiden is zo groot dat onze studie van de niet-enzymatische hydrolyse beperkt moest blijven tot een aantal proto-typen. Uit de groep der di-acylglycerofosfatiden werden diverse lecithinen en twee typen kephalinen gekozen, namelijk fosfatidylethanolamine en fosfatidylserine. Van de sfingolipiden werden voornamelijk de sfingomyelinen onderzocht. Slechts voor het vrijmaken van suikers werden fosforvrije „fosfolipiden” van het cerebroside-type gebruikt. Het ontbreken van een goed gedefinieerd plasmalogeen-preparaat (synthetisch nog niet beschreven) beperkte de mogelijkheden van een goed gefundeerde studie over dit type fosfolipide zeer, zodat hierover slechts enige voorlopige gegevens verkregen konden worden.

De volgende aspecten en factoren werden bij onze bestudering van de niet-enzymatische hydrolyse van fosfolipiden betrokken:

- de hydrolyse als functie van temperatuur en tijd;
- de hydrolyse als functie van de concentratie aan hydrolytisch agens;
- de hydrolyse als functie van de polariteit van het milieu;
- het reactiemechanisme van de hydrolyse, en
- de hydrolytische afbraak van de deacyleringsprodukten.

EXPERIMENTELE METHODEN EN MATERIALEN

Een bespreking van de toegepaste experimentele technieken, met inbegrip van de theoretische achtergronden en een verantwoording van de keuze uit meerdere mogelijkheden, zou, zonder het inachtnemen van beperkingen, een studie op zichzelf vormen. Immers naast de gebruikte *hydrolysemethoden* (1.1) dient aangegeven te worden welke *fysisch-chemische scheidingsmethoden* (1.2) nodig waren om het verloop van de hydrolyse analytisch te benaderen, en tenslotte welke *analytische methoden* (1.3) gekozen of ontwikkeld werden, om de hydrolytische processen te kunnen volgen. Methoden welke zonder aanpassing werden overgenomen, zullen zeer summier behandeld kunnen worden, de aangepaste en ontwikkelde methoden zullen ten aanzien van de meest essentiële punten wat uitgebreider worden besproken.

1.1 Niet-enzymatische hydrolysemethoden

De keuze van het milieu waarin de niet-enzymatische hydrolyse werd bestudeerd was zeer belangrijk. Uitgegaan diende te worden van een milieu dat op zichzelf zo min mogelijk invloeden uitoefent (1.1.1).

Daarnaast moet zo algemeen mogelijk aangegeven worden hoe de hydrolyses uitgevoerd werden (1.1.2) (1.1.3).

1.1.1 *Keuze hydrolytisch milieu*

Van de aanvang af is het „basis”-oplosmiddel 99% methanol geweest. Het belang van dit oplosmiddel is zo groot, dat een meer uitvoerige argumentatie van de keus nodig is.

Oppervlakkig beschouwd is methanol als oplosmiddel voor fosfolipiden niet zo geschikt, daar de oplosbaarheid, in het bijzonder van fosfolipiden met verzadigde vetzuren, hierin vrij gering is. Uit het werk van ELSWORTHY (1961) echter blijkt, dat het schijnbaar moleculairgewicht van lecithine, in verschillende oplosmiddelen gemeten, in methanol het kleinst is. Uit zijn numerieke gegevens is af te leiden dat in methanol zeer waarschijnlijk slechts associaten van maximaal 3-4 moleculen voorkomen, hetgeen de vorming van echte micellen uitsluit. Een oplossing van fosfolipiden in methanol benadert dus, in vergelijking tot systemen met andere oplosmiddelen, het meest een „ware” oplossing. Hoewel de activiteit van het hydrolyserende ion in methanol groter geacht moet worden dan in minder polaire oplosmiddelen en de actuele concentratie van de niet geassocieerde fosfolipiden moleculen in methanol groter is dan in enig ander tot nu toe bestudeerd oplosmiddel, wil dit nog niet zeggen

dat in methanol de grootste hydrolysesnelheid gemeten zal worden. In een minder polair oplosmiddel kan juist tengevolge van de micelvorming de toegankelijkheid van de acylestergroepen voor hydrolyse belangrijk vergroot zijn. Immers in deze micellen zullen de alifatische vetzuurketens naar buiten en de polaire fosforzuur-base groeperingen naar binnen gericht zijn, terwijl bovendien binnen de micel de ladingen afgeschermd kunnen zijn. De interpretatie van de metingen wordt dan echter wel zeer gecompliceerd; immers niet alleen extrinsieke grootheden zoals temperatuur, concentratie van het hydrolytisch agens en tijd spelen een rol, maar evenzeer intrinsieke grootheden zoals de grootte der micellen en de oriëntatie van de eenheden binnen de micel. Een bijzonder gelukkige omstandigheid bij het gebruik van methanol is, zoals tijdens het onderzoek bleek, dat hierin de snelheid van de nevenreacties aanzienlijk geringer is dan in minder polaire oplosmiddelen.

Tenslotte is er nog een technisch voordeel aan methanol verbonden: bij de isolatie van de hydrolyseprodukten kan op eenvoudige wijze de Folch-partitie worden toegepast (1.2.1).

1.1.2 *Uitvoering van de alkalische hydrolyse*

1 mg van het te onderzoeken monster werd opgelost in 1 ml 99% methanol. Vervolgens werd 1 ml methanolische KOH-oplossing toegevoegd, van een zodanige concentratie dat de gewenste eindconcentratie aan alkali in het hydrolysemengsel ontstond. Het beëindigen van de hydrolyse geschiedde door aanzuren met HCl, waarbij tegelijkertijd afgekoeld werd. Onmiddellijk hierna werden de niet omgezette fosfolipiden en de gevormde lyso-verbindingen gescheiden van de wateroplosbare hydrolyseprodukten door het hydrolysemengsel aan te vullen tot een Folch-partitiesysteem (1.2.1).

Wanneer het voortschrijden der hydrolyse wordt nagegaan met behulp van een fosforbepaling vormt de aanwezigheid van een kleine overmaat zuur in de waterige fase der partitie geen bezwaar. Gaat het er echter om het optreden van nevenreacties te volgen, die de deacylering begeleiden, dan is het minder wenselijk zuur te gebruiken. De papierchromatografische scheiding der glycerofosfaatesters (1.2.3) wordt namelijk door zuren bemoeilijkt. In dat geval werd steeds geneutraliseerd door toevoeging van een overmaat ethylformiaat. De neutraliserende verzepingsreactie verliep zeer snel. Bij temperaturen van 20° en hoger was deze binnen 5 minuten volledig.

1.1.3 *Uitvoering van de zure hydrolyse*

De monsters werden in droge toestand direct opgenomen in methanol, dat de gewenste concentratie aan HCl bevatte. Het afbreken van de methanololyse geschiedde door snel af te koelen, waarna de niet omgezette fosfolipiden onmiddellijk van de wateroplosbare hydrolyseprodukten werden gescheiden

door het hydrolysemengsel met de vereiste hoeveelheden oplosmiddelen aan te vullen tot een Folch-partitie systeem.

1.2 Scheidingsmethoden

Een aantal scheidingsmethoden was nodig om het verloop van de hydrolyse analytisch te kunnen volgen. Met behulp van een *vloeistof-vloeistof partitie* (1.2.1) werden de tijdens de hydrolyse niet omgezette fosfolipiden, tesamen met de daaruit ontstane lyso-fosfolipiden, gescheiden van de volledig gedeacy-leerde hydrolyseprodukten. De verhouding van niet-omgezet fosfolipide en lyso-fosfolipide werd bepaald met behulp van een scheiding op met silicagel geïmpregneerd papier. De glycerofosfaatesters konden zeer goed *papier-chromatografisch* gescheiden worden (1.2.2). De preparatieve scheiding van fosfolipiden en lyso-fosfolipiden werd *kolomchromatografisch* uitgevoerd met silicagel als adsorbens (1.2.3). De vetzuursamenstellingen werden bepaald met behulp van *gas-vloeistof verdelingschromatografie* (1.2.4).

1.2.1 Vloeistof-vloeistof partitie van hydrolysemengsels

Het ternaire systeem chloroform-methanol-water heeft een omvangrijk ontmengingsgebied, waarbij twee fasen ontstaan: een onderlaag die rijk is aan chloroform en een bovenlaag die zeer arm is aan chloroform, maar rijk aan water.

Wordt aan een methanolisch hydrolysemengsel chloroform en water toegevoegd, zodanig dat er ontmenging optreedt, dan blijven de niet omgezette fosfolipiden en de daarvan afgeleide lyso-verbindingen in de minder polaire fase opgelost, terwijl de glycerofosfaatesters, zoals glycerofosforylcholine, in de waterrijke fase worden aangetroffen.

Het gebruikte ontmengingssysteem is een modificatie van het oorspronkelijke Folch-systeem, namelijk chloroform : methanol : water = 2 : 1 : 0,6 (tegenover 2 : 1 : 0,75) in volumedelen. Veel verschil is er niet tussen beide systemen, zeker niet wat betreft de glycerofosfolipiden, maar door het wat hogere gehalte aan methanol in de onderlaag van het gekozen systeem wordt de kans op de vorming van myelinen bij de partitie van sfingolipiden nog meer verkleind. Bij het onderzoek naar de zure fosfatiden en de gangliosiden is het daarentegen aan te bevelen een meer waterrijk systeem te gebruiken; dit in verband met de wenselijkheid om hierbij het percentage chloroform in de bovenlaag zo laag mogelijk te houden.

In figuur 1 is het ternaire systeem gegeven met de bij 20° gevonden bino-daallijn en de conjugatielijnen van de twee ontmengingssystemen, door middel van een benaderingsconstructie uit de verhouding tussen volume bovenlaag en volume onderlaag verkregen.

Mengsels synthetische fosfolipiden, zelfs indien deze met niet-lipiden wor-

den gemengd, vertoonden bij onderwerping aan een Folch-partitie geen verliezen aan lyso-verbindingen.*

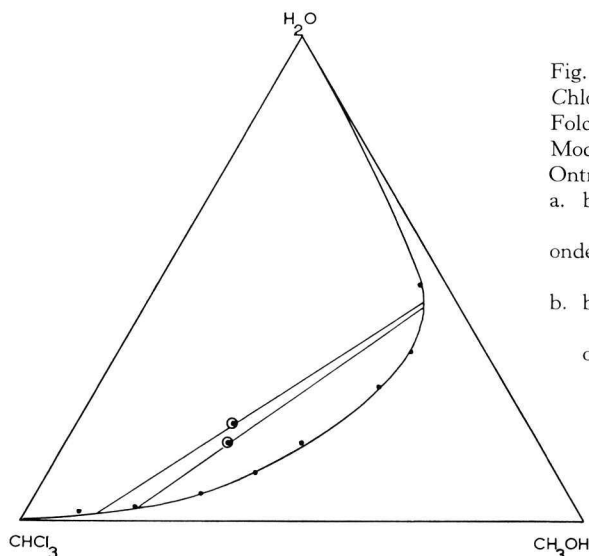


Fig.1 Het ternaire systeem Methanol-Chloroform-Water bij 20 °.

Folch-mengsel a. C : M : W = 2 : 1 : 0,75

Modificatie b. C : M : W = 2 : 1 : 0,6

Ontmenging:

a. bovenlaag 43,5% (v)

M : C : W = 48 : 8 : 44

onderlaag 56,5% (v)

M : C : W = 10 : 88 : 2

b. bovenlaag 39,4% (v)

M : C : W = 50 : 9 : 41

onderlaag 60,6% (v)

M : C : W = 13 : 85 : 2

1.2.2 Papierchromatografische scheidingen

De di-acylglycerofosfatiden werden van de afgeleide lyso-verbindingen gescheiden met behulp van met silicagel geïmpregneerde papieren. Whatman no. 1 werd gedrenkt in een oplossing, bevattende 300 gram SiO_2 , 300 gram KOH en 900 ml water. Na afvloeien van de overmaat silicaat werd het papier behandeld met 6 N HCl en vervolgens gewassen en gedroogd.

De chromatogrammen werden ontwikkeld met het systeem van MARI-NETTI (1957) (di-isobutylketon, 40; azijnzuur, 25; water, 5; in volumedelen). De bepaling van de verhouding der gescheiden componenten geschiedde op twee gelijkwaardige manieren. Bij de eerste werd de kwalitatieve detectie gecombineerd met de kwantitatieve bepaling met behulp van de tricomplexkleuring volgens HOOGHWINKEL en VAN NIEKERK (1960). Bij de tweede werd het chromatogram besproeid met Rhodamine 6G, waarna de vlekken onder U.V.-belichting konden worden afgetekend. Na extractie van de vlekken werd met een submicro-fosfor-bepaling de verhouding fosfatide en verwante lyso-verbinding bepaald. Deze tweede methode is onder meer noodzakelijk voor fosfatidylserine, omdat dit fosfolipide, noch de daarvan afgeleide lyso-verbinding tricomplexkleuring vertoonde. De beide methoden gaven voor lecithinen en fosfatidylethanolaminen goed overeenkomende waarden; de afwijkingen bleven binnen het gebied van de normale meetfouten.

* Zie ook de binnenkort te verschijnen dissertatie van VAN GENT, Leiden.

De papierchromatografische scheiding der diverse glycerofosfaatesters geschiedde volgens de door ons gemodificeerde methode van DAWSON (1960). Door reductie van de voorgeschreven hoeveelheid alkaliën bleek het mogelijk de scheidingsscherpte te verbeteren. Vooral de scheiding tussen glycerofosforylethanolamine en de cyclische fosfaatesters en ook die tussen glycerofosforylserine en glycerofosforzuur werd daardoor duidelijker.

1.2.3 Kolomchromatografische scheidingen

Preparatief werden de lyso-fosfatiden geïsoleerd door middel van kolomchromatografie over silicagel. Mallinckrodt silicagel werd hiertoe gezuiverd door verhitten op 450–500° onder doorvoering van lucht, rehydratatie door koken met water en drogen gedurende 3 uur bij 110°. Kolomladingen silicagel van 30 mm hoog en 12 mm diameter werden gewassen met 10 ml methanol-chloroform 1:1 en daarna met 10 ml chloroform. De kephalinen en de lyso-kephalinen werden geëluëerd met 20%, respectievelijk 40% methanol in chloroform, de lecithinen met 50% en de lyso-lecithinen met 80% methanol-chloroform.

1.2.4 Gas-vloeistof verdelingschromatografie

Voor de bepaling van de vetzuren samenstelling der lyso-verbindingen werden de vetzuren overgevoerd in de methylesters en deze werden met behulp van gas-vloeistofverdelingschromatografie gescheiden.

Ieder monster werd tweemaal gechromatografeerd: eenmaal op Apiezon L (10% op Celite 545, 50–80 mesh) en eenmaal op een maleïnezuur-adipinezuur-ethyleenglycol polyester (20% op chromosorb, 50–80 mesh). Op deze wijze werd een duplo in de kwantitatieve bepaling verkregen en grotere zekerheid bij de identificatie der componenten.

1.3 Toegepaste analytische methoden

Voor verschillende doeleinden, zoals de bepaling van de verhouding tussen fosfolipide en lyso-fosfolipide, en die van de som van deze twee, was een bepaling van fosfor nodig (1.3.1).

Om het voortschrijden van een hydrolyse niet alleen met een fosforbepaling te behoeven volgen, en tevens om na te gaan in hoeverre nevenreacties optreden waren in het geval van lecithine een *cholinebepaling* (1.3.3) en in het geval der kephalinen een *stikstofbepaling* (1.3.2) gewenste hulpmiddelen. Voor het nagaan van de mate van deacylering van de amidegroep in sfingolipiden werd gebruik gemaakt van de *sfingosinebepaling* met fluoresceïne (1.3.4). Verder werd voor de bestudering van de cerebrosiden gebruik gemaakt van een *reducerende-suiker-bepaling* (1.3.5) en voor die der plasmalogenen van een *vetzuuraldehyde-bepaling* (1.3.6).

1.3.1 *Bepaling van fosfor*

Toegepast werd de door BÖTTCHER, VAN GENT en PRIES (1961a), en daarna door MARINETTI (1962) opnieuw gemodificeerde methode van BARTLETT (1959). De monsters werden ontsloten met perchloorzuur (70%) bij 180°, na toevoegen van $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ werd het ontstane fosfomolybdaatcomplex bij 95° met 1-amino-2-naphtolsulfonzuur-4 (ANSA) gereduceerd. Door de kleurontwikkeling bij hogere temperatuur te laten verlopen werd het absorptie-maximum van de gevormde kleur bij 830 m μ sterk geprononceerd. De waarde der extinctie gemeten in een 1 cm cel, bedroeg per γ P: 0,170, zodat de gevoeligheid der bepaling bij ongeveer 0,1 γ P ligt.

1.3.2 *Bepaling van stikstof*

Hoewel voor organisch gebonden stikstof de micro-dumas de meest algemeen toegepaste en meest betrouwbare bepalingsmethode is, vormt de benodigde tijd, in het bijzonder voor grotere reeksen monsters, een bezwaar. BÖTTCHER, VAN GENT en PRIES (1961b) ontwikkelden daarom een methode, waarmee in korte tijd grote reeksen bewerkt kunnen worden. De monsters werden ontsloten met een mengsel van zwavelzuur en kaliumsulfat in de verhouding van 1 ml : 750 mg, en bij een temperatuur van 380°. De juiste keuze van deze grootheden bleek van meer belang te zijn dan die van de gebruikte katalysator. Na neutralisatie van het ontsloten materiaal werd direct de fenol-hypochloriet kleuringsmethode toegepast, in de vorm zoals RILEY (1953) in een uitgebreide studie heeft aanbevolen.

1.3.3 *Bepaling van choline*

Voor de bepaling van choline, in vrije en gebonden vorm, werd een door BÖTTCHER, PRIES en VAN GENT (1961c) ontwikkelde snelle en gevoelige methode gebruikt. De methode is gebaseerd op de vorming van het groen gekleurde complex van een kwaternaire-stikstof bevattende verbinding en cisaconietzuuranhydride, in een mengsel van azijnzuuranhydride en toluol. Deze bepaling heeft het voordeel dat niet eerst choline door hydrolyse behoeft te worden vrijgemaakt. De gevoeligheid is zeker een factor 10 groter dan die van de reineckaat-, ennaejodide- of fosfomolybdaat-methode. De gevoeligheid der methode bedraagt ongeveer 0,3 γ kwaternaire-stikstof. Primair en secundair gebonden stikstof storen de bepaling niet.

1.3.4 *Bepaling van sfingosine*

Hiervoor werd de methode van SAITO (1960) in een aangepaste vorm gebruikt. Deze is gebaseerd op de reactie van de vrije NH_2 -groep in sfingosine met fluoresceïne tot een gekleurd complex. Andere NH_2 -houdende verbindingen

in het gebied van de lipiden storen de reactie niet. De in chloroform opgeloste monsters, welke naar verwachting 0,1–5 γ vrij sfingosine bevatten, werden op een papierstrook (Whatman no. 1) gebracht, zodanig dat de diameter van de vlekken ongeveer 5–6 mm bedroeg. Na verdampen van het oplosmiddel werd de strook gedurende 1 minuut gedrenkt in een 0,1% oplossing van het natriumzout van fluoresceïne in water, waarvan de pH op 5,8 gebracht was. Hierna werd de strook gewassen met stromend leidingwater tot de overmaat van het reagens verdwenen was en een vrijwel kleurloze achtergrond verkregen werd. Na droging werd de kleurintensiteit densitometrisch bepaald. Voor absolute metingen was het noodzakelijk op iedere strook een standaard mee te bepalen. In het gebied tot 5 γ sfingosine werd een lineair verband tussen concentratie en gemeten extinctie gevonden.

1.3.5 *Bepaling der reducerende suikers in cerebrosiden*

Hiervoor werd gebruik gemaakt van de anthronmethode in zwavelzuur. In natuurlijke cerebrosiden, waarvan een gezuiverd preparaat gebruikt werd, komen meerdere suikers voor. De voornaamste component is veelal galactose, maar ook glucose en galaktosamine komen in belangrijke hoeveelheden voor. Verder kunnen sporen mannose, en wellicht lactose, aanwezig zijn. De molaire extincties van elk van deze suikers zijn, volgens de anthronmethode bepaald, niet even groot. Hoewel dit in principe bedenkelijk is, bleek uit het verrichten van vergelijkende metingen, dat de anthron-methode toch goed bruikbaar is. Het voordeel ervan is de snelheid waarmee hij uitgevoerd kan worden en de omstandigheid dat de suikers niet eerst door hydrolyse behoeven te worden vrijgemaakt. PRIES, VAN GENT en BÖTTCHER* hebben de toepassing van de anthronmethode op de bepaling van suikers gebonden in cerebrosiden uitvoerig bestudeerd. Hierbij bleek de zwavelzuurconcentratie van het medium, waarin de kleurreactie plaats vindt, wat ruimer variabel te zijn dan door VAN HELBERT en BROWN (1955) wordt aangegeven, nl. 25,6–27,0 N in plaats van $27,5 \pm 0,1$ N.

Evenmin werd hinder ondervonden van het teruglopen der kwaliteit bij opslag van het reagens, wanneer het uit ethanol gekristalliseerd anthron (80 mg) eerst opgelost werd in geconcentreerd zwavelzuur (37,1 ml) (wat zeer snel ging) en daarna op de gewenste eindconcentratie werd gebracht door toevoegen van water (16,3 ml).

De procedure voor de bepaling was als volgt: de monsters werden opgenomen in 2 ml 26 N H_2SO_4 en vervolgens werd 4 ml reagens toegevoegd. Na verwarming gedurende 8 min op 90° en wederom afkoelen werd de extinctie bij 625 m μ gemeten in een cel met 1 cm weglengte.

* Bij de drukker.

1.3.6 Bepaling van plasmalogenen en vetzuuraldehyden

Voor de bepaling van plasmalogenen en vetzuuraldehyden werd gebruik gemaakt van de p-nitrofenylhydrazine-methode. De gevormde p-nitrofenylhydrazonen worden door partitie tussen hexaan en ethanol-water uit het reactiemengsel geïsoleerd. Hierbij komen slechts de p-nitrofenylhydrazonen van aldehyden met een koolstofketen langer dan 14 koolstofatomen kwantitatief in de hexaanlaag. Aangezien in de lipiden overwegend vetzuuraldehyden met lange koolstofketens voorkomen vormt deze beperking geen ernstige hinderpaal voor toepassing in dit gebied.

De uitvoering die gebruikt werd was van PRIES en BÖTTCHER (1964). Door de p-nitrofenylhydrazonvorming in zowel neutraal als in zuur milieu te laten verlopen konden waarden voor de vrije vetzuuraldehyden alleen en voor de som van deze en de plasmalogenen verkregen worden. Bij de isolatie van de gevormde p-nitrofenylhydrazonen met hexaan kon deze hexaanlaag door eenmaal wassen met ethanol-water 1:1 ontdaan worden van vrijwel al het overmaat reagens. De monsters werden gedurende 20 minuten verwarmd op 70° met 10 ml 80% methanol, dat 0,002 M p-nitrofenylhydrazine bevatte en bovendien, wanneer plasmalogenen mede bepaald werden, nog 0,1 N zwavelzuur. Na afkoelen en mengen met 5 ml water werd geschud met 10 ml hexaan. De hexaanlaag werd eenmaal gewassen met ethanol-water 1:1.

Een monster van de hexaanlaag werd na droogdampen opgenomen in 96% ethanol en de extinctie gemeten bij 390 m μ tegen een blanco die de gehele procedure doorlopen had.

1.4 Berekening van de orde der hydrolytische reactie en de snelheidsconstante in één bewerking

De methoden die gewoonlijk toegepast worden voor het berekenen van de snelheidsconstanten uit de experimentele gegevens gaan uit van een vooraf nauwkeurig bekende waarde voor de orde van de reactie, n , of van een aangenomen waarde die geprobeerd wordt („trial-and-error” techniek). Bij complexe reacties en reacties die verlopen met een gebroken waarde voor de orde is vaak de eerste aanname onjuist en worden de berekeningen moeizaam.

Ook meer directe methoden, die uitgaan van half-waarde tijden ($t_{1/2} \simeq 1/(n-1)$) of van initiële omzettingssnelheden voor een serie concentraties van de reactanten, hangen af van het beschikbaar zijn van aanvullende experimentele gegevens en zijn mede daarom omslachtig. Het bezwaar van al deze methoden ligt in de noodzakelijkheid verschillende stappen in de berekeningen of grafische bewerkingen der meetresultaten te moeten combineren, alvorens tot waarden voor zowel de orde van de reactie als de snelheidsconstante te kunnen besluiten. Wanneer het vereiste aantal proeven niet gedaan

kon worden, kan de ongevoeligheid in de bepaling van n , waaraan sommige van deze methoden lijden, de oorzaak zijn van misleidende uitspraken.

Deze overwegingen maken het wenselijk een manier te vinden om beide kinetische grootheden in één bewerking van de meetresultaten te berekenen.

PESSEN (1961) heeft een methode voorgesteld waarbij dit mogelijk is, zonder evenwel de afleiding van de door hem gebruikte relatie te vermelden. Om de beperkingen van zijn methode te leren kennen wordt die afleiding hier in extenso gegeven.

Wanneer a het oorspronkelijke aantal grammoleculen van de uitgangsstof is en x het aantal grammoleculen dat na een tijd t is omgezet dan is de omgezette fractie $f = x/a$. PESSEN voert nu in de „unit reaction time”, gedefinieerd als $u = t/f$. Deze definitie is zo gekozen dat u gelijk is aan de denkbeeldige tijd die nodig zou zijn om de uitgangsstof geheel om te zetten als na het tijdstip t de nog resterende hoeveelheid van de uitgangsstof zou worden omgezet met een constante snelheid, gelijk aan de gemiddelde snelheid gedurende het tijdvak van 0 tot t .

De differentiaalvergelijking voor een reactie van de n^e orde met gelijke hoeveelheden van de reactanten is:

$$\frac{dx}{dt} = k(a-x)^n, \dots \dots \dots (1)$$

waarin k de reactieconstante is.

Voeren we de fractie $f = x/a$ in, dan kan (1) geschreven worden als:

$$\frac{df}{dt} = a^{n-1}k(1-f)^n$$

of:

$$a^{n-1}kdt = \frac{df}{(1-f)^n} = \frac{-d(1-f)}{(1-f)^n}$$

Voor $n \neq 1$ wordt bij integratie verkregen:

$$a^{n-1}kt = \frac{1}{(n-1)(1-f)^{n-1}} + C \dots \dots \dots (2)$$

C wordt bepaald door de voorwaarde dat bij $t = 0$ ook $x = 0$ en dus $f = 0$ moet zijn. Dit leidt tot:

$$C = \frac{-1}{(n-1)}$$

Dit ingevuld in (2) geeft:

$$a^{n-1}kt = \frac{1}{(n-1)(1-f)^{n-1}} - \frac{1}{(n-1)}$$

of anders geschreven:

$$(1-f)^{-(n-1)} = 1 + (n-1)a^{n-1}kt \dots \dots \dots (3)$$

Ter vereenvoudiging voeren we een hulpgrootheid $y = (n-1)a^{n-1}kt$ in; (3) gaat dan over in:

$$(1-f)^{-(n-1)} = 1+y$$

waaruit volgt dat:

$$f = 1 - (1+y)^{\frac{-1}{n-1}}$$

en

$$u = \frac{t}{f} = \frac{t}{1 - (1+y)^{\frac{-1}{n-1}}} \dots \dots \dots (4)$$

Door de noemer van het laatste lid van vergelijking (4) in een binomiaalreeks te ontwikkelen krijgen we:

$$\begin{aligned} u &= \frac{t}{1 - \left\{ 1 + \frac{-1}{n-1}y + \frac{1}{2!} \cdot \frac{-1}{n-1} \cdot \left(\frac{-1}{n-1} - 1 \right) y^2 + \frac{1}{3!} \cdot \frac{-1}{n-1} \cdot \left(\frac{-1}{n-1} - 1 \right) \left(\frac{-1}{n-1} - 2 \right) y^3 + \dots \right\}} \\ &= \frac{t}{a^{n-1}kt - \frac{1}{2!}n(a^{n-1}kt)^2 + \frac{1}{3!}n(2n-1)(a^{n-1}kt)^3 \dots} \\ &= \frac{1}{a^{n-1}k} \left[\frac{1}{1 - \frac{n}{2}a^{n-1}kt + \frac{n(2n-1)}{6}(a^{n-1}kt)^2 \dots} \right] \end{aligned}$$

De vorm tussen haken kan voor $z < 1$ worden ontwikkeld volgens de reeks:

$$\frac{1}{1-z} = 1 + z + z^2 + z^3 \dots$$

Dit geeft:

$$u = \frac{1}{a^{n-1}k} \left[1 + \frac{n}{2}a^{n-1}kt - \frac{n(2n-1)}{6}(a^{n-1}kt)^2 + \dots + \left(\frac{n}{2}a^{n-1}kt - \dots \right)^2 + \dots \right]$$

Worden de termen naar machten van t verzameld dan krijgen we:

$$u = \frac{1}{a^{n-1}k} + \frac{n}{2}t - \frac{n(n-2)}{12}a^{n-1}kt^2 + \dots \dots \dots (5)$$

Daar voor de afleiding van (5) de voorwaarde $n \neq 1$ geldt mag blijkbaar de door Pessen voorgestelde methode niet gebruikt worden voor een reactie van de eerste orde.

Uit (5) volgt dat voor $n = 2$ een lineair verband voor u als functie van t verwacht moet worden.

Voor andere waarden van n zal bij kleine waarden voor t het verband toch

nog nagenoeg lineair zijn. Uit de helling van het rechte begin van de curve in de u, t -grafiek (fig. 2) kan de orde van de reactie berekend worden, volgens $\operatorname{tg} \alpha = n/2$, waarin α de hellingshoek is.

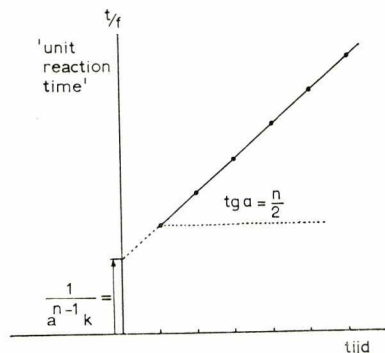


Fig. 2 De „unit reaction time” als functie van de tijd.
(rechte begin van de curve)

De reactieconstante k wordt bepaald door extrapolatie naar $t = 0$. Het van de ordinaat afgesneden stuk is gelijk aan $1/a^{n-1}k$.

Hoewel op theoretische grond de toepassing van de relatie (5) dus het meest nauwkeurig is in het gebied van kleine waarden voor t , kunnen door fouten in de tijdsbepaling en onzekerheid over het nauwkeurige tijdstip waarop de reactie begint aanzienlijke afwijkingen in de curve optreden in het gebied van zeer kleine waarden voor t .

PESSEN past de methode ook toe op reacties waarbij de oorspronkelijke concentraties der reactanten ongelijk zijn.

Wanneer dit uitgewerkt wordt voor een bimoleculaire reactie waarbij in het bijzonder de omzettingssnelheid van één der reactanten gevolgd werd, zoals dat in ons geval vrijwel steeds het geval was, dan volgt uit de grafische behandeling der meetresultaten volgens (5) de snelheidsconstante der omzetting k_{obs} . Hierbij is $k_{obs} = k \cdot b$, waarin k de reactieconstante en b de oorspronkelijke concentratie van het reagens voorstelt. Opnieuw zal ook deze benadering het meest verantwoord zijn in het gebied van kleine waarden voor x en dus voor t .

1.5 De gebruikte fosfolipide-preparaten

Waar mogelijk werden zuivere synthetische preparaten gebruikt. Niet alle typen van fosfolipiden waren echter in deze vorm verkrijgbaar, voor het onderzoek van de cerebrosiden, de sfingolipiden en de plasmalogenen moest worden volstaan met uit natuurlijke bron verkregen, gezuiverde preparaten.

DL- α -dipalmitoylfosfatidylcholine en DL- α -dipalmitoylfosfatidylethanolamine konden uit de handel (Light and Co Ltd., Colnbrook, Bucks, England) worden betrokken. Een groot aantal preparaten, nl.:

(β -oleoyl- γ -palmitoyl) L- α -fosfatidylcholine,
(β -palmitoyl- γ -oleoyl) L- α -fosfatidylcholine,
(β -lineoleoyl- γ -palmitoyl) L- α -fosfatidylethanolamine,
(β -palmitoyl- γ -oleoyl) L- α -fosfatidylserine,

benevens enige kleine monsters van di-myristoyl-; di-stearoyl-; di-oleoyl-; di-lineoyl- en di-lignoceroyl-fosfatidylcholine en tetra-acyl-bis-L- α -fosfatide-zuur, mochten wij ontvangen van het Laboratorium voor Organische Chemie te Utrecht. Voor het beschikbaar stellen van deze preparaten zijn wij Prof. Dr. L. L. M. VAN DEENEN grote dank verschuldigd.

Eén preparaat, tenslotte, werd ons door Dr. J. N. HAWTHORNE (Birmingham University) ter beschikking gesteld: 10 mgr van een 95% zuiver monoinositide.

Wat de preparaten betreft, die uit natuurlijk materiaal waren verkregen, het volgende. Onder de naam cerebrosiden worden preparaten in de handel aangeboden, die in hoge mate verontreinigd zijn en zelfs gedeeltelijk zijn afgebroken. Enige oriënterende experimenten met een dergelijk preparaat van „Bios”, gaven net voldoende inzicht in de stabiliteit van cerebrosiden tegenover milde alkalische en zure hydrolyse om een zuiveringsmethode te kunnen opstellen. Door een mengsel natuurlijke fosfolipiden met 0,1 N methanolische KOH gedurende 30 min bij 40° aan alkalische hydrolyse te onderwerpen en daarna zure hydrolyse met 0,5 N methanolische HCl gedurende 60 min bij 20° toe te passen, gevolgd door Folch-partitie en fractionering van de onderlaag over een silicakolom, kon een cerebrosidefractie verkregen worden, die voor meer dan 95% zuiver was. De bijmengsels waren alkylether-verbindingen. Dergelijke preparaten bevatten:

<i>fosfor</i>	gevonden: 0,01– 0,08%	berekend: 0,00%
<i>suiker</i>	gevonden: 22,5 –25,5%	berekend: 24,6%
<i>sfigosine</i>	gevonden: 33,0 –36,5%	berekend: 35,8%
<i>vetzuur</i>	gevonden: 37 –40%	berekend: 39,6%

Voor de berekening van de gehaltes aan de verschillende componenten werd een gemiddelde vetzuur-ketenlengte van 18 koolstofatomen aangenomen.

De sfigomyelinen werden geïsoleerd uit een ruw fosfolipidenmengsel door eerst te fractioneren over een silicakolom, waarbij het mogelijk was een fractie in handen te krijgen die sfigomyelinen, lyso-lecithinen en enige alkylether-verbindingen bevatte. Door alkalische hydrolyse met 0,1 N KOH in methanol gedurende 15 min bij 40° en verder een opwerking toe te passen, zoals bij het isoleren van cerebrosiden beschreven, werd een preparaat verkregen, dat reeds voor meer dan 95% zuiver was. Verdere zuivering was mogelijk door kristallisatie uit chloroform bij –10°. De analyse van een dergelijk sfigomyelinepreparaat gaf waarden die voor fosfor, choline en sfigosine zeer dicht bij de

berekende waarden (gebaseerd op een gemiddelde vetzuursamenstelling van C-18) lagen.

Voor de bereiding van lyso-plasmalogenen werd uitgegaan van een mengsel fosfatidylcholine en fosfatidylcholine, geïsoleerd volgens PANGBORN (1951) uit runderhart-extract. Deze zogenoemde lecithine-fractie bevatte ongeveer 30% plasmalogenen. Het begeleidende lecithine werd met 0,1 N KOH in methanol bij kamertemperatuur totaal gedeacyleerd, waarbij eveneens het vetzuur uit het fosfatidylcholine werd vrijgemaakt. Een fractionering over een silica-kolom leverde een lyso-plasmalogen concentraat met een zuiverheid van $\pm 90\%$.

Alle fosfolipide-preparaten werden steeds in chloroform, dat met enige procenten methanol was gestabiliseerd, bij -20° bewaard. In droge toestand kunnen, ook bij uitsluiting van lucht, gemakkelijk ontledingen optreden.

NIET-ENZYMATISCHE HYDROLYSE VAN LECITHINEN

De niet-enzymatische hydrolyse van lecithinen werd bestudeerd met kaliumhydroxide (2.1) en met zoutzuur (2.2) als hydrolytisch agens.

2.1 De alkalische hydrolyse van lecithinen

Bij de alkalische hydrolyse werd eerst achtereenvolgens de invloed van de temperatuur, reagensconcentratie, lengte en onverzadigdheid der vetzuren en de polariteit van het medium nagegaan. Daarna werd de hydrolyse van de eerste en tweede acylestergroep afzonderlijk onderzocht en nagegaan of er een preferentie voor de γ - of β -positie van het eerste te hydrolyseren vetzuur bestaat. Met een bestudering van de nevenreacties in afhankelijkheid van temperatuur en polariteit van het oplosmiddel werd de studie der alkalische hydrolyse afgesloten.

2.1.1 Invloed van de temperatuur

Dipalmitoylfosfatidylcholine werd bij -20° , 0° en $+20^\circ$ gedurende verschillende tijden behandeld met 1 N KOH in 99% methanol. Het voortschrijden der hydrolyse werd gevolgd met een fosforbepaling in de organische laag, die was verkregen na partitie van het hydrolysemengsel in een Folch-systeem. Uit het fosforverlies kan de mate van totale deacylering worden berekend. De reactie die gevolgd werd was dus:



In figuur 3 is het voortschrijden der hydrolyse uitgezet tegen de tijd. Het was niet mogelijk een curve op te nemen bij 40° , omdat reeds na 3 min volledige omzetting verkregen werd. De gevonden orde der reactie was bij -20° : 2,06, 0° : 1,96 en bij $+20^\circ$: 1,98. Steeds werd dus met een goede benadering een bimoleculaire reactie gevonden. De berekende waarden voor de reactieconstante waren: bij -20° : $28 \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bij 0° : $489 \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ en bij $+20^\circ$: $8695 \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Uit de verhoudingen $k_0/k_{-20} = 17,5$ en $k_{+20}/k_0 = 17,8$ kan de waarde voor de factor, waarmee de reactiesnelheid toeneemt bij verhoging der temperatuur met 10° , bij benadering berekend worden door $\frac{k(T+10)}{k(T)} \simeq \sqrt{\frac{k(T+20)}{k(T)}}$ te stellen. De waarden voor deze factor (Q_{10}) gevonden waren respectievelijk 4,18 en 4,22.

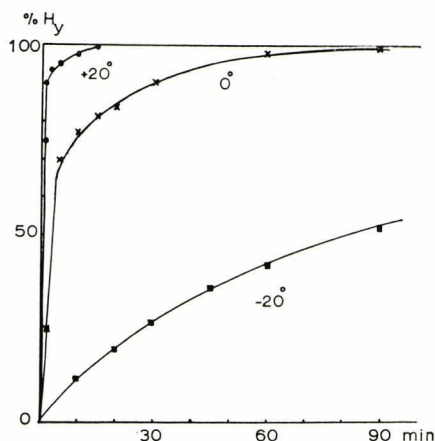


Fig. 3 Het verloop van de hydrolyse van dipalmitoyllecithine met 1 N KOH in methanol bij verschillende temperaturen.

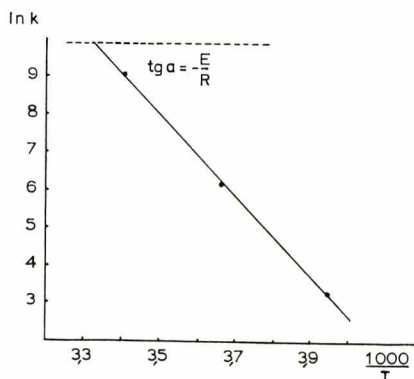


Fig. 4 Hulpgrafiek voor de bepaling van de activeringsenergie E bij de alkalische hydrolyse van lecithinen.

In het beschouwde temperatuurgebied (-20° – $+20^{\circ}$) kan dus, voor gegeven concentraties aan lecithine en reagens opgelost in methanol, de hydrolysesnelheid met een factor 4 vergroot worden door de hydrolyse-temperatuur 10° hoger te kiezen.

Door de relatie $\ln k = \ln k_0 - E/R \cdot 1/T$ bij verschillende temperaturen te beschouwen en, zoals in figuur 4 voor het onderhavige geval werd gedaan, $\ln k$ uit te zetten als functie van $1000/T$ ($\sim 1/T$), kan uit de helling van de gevonden lijn ($\text{tg } \alpha = -E/R$) de activeringsenergie berekend worden. De op deze wijze uit figuur 4 afgeleide waarde voor E bedraagt 24,8 Kcal/mol.

2.1.2 Invloed van de reagensconcentratie

Om de invloed van de concentratie van het hydrolytisch agens na te gaan werd dipalmitoyllecithine bij 20° behandeld met diverse concentraties KOH in methanol: 1 N, 0,1 N en 0,01 N. Monsters van 1 mg ($= 1,32 \mu\text{mol}$) werden behandeld met 2 ml methanolische KOH van de genoemde concentraties. De consumptie aan KOH gedurende de hydrolyse kan voor zover het de experimenten met 1 N en 0,1 N betreft worden verwaarloosd; deze bedraagt namelijk 0,2% en 2%. Bij het experiment met 0,01 N KOH evenwel is het maximale verbruik 20% van de toegevoegde hoeveelheid reagens. In figuur 5 is het verloop van de hydrolyse uitgezet tegen de tijd. Na 15 min, respectievelijk 60 min, is de hydrolyse juist compleet voor 1 N en 0,1 N methanolische KOH.

De gevonden orde der reactie, n , was voor 1 N: 1,98, voor 0,1 N: 1,86 en voor 0,01 N: 1,34. Voor de afwijking van $n = 2$ bij de lagere concentraties is niet zonder meer een verklaring te geven. Bij herhaling van het experiment

met 0,01 N alkali bleek, tot ongeveer 15% omzetting, de reactie bij benadering bimolecuair te verlopen. Daarna daalde de waarde voor de orde van de reactie geleidelijk. De berekende reactieconstanten ($k = k_{obs}/c_{KOH}$) waren voor 1 N: 8690 l mol⁻¹·min⁻¹ en voor 0,1 N: 8420 l mol⁻¹·min⁻¹ (een afwijking van -3,2%). Werd voor 0,01 N gerekend met $n = 2$ dan was de waarde voor $k = 4900$ l mol⁻¹·min⁻¹.

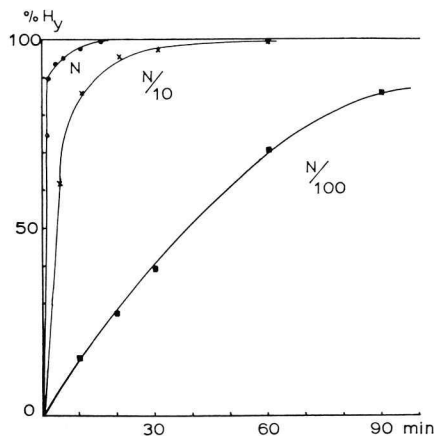


Fig. 5 De hydrolyse van dipalmitoyllecithine met diverse conc. KOH in methanol.

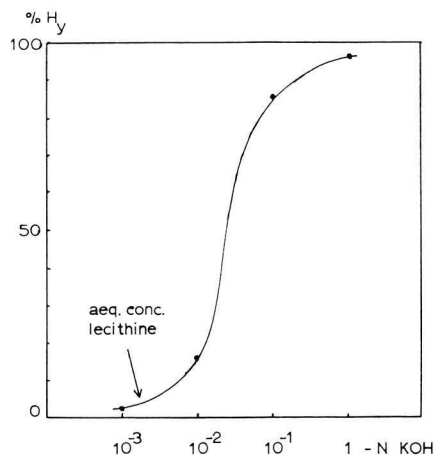


Fig. 6 De hydrolyse van een 0,66 μmol. oplossing van lecithine gedurende 10 min. bij 20 ° met diverse conc. KOH in methanol.

Om een beter overzicht te krijgen is in figuur 6 het percentage hydrolyse na 10 min inwerken bij 20° uitgezet in afhankelijkheid van de alkaliconcentratie. Onder de gekozen omstandigheden is 0,1 N KOH een gunstige concentratie, verdere toename heeft relatief weinig effect op de hydrolysesnelheid. In de grafiek werd ook het punt voor 0,001 N KOH opgenomen. Hoewel er dan ondermaat KOH aanwezig is (voor de neutralisatie van de fosfaat-groep en de twee deacyleringen is voor de 0,66 μmol-oplossing van lecithine 1,98 maeq. loog nodig) bleek toch een klein gedeelte te zijn gehydrolyseerd.

2.1.3 Invloed van ketenlengte en mate van onverzadigdheid van de vetzuren van het lecithine op de hydrolysesnelheid

Bij de opzet van het vergelijkende onderzoek naar de hydrolysesnelheid van diverse lecithinen was het noodzakelijk rekening te houden met de oplosbaarheid van de te beproeven monsters. Vooral de oplosbaarheid van distearoyllecithine in methanol is zeer veel geringer dan die van b.v. dimyristoyl- en dilinoleoyllecithine.

Daarom werd afgeweken van het basismedium van 99% methanol en werd

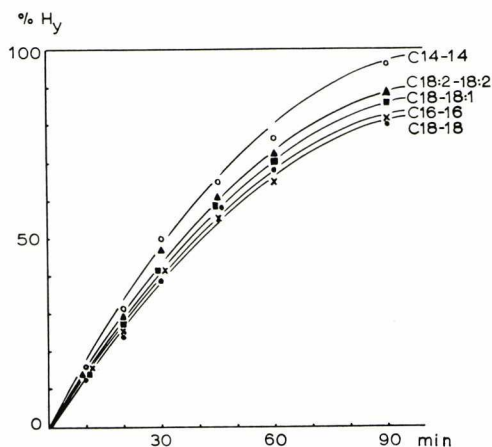


Fig. 7 De hydrolyse van diverse lecithinen met 0,01 N KOH in methanol, dat 15% benzeen bevatte, bij 20 ° als functie van de tijd.

C 14-14 = dimyristoyl-
 C 18 : 2-18 : 2 = dilinoleoyl-
 C 18-18 : 1 = stearoyl-oleoyl-
 C 16-6 = dipalmitoyl- en
 C 18-18 = distearoyl-lecithine

15% benzeen toegevoegd. Onder deze omstandigheden losten van alle te onderzoeken monsters 1,5 μ mol op in 2 ml van het medium.

In figuur 7 is het verloop van de hydrolyse van 5 verschillende lecithinen onder dezelfde proefomstandigheden, t.w. 0,01 N KOH in methanol-benzeen (85:15) bij 20°, gegeven. De verschillen in het verloop zijn gering en voor analytische toepassingen onbelangrijk. De curven van dipalmitoyllecithine en distearoyllecithine vallen praktisch samen.

De verschillen tussen de curven van lecithinen met verzadigde vetzuren, en die van lecithinen met één en twee onverzadigde vetzuren, is zo gering, dat er nauwelijks van beïnvloeding der hydrolysesnelheid door de mate van onverzadigdheid der vetzuren gesproken kan worden. Het verschil in het verloop der hydrolyse van dimyristoyllecithine enerzijds en dipalmitoyl- en distearoyllecithine anderzijds is ook klein, maar o.i. toch voldoende om de conclusie te rechtvaardigen, dat de lecithinen met kortere vetzuurketens iets sneller ge-deacyleerd worden dan die met langere vetzuurketens.

Om een idee van de spreiding te krijgen werd voor de zes beschouwde tijden (fig. 7) de gemiddelde omzetting berekend voor dipalmitoyl-, distearoyl-, dilinoleoyl- en (stearoyl-oleoyl)-lecithine met de standaardafwijkingen in procenten; deze bedroeg 6,5% bij een standaardafwijking van de experimenten van $\pm 3\%$.

2.1.4 Invloed van de polariteit van het milieu

De polariteit van het hydrolytische milieu (methanol) kan vergroot worden door toevoegen van water. Om de invloed hiervan na te gaan werd een serie oplossingen van dipalmitoyllecithine onderzocht waarin de concentraties aan monster en KOH gelijk waren (respectievelijk 1 mg per 3 ml en 1 N) maar de methanol-water verhouding werd varieerd.

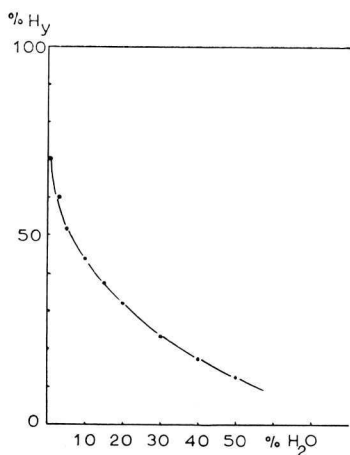


Fig. 8 Het percentage dipalmitoyllecithine, gehydrolyseerd met 1 N KOH gedurende 10 min. bij 0 °, als functie van het percentage water in methanol.

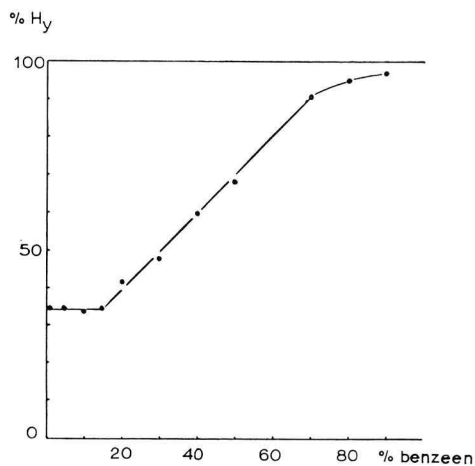


Fig. 9 Het percentage dipalmitoyllecithine gehydrolyseerd met 0,1 N KOH gedurende 15 min. bij 0 °, als functie van het percentage benzeen in methanol.

In figuur 8 is het verband gegeven tussen het percentage hydrolyse bij de beschouwde omstandigheden en het percentage water in het medium. Reeds de toevoeging van 3% water verlaagt de mate van deacylering met ruim 10%.

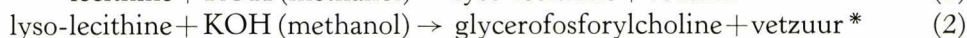
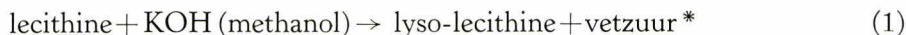
Vermoedelijk houdt de geleidelijke afname van de hydrolysesnelheid verband met de evenzeer geleidelijk vergrote tendens tot micelvorming van het lecithine in het medium. Omgekeerd, wanneer aan methanol benzeen toegevoegd wordt neemt de polariteit van het milieu af. Om de invloed van de geleidelijke vervanging van methanol door benzeen na te gaan werd een geheel aan de proeven over water-toevoeging analoge procedure gevolgd. In figuur 9 is het percentage deacylering uitgezet als functie van het percentage benzeen in het medium. Tot ongeveer 15% benzeen is geen invloed op de hydrolysesnelheid merkbaar; bij hogere benzeenconcentraties wordt de hydrolyse echter geleidelijk versneld.

Opgemerkt moet worden dat deze op zichzelf aantrekkelijke mogelijkheid tot versnelling van de deacyleringsreactie het nadeel meebrengt van een progressief sterker wordende afsplitsing van choline. Daarom is het opvoeren van de hydrolysesnelheid door in een milieu te werken dat meer dan 15% benzeen bevat, niet aan te bevelen.

2.1.5 *Splitsing van de totale hydrolyse in die van eerste en tweede acylestergroep*

Tot nu toe was het onderzoek over de hydrolyse van lecithine uitsluitend gericht op de totale deacylering en werd geen aandacht geschonken aan de reactieweg. Zoals in de inleiding reeds opgemerkt werd, ligt het voor de hand

om aan te nemen dat de totale deacylering onder intermediaire vorming van lyso-lecithinen zal verlopen. In schema 1 is deze reactieweg aangegeven.



Schema 1

Om afzonderlijke gegevens over beide reacties te verkrijgen werd bij de hydrolyse van di-palmitoyllecithine, die werd uitgevoerd bij 20° met 0,01 N KOH in methanol niet volstaan met het nagaan van de verdeling van fosfor over boven- en onderlaag na Folch-partitie, maar werd bovendien het lecithine van het lyso-lecithine gescheiden met behulp van chromatografie over met silica geïmpregneerd papier.

De verhouding lecithine : lyso-lecithine werd zowel met de tri-complex-kleuring als met een submicrofosforbepaling nagegaan. De twee methoden gaven zeer goed overeenstemmende resultaten. Op ieder moment konden op deze wijze in het hydrolysemengsel lecithine, lyso-lecithine en glycerofosforylcholine (GPC) worden bepaald. In figuur 10 is het verloop van deze samenstelling gegeven als functie van de hydrolysetijd. Onder de beschreven omstandigheden liep de hoeveelheid lyso-lecithine, die in het mengsel werd aangetroffen, op tot bijna 30%. De curve, die het verloop der GPC-vorming weergeeft is dezelfde als die, welke de totale deacylering aangeeft. De curve die de afname van het lecithine aangeeft, beschrijft indirect het verloop der eerste deacylering

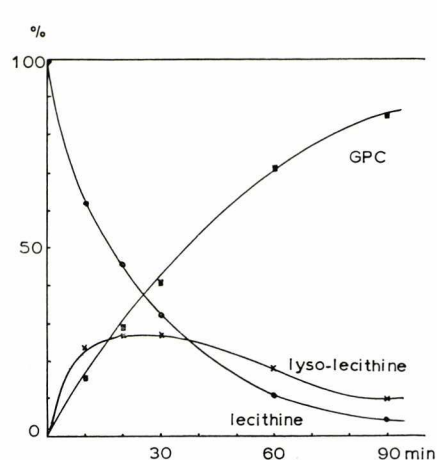


Fig. 10 De samenstelling van het hydrolysemengsel tijdens de deacylering van dipalmitoyllecithine met 0,01 N KOH in methanol bij 20°.

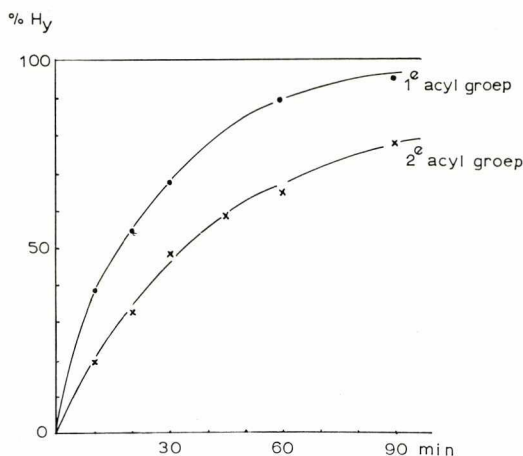


Fig. 11 Het verloop van de hydrolyse van de 1e en 2e acylestergroep in dipalmitoyllecithine met 0,01 N KOH in methanol bij 20°

* De vetzuren kunnen zowel in de vorm van kaliumzouten als in die van methylesters in het reactiemengsel voorkomen.

(vorming van lyso-lecithine), die in figuur 11 wordt vergeleken met het verloop van de hydrolyse van lyso-lecithine. Hoewel de omstandigheden en concentraties gelijk gekozen werden is er een significant verschil in hydrolysesnelheid van eerste en tweede acylestergroep te zien. De waarden die berekend werden voor de orde van de reactie en voor de snelheidsconstante van de hydrolyse van de tweede acylestergroep kwamen goed overeen met de waarden die gevonden waren bij de hydrolyse van lyso-lecithine: $n_2 = 1,85$ en $n_{1-lec.} = 1,81$; $k_2 = 6310 \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ en $k_{1-lec.} = 6030 \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Voor de hydrolyse der eerste acylestergroep waren deze waarden: $n_1 = 1,70$ en $k_1 = 8700 \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Opmerkelijk is dat de waarde voor n_1 meer van 2 afwijkt dan die voor n_2 . Het lijkt er dus op, dat de hydrolyse van de eerste esterband een sterker gemengd monomoleculair-bimoleculair karakter heeft dan de hydrolyse der tweede esterband. Wellicht is dit gedeeltelijk te verklaren uit het feit dat de oplosbaarheid van lyso-lecithine in het medium zeer veel beter is dan van lecithine.

Experimenten, soortgelijk aan die welke in figuur 10 in beeld gebracht werd, werden herhaald met dipalmitoyllecithine in methanol-benzeen en met dimyristoyllecithine in methanol. De verhouding methanol-benzeen was zodanig gekozen, dat de totale hydrolyse qua snelheid er net niet door beïnvloed zou worden: 85–15 volume procenten. Dimyristoyllecithine werd gekozen, omdat de totale deacylering van deze verbinding een sneller verloop had dan die van de lecithinen met langere vetzuurketens. In methanol verliep de hydrolyse van de eerste acylestergroep van dipalmitoyl- en dimyristoyllecithine met nagenoeg gelijke snelheid, in methanol-benzeen was het verloop van de reactie iets langzamer. De snelheid waarmee het tweede vetzuur werd vrijgemaakt was voor het myristoyllecithine duidelijk groter dan voor het palmitoyllecithine, terwijl voor dit laatste produkt in methanol-benzeen ook een wat grotere snelheid der tweede deacylering werd waargenomen.

Geconcludeerd kan dus worden dat lecithinen met vetzuren van kortere keten een grotere totale hydrolysesnelheid vertonen, doordat de afsplitsing van de tweede vetzuurrest belangrijk sneller verloopt. De afname van de polariteit van het oplosmiddel resulteerde in een nivellering van de hydrolysesnelheden van de eerste en de tweede acylestergroep. In tabel 1 wordt een overzicht gegeven van de gemeten effecten.

Tabel 1

Snelheidsconstanten bij de hydrolyse van dipalmitoyllecithine in methanol en methanol-benzeen (85 : 15) en dimyristoyllecithine in methanol, met 0,01 N KOH bij 20 °.

lecithine	oplosmiddel	$k_1 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$k_2 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
dipalmitoyl-	methanol	8.700	6.030
dipalmitoyl-	methanol-benzeen	7.430	6.670
dimyristoyl-	methanol	8.350	15.500

Tot nu toe zijn de experimenten beschreven waarbij de overmaat alkaliën niet groot was, de concentratie was steeds 0,01 N. Eerder werd reeds opgemerkt dat 0,1 N KOH bij 20° zeer gunstig is voor het verkrijgen van een grote hydrolysesnelheid. Om evenwel het proces goed te kunnen volgen werd bij deze concentratie KOH een temperatuur van 0° gekozen. Het resultaat is in figuur 12 weergegeven.

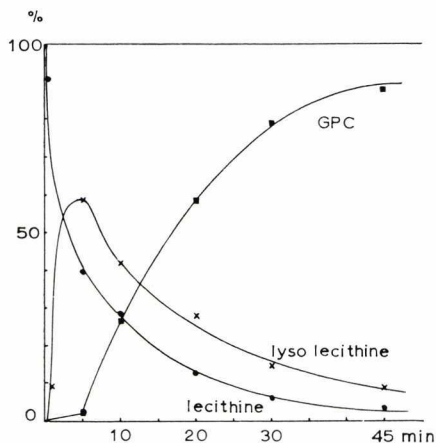


Fig. 12 De samenstelling van het hydrolysemengsel tijdens de deacylering van dipalmitoyllecithine met 0,1 N KOH in methanol bij 0°, als functie van de tijd.

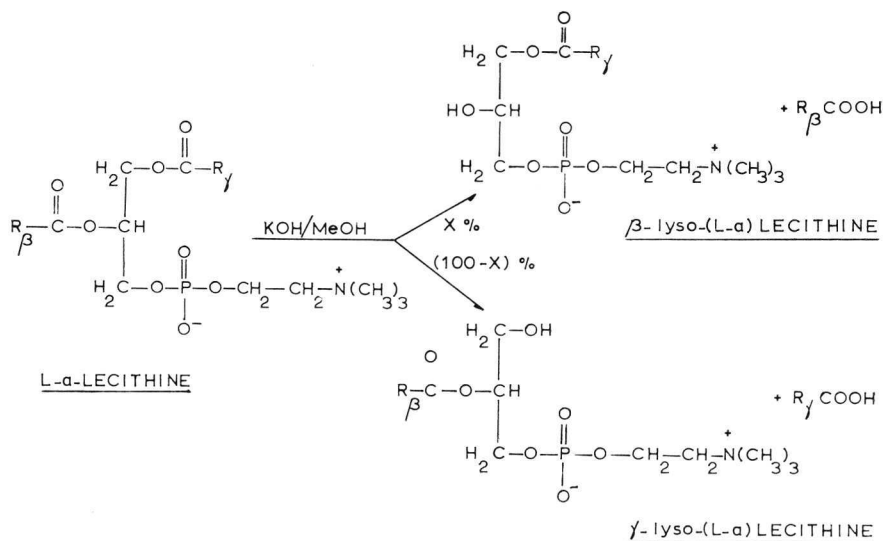
Aanvankelijk liep de concentratie aan lyso-lecithine tot zeer hoge waarden op, tot 60% van het totaal, waarbij nog vrijwel geen GPC werd gevormd. De hydrolyse van de eerste estergroep verliep onmiddellijk met grote snelheid, terwijl de afsplitsing van het tweede vetzuur slechts zeer langzaam op gang kwam. Na 5 minuten inwerken van de methanolische KOH was de samenstelling van het hydrolysemengsel: 39,9% lecithine, 58,0% lyso-lecithine en 2,0% GPC. In de aanlooperperiode verliep de eerste deacyleringsreactie duidelijk bimolecuair: $n_1 = 2,05$. Bij voortgezette omzetting daalde deze waarde voor n_1 iets, tot 1,80–1,90. De reactie waarbij het tweede vetzuur werd afgesplitst verliep aanvankelijk nagenoeg monomolecuair: $n_2 = 1,06$; na langere tijd (b.v. bij 25% omzetting) liep de waarde voor n_2 op tot 1,60. Het gemengd monomolecuair-bimolecuair verloop, zoals dat steeds waargenomen was bij de proeven met KOH van lagere concentratie, trad hier dus pas na een aanlooperperiode op.

De zoëven vermelde resultaten openen de mogelijkheid om langs niet-enzymatische weg lyso-lecithinen te bereiden met geringe verliezen aan lipofosfor. Wel moet hierbij dan nog het lyso-lecithine van het niet omgezette lecithine gescheiden worden. Dit kan b.v. door fractionering over geactiveerde silicagel, waarbij het niet omgezette lecithine teruggewonnen kan worden.

2.1.6 Preferentie voor de positie van het eerste te hydrolyseren vetzuur

De verschillen, die gevonden waren tussen de snelheden waarmee de eerste en de tweede acylesterband werden afgesplitst, maakten het interessant om ook na te gaan of er bij de hydrolyse van het eerste vetzuur een preferentie bestaat voor zijn positie in het fosfatide-molecuul.

Hiertoe werden de lyso-lecithinen uit de hydrolysemengsels van twee synthetische lecithinen met precies bekende, verschillende vetzuren op de γ - en de β -positie, geïsoleerd met behulp van silica-kolomchromatografie. Door methanolysen werden de in de lyso-lecithinen gebonden vetzuren omgezet in de methylesters, welke vervolgens met behulp van GLC werden geïdentificeerd, en waarbij de verhouding in mol% kon worden berekend. De gebruikte preparaten waren γ -oleoyl- β -stearoyllecithine en γ -stearoyl- β -oleoyllecithine; doordat in deze preparaten de vetzuren verwisseld voorkomen, werden eventuele beïnvloedingen door de mate van onverzadigdheid van de vetzuren geëlimineerd. Naast geringe hoeveelheden andere vetzuren, zoals palmitinezuur en palmitoliezuur bevatten de preparaten oliezuur en stearinezuur in de verhouding van resp. 49,6:50,4 en 48,1:51,9.



Schema 2 De alkalische hydrolyse van L- α -lecithine; de afsplitsing van de eerste acylestergroep.
 $x/100-x = 1$: at random, geen preferentie
 $\neq 1$: preferentie

In schema 2 is aangegeven hoe er twee verschillende lyso-lecithinen kunnen ontstaan bij de hydrolyse van één vetzuurrest uit L- α -lecithine: namelijk een γ -lyso- en een β -lyso-verbinding. Zou naar willekeur één van beide plaatsen als eerste bij de hydrolyse worden aangegrepen dan moet 50% van ieder type

in het hydrolysemengsel worden aangetroffen en de verhouding der γ -vetzuren en β -vetzuren in de lyso-lecithine-fractie moet dus 1:1 zijn.

Met γ -oleoyl- β -stearoyllecithine werd in een viervoudig experiment gemiddeld 62% oliezuur en 38% stearinezuur in de lyso-lecithine-fractie aangetroffen; met γ -stearoyl- β -oleoyllecithine juist andersom, nl. gemiddeld 60,5% stearinezuur en 39,5% oliezuur. In beide gevallen, onderling goed overeenkomend, overwoog het lyso-lecithine met het vetzuur op de γ -positie het zogenaamde β -lyso(L- α)-lecithine. Bij de hydrolyse van de eerste acylestergroep is er dus een duidelijke, zij het niet extreme, preferentie voor het aangrijpen van de β -positie.

2.1.7 Nevenreacties

Onder de condities van de milde alkalische hydrolyse van lecithine vindt behalve deacylering, tot op zekere hoogte ook aantasting van de binding tussen fosforzuur en choline plaats, hetzij door hydrolyse hetzij door methanolysen.

In het eerste geval ontstaat als eindproduct glycerolfosfaat, in het tweede geval methyl-glycerofosfaatesters en cyclische fosfaatesters. Informatie omtrent het optreden van deze nevenreacties kon worden verkregen door de wateroplosbare hydrolyseproducten, die na neutraliseren met ethylformiaat, gevolgd door Folch-partitie, in de bovenlaag werden aangetroffen, te onderwerpen aan papierchromatografie. Het GPC is hierbij goed te scheiden van glycerolfosfaat (GPA) en de methyl-glycerofosfaatesters plus cyclische fosfaatesters (MGP+cycl.P). In tabel 2 zijn resultaten weergegeven van de invloed, die de temperatuur uitoefent op de vorming van deze nevenproducten.

Tabel 2

Aantasting van de glycerofosforylcholine-rest bij de hydrolyse van dipalmitoyllecithine met 0,1 N KOH in methanol met 1% water.

temperatuur	reactietijd	% hydrolyse carboxylester	% GPA	% MGP + cycl.P
0 °	90 min	98,0	1,0	1,8
20 °	60 min	99,8	1,1	2,2
40 °	20 min	100	1,3	3,0
65 °	8 min	100	2,9	7,3

Uit bovenstaande resultaten blijkt dat voor het onderdrukken van deze nevenreacties langere tijd inwerken van 0,1 N KOH bij lage temperatuur gunstiger is dan korte tijd bij hogere temperatuur. Verder, dat steeds meer cyclisch-fosfaat en methyl-glycerofosfaatesters werd gevormd dan glycerolfosfaat.

Reeds eerder werd opgemerkt, dat een minder polair milieu het optreden van nevenreacties bevordert. Hierbij werd vooruit gelopen op de resultaten

van proeven, die in tabel 3 zijn opgenomen. Het hydrolyse-milieu was methanol-chloroform 4:1 (v:v). Vergeleken met de uitkomsten van proeven uitgevoerd in 99% methanol (tabel 2) ligt thans het niveau van de afbraak belangrijk hoger en loopt vooral de vorming van cyclische fosfaatesters tot zeer hoge waarden op.

Tabel 3

Aantasting van de glycerofosforylcholine-rest bij de hydrolyse van dipalmitoyllecithine met 0,1 N KOH in methanol-chloroform 4 : 1.

temperatuur	reactietijd	% hydrolyse carboxylester	% GPA	% MGP + cycl.P
0 °	30 min	98,6	2,7	5,6
20 °	15 min	98,6	2,7	5,6
40 °	10 min	99,4	3,3	7,4
65 °	5 min	99,7	3,6	25,2

Aangezien de monsters na neutralisatie met ethylformiaat moeten worden geconcentreerd, alvorens tot de chromatografische analyse kan worden overgegaan, was het nodig na te gaan of tijdens de bewerking verdere aantasting van het glycerofosforylcholine optreedt. Speciaal werd gelet op de invloed van de temperatuur tijdens het concentreren (normaliter 20°).

Lecithinemonsters werden gedurende 90 min bij 0° gehydrolyseerd en na neutralisatie geconcentreerd bij de temperaturen als in tabel 4 aangegeven.

Tabel 4

Invloed van de temperatuur op de aantasting van GPC tijdens het concentreren van de hydrolyse-monsters.

temperatuur	% GPA	% MPG + cycl.P	% totale afbraak
0 °	0,9	1,7	2,6
20 °	1,2	2,1	3,3
40 °	1,5	5,1	6,6
65 °	3,3	10,6	13,9

Uit de resultaten blijkt dat de aantasting tijdens de opwerking van de monsters bij 0° gering, bij 20° iets meer, en in beide gevallen nog acceptabel is. Boven 20° neemt vooral de vorming van MGP en de cyclische fosfaatesters in hinderlijke mate toe.

Resumerend kan worden gezegd, dat om de storende invloed van de nevenreacties zo gering mogelijk te houden, de hydrolyse het beste kan worden uitgevoerd in methanol (met enige procenten water), gedurende langere tijd bij lage temperaturen ($\leq 20^\circ$), terwijl ook tijdens de opwerking van de hydrolyse-producten de temperatuur laag gehouden dient te worden.

2.2 De zure hydrolyse van lecithinen

Vooraf met het oog op de methanololyse van lecithinen bij de bereiding van methylesters der vetzuren, maar ook in verband met proeven over partiële hydrolyse van fosfolipiden, was het interessant de zure hydrolyse van dit fosfatide nader te onderzoeken. Bij dit onderzoek werd aandacht geschonken aan de temperatuurafhankelijkheid, de invloed van de concentratie aan hydrolytisch agens en de invloed van de polariteit van het milieu. Ook werd de snelheid van methanololyse der eerste en tweede acylestergroep afzonderlijk onderzocht en, tenslotte, de preferentie voor de positie (β of γ) van het eerste te hydrolyseren vetzuur.

2.2.1 Invloed van de temperatuur

Bij de deacylering van lecithine met 1 N HCl in methanol viel het in de eerste plaats op dat de methanololyse zoveel trager verloopt dan de alkalische hydrolyse onder vergelijkbare omstandigheden. In figuur 13 blijkt dit duidelijk; eerst na ruim een uur inwerken bij 65° werd volledige omzetting verkregen.

% H_y

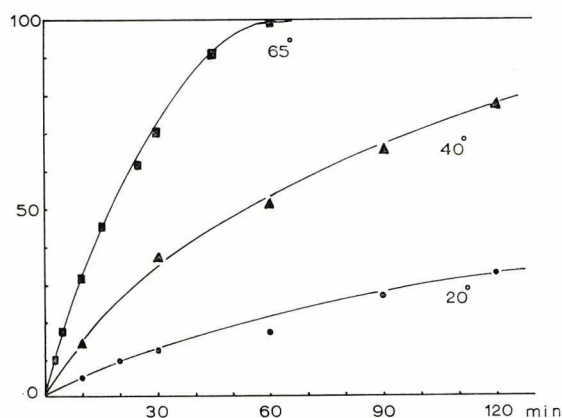


Fig. 13 Het verloop van de methanololyse van dipalmitoyllecithine met 1 N HCl in methanol bij verschillende temperaturen.

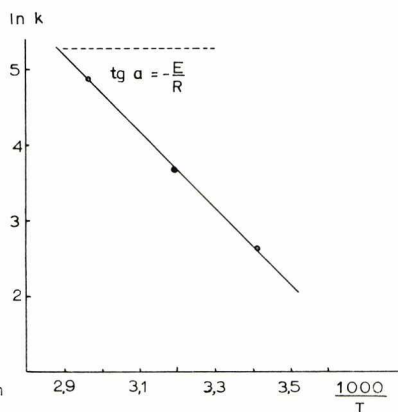


Fig. 14 Hulpgrafiek voor de bepaling van de activeringsenergie E voor de methanololyse van lecithine.

De (totale) deacyleringsreactie verliep steeds bimolecuair: $n_{20^\circ} = 2,10$, $n_{40^\circ} = 1,96$ en $n_{65^\circ} = 2,10$. De berekende reactieconstanten waren: $k_{20^\circ} = 11,4$, $k_{40^\circ} = 39,2$ en $k_{65^\circ} = 130 \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Met de relatie $\ln k = \ln k_0 - E/R \cdot 1/T$ werd E bepaald door in een hulpgrafiek $\ln k$ uit te zetten tegen $1000/T$ (fig. 14). De richtingscoëfficiënt $\text{tg } \alpha$ is gelijk aan $-E/R$. De afgeleide waarde voor de activeringsenergie bedroeg 10,8 Kcal/mol. Door de grote invloed van de zoutzuurconcentratie op de snelheidsconstanten is deze

waarde slechts van beperkte betekenis. Zoutzuur of een van de ionen neemt daadwerkelijk intermediair en activerend deel aan de reactie (2.2.2). De grootteorde van E die hier gevonden werd, is echter in zoverre van belang, dat in ieder geval de trager verlopende zure hydrolyse niet verklaard kan worden door een hoge activeringsenergie te postuleren: integendeel, de gevonden waarde is belangrijk lager dan die welke bij de alkalische hydrolyse gevonden werd.

2.2.2 De invloed van de zuurconcentratie

Het verloop van de zure hydrolyse, of feitelijk de methanolysen, van dipalmitoyllecithine werd gevolgd met diverse concentraties HCl in methanol bij 65°. In figuur 15 is een overzicht van de resultaten in beeld gebracht. De invloed van

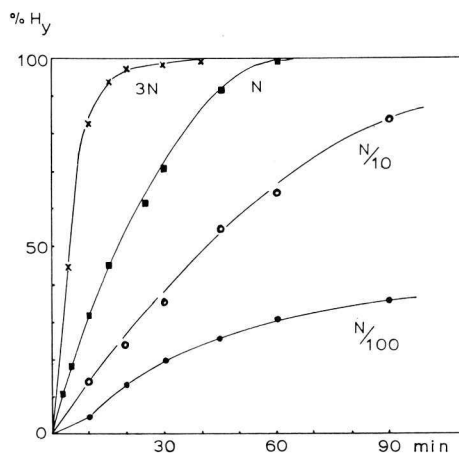


Fig. 15 Het verloop van de hydrolyse van dipalmitoyllecithine met verschillende concentraties HCl in methanol bij 65°.

de HCl-concentratie is groot; het is dus gunstig bij de methanolysen met hoge HCl-concentraties te werken. Met 3 N HCl werd na 40 min inwerken volledige omzetting verkregen en met 1 N HCl eerst na ruim een uur. De snelheidsconstante k werd beïnvloed door de HCl-concentratie:

$$k_{0,01\text{ N}}^{\text{obs}} = 18, \quad k_{0,1\text{ N}}^{\text{obs}} = 94,7, \quad k_{1\text{ N}}^{\text{obs}} = 130 \quad \text{en} \quad k_{3\text{ N}}^{\text{obs}} = 446 \text{ l/mol} \cdot \text{min}.$$

De invloed van de HCl-concentratie in aanmerking nemende door $k = k^{\text{obs}}/c_{\text{HCl}}$ te stellen, worden de bimoleculaire snelheidsconstanten in dezelfde volgorde: 1800, 947, 130 en 149 l/mol·min. Deze afname moet verklaard worden uit de beperkte dissociatie van de HCl-moleculen in droge methanolische oplossing. Bij de zure methanolysen kan de taak van het proton niet overgenomen worden door een ander ion, zoals dat bij de alkalische hydrolyse wel kan, waarbij $\text{CH}_3\text{O}'$ en OH' beide nucleofiele agentia zijn.

De gevonden waarden voor de orde van de reactie waren achtereenvolgens voor 0,01 N: 2,25, 0,1 N: 2,10, 1 N: 2,10 en voor 3 N: 1,90. Voor de reacties

uitgevoerd met 0,1 N HCl en hoger werd in goede benadering een bimoleculair verloop gevonden. De waarde 2,25 verschilt echter te veel van 2,00 dan dat dit teruggevoerd zou kunnen worden op de meetfout, die steeds 3–5% relatief bedroeg. Bij voortgezet onderzoek bleek bij hydrolyse met 0,005 N HCl n nog hoger gevonden te worden, namelijk 2,72.

Dit doet sterk denken aan de uitspraak van BENDER (1960, blz. 62): „In a concerted catalytic process which involves the substrate, an electrophilic catalyst and a nucleophilic agent, third order kinetics can result, although the overall stoichiometry indicates a bimolecular reaction”.

2.2.3 Invloed van de polariteit van het milieu

In de eerste plaats werd de invloed van water onderzocht door aan het oplosmiddel methanol toenemende hoeveelheden water toe te voegen. Lecithine werd bij 65° gedurende 30 min behandeld met mengsels van water en methanol, die 1 N aan HCl waren. In figuur 16 wordt het gevonden effect grafisch weergegeven. Tot ongeveer 10% water in het medium is de invloed van de watertoevoeging sterk, daarna veel geringer.

Het discontinue verloop van de curve in figuur 16 zou goed te begrijpen zijn, wanneer de deacylering in methanol (0% water) als methanololyse verloopt en vervolgens overgaat in hydrolyse (0–10% water), waarbij de hydrolysesnelheid dan kennelijk geringer is dan de snelheid van methanololyse.

Deze mogelijkheid vindt steun in de waarneming, dat de opbrengst aan vetzure methylesters bij toename van het percentage water geringer werd ten

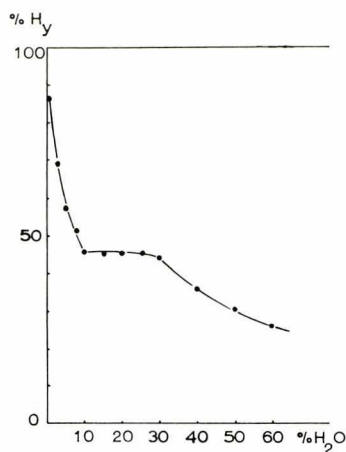


Fig. 16 Het percentage dipalmitoyllecithine, gehydrolyseerd met 1 N HCl gedurende 30 min. bij 65°, als functie van het percentage water in methanol.

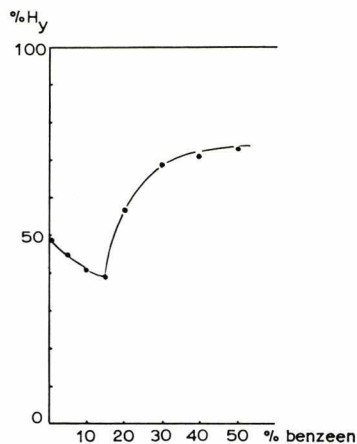
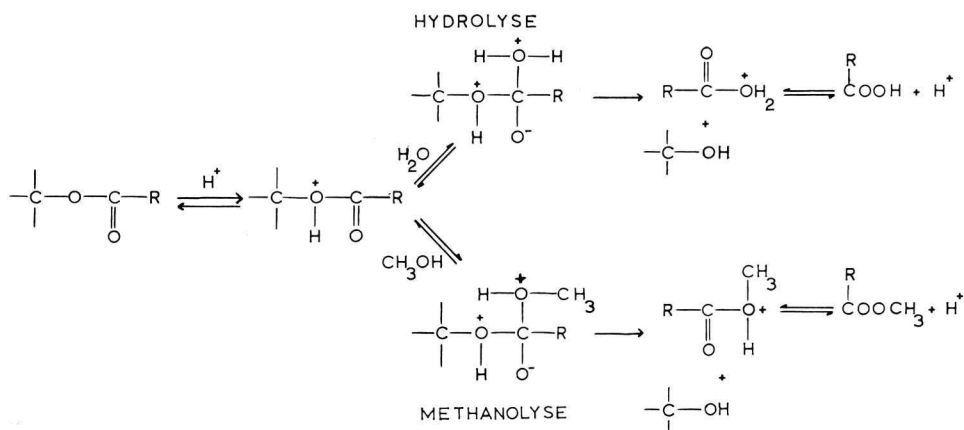


Fig. 17 Het percentage dipalmitoyllecithine, gehydrolyseerd met 1 N HCl gedurende 15 min. bij 65°, als functie van het percentage benzeen in methanol.



Schema 3 De zuur-gekataliseerde hydrolyse en methanolysen van een acylesterband.

gunste van een opbrengst aan vrije vetzuren. In schema 3 zijn de methanolysen en hydrolyse naast elkaar gegeven, waarbij als eerste intermediair een oxoniumverbinding aangenomen werd.

Om de invloed van de vermindering der polariteit van het medium na te gaan werden vervolgens monsters lecithine met 1 N HCl gedurende 15 min bij 65° gehydrolyseerd in mengsels methanol-benzeen. In figuur 17 is het effect hiervan geschetst. Opnieuw werd een grens gevonden bij ongeveer 15% benzeen in methanol. Tot dat gehalte benzeen neemt de hydrolysesnelheid iets af, zeer waarschijnlijk te verklaren door de afname der activiteit van de waterstofionen. Bij hogere concentraties benzeen wordt een toename der methanolysesnelheid gevonden, wat onder meer kan samenhangen met de toenemende kans op de vorming van micellen, die, doordat hun koolwaterstofketens naar buiten zijn gericht en de polaire groepen naar binnen, beter toegankelijk zijn voor methanolysen dan de monomeren.

2.2.4 *Splitsing totale methanolysen in die der eerste en tweede acylestergroep*

Op dezelfde wijze als bij de alkalische hydrolyse beschreven werd tijdens de methanolysen van dipalmitoyllecithine met 0,1 N HCl in methanol bij 65° de samenstelling van het hydrolysemengsel gevolgd. In figuur 18 wordt de gevonden samenstelling als functie van de tijd gegeven. Het percentage lysolecithine bereikt hier geen hoge waarden en het bleek ook niet mogelijk om hierin verandering te brengen door de omstandigheden anders te kiezen. De orden der respectievelijke deacyleringsreacties waren $n_1 = 2,06$ en $n_2 = 1,96$, beide reacties verlopen dus bimoleculair. De gevonden waarden voor de reactieconstanten waren $k_1 = 91$ en $k_2 = 152 \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. De methanolysen van de tweede acylestergroep verloopt dus sneller dan die van de eerste, waar-

door het percentage lyso-lecithine in het mengsel, in tegenstelling tot de waarneming bij de alkalische hydrolyse, laag blijft.

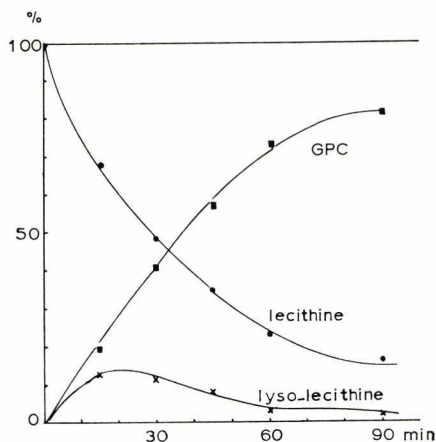


Fig. 18 De samenstelling van het hydrolysemengsel tijdens de methanolysen van dipalmitoyllecithine met 0,1 N HCl in methanol bij 65 °.

2.2.5 *Preferentie voor de positie van het eerste te methanolysen vetzuur*

Ongeveer 5 mg γ -stearoyl- β -oleoyl (L- α)lecithine werd 15 min met 0,1 N HCl bij 65° gehydrolyseerd, waarna de gevormde lyso-verbinding werd geïsoleerd en onderzocht op vetzuren. Het principe van schema 2, gepresenteerd bij de alkalische hydrolyse, blijft onveranderd geldig voor de methanolysen. Bij een at random aantasting van de vetzuuresters zou 50% van elk vetzuur in het lyso-fosfatide moeten worden aangetroffen. Bij gaschromatografische analyse van de methylesters, verkregen uit de vetzuren van de lyso-lecithine-fractie werd echter slechts 37,5% oliezuur naast 62,5% stearine zuur gevonden (waarnaast geringe verontreinigingen van andere vetzuren, zoals palmitinezuur en palmit-oliezuur, die buiten beschouwing bleven).

Ook bij de methanolysen wordt dus een preferentie gevonden voor de β -positie van het eerste te hydrolyseren vetzuur.

NIET-ENZYMATISCHE HYDROLYSE VAN KEPHALINEN

Lange tijd werd de naam kephaline gebruikt voor de aanduiding van fosfatidylethanolamine; tegenwoordig wordt hij echter gebezigd als verzamelnaam voor de diacylglycerofosfatiden, afgeleid van ethanolamine, serine en inositol, bij welk gebruik wij ons hier aansluiten.

Aangezien de kephalinen en lecithinen in hun eigenschappen sterke overeenkomst vertonen konden we de opzet van het hier ter sprake komende onderzoek beperken tot die aspecten, welke van praktische belang konden zijn voor de hydrolyse als analytisch hulpmiddel.

De waarnemingen hebben voornamelijk betrekking op fosfatidylethanolamine, een enkel experiment werd gedaan met fosfatidylserine. Een onverwachte moeilijkheid die zich voordeed, was de grote spreiding in zuiverheid van de commerciële synthetische preparaten. De grootste verontreiniging was steeds de overeenkomstige lyso-verbinding. Geconstateerd werd, dat grotere zuiverheid steeds gepaard ging met een geringere oplosbaarheid in methanol. Teneinde neveninvloeden op de hydrolysesnelheid te vermijden, werden de metingen zoveel mogelijk verricht aan één en hetzelfde preparaat van grote zuiverheid (Light and Co, Ltd., Colnbrook, Bucks, England).

3.1 De alkalische hydrolyse van kephalinen

Het onderzoek naar de alkalische hydrolyse van kephalinen omvatte de bestudering van de invloeden van temperatuur, reagensconcentratie en polariteit van het medium. Verder werden de hydrolyse-eigenschappen van eerste en tweede acylestergroep afzonderlijk, en de preferentie t.a.v. de positie, waarin de zuurresten zijn gebonden (β of γ) onderzocht. Tenslotte werd aandacht geschonken aan de nevenreacties die tijdens de deacylering kunnen optreden (3.1.1 tot 3.1.6).

3.1.1 *De invloed van de temperatuur*

Dipalmitoyl-L- α -fosfatidylethanolamine werd bij -20° , 0° , $+20^\circ$ en $+40^\circ$ gehydrolyseerd met 1 N KOH in methanol. Het verloop der hydrolyse werd gevolgd met fosfor- en stikstofbepalingen.

In figuur 19 worden de resultaten grafisch gegeven, waarbij direct opvalt, in vergelijking met figuur 3 (2.1.1), dat dit kephaline minder snel hydrolyseerde dan het overeenkomstige lecithine. Bij 40° werd complete omzetting binnen 10 min verkregen en bij 20° na 30 min. De berekende waarden voor de orde van de reactie waren bij -20° , 0° , $+20^\circ$ en $+40^\circ$ respectievelijk 2,00; 2,07;

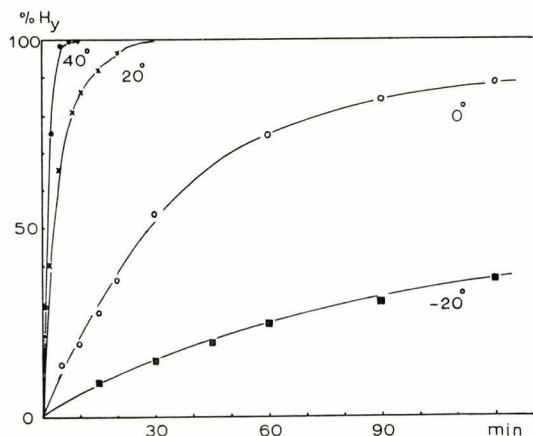


Fig. 19 De alkalische hydrolyse van kephalinen met 1 N KOH in methanol bij verschillende temperaturen.

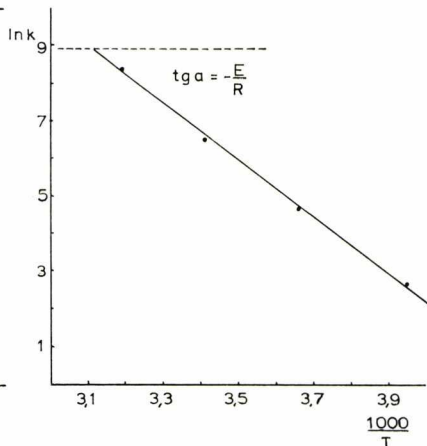


Fig. 20 Hulpgrafiek voor de berekening van de activeringsenergie E voor de alkalische hydrolyse van kephalinen.

1,96 en 1,92. De snelheidsconstanten waren, in dezelfde volgorde: 15,0; 109; 650 en 4370 $\text{l mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Vergelijking met de overeenkomstige waarden doet zien dat de snelheidsconstanten steeds kleiner waren dan die voor de lecithinen.

Figuur 20 is weer de hulpgrafiek ter bepaling van de activeringsenergie E . De afgeleide waarde voor E bedraagt 15 Kcal/mol, en is dus ook kleiner dan die voor het overeenkomstige lecithine.

3.1.2 De invloed van de reagensconcentratie

Dipalmitoylfosfatidylethanolamine werd met 1 N, 0,1 N en 0,01 N KOH in methanol bij 20° gedeacyleerd. In figuur 21 is het resultaat grafisch weergegeven. Evenals bij lecithine is ook hier 0,1 N KOH gunstig voor een snelle hydrolyse; door verdere opvoering van de KOH-concentratie wordt relatief weinig verdere versnelling verkregen. De snelheidsconstanten ($k = k_{\text{obs}}/c_{\text{KOH}}$) voor 1 N en 0,1 N zijn respectievelijk 650 en 615 $\text{l mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. De onderlinge afwijking van deze twee waarden bedraagt 5,4%, van dezelfde grootte-orde dus als bij het overeenkomstige lecithine. De orde van de reactie was in beide gevallen 2, voor de berekening van de kinetische grootheden bij gebruik van 0,01 N KOH waren de waarnemingsfouten te groot om tot betrouwbare resultaten te leiden.

3.1.3 Invloed van de polariteit van het medium

Deze werd op dezelfde wijze onderzocht als beschreven bij het overeenkomstige lecithine, door dipalmitoylfosfatidylethanolamine te hydrolyseren zowel in methanol-water als methanol-benzeen mengsels. De percentages hydrolyse

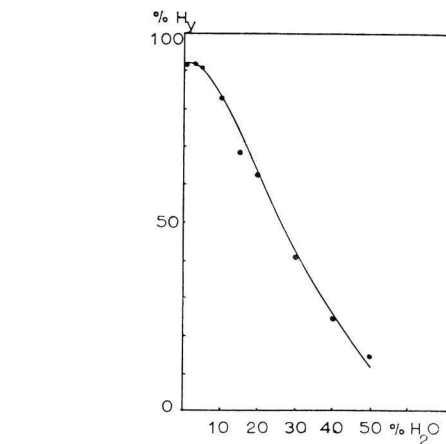
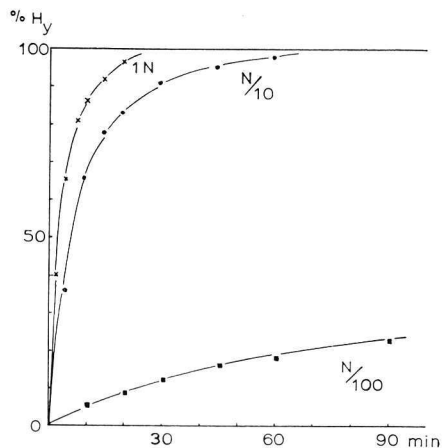


Fig. 21 De alkalische hydrolyse van kephalinen bij 20 ° met diverse concentraties KOH in methanol.

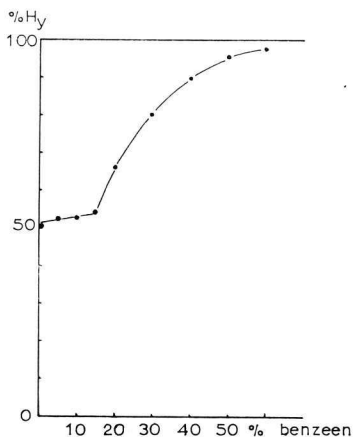


Fig. 22 Het percentage dipalmitoylfosfatidylethanolamine, gehydrolyseerd met 1 N KOH gedurende 15 min. bij 20 °, als functie van het percentage water in methanol.

Fig. 23 Het percentage dipalmitoylfosfatidylethanolamine, gehydrolyseerd met 0,1 N KOH gedurende 10 min. bij 20 °, als functie van het percentage benzeen in methanol.

zijn in figuur 22 en 23 als functie van het water- resp. benzeengehalte van de methanol weergegeven. De geleidelijke afname van de hydrolysesnelheid bij toenemend watergehalte is geheel in overeenstemming met de bevindingen met het lecithine. Een soortgelijk effect zoals reeds bij lecithine was waargenomen, werd ook hier gevonden: tot 15% benzeen nauwelijks of geen invloed op de totale deacylering, bij hogere percentages een toename van de hydrolysesnelheid.

3.1.4 *Splitsing van de totale hydrolyse in die van eerste en tweede acylestergroep*

Teneinde na te gaan of het een algemeen verschijnsel is, dat di-acylglycerofosfatiden met lange vetzuurketens sneller deacyleren dan de daarbij intermediair gevormde lyso-verbindingen, werd ook bij dipalmitoylfosfatidylethanolamine tijdens de hydrolyse met 0,01 N KOH in methanol bij 40°, steeds de samenstelling van het hydrolysemengsel bepaald. De verhouding

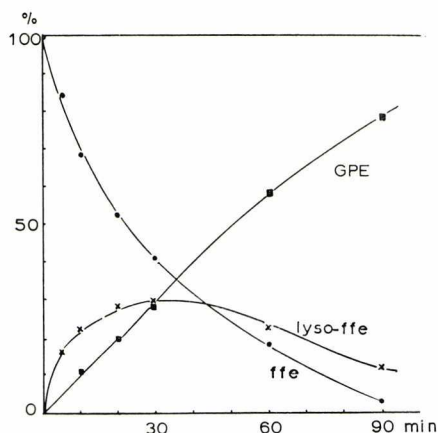


Fig. 24 De samenstelling van het hydrolysemengsel tijdens de inwerking van 0,01 N KOH in methanol bij 40 ° op fosfatidylethanolamine.

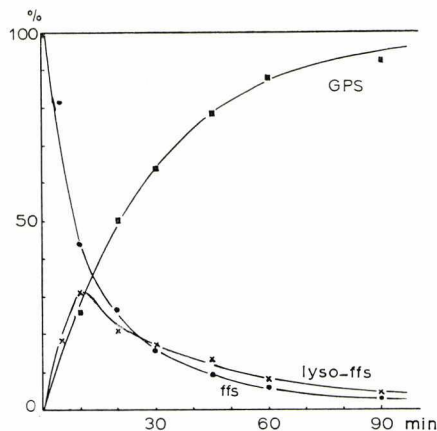


Fig. 25 De samenstelling van het hydrolysemengsel tijdens de inwerking van 0,01 N KOH in methanol bij 40 ° op fosfatidylserine.

kephaline: lyso-kephaline: glycerofosforylethanolamine (GPE) kon zodoende voor iedere hydrolysetijd worden berekend. In figuur 24 wordt de samenstelling van het hydrolysemengsel als functie van de tijd grafisch weergegeven. Het gehalte aan lyso-fosfatide in het hydrolysemengsel liep op tot ongeveer 30%. Zowel de deacylering van eerste als tweede esterband verliep bimoleculair $n_1 = 2,02$ en $n_2 = 2,00$, dit in afwijking met hetgeen voor lecithinen gevonden werd; daar verliep de hydrolyse van eerste esterband steeds met een duidelijke afwijking van $n = 2$. De snelheidsconstante van de eerste deacylering was groter dan voor de tweede, respectievelijk 3125 en $2350 \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, volkomen in overeenstemming met de bevindingen met lecithine. Toevoeging van benzeen (15%) aan het medium gaf ook bij het kephaline een nivellering van de snelheidsconstanten voor de eerste en tweede esterband te zien.

Hetzelfde experiment werd herhaald met γ -oleoyl- β -palmitoylfosfatidylserine. In figuur 25 is het resultaat van deze proeven grafisch weergegeven. Ook hier liep het percentage lyso-fosfatide op tot (ruim) 30%, het maximum werd echter eerder bereikt. De hydrolyse van dit fosfatidylserine verliep slechts weinig sneller dan die van het fosfatidylethanolamine. De orde van de reactie bij hydrolyse der eerste esterband was opnieuw vrijwel gelijk aan die der tweede en weinig afwijkend van 2; $n_1 = 1,90$ en $n_2 = 1,94$. De snelheidsconstanten waren $k_1 = 4670$ en $k_2 = 3250 \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.1.5 Preferentie voor de positie van het eerste te hydrolyseren vetzuur

Bij lecithine was een duidelijke preferentie gevonden voor de hydrolyse van het in de β -positie gebonden vetzuur. Om na te gaan of dit voor de kephalinen ook gold, werden de lyso-verbindingen, die gevormd werden bij de alkalische

hydrolyse van γ -palmitoyl- β -linoleoyl-L- α -fosfatidylethanolamine en γ -oleoyl- β -palmitoyl-L- α -fosfatidylserine uit het hydrolysemengsel geïsoleerd.

Na methanolysen werden de uit de lyso-fractie verkregen vetzuren methylesters onderworpen aan gaschromatografische analyse.

In een viervoudig experiment werd uit de lyso-verbinding van het fosfatidylethanolamine gemiddeld 70% palmitinezuur naast 30% linolzuur verkregen – kleine verontreinigingen van andere vetzuren buiten beschouwing gelaten – en uit dat van het fosfatidylserine 74% oliezuur naast 26% palmitinezuur. Steeds werd dus een lyso-kephaline verkregen dat overwegend het in de γ -positie gebonden vetzuur bevatte; bij de partiële hydrolyse ontstaan dus overwegend de β -lyso-fosfatiden. Deze preferentie voor de β -plaats is bij de kephalinen nog iets duidelijker dan bij de lecithinen. Hoewel bij deze kephalinen geen „inversie”verbinding beschikbaar was, kan het gemeten effect niet toegeschreven worden aan het karakter van het gehydrolyseerde vetzuur, in het ene geval werd nl. preferent linolzuur en in het andere geval palmitinezuur vrijgemaakt.

3.1.6 *Nevenreacties*

In tegenstelling tot GPC, het hydrolyseprodukt van lecithine, zijn GPE en GPS, de respectievelijke hydrolyseprodukten der fosfatidylethanolamines en fosfatidylserines, zeer stabiel in alkalische oplossing. Bij onze proeven, die zich in de tijd niet verder uitstrekten dan tot het moment waarop de deacylering juist volledig was, werd nimmer een hoeveelheid glycerofosforzuur (vermeerderd met glycerofosforzure methylesters en cyclische fosfaatesters) gevonden, die de 1% overschreed. Ook de invloed van minder polaire oplosmiddelen was zeer gering. Analytisch is dit een gelukkige omstandigheid.

Hetzelfde is echter niet waar voor het derde type kephaline: de fosfoinositiden. Uit het werk van BROWN (1961) kon verwacht worden dat glycerofosforylinositol in alkalisch milieu zeer instabiel zou zijn. Modelexperimenten met glycolfosforzure phenylesters toonden aan, dat de invoering van een OH-groep in de fenylkern gepaard ging met een aanzienlijk vergrote snelheid waarmee de alkalische afbraak van de verbinding plaats vond. BROWN veronderstelde* dat de OH-groepen van het inositol inductief zouden werken op de band fosforzuur-inositol en deze meer gevoelig zouden maken voor een nucleofiele aantasting door alkaliën. Kwantitatieve gegevens stonden hem echter niet ter beschikking. Opvallend is, dat de instabiliteit van glycerofosforylinositol steeds opgemerkt werd in betrekkelijk apolaire oplosmiddelen. BROWN (1961) zelf voerde de deacylering van mono-inositiden uit met alkalische hydroxylamine in water, waarbij geen afbraak van de gevoelige di-ester werd gevonden. Desgevraagd gaf BROWN toe, dat het waarschijnlijk te achten is, dat de polariteit van het medium hier een grote rol speelt. Deze

* Persoonlijke mededeling, 1963.

mening sloot geheel aan bij de resultaten van enkele experimenten die gedaan werden met een mono-inositide preparaat. Daar slechts ongeveer 10 mg van dit preparaat beschikbaar was, moest het onderzoek beperkt blijven. Bij de deacylering bij 40° met 0,1 N KOH in methanol, dat 3% water bevatte, werd een afbraak gevonden van ongeveer 3%, resulterende in de vorming van GPA en cyclische fosfaatesters. Bij 20° was dit percentage nog iets geringer, zodat de indruk bestaat dat de snelheid der nevenreacties die hier optreden, in grootte-orde overeenkomen met die van de afbraak van GPC, onder gelijke omstandigheden.

3.2 Zure hydrolyse (methanolyse) van kephalinen

Het onderzoek naar de zure methanolyse van kephalinen bleef beperkt tot bestudering van de invloeden van temperatuur, reagensconcentratie en het watergehalte van het medium (3.2.1 tot 3.2.3).

3.2.1 *Invloed van de temperatuur*

Het verloop der methanolyse van dipalmitoylfosfatidylethanolamine, uitgevoerd met 1 N methanolische HCl, werd onderzocht bij 20°, 40° en 65°. De deacyleringssnelheid van dit kephaline bleek nagenoeg even groot te zijn als die van het overeenkomstige lecithine. Dit blijkt bij de vergelijking van figuur 13 met figuur 26: bij 65° is de deacylering volledig na 60 min. De waarden die voor de orde der reactie gevonden werden, bedroegen bij 20°, 40° en 65° respectievelijk 2,10; 2,00 en 1,62. De berekende waarden voor de snelheidsconstanten waren in dezelfde volgorde: 3,5; 33,3 en 208 l mol⁻¹·min⁻¹. De uit deze waarden afgeleide activeringsenergie bedroeg 15,7 Kcal/mol. Deze is enigszins groter dan die welke bij de zure hydrolyse van lecithine gevonden werd.

3.2.2 *Invloed van de zuurconcentratie*

Dipalmitoylfosfatidylethanolamine werd bij 65° gemethanoliseerd met 1 N; 0,1 N; 0,01 N en 0,001 N HCl in methanol.

Het verloop van de onderscheidelijke hydrolyses is in figuur 27 weergegeven, vergelijking met figuur 15 doet zien dat de kephalinen en lecithinen zich in dit opzicht zeer analoog gedragen. De zoutzuur-concentratie beïnvloedt de k_{obs} in sterke mate: voor 1 N; 0,1 N; 0,01 N en 0,001 N werden de volgende waarden gevonden: 208; 51; 18 en 4,2 l mol⁻¹·min⁻¹. De waarden voor de orde der reactie liepen niet zo hoog op als bij lecithine: voor 1 N werd $n=1,62$ en voor 0,001 N $n=2,20$ gevonden.

3.2.3 *Invloed van de polariteit van het medium*

Monsters kephalinen werden met 1 N HCl, bij 65°, gedurende 10 min be-

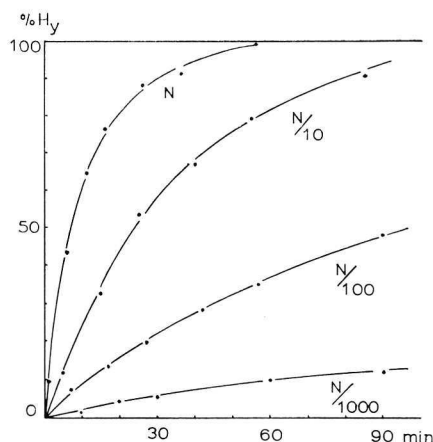
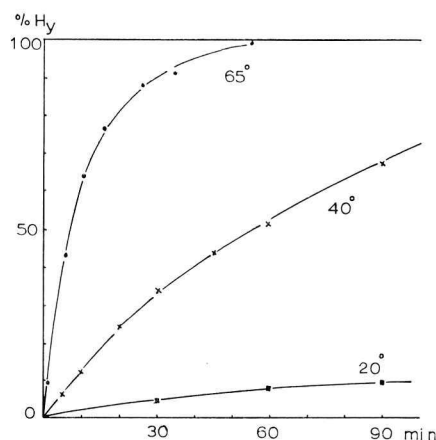


Fig. 26 Het verloop van de zure hydrolyse van kephalinen met 1 N HCl in methanol bij diverse temperaturen.

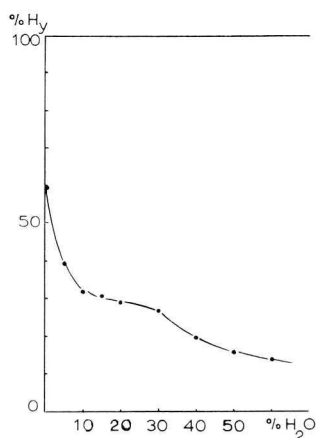


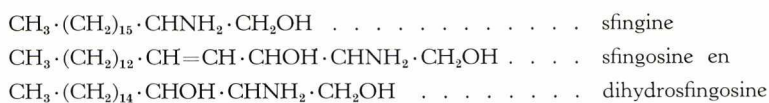
Fig. 27 Het verloop van de zure hydrolyse van kephalinen bij 65 ° met diverse concentraties HCl in methanol.

Fig. 28 De invloed van het watergehalte van het medium op de zure hydrolyse van kephalinen met 1 N HCl bij 65 °, na 10 min. gemeten.

handeld in een milieu van methanol-water. Hierbij werd het percentage totale deacylering gevolgd als functie van het percentage water. Het resultaat is in figuur 28 grafisch voorgesteld. De vorm van de curve is dezelfde als die welke bij de proef met het overeenkomstige lecithine werd gevonden; tot ongeveer 10% water een zeer sterke invloed, verklaarbaar door de veronderstelling dat dan de methanololyse overgaat in hydrolyse (zie schema 3).

DE NIET-ENZYMATISCHE HYDROLYSE VAN SFINGOLIPIDEN

De sfingolipiden onderscheiden zich van de glycerofosfatiden doordat in de laatstgenoemde fosfolipiden het glycerol vervangen is door een amino-alkohol met 18 koolstofatomen. Van deze amino-alkoholen komen er in de natuur een aantal voor, in het dierenrijk o.a.:



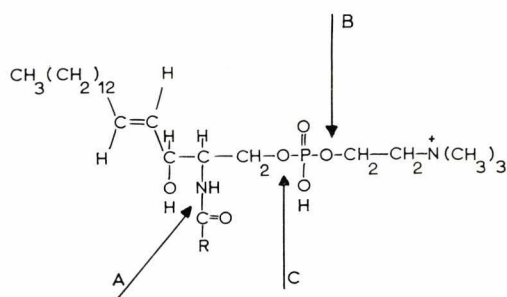
In het plantenrijk wordt voornamelijk het



gevonden.

In de sfingolipiden zijn de vetzuren niet, zoals bij de glycerofosfatiden, gebonden aan de hydroxylzuurstof, maar aan de stikstof in de vorm van een amide. De groepsnaam van deze stoffen is ceramiden. Er bestaat geen zekerheid over de vraag of er wellicht toch ook vetzuren veresterd zijn aan de vrije OH-groepen. Er zijn echter aanwijzingen dat dit slechts voor een gering percentage het geval is.

Een sfingomyeline is een ceramide, waaraan een fosforylcholine-groep is gebonden; is het ceramide gebonden aan een hexose (veelal galactose), dan spreekt men van een cerebroside.



Schema 4 Structuur van de natuurlijke sfingomyelinen. De hydrolyse mogelijkheden zijn:
A. deacylering, B. afsplitsing van choline en C. de afsplitsing van fosforylcholine.

De structuurformule van sfingomyeline is in schema 4 gegeven; daarbij is ook aangegeven welke bindingen hydrolyseerbaar zijn en door ons werden bestudeerd. Dat zijn de amide-band, de band met de choline-rest en die met de

fosforylcholine-rest (4.1 tot 4.3). Behalve aan deze drie reacties werd ook aandacht geschonken aan het vrijmaken van de suikers uit de cerebrosiden (4.4).

4.1 Deacylering van sfingolipiden

De amide-band van de sfingolipiden is tegenover methanolische KOH zeer stabiel. Bij 20° en 40° kon na 2 uur inwerken van 1 N KOH in methanol niet met zekerheid hydrolyse worden aangetoond. De nauwkeurigheid van de analyse-methode (bepaling van de vrije NH₂-groep in sfingosine) in aanmerking genomen, moet hieruit geconcludeerd worden dat onder de genoemde omstandigheden minder dan 4–5% omzetting plaats vond. Bij 65° werd na 2 uur een gering maar significant verschil (5–6%) met het uitgangsmateriaal waargenomen.

Om de vetzuren uit sfingolipiden te isoleren is alkalische hydrolyse dus niet de aangewezen weg. Bestudering van de zure hydrolyse toonde aan, dat deze zich daar beter toe leent. Eerst werd de invloed van de temperatuur op de hydrolysesnelheid nagegaan door 1 N HCl in methanol op sfingomyeline bij 20°, 40° en 65° te laten inwerken. Het resultaat is in figuur 29 grafisch gegeven. De hydrolysesnelheid is bij 20° en 40° gering, maar bij 65° is het mogelijk kwantitatieve omzetting te verkrijgen in 90 à 120 min. Bij 40° zowel als 65° verliep de methanolysen bimoleculair, de berekende waarden voor n waren bij 40°: 1,98 en bij 65°: 2,04. De snelheidsconstanten waren bij 40° en bij 65° respectievelijk: 32 en 374 l mol⁻¹·min⁻¹. De uit deze twee k -waarden berekende orde van grootte der activeringsenergie was ± 21 Kcal/mol. De

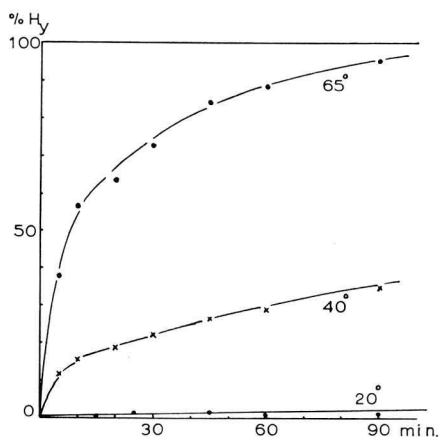


Fig. 29 Het verloop der deacylering van sfingomyeline met 1 N HCl in methanol bij verschillende temperaturen.

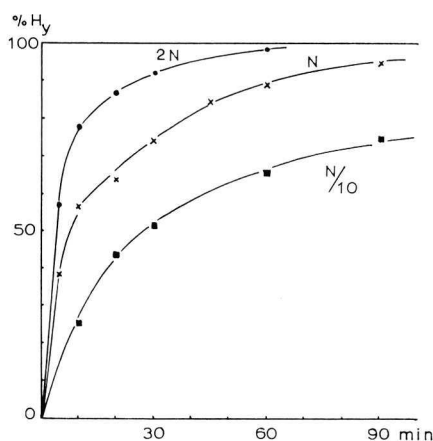


Fig. 30 Het verloop der deacylering van sfingomyeline bij 65° met verschillende concentraties HCl in methanol.

omstandigheid dat bij 20° in 2 uur minder dan 5% omzetting werd gevonden is analytisch bijzonder prettig. Een ander type van fosfolipiden, de plasmalogenen, reageert nl. bij 20° redelijk snel (hoofdstuk 5).

Vervolgens werd de invloed van de zoutzuurconcentratie onderzocht. Daartoe werd sfingomyeline met 0,1 N, 1 N en 2 N methanolische HCl bij 65° gehydrolyseerd en het verloop van de deacylering met de bepaling van de vrijgekomen NH₂-groepen gevolgd. Het resultaat is in figuur 30 weergegeven. Daaruit is te zien dat de zoutzuurconcentratie een zeer grote invloed heeft op de snelheid der methanolyse. Voor de isolering van de vetzuren uit de sfingolipiden (in de vorm van methylesters) is een hoge zoutzuurconcentratie dan ook zeer wenselijk.

De orde der reactie waarmee de methanolyse verliep was steeds een goede benadering van 2: met 0,1 N, 1 N en 2 N methanolisch zoutzuur bedroegen de *n*-waarden respectievelijk: 2,04, 2,04 en 2,00. De grote invloed van de zoutzuurconcentratie op de reactiesnelheid wordt gereflecteerd in de *k*-waarden; voor 0,1 N, 1 N en 2 N methanolisch zoutzuur bedroegen deze respectievelijk: 113, 374 en 1110 l mol⁻¹·min⁻¹. De activering van de methanolyse door het waterstofion verloopt dus als een functie van C_{H⁺}.

Tenslotte werd de invloed van het watergehalte op de hydrolysesnelheid nagegaan. In figuur 31 is het percentage hydrolyse, na 30 min. inwerken van 1 N HCl bij 65°, als functie van het watergehalte gegeven. De invloed van de watertoevoeging is geringer dan die welke bij de methanolyse der glycerofosfatiden werd waargenomen en de vertragende invloed op de hydrolysesnelheid verloopt zeer geleidelijk. Vorming van grotere conglomeraten, ten-

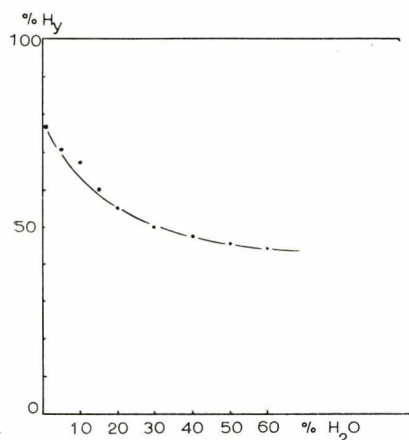


Fig. 31 De invloed van het percentage water in methanol op de deacylering van sfingomyeline met 1 N HCl gedurende 30 min. bij 65°

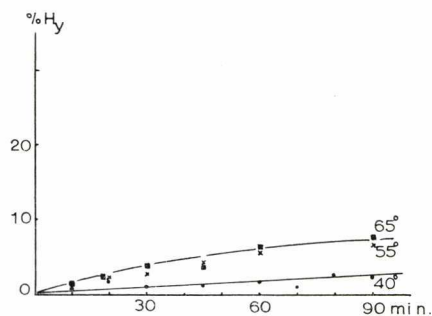


Fig. 32 De afbraak van sfingomyeline tot ceramide en fosforylcholine met 1 N KOH in methanol bij verschillende temperaturen.

gevolge van toename der polariteit van het milieu, en de daarmee gepaard gaande geringere „bereikbaarheid” van de te hydrolyseren groepen, zal wel optreden, maar het effect zal afgezwakt worden door de sterke solvatatie der conglomeraten. Sfingolipiden en hun afbraakprodukten vormen gemakkelijk zogenaamde myelinen, dat zijn sterk gesolvateerde (micellaire) deeltjes, die vaak aanleiding geven tot hardnekkige emulsies.

4.2 Hydrolytische splitsing van sfingomyeline in fosforylcholine en ceramide

In tegenstelling tot wat in de literatuur algemeen wordt aangenomen, bleek de ceramide-fosforylcholine-band tegenover methanolische alkali niet geheel stabiel te zijn. In 1 N methanolische KOH en bij 40° werd na 90 min een fosforverlies van bijna 3% geconstateerd. De nauwkeurigheid der fosforbepaling in aanmerking genomen, moet dit resultaat juist significant genoemd worden. Bij 55° en 65° waren de verliezen aan fosfor na 90 min inwerken van 1 N KOH in methanol respectievelijk 7% en 8%; het verloop wordt in figuur 32 grafisch weergegeven.

Deze waarnemingen zijn van praktisch analytisch belang. In de literatuur zijn nl. herhaaldelijk sfingomyelinebepalingen beschreven, volgens welke fosfolipidenmengsels aan hydrolyse worden onderworpen en het niet gehydrolyseerde deel als sfingomyeline wordt beschouwd (zie o.a. SCHMIDT e.a. 1959, DAWSON 1954 en 1960). Nog afgezien van de onnauwkeurigheid tengevolge van het mede bepalen van de zeer moeilijk te hydrolyseren alkyletherverbin-

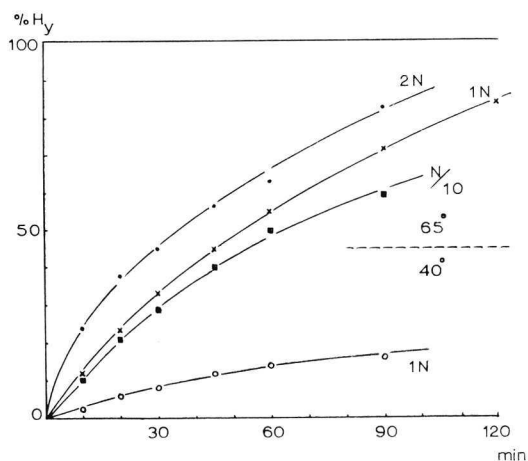


Fig. 33 De afbraak van sfingomyeline tot ceramide en fosforylcholine met 1 N HCl in methanol bij 40°; en met diverse concentraties HCl in methanol bij 65°.

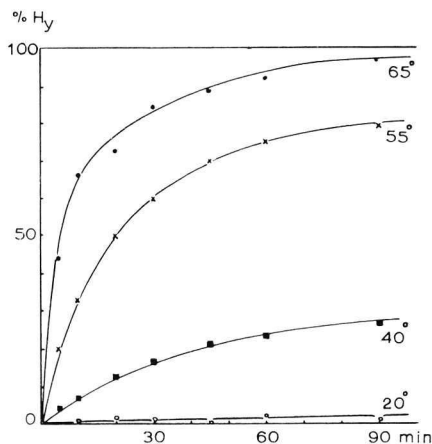


Fig. 34 De afsplitsing van choline van sfingomyeline met 1 N KOH in methanol bij verschillende temperaturen.

dingen, o.a. batylalkoholderivaten, worden volgens deze methode dus verliezen aan sfingomyeline geleden, waarvan de grootte afhankelijk is van de toegepaste hydrolysecondities.

In zure methanolische oplossing is de ceramide-fosforylcholine binding veel meer voor hydrolyse vatbaar dan in alkalisch milieu. Met 1 N HCl in methanol werd na 90 min bij 40° ruim 15% en bij 65° 70% afbraak gevonden. In figuur 33 is het verloop geschetst en bovendien de invloed van de zuurconcentratie bij 65° aangegeven. De orde van de hydrolysereactie waarmee de afsplitsing van fosforylcholine verliep, was steeds bimoleculair. De waarden voor de snelheidsconstanten bedroegen bij 65° voor 0,1 N, 1 N en 2 N methanolische HCl respectievelijk: 50,8, 54,6 en 50,5 l mol⁻¹·min⁻¹. Bij vergelijking van de figuren 29 en 33 blijkt, dat tijdens het deacyleren van sfingomyelinen een zeer belangrijke additionele afbraak plaats vindt, waardoor het hydrolysemengsel een gecompliceerde samenstelling krijgt. Naast de vetzure methylesters en sfingosylfosforylcholine worden ook sfingosine en fosforylcholine gevormd.

4.3 Hydrolytische splitsing van sfingomyeline in choline en ceramide-fosfaat

In tegenstelling tot de amide-band, die tegenover methanolische loog redelijk stabiel is, bleek bij het daartoe ingestelde onderzoek, dat de ceramidefosfor-zuur-choline-binding daar juist gevoelig voor was. Wanneer sfingomyeline met 1 N KOH in methanol bij 65° werd behandeld, kon na 90 min een vrijwel volledige afsplitsing van het choline geconstateerd worden. Het verloop van de hydrolytische splitsing, die in figuur 34 is weergegeven, werd gevolgd door bepaling van de kwaternair gebonden stikstof (cholinestikstof), in de organische laag verkregen na partitie van het hydrolysemengsel in een Folch-systeem. De reactie is overigens in sterke mate temperatuurafhankelijk: bij 20° verliep de hydrolyse zeer langzaam: na 72 uur inwerken van 1 N KOH werd 4,7% en na 92 uur 5,5% hydrolyse geconstateerd. Uit de gevonden waarden voor de snelheidsconstanten: bij 40°, 55° en 65° van respectievelijk: 27,7, 166 en 555 l mol⁻¹·min⁻¹ werd een activeringsenergie van ruim 26 Kcal/mol berekend.

Indien voor de preparatieve bereiding van sfingomyelinen van milde alkalische hydrolyse gebruik gemaakt wordt, moet er rekening mee gehouden worden dat een deel van het te isoleren produkt wordt afgebroken. Het hierbij ontstane ceramidefosfaat kan echter door zijn sterk zure karakter gemakkelijk met silicagel-kolomchromatografie van het sfingomyeline gescheiden worden.

4.4 Hydrolytische afsplitsing van suikers uit cerebrosiden

Van de suikers die uit natuurlijke cerebrosiden geïsoleerd kunnen worden is galactose de voornaamste; kleinere hoeveelheden glucose, en soms mannose,

galaktosamine en glucosamine kunnen echter ook voorkomen. Tegenover alkalische hydrolyse is de ceramide-suikerbinding zeer resistent; de aange-
wezen methode om deze te verbreken is zure hydrolyse.

De omstandigheden waaronder een dergelijke zure hydrolyse het best uit-
gevoerd kon worden, waren niet zonder meer te voorspellen. Een vrij zuiver
cerebrosidepreparaat werd bij 40° behandeld met 1 N HCl in methanol, waar-
bij zoals in figuur 35 (curve A) te zien is, een geringe hydrolysesnelheid ge-

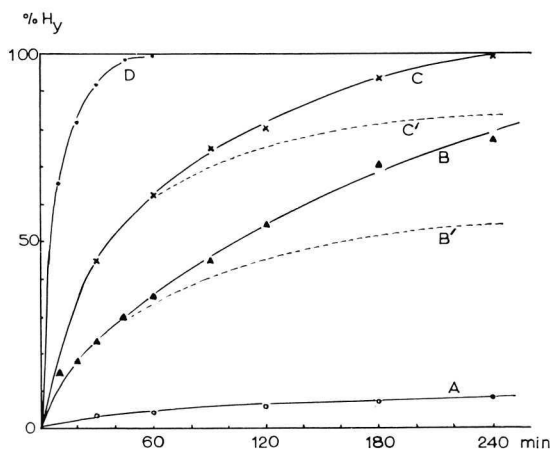


Fig. 35 De vrijmaking van suikers uit cerebrosiden: A. met 1 N HCl in methanol bij 40 °; B. met 1 N HCl in methanol-water 1 : 1 bij 65 °; B'. met 1 N HCl in methanol bij 65 °; C. met 3 N HCl in methanol-water 1 : 1 bij 65 °; C'. met 3 N HCl in methanol bij 65 ° en D. met 6 N HCl in methanol-water 1 : 1 bij 65 °.

vonden werd. Herhaling van het experiment bij 65° (curve B'), liet zien dat dan de reactie aanvankelijk redelijk snel gaat, maar door teruglopen van de zout-
zuurconcentratie minder wordt. Dit verlies aan zoutzuur is niet het gevolg van
verdamping, maar van de vorming van methylchloride. Onafhankelijk van de
beginconcentratie bleek de zoutzuurconcentratie na ongeveer twee uur op onge-
veer 0,6 N te zijn verminderd. Om dit ongewenste verschijnsel te elimineren
werd in plaats van zuivere methanol een methanol-watremengsel 1:1 gebruikt,
waarin de cerebrosiden bij 65° nog redelijk goed oplosbaar zijn. Zoals uit figuur
35 blijkt vertonen de curven voor 1 N en 3 N zoutzuur in methanol-water
(B en C) niet meer de afvlakking, die bij gebruik van watervrije methanol
optrad (B' en C'). Na ongeveer 4 uur incuberen met 3 N HCl waren de suikers
volledig uit de cerebrosiden vrijgemaakt; met 6 N HCl was dit reeds na 1 uur
het geval (D).

Ter controle werden in de waterlaag van het Folch-partitiesysteem van het
hydrolysemengsel suikerbepalingen uitgevoerd. Steeds werd 95–100% van
de verwachte hoeveelheid teruggevonden.

NIET-ENZYMATISCHE HYDROLYSE VAN ANDERE FOSFOLIPIDEN

Tot nu toe werden de twee grote hoofdgroepen van fosfolipiden, de glycerofosfatiden en sfingolipiden, aan de hand van enige representanten bestudeerd. In de natuur komen echter nog een aantal andere fosfolipiden voor, zij het in geringere kwantiteiten dan de twee hoofdgroepen.

In de eerste plaats kent men nog de groep der zure fosfolipiden, met fosfatidezuur en cardiolipine als belangrijkste vertegenwoordigers.

Enige experimenten werden gedaan met synthetisch tetra-acyl-bis-L- α -fosfatidezuur, een goede vervanger van het natuurlijke cardiolipine in fysiologische testen. Om na te gaan of de zure fosfatiden aanmerkelijk in hydrolysesnelheid van de diacylglycerofosfatiden afwijken, waarvoor overigens op grond van de structuurovereenkomst weinig reden aan te voeren is, werd het cardiolipine met 1 N KOH in methanol bij 20° gehydrolyseerd. Het verloop van de hydrolyse is in figuur 36 curve A in beeld gebracht. Vergelijking met proeven over de hydrolyse van lecithine en fosfatidylethanolamine onder dezelfde omstandigheden (zie figuren 3 en 19) doet zien dat het verloop van de hydrolyse met de tijd sterke overeenkomst vertoont.

Dit geldt evenzeer voor de zure methanolyse: cardiolipine dat met 1 N HCl in methanol bij 65° werd behandeld hydrolyseerde even snel als de lecithinen en de kephalinen onder vergelijkbare omstandigheden. Zie hiervoor figuur 36 curve B (cardiolipine) en de figuren 13 en 26 (lecithine en kephaline).

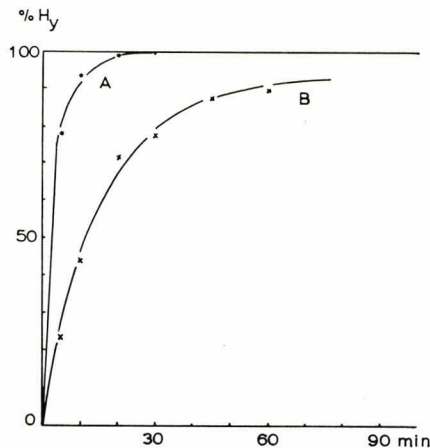


Fig. 36 De hydrolyse van cardiolipine: A. alkalisch met 1 N KOH in MeOH bij 20°, B. zuur met 1 N HCl in MeOH bij 65°.

Daarnaast vormen de plasmalogenen een belangrijke groep. Plasmalogenen zijn zeer verwant aan de di-acylglycerofosfatiden, maar onderscheiden zich van deze groep doordat één vetzuur vervangen is door een vetzuuraldehyde. Dit aldehyde is overwegend als vinylether gebonden. Methoden voor de synthese van deze natuurstoffen zijn tot nu toe niet beschreven en de experimenten moesten noodgedwongen uitgevoerd worden met een onzuiver natuurlijk preparaat, dat slechts ca. 30% fosfatidylcholine, naast ca. 70% lecithine, bevatte.

Hoewel dus blootgesteld aan dezelfde kritiek, die in de inleiding van dit proefschrift uitgesproken werd, namelijk dat veel gegevens, verkregen met natuurlijke mengsels van fosfolipiden, vaak zeer beperkt geldig blijken en slechts globale informatie leveren, worden hier toch enige resultaten gememooreerd, omdat ze een uitgangspunt voor verdere studie kunnen vormen.

Bij de milde alkalische hydrolyse van plasmalogenen, waarbij de vetzuuraldehyden niet of vrijwel niet worden aangetast, is het interessant te weten of het gebonden vetzuur met vergelijkbare snelheid wordt gehydrolyseerd als de vetzuren in de di-acylglycerofosfatiden. Dit punt is een onderwerp van discussie in het gebied der gedifferentieerde fosfolipiden-analyse (DAWSON 1960 en DAVENPORT en DAWSON 1962).

Een plasmalogeconcentraat werd bij 20° onderworpen aan alkalische hydrolyse met 1 N KOH in methanol. Vervolgens geneutraliseerd door toevoegen van ethylformiaat. Na partitie van het hydrolysemengsel in een Folch-systeem kwamen de gedeacyleerde plasmalogenen als lyso-verbinding in de organische laag. De gevonden verliezen aan fosfor kwamen slechts voor rekening van de di-acylglycerofosfatiden (fig. 37A). Werde evenwel na de alkalische hydrolyse aangezuurd, tot het medium 1 N HCl bevatte, en werkte dit zuur gedurende 1 uur bij 20° in, dan werden de lyso-plasmalogenen verder gesplitst tot in water oplosbaar glycerofosforylcholine en vetzuuraldehyden. Aangezien de niet gedeacyleerde plasmalogenen tijdens de zure hydrolyse wel het vetzuuraldehyde maar slechts zeer langzaam het resterende vetzuur verliezen, geven de verliezen aan lipoid fosfor het totaal der deacylering van di-acylglycerofosfatiden en plasmalogenen weer (fig. 37B). In figuur 37 geven de curven A en B het resultaat te zien. De fout die in curve B gesloten is, door de additionele zure hydrolyse van 1 uur, is maximaal 15% relatief. Uit het gelijkvormig verloop is het waarschijnlijk dat de vinyletherband geen duidelijk ongunstige invloed heeft op de hydrolysesnelheid van het begeleidend vetzuur. Curve C geeft het verloop der alkalische hydrolyse van hetzelfde preparaat weer, dat vooraf 1 uur aan 1 N HCl in methanol werd blootgesteld.

Daarom is het startpunt van de alkalische hydrolyse daar, waar reeds 12,6% van de aanwezige fosfatiden geheel gehydrolyseerd is. De voorafgaande zure hydrolyse heeft de vetzuuraldehyden geheel vrijgemaakt, waarbij lyso-lecithine ontstond. Feitelijk werd met curve C de hydrolyse van een mengsel lecithine en lyso-lecithine beschreven.

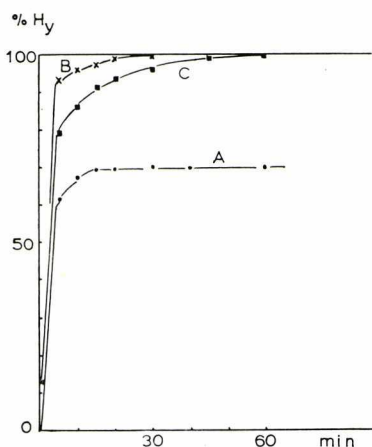


Fig. 37 Indirecte informatie over de hydrolyse van het plasmalageen-vetzuur (details A, B en C zie tekst).

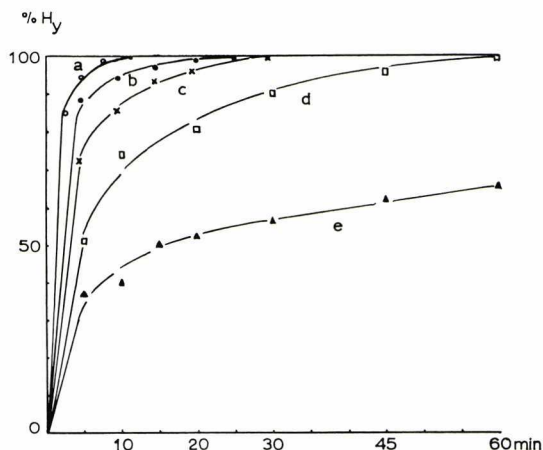


Fig. 38 De zure hydrolyse van vetzuuraldehyden uit lysoplasmalogenen;
a. met 1 N HCl in methanol bij 70 °
b. met 0,01 N HCl in methanol bij 70 °
c. met 0,01 N HCl in methanol bij 40 °
d. met 0,01 N HCl in methanol bij 20 °
e. met 0,005 N HCl in methanol bij 20 °

De hydrolyse van het vetzuuraldehyde werd gevolgd aan de hand van een lyso-plasmalageen preparaat dat ongeveer 90% zuiver was. Met verschillende concentraties HCl in 95% methanol en bij diverse temperaturen werd het verloop der hydrolyse gevolgd, hetgeen in figuur 38 grafisch is weergegeven. Het is duidelijk dat de plasmalogenen het vetzuuraldehyde zeer gemakkelijk kunnen verliezen, zelfs onder zeer milde omstandigheden. Deze zuur-labiliteit der plasmalogenen zou wel eens een belangrijke oorzaak kunnen zijn voor het artificieel ontstaan van lyso-glycerofosfatiden, tijdens de bewerkingen waaraan mengsels van fosfolipiden bij isolatie, scheiding en analyse worden onderworpen.

SAMENVATTENDE DISCUSSIE

Met behulp van moderne scheidingsmethoden en analytische technieken werd de niet-enzymatische hydrolyse van een aantal synthetische fosfolipiden en gezuiverde natuurlijke fosfolipiden onderzocht.

De deacylering van di-acylglycerofosfatiden in methanolische loog bleek dusdanig snel te verlopen, dat bij kamertemperatuur alle onderzochte typen in minder dan dertig minuten vrijwel geheel werden gehydrolyseerd.

In het temperatuurgebied waarbinnen de onderzoeken werden uitgevoerd (-20°C tot $+40^{\circ}\text{C}$) bleek de hydrolysesnelheid van de lecithinen steeds groter te zijn dan die van de kephalinen. De kephalinen verschilden onderling weinig in hydrolysesnelheid: die van de fosfatidylserinen werd slechts weinig hoger gevonden dan die van de fosfatidylethanolaminen.

Zowel voor de lecithinen als voor de kephalinen werd een lineair verband gevonden tussen de natuurlijke logaritme van de snelheidsconstante k en de reciproke absolute temperatuur. Uit deze relatie werd voor de activeringsenergie van de twee acylesterbanden tesamen, voor de lecithinen en de kephalinen respectievelijk 25 Kcal/mol en 15 Kcal/mol berekend. In overeenstemming met het aanzienlijke verschil tussen deze waarden is de verhouding van de snelheidsconstanten van lecithinen en kephalinen in sterke mate temperatuurafhankelijk. Bij 20°C is deze verhouding 13, bij 0°C 5 en bij -20°C 2, terwijl bij ongeveer -33°C de twee snelheidsconstanten gelijk worden.

Het ligt voor de hand, het verschil in activeringsenergie te verklaren op grond van een verschil in ladingstoestand van het aan de fosforylgroep gebonden amine. In methanolische loog zijn de NH_2 -groepen van ethanolamine en serine niet geprotoneerd. Choline bezit een duidelijk positief geladen kwaternair-stikstofatoom met in de solvatatiemantel, al dan niet in de directe omgeving, een tegen-ion.

Bij lecithinen zal, in vergelijking met kephalinen, de inductieve beïnvloeding van de positieve cholinestikstof langs de keten enige toename van de elektro-positiviteit van het P-atoom tot gevolg hebben. Daarnaast zal ook de elektronegativiteit van de fosfaatzuurstof wat afnemen, waardoor de aciditeit toeneemt. Naar verwachting zal deze inductie in twee concurrerende effecten resulteren. Door de enigermate vergrote elektronenzuigende werking van het P-atoom zal de inductieve beïnvloeding van de carboxyl-C-atomen van de esterbanden wat duidelijker worden. Deze krijgen een wat versterkt positief karakter en worden daardoor gemakkelijker toegankelijk voor een sp_3 -hybridisatie met $\text{CH}_3\text{O}'$ of OH' . Dit zal resulteren in een verlaging van de activeringsenergie. Anderzijds zal de toegenomen aciditeit de afstotende werking ten opzichte van een naderend hydrolyserend ion vergroten, met als gevolg een verhoogde activeringsenergie. Het is mogelijk dat bij lecithine juist de indirecte beïnvloeding, via de solvatatiemantel, waarbij het hydrolyserend ion een energetische barrière moet overwinnen, van overwegende invloed is.

Gevonden werd dat er ook een verschil is tussen lecithinen en kephalinen ten aanzien van de mate waarin een nucleofiele aanval op de fosforzuur-base

binding als nevenreactie van de deacylering optrad. Terwijl van de lecithinen met 0,1 N KOH bij kamertemperatuur 3–4% choline werd afgesplitst, bleek van de basen der kephalinen op het moment van volledige deacylering minder dan 1% te zijn vrijgemaakt. Bovendien bleek temperatuursverhoging bij lecithinen de snelheid van de nevenreactie beduidend meer te doen toenemen dan die van de deacylering, wat bij de kephalinen niet het geval was. Ook deze waarnemingen zijn verklaarbaar op grond van het verschil in ladingstoestand van de betreffende aan fosforzuur gebonden basen. De elektronenzuigende werking van het positief geladen kwaternaire stikstof-atoom in choline zal de ontvankelijkheid van de fosfaatester voor een alkalisch gekatalyseerde hydrolyse (methanolysen) bevorderen, terwijl bij de onder deze omstandigheden niet-geprotoneerde NH_2 -groepen van ethanolamine en serine dit effect niet kan optreden. Bij de sfingomyelinen werd voor de activeringsenergie van de choline-fosfaatesterbinding ongeveer 26 Kcal/mol gevonden, hetgeen goed overeenstemde met de waarde van 27 ± 2 Kcal/mol, die ATHIAS (1963) in waterige oplossing vond bij fosforylcholine.

Bij de totale deacylering van de di-acylglycerofosfatiden bleek het overeenkomstige lyso-fosfatide als tussenproduct op te treden. De snelheid, waarmee de lyso-verbinding werd gevormd (eerste deacylering) was bij lecithinen met relatief lange vetzuurketens ($\geq \text{C}_{16}$), steeds groter dan de snelheid waarmee dit lyso-fosfatide op zijn beurt hydrolyseerde (tweede deacylering). Tijdens de hydrolyse gaf dit aanleiding tot soms hoge percentages lyso-fosfatiden in het reactiemengsel: bij 0 °C werd met 0,1 N KOH in methanol na 5 minuten bijna 60% lyso-lecithine uit lecithine gevormd.

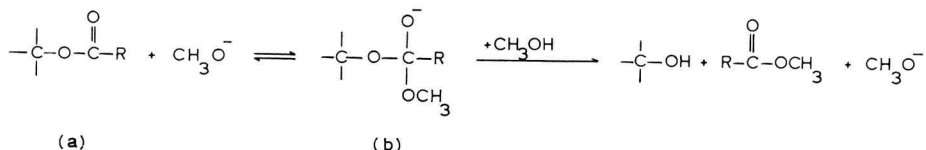
Bij lecithinen met relatief korte vetzuurketens (C_{14} en kleiner) verliep de tweede deacylering aanmerkelijk sneller dan de eerste, zodat het percentage lyso-fosfatide dat intermediair in het reactiemengsel kon worden aangetroffen laag bleef.

Hoewel gewoonlijk esters van primaire alcoholen gemakkelijker hydrolyseren dan esters van secundaire alcoholen, bleek in dit geval een duidelijke, evenwel niet extreme, preferentie te bestaan voor de vorming van β -lyso-verbindingen. Deze preferentie is verklaarbaar op grond van de overweging dat het eerder genoemde inductieve effect van het fosfaat-P-atoom op de carboxyl-C-atomen der esterbanden het meest merkbaar zal zijn op de direct aangrenzende β -plaats.

Indien ter vermindering van de polariteit het oplosmiddel methanol verdund werd met benzeen bleek, tot een concentratie van ongeveer 15 volume-percenten benzeen was bereikt, de snelheid, waarmee de totale deacylering verliep, niet beïnvloed te worden. Het verschil in snelheid tussen de eerste en tweede deacylering werd echter geringer. Nam het percentage bezeen verder toe, dan bleek een duidelijke versnelling der totale deacylering op te treden. Werd echter, om de polariteit van het milieu te laten toenemen, water aan de

methanol toegevoegd dan nam de hydrolysesnelheid af. In dit laatste geval verandert niet alleen de polariteit van het milieu, maar uiteraard ook de activiteit van de OH'-ionen.

Een eenvoudige verklaring voor deze polariteitsinvloeden op de deacyleringsnelheid is niet eenduidig te geven, daar rekening gehouden moet worden met meerdere fenomenen, die wellicht gezamenlijk voor de waargenomen effecten verantwoordelijk zijn. In de eerste plaats zal de polariteit van het medium een directe invloed hebben op de mate waarin de grondtoestand (ground state) en de overgangstoestand (transition state), bij de anion-gecatalyseerde methanolysen van acylesters, zullen worden gestabiliseerd.



Schema 5

Daar aangenomen mag worden dat de polariteit van de overgangstoestand (b) geringer is dan die der grondtoestand (a), zal bij afname der polariteit van het medium, (b) meer dan (a) worden gestabiliseerd, hetgeen resulteert in een grotere reactiesnelheid. Wanneer de polariteit toeneemt, door het toevoegen van water, treedt OH' als concurrent van CH₃O' op, en verdringt hydrolyse de methanolysen. In dit geval zal juist de overgangstoestand meer polair zijn dan de grondtoestand, en dus beter gestabiliseerd worden, temeer daar er een resonantie-mogelijkheid is. Bij toename van het volume-percentages water zou dus op grond van de directe polariteitsinvloed een vergrote hydrolysesnelheid verwacht worden. Experimenteel wordt echter het tegengestelde waargenomen. Hoe aantrekkelijk de onder meer door INGOLD (1953) en BENDER (1960) besproken verklaring, die op het verschil in stabilisering van grond- en overgangstoestand is gebaseerd, ook moge zijn, het is niet duidelijk op welke wijze de stabiliserende invloed wordt gerealiseerd.

Naast polariteitsinvloeden zullen ook sterische effecten een rol spelen. De twee lyophile vetzuurketens en ook het zwitter-ion kunnen allerlei oriënteringsmogelijkheden realiseren in de solvatatie-mantel. De polariteit van het oplosmiddel zal ongetwijfeld invloed hierop uitoefenen. Een verandering van de conformatie der afzonderlijke fosfatide-moleculen kan de toegankelijkheid van de verschillende posities voor het hydrolyserende ion ingrijpend wijzigen.

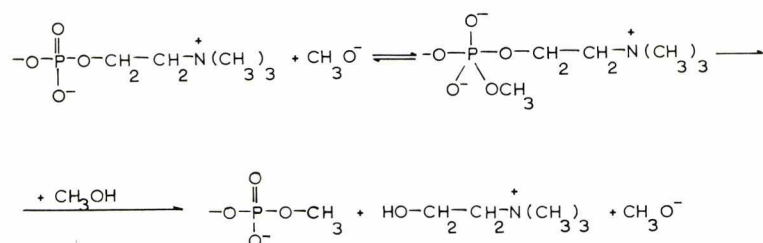
Bovendien kan de overweging, dat ELWORTHY (1961) vanuit het oplosmiddel methanol zowel bij toenemende als bij afnemende polariteit voor lecithinen een versterkte tendens tot micelvorming waarnam, een belangrijke bijdrage in de verklaring der waargenomen invloeden leveren. In een meer apolair milieu zullen de micellaire ordeningen die ontstaan de vetzuurketens naar de periferie richten, terwijl de polaire ketens elkaar wederzijds afscher-

men. Het ligt voor de hand dat de bereikbaarheid van de acylestergroepen voor een OH' of CH₃O', zowel door ruimtelijke ordening als door afscherming der ladingsinvloeden, belangrijk vergroot wordt. In een polair medium daarentegen zullen ordeningen overwegen waarbij de polaire ketens naar buiten en de vetzuurketens naar binnen zijn gericht. De bereikbaarheid van de acylestergroeperingen zal hierdoor verminderd worden, hetgeen resulteert in een geringere hydrolysesnelheid.

Zeer waarschijnlijk zullen de directe polariteitsinvloeden op het reactiemechanisme, de ruimtelijke oriëntering binnen het enkele molecuul en ook de sterische en energetische effecten tengevolge van micellaire ordening, allen in meerdere of mindere mate een bijdrage leveren tot de waargenomen effecten.

Ook werd waargenomen dat vermindering van de polariteit van het milieu bij de hydrolyse van lecithine, de afsplitsing van choline bevorderde, waardoor als nevenprodukten vooral glycerofosforzuren methylesters werden gevonden.

Dit feit is begrijpelijk op grond van het reactieschema dat gewoonlijk voor een dergelijke afsplitsing wordt aangenomen:



Schema 6

Bij de anion-geactiveerde methanolyse is de overgangstoestand van de fosfaatester minder polair dan de grondtoestand. Derhalve zal bij afname van de polariteit van het oplosmiddel de overgangstoestand meer gestabiliseerd worden dan de grondtoestand, hetgeen resulteert in een grotere reactiesnelheid.

De zure methanolyse van de di-acylglycerofosfatiden verliep trager dan de alkalische hydrolyse (methanolyse). Dit is in overeenstemming met de algemene ervaring, dat de esterhydrolyse door een hydroxide-ion krachtiger gekatalyseerd wordt dan door een hydronium-ion. Het minimum in de curve, die de relatie tussen hydrolysesnelheid en de pH geeft, ligt normaliter tussen 4 en 6.

De verschillen in snelheid, waarmee de diverse typen van di-acylglycerofosfatiden methanolysen, waren gering. In een milieu van methanolisch HCl is een aanzienlijk deel van de NH₂-groepen der kephalinenbasen geprotoniseerd en er is geen belangrijk verschil in ladingstoestand der basen die bij de verschillende typen aan fosfatidezuur veresterd zijn. Daarom zullen de inductieve beïnvloedingen, die bij de alkalische hydrolyse zo'n groot verschil in hydrolysesnelheid van lecithinen en kephalinen veroorzaakten, bij de zure methanolyse slechts graduele verschillen doen verwachten. Inderdaad was het

grootste waargenomen verschil in deacyleringssnelheid van lecithinen en fosfatidylethanolaminen een factor 1,6 (1 N HCl/MeOH bij 65°).

Uit de bij verschillende temperaturen waargenomen snelheidsconstanten kon voor lecithinen een activeringsenergie, voor de beide esterbanden tesamen, van ongeveer 11 Kcal/mol berekend worden. Deze waarde is aanzienlijk kleiner dan die welke bij de alkalische hydrolyse gevonden werd. Dit geeft indirect steun aan de opvatting dat bij de alkalische hydrolyse van lecithinen vooral de inductieve beïnvloeding der aciditeit van de fosfaatgroep, en de daarvan uitgaande afstotende werking op het hydrolyserende ion, van overwegende invloed is op de activeringsenergie der reactie. De preferentie voor de methanolylse van het vetzuur op de β -plaats was in overeenstemming met de waarnemingen bij de alkalische hydrolyse.

De invloed van de polariteit van het oplosmiddel op de snelheid van methanolylse is even complex als bij de alkalische hydrolyse. Dat bij een mengverhouding van 15% benzeen en 85% methanol in het medium ook bij de zure methanolylse de snelheid discontinu veranderde, wijst toch sterk in de richting van een kritisch effect. Hierbij wordt niet alleen aan een kritische polariteit voor het ontstaan van micellen gedacht, maar evenzeer aan het discontinu veranderen van de conformatie der niet-geassocieerde moleculen.

De sterke daling van de deacyleringssnelheid in het gebied van 0–10% water in methanol, moet aan de overgang van methanolylse in hydrolyse worden toegeschreven. Kennelijk is de $k_{\text{methanolylse}}$ groter dan $k_{\text{hydrolyse}}$, hetgeen samen kan hangen met een verschil in nucleofiliteit van water en methanol.

De meest belangrijke praktische punten, die betrekking hebben op de hydrolyse van di-acylglycerofosfatiden, kunnen als volgt worden samengevat:

- bij de deacylering werd een goed bruikbare snelheid gevonden onder de volgende condities: 0,1 N KOH, 99% methanol (1% water), 20°;
- verhoging van de concentratie aan hydrolytische agens, met als doel versnelling der deacylering, moet ontraden worden, zulks met het oog op de eveneens daardoor versnelde nevenreactie, die tot afbraak van de polaire keten leidt;
- verhoging van de temperatuur heeft hetzelfde effect: zowel de deacylering als de nevenreactie worden versneld, de laatste echter meer dan de eerste en naarmate de temperatuur toeneemt is op het moment van de totale deacylering de nevenreactie verder voortgeschreden;
- het gebruik van minder polaire media geeft een verhoogde kans op additionele afbraak der polaire ketens, in het bijzonder bij lecithinen en inositiden; eerst na het bereiken van een bepaalde polariteit wordt de hydrolysesnelheid in gunstige zin beïnvloed;
- het gebruik van meer polaire media (waterige milieu's) heeft een remmende invloed op snelheden van hydrolyse en methanolylse;
- bij de methanolylse heeft het zin een hoge HCl-concentratie te kiezen om de methanolylse in een aanvaardbaar tijdsbestek te beëindigen.

Bij de bestudering van de sfingolipiden is komen vast te staan dat de opvattingen over de stabiliteit in verschillende hydrolytische milieu's, zoals in vele literatuur plaatsen vermeld, enigszins moeten worden gewijzigd.

Uit tabel 5 blijkt dat voor de amideband geen essentiële afwijkingen gevonden werden van hetgeen reeds bekend was. Voor de twee andere mogelijke hydrolytische degradaties werden evenwel omzettingen gevonden die niet eerder zo duidelijk werden gesignaleerd.

Tabel 5

Stabiliteit van de verschillende potentieel hydrolyseerbare bindingen in sfingomyelinen onder diverse hydrolytische omstandigheden.

agens	temp.	amide-band	fosforzuur-choline	ceramide-fosforylcholine
alkalische-methanol 1 N	20 °	stabiel	vrijwel stabiel	stabiel
	40 °	stabiel	15% Hy na 30'	3% Hy na 90'
	65 °	4-6% Hy na 90'	100% Hy na 90'	8% Hy na 90'
methanolische HCl 1 N	65 °	100% Hy na 90'	niet afzonderlijk bepaald	70% Hy na 90'

De milde alkalische hydrolyse, die veelal bij 40° wordt uitgevoerd, heeft in mengsels fosfolipiden, behalve deacylering der glycerofosfatiden, een aanzienlijke afbraak der sfingomyelinen tot gevolg. De methanolise van sfingomyelinen gaat steeds vergezeld van een nevenreactie, waarbij fosforylcholine wordt afgesplitst.

SUMMARY

The non-enzymatic hydrolysis of phospholipids was studied using modern analytical methods and separation techniques, which are described in Chapter 1 together with the choice of the reaction solvent, the method used for calculating kinetic data and the synthetic and purified natural phospholipids used.

The alkaline hydrolysis of di-acylglycerophosphatides, forming a lyso-compound as an intermediate, was fast in comparison with both the additional breakdown of the phosphate esters and the hydrolysis of sphingolipids (Chapters 2, 3 and 4).

At room temperature the rate of overall deacylation of lecithins was about 13 times the corresponding rate for phosphatidylethanolamines and phosphatidylserines.

This ratio decreased with temperature; at 0 °C it was about 5, at -20 °C it was only 2 and at -33 °C it reached 1.

This was due to the difference in energy of activation, calculated for the sum of the two acyl ester bonds to be 25 Kcal/mol in lecithins and 15 Kcal/mol in cephalins.

In addition to this it was found that an increase in temperature resulted in an even sharper increase in the rate of hydrolytic disintegration of the phosphate ester in lecithins. This can be explained by the observed energy of activation for glycerophosphorylcholine, 26 Kcal/mol. The phosphate esters of the cephalins were more stable.

The difference in energy of activation of lecithins and cephalins was explained by charge induction theory, based on the fact that the bases of cephalins were not protonated in alkaline solution, while choline was positively charged.

During alkaline hydrolysis of lecithins with long chain fatty acids (more than 16 carbon atoms) the rate of lyso-lecithin formation was faster than the hydrolysis of the lyso-lecithins formed. In contrast, the rate of hydrolysis of the second ester bond was faster than that of the first acyl group, when the fatty acid chains were relatively short (less than 14 carbon atoms).

In the case of long-chain fatty acids the intermediate concentration of lyso-lecithins in the mixture increased during hydrolysis with 0.01 M KOH in methanol to about 30% of the total phospholipid phosphorus, and up to 60% with 0.1 M KOH in methanol.

A small (1:2) preference was observed for the formation of β -lyso-compounds. The influence of the polarity of the hydrolytic medium was very complicated. Up to 15% benzene in methanol no effect on the rate of overall

deacylation could be observed; only the difference between the rates of hydrolysis of first and second acyl ester bonds decreased. If, however, more benzene was added to the solvent a discontinuous increase in the rate of overall deacylation could be observed. Decrease in the polarity of the solvent resulted in a sharp increase in the breakdown of glycerophosphorylcholine, yielding cyclic phosphate esters and methylglycerophosphate esters in particular. The same effect could not be observed in the hydrolysis of phosphatidyl-ethanolamines and -serines.

In more aqueous systems the rate of hydrolysis decreased rather sharply up to about 10% water in methanol. Further increase in water percentage only resulted in a small gradual decrease in reaction rate. It seems obvious that the rate of methanolysis is greater than that of hydrolysis.

These observations on the influence of the polarity of the solvent could not be explained by comparing the stabilisation of ground- and transition states only, but both the *intra*-molecular arrangement of the hydrophobic acyl-chains and the polar phosphate-base group as well as the *inter*-molecular arrangements, such as micel-formation, were suggested to be contributing factors to the observed effects.

In the acid (HCl) catalyzed methanolysis of the glycerophosphatides, which proceeded at a much slower rate than the alkaline hydrolysis under similar conditions, it was observed that the HCl-concentration is very important.

It is advisable to use high concentrations of HCl in methanol to speed up the rate of methanolysis. The incomplete ionization of HCl in methanol and the varying ionic strength is the reason that k_{observed} is not a linear function of c_{HCl} .

The energy of activation for both acyl groups together was about 11–15 Kcal/mol in methanolysis of di-acylglycerophosphatides. Therefore no important differences between the rates of methanolysis of lecithins and cephalins were expected, and no considerable difference was observed.

The reason is that in this case no significant difference in electropositivity of choline and the cephalin-bases is to be expected: the cephalin-bases will be protonated.

The effect due to the changes in polarity of the solvent were more or less similar to those observed during alkaline hydrolysis. As already stated above the explanation for these polarity influences is complex.

The stability of the sphingolipids to hydrolytic agents was under certain conditions not so great as suggested previously in several papers.

The amide bond is stable to alkaline hydrolysis at 20 °C and 40 °C, and only 4–6% is hydrolysed at 65 °C with 1 M methanolic KOH in a 90 minute incubation period. With methanolic HCl (1 M) complete methanolysis could be obtained after 90 minutes at 65 °C.

The phosphate-choline bond was only stable at 20 °C to alkaline hydrolysis;

after a 30 minute incubation period with 1 M methanolic KOH at 40 °C, 15% of the choline was removed while at 65 °C complete removal of the choline was obtained in 90 min.

Finally, the ceramide-phosphorylcholine bond was found to be not completely stable to alkaline hydrolysis: with 1 M methanolic KOH 3% hydrolysis could be observed after 90 min at 20 °C and 8% after 90 min at 65 °C.

This bond was of course more susceptible to acid methanolysis: after a 90 minute incubation period with 1 M methanolic HCl at 65° about 70% of the phosphorylcholine was removed.

Preliminary experiments with plasmalogens suggest that the rate of alkaline hydrolysis of the acyl-ester bond in phosphatidal compounds is not significantly different from that for phosphatidyl compounds.

LITERATUUR

- ATTIAS, J., Thèses a la Faculté des Sciences de Montpellier (1963).
- BARTLETT, G. R., J. Biol. Chem. **234**. 466 (1959).
- BENDER, M. T., Chem. Rev. **60**. 54-107 (1960).
- BÖTTCHER, C. J. F., C. M. VAN GENT en C. PRIES, Anal. Chim. Acta **24**. 203 (1961 a).
- BÖTTCHER, C. J. F., C. M. VAN GENT en C. PRIES, Rec. Trav. Chim. **80**. 1157 (1961 b).
- BÖTTCHER, C. J. F., C. Pries en C. M. VAN GENT, Rec. Trav. Chim. **80**. 1169 (1961 c).
- BROCKERHOFF, H., J. Lipid Research **4**. 96 (1963).
- BROWN, D. M., B. F. C. CLARK en L. LETTERS, J. Chem. Soc. **1961**. 3774 (1961).
- DAVENPORT, J. B. en R. M. C. DAWSON, Biochem. J. **84**. 490 (1962).
- DAWSON, R. M. C., Biochim. et Biophys. Acta **14**, 374 (1954).
- DAWSON, R. M. C., Biochem. J. **68**. 357 (1958).
- DAWSON, R. M. C., Biochem. J. **75**. 45 (1960).
- DEENEN, L. L. M. VAN, G. H. DE HAAS en C. H. TH. HEEMSKERK, Proc. Deuel Conf. (1962).
- ELWORTHY, E. H. en D. S. MCINTOSH, J. Pharm. Pharmacol. **13**. 663 (1961).
- GOTTFRIED, E. L. en M. M. RAPPORT, J. Biol. Chem. **237**. 329 (1962).
- HAAS, G. H. DE, C. H. TH. HEEMSKERK, L. L. M. VAN DEENEN, R. W. R. BAKER, J. GALLAI-HATCHARD, W. L. MAGEE en R. H. S. THOMSON, VII Intern. Conf. on Biochem. Problems of lipids Birmingham (1962).
- HAAS, G. H. DE, Academisch Proefschrift Utrecht, Hoofdstuk V (1963).
- HANAHAN, D. J., H. BROCKERHOFF en E. J. BARRON, J. Biol. Chem. **235**. 1917, (1960).
- HELBERT, J. R. en K. D. BROWN, Anal. Chem. **27**. 1791 (1955).
- HÜBSCHER, G., J. N. HAWTHORNE en P. KEMP, J. Lipid Research **1**. 433 (1960).
- INGOLD, C. K., Structure and Mechanism in Organic Chemistry, Cornell Univ. Press, Ithaca New York (1953).
- MARINETTI, G. V., J. ERBLAND en J. KOCHEN, Federation Proc. **16**. 837 (1957).
- MARINETTI, G. V., J. Am. Chem. Soc. **81**. 861 (1959).
- MARINETTI, G. V., J. Lipid Research **3**. 1 (1962).
- MARUO, B. en A. A. BENSON, J. Biol. Chem. **234**. 254 (1959).
- PANGBORN, M. C., J. Biol. Chem. **188**. 471 (1951).
- PESSSEN, H., Science **134**. 676 (1961).
- PRIES, C. en C. J. F. BÖTTCHER, Biochim. et Biophys. Acta Previews **4**. No. 6, 55087 (1964).
- RILEY, J. P., Anal. Chim. Acta **9**. 575 (1953).
- SAITO, K., J. of Biochem. (Japan) **47**. 573 (1960).
- SCHMIDT, G., J. BENOTTI, B. HERSMAN en S. J. THANNHAUSER, J. Biol. Chem. **166**. 505 (1946).
- SCHMIDT, G., B. OTTENSTEIN, W. A. SPENCER, C. HACKENTHAL en S. J. THANNHAUSER, Federation Proc. **16**. 832 (1957).
- SCHMIDT, G., B. OTTENSTEIN, W. A. SPENCER, K. KECK, R. BLIETZ, J. PAPAS, D. PORTER, M. J. LEVIN en S. J. THANNHAUSER A.M.A.J. of Diseases of Children **97**. 691 (1959).

Op verzoek van de Faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen volgt hier een overzicht van mijn academische studie.

Na het behalen van het eindexamen HBS-B aan de Rijks HBS te Utrecht in 1949 begon ik in datzelfde jaar de studie in de scheikunde aan de Rijksuniversiteit te Utrecht. In 1953 legde ik het candidaatsexamen chemie, letter g, af. De studie voor het doctoraal examen met hoofdvak chemie omvatte analytische scheikunde (Prof. Dr. Ir. J. J. Smittenberg), colloid- en elektrochemie (Prof. Dr. J. Th. G. Overbeek), fysische chemie (Prof. Dr. J. M. Bijvoet) en organische scheikunde (Prof. Dr. F. Kögl).

De eerste specialisatie-richting, biochemie, werd bestudeerd onder leiding van wijlen Prof. Dr. F. Kögl, terwijl ik voor het tweede bijvak, plantenfysiologie, gastvrijheid mocht genieten in het laboratorium van Prof. Dr. V. J. Koningsberger. In 1957 werd het doctoraal examen afgelegd.

Korte tijd daarna werd ik opgeroepen in militaire dienst, waar ik gedurende bijna twee jaren werkzaam was als technisch officier materieel-zaken.

Na het verlaten van de militaire dienst trad ik in maart 1960 in dienst van de Gezondheidsorganisatie T.N.O., ten behoeve van het onderzoek naar de chemische aspecten van atherosclerose en coronairthrombose, dat onder leiding van Prof. Dr. C. J. F. Böttcher in verschillende laboratoria der Rijksuniversiteit te Leiden werd uitgevoerd, en thans is gevestigd in het Gaubius Instituut der Rijksuniversiteit te Leiden. Reeds spoedig werd ik belast met de dagelijkse leiding van het toegepast analytisch onderzoek.

Voor een belangrijk deel maakten de experimenten, waarvan de resultaten in dit proefschrift zijn samengevat, deel uit van een fundamentele studie van de fosfolipiden ten dienste van de onderzoekingen over atherosclerose en coronairthrombose.

Bij het verschijnen van dit proefschrift wil ik gaarne alle medewerkers van het Gaubius Instituut dank zeggen voor de hulp die ik steeds van hen mocht ondervinden, in het bijzonder Mevr. J. Verweij-van Kampenhout en Mevr. M. Rosenberg-v. d. Linden voor de assistentie bij het uitvoeren der experimenten en Dr. J. A. van Melsen voor de waardevolle adviezen bij het persklaar maken van het manuscript.