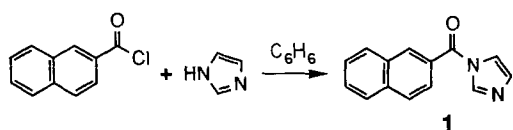


## Nachweis von Verbindungen mit Hydroxy- und Aminogruppen im Subpicomol-Bereich mit 2-Naphthoylimidazol als Fluoreszenzmarker\*\*

Von Norihiro Ikemoto, Lee-Chiang Lo und Koji Nakanishi\*

Hochempfindliche Methoden zur Identifizierung von Naturstoffen wie den Oligosacchariden wurden für Fortschritte im Bereich der Biowissenschaften immer wichtiger. Vielfach wird die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) zuvor geeignet mit Chromophoren derivatisierter Substrate verwendet. Von den zur Derivatisierung von Hydroxy- und/oder Aminogruppen herangezogenen Verfahren<sup>[1]</sup> hat sich aufgrund der starken UV-Absorption des Chromophors, der leichten Umsetzbarkeit der Reaktanten miteinander sowie der Stabilität der Produkte besonders die Benzoylierung<sup>[2, 3]</sup> bewährt. Der alternative 2-Naphthoatchromophor<sup>[4]</sup> besitzt zusätzlich zu diesen Eigenschaften die Fähigkeit zur Fluoreszenz, was die Nachweisempfindlichkeit drastisch vergrößert. Um die Vorteile dieses Markers zu zeigen, untersuchten wir seine Anwendung in der Analyse von Zuckern.

Die meisten Methoden zur Komponentenanalyse von Oligosacchariden enthalten eine Derivatisierung der Monosaccharide, die durch saure Hydrolyse erhalten wurden<sup>[3, 5]</sup>. In dem hier vorgestellten Verfahren im Mikromaßstab handelt es sich bei der Derivatisierung um eine Reduktions-Naphthoylierungs-Sequenz (Schema 1 unten), die an einer Mischung aus neun der am häufigsten in Bioconjugaten vorkommenden Monosaccharide durchgeführt wurde. Die



Aldosen  $\xrightarrow{\text{NaBH}_4}$  Aldite  $\xrightarrow[\text{CH}_3\text{CN}]{\text{1. DBU}}$  Alditernaphthoate  $\rightarrow$  HPLC

Schema 1. Die Synthese von Naphthoylimidazol **1** sowie das Derivatisierungs-Analyse-Schema. DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en.

resultierenden Alditernaphthoate haben UV-Absorptionsmaxima bei 234 nm und weisen große  $\epsilon$ -Werte (in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) auf: 254 000 für die Hexanaphthoate und 220 000 für die Pentanaphthoate, somit 43 000 pro Naphthoatchromophor, ein Wert, der dreimal größer ist als der entsprechende Wert für den Benzoatchromophor. Darüber hinaus zeigen die Naphthoate bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 234 nm starke Fluoreszenz bei 374 nm, was die Nachweisempfindlichkeit weiter erhöht.

Zur Naphthoylierung im Mikromaßstab verwendeten wir 2-Naphthoylimidazol **1** (Schema 1 oben), synthetisiert in Analogie zu Cinnamoylimidazol<sup>[6]</sup>, welches sich als exzellentes Reagens für die Acylierung acyclischer Polyole im Mikromaßstab erwiesen hat<sup>[7]</sup>. Die Pernaphthoylierung von Alditen und anderen Naturstoffen<sup>[8]</sup> im 10 nmol-Maßstab erfolgte schnell und vollständig, und es bildeten sich nur minimale Mengen an vom Reagens herrührenden Verunreinigungen. Im Gegensatz dazu verliefen Reaktionen mit 2-

Naphthoylchlorid, Pyridin und Dimethylaminopyridin langsamer, erforderten Wärmezufuhr und führten zu mehr Verunreinigungssignalen. Eine Reinigung von Proben biologischer Herkunft vor der Derivatisierung und HPLC-Analyse minimiert die Kontamination mit biogenetischen Stoffen, die ähnliche spektroskopische Eigenschaften haben könnten. Abbildung 1 zeigt das Chromatogramm einer Probe mit ca. 0.4 pmol Substanz, detektiert mit einem Fluoreszenzdetektor (siehe Experimentelles). Die neun Alditernaphthoatderivate wurden auf der Kieselgelsäule gut getrennt. Das Fehlen unvollständig derivatisierter Produkte im Chromatogramm deutet auf eine hohe Umsetzung im 10 nmol-Maßstab hin<sup>[9]</sup>. Die Nachweisgrenze beträgt ca. 0.1 pmol (Signal/Rausch-Verhältnis ca. 5). Wegen des großen Absorptionskoeffizienten der 2-Naphthoate sowie der Mehrfachderivatisierung eines jeden Zuckers kann eine hohe Empfindlichkeit auch durch UV-Detektion erreicht werden (bis herab zu ca. 1 pmol, Signal/Rausch-Verhältnis ca. 2), dennoch ist diese Nachweismethode eine Größenordnung weniger empfindlich als die Fluoreszenzdetektion.

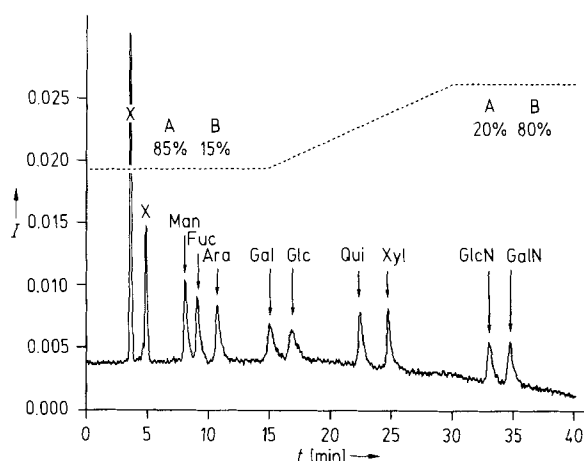


Abb. 1. Chromatogramm von ca. 0.4 pmol der Pernaphthoatderivate von Mannit, Fucit, Arabit, Galactit, Glucit, Chinovit, Xylit, Glucosamin und Galactosamin (X kennzeichnet vom Reagens herrührende Verunreinigungen). Solvens A: 0.025% 2-Propanol/Dichlormethan. Solvens B: 4% Acetonitril/0.025% 2-Propanol/Dichlormethan. Fließgeschwindigkeit: 1 mL min<sup>-1</sup>. Säule: YMC-Kieselgel (4.6 × 250 mm<sup>2</sup>, 5 µm). Absorption bei 234 nm. Emission der Intensität *I* bei 374 nm.

Alditbenzoate lassen sich durch Umkehrphasen-HPLC nur schlecht trennen<sup>[3]</sup>, die Alditernaphthoate dagegen werden sogar mit normaler HPLC gut getrennt. Diastereomere, die sich nur in einem Stereozentrum unterscheiden, z.B. Sorbit/Mannit/Dulcitol, Xylit/Arabit, Fucit/Chinovit und Glucosamin/Galactosamin, wurden vollständig getrennt. Die Aminoaldite Galactosamin und Glucosamin werden stärker auf der Säule zurückgehalten als die Oxy-Zucker. Zusätzlich zu höheren Nachweisempfindlichkeit bieten die 2-Naphthoylderivate gegenüber den Benzoylderivaten den wichtigen Vorteil der besseren HPLC-Trennbarkeit.

Enthält eine chirale Verbindung zwei oder mehr 2-Naphthoatchromophore, läßt sich häufig durch Circular-Dichroismus(CD)-Spektroskopie eine Excitonenkopplung nachweisen<sup>[10]</sup>. Die resultierende CD-Kurve spiegelt nicht nur die Stereochemie des Moleküls wieder, sondern kann auch zur strukturellen Identifizierung herangezogen werden. Unter Verwendung eines CD-Strahlenkondensators und einer Mikrozeile (100 µL, 1 cm) ergeben Verbindungen mit 2-Naphthoatchromophoren bereits mit 50 pmol Material charakteristische CD-Spektren. Die zehnfache Menge wird für eine reguläre CD-Zelle benötigt (1 mL, 1 cm).

[\*] Prof. K. Nakanishi, N. Ikemoto, L.-C. Lo  
Department of Chemistry, Columbia University  
New York, NY 10027 (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (GM 34509 für K. N. und 5F32CA08972 für N. I.) sowie den Firmen Shaman Pharmaceuticals (Bereitstellung ihres Fluoreszenzdetektors) und Bristol-Myers Squibb (Bereitstellung ihres Strahlenkondensators zur Aufnahme der CD-Spektren) gefördert.

Die Vorteile des 2-Naphthoatchromophors sind somit die leichte Derivatisierung, die hohe Nachweisempfindlichkeit, das gute chromatographische Verhalten sowie die Möglichkeit einer weiteren Charakterisierung der Derivate durch CD-Spektroskopie.

### Experimentelles

Synthese von **1**: Imidazol (0.71 g) wurde in Benzol (40 mL) suspendiert und auf 8°C gekühlt. Eine Lösung von 2-Naphthoylechlorid (1.0 g) in Benzol (10 mL) wurde in 10 min zugetropft und das Reaktionsgemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde durch Celite filtriert und zur Isolierung des Produkts lyophilisiert (1.2 g, quantitativ).

Mannose, Fucose, Arabinose, Galactose, Glucose, Chinovose, Xylose, Glucosaminhydrochlorid und Galactosaminhydrochlorid (jeweils 5 µmol) wurden 2 h bei Raumtemperatur mit NaBH<sub>4</sub> (10 mg) in H<sub>2</sub>O (1 mL) gerührt. Nach der Zugabe wässriger HCl wurde die entstandene Lösung sechs Mal unter Zugabe von Methanol eingedampft. Ein Aliquot (10 nmol eines jeden Zuckers) wurde zusammen mit **1** (10 µmol) und DBU (10 µmol) 2 h bei Raumtemperatur in CH<sub>3</sub>CN (2 mL) gerührt. Nach der Hydrolyse mit H<sub>2</sub>O wurde ein Aliquot (2 nmol) in einem silanisierten Reagensglas eingedampft. Der Rückstand wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen, und Aliquote davon wurden zur HPLC-Analyse [11] verwendet (Perkin-Elmer Series 4 Liquid Chromatograph mit 7500 Data Station, Shimadzu RF-551 Fluorescence HPLC Monitor).

Eingegangen am 11. Januar 1992 [Z 5115]

CAS-Registry-Nummern:

**1**, 141903-34-6; Imidazol, 288-32-4; Mannose, 3458-28-4; Fucose, 2438-80-4; Arabinose, 147-81-9; Galactose, 59-23-4; Glucose, 50-99-7; Chinovose, 7658-08-4; Xylose, 58-86-6; Glucosaminhydrochlorid, 66-84-2; Galactosaminhydrochlorid, 1772-03-8; 2-Naphthoylechlorid, 2243-83-6.

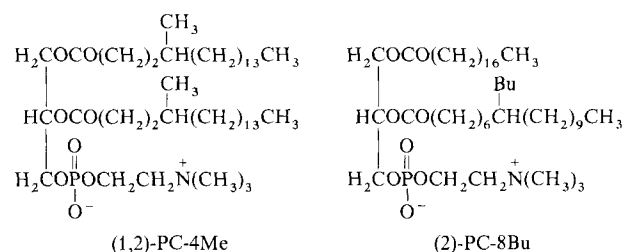
- [1] T. J. Bruno, P. D. N. Svoronos, *CRC Handbook of Basic Tables for Chemical Analysis*, CRC, Boca Raton, FL, USA, **1989**, S. 118, zit. Lit.
- [2] P. F. Daniel, D. F. De Feudis, I. T. Lott, R. H. McCluer, *Carbohydr. Res.* **1981**, 97, 161.
- [3] N. Jentoft, *Anal. Biochem.* **1985**, 148, 424.
- [4] J. Golik, H.-W. Liu, M. Dinovi, J. Furukawa, K. Nakanishi, *Carbohydr. Res.* **1983**, 118, 135.
- [5] K. Kakehi, S. Honda in *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS* (Hrsg.: C. J. Beirmann, G. D. McGinnis), CRC, Boca Raton, FL, USA, **1989**, S. 43, zit. Lit.
- [6] G. R. Schonbaum, B. Zerner, M. L. Bender, *J. Biol. Chem.* **1961**, 236, 2930.
- [7] P. Zhou, N. Berova, K. Nakanishi, M. Knani, M. Rohmer, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4040.
- [8] Reaktionen in kleinerem Maßstab (<0.5 nmol), HPLC-Trennungen sowie CD-Messungen wurden erfolgreich mit mehreren Serien von hydroxygruppenhaltigen Verbindungen biologischen Ursprungs durchgeführt.
- [9] Die isolierte Ausbeute betrug ca. 32%, wenn die Naphthoylierung im kleineren 0.6nmol-Maßstab durchgeführt wurde.
- [10] N. Harada, K. Nakanishi, *Circular Dichroic Spectroscopy: Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, USA, **1983**, S. 38.
- [11] Sofern erwünscht, können die stark polaren, vom Reagens herrührenden Verunreinigungen durch Vorschalten einer C18-Säule entfernt werden. Siehe [3].

## Synthetische kettensubstituierte Phospholipide; Ionentransport durch die Doppelschichtmembran\*\*

Von F. M. Menger\* und Patricia Aikens

Die Natur hat die Mittel zur Kontrolle der passiven Diffusion durch ihre Membranen den jeweiligen Bedingungen entsprechend entwickelt. Zum Beispiel enthalten die Membranen von Kaltwasser-Meereslebewesen hohe Anteile an „fluiditätserhöhenden“ (d. h. mehrfach ungesättigten) Lipiden. Die Steuerung der Permeabilität ist jedoch auch für Systeme zur Medikamentenfreisetzung wichtig, die auf Li-

pidmembranen mit definierten Freisetzungsgeschwindigkeiten beruhen<sup>[1]</sup>. Daher ist es wünschenswert, den Einfluß der Lipidstruktur auf die Permeabilität systematisch zu untersuchen. Die Gelegenheit dazu ergab sich, nachdem wir eine Reihe von Phospholipiden für calorimetrische und Filmstudien synthetisiert hatten<sup>[2, 3]</sup>. Die neuen Lipide enthielten Ketten aus 18 Kohlenstoffatomen mit Alkylsubstituenten unterschiedlicher Größe, Position und Zahl. Zwei Beispiele solcher Distearoylphosphatidylcholine (mit selbsterklärenden Namens Kürzeln) zeigt Schema 1. An diesen Lipiden un-



Schema 1. Zwei Beispiele für Phospholipide mit alkylsubstituierten Ketten.

tersuchten wir nun den Ionenfluß durch die Doppelschichtmembran. Dabei stellten wir fest, daß die Alkylverzweigung die Packung der Lipidketten, die mehr oder weniger parallel innerhalb der Membran angeordnet sind, stört. Diese Störung erleichtert in Abhängigkeit von der Größe und der Position der Alkylsubstituenten die Passage von Ionen.

Der Ionenfluß wurde mit derselben Methode gemessen, die in einer früheren Arbeit über synthetische Ionenkanäle beschrieben ist<sup>[4]</sup>: Ein verzweigtes Phospholipid und ein Fluoreszenzfarbstoff<sup>[5]</sup> wurden in einem schwachen Puffer (pH = 7.7, 0.1 M KCl) gemeinsam beschallt<sup>[6]</sup>. Dabei entstanden unilamellare Vesikel mit Farbstoff innerhalb und außerhalb der Vesikel. Letzterer wurde durch Gelfiltration entfernt. Wurde der externe pH-Wert plötzlich auf 6.7 gesenkt, wanderten Protonen in die Vesikel und protonierten dort den Farbstoff, so daß die Fluoreszenz abnahm. Aus der quasielastischen Lichtstreuung ergab sich für die Vesikel ein Durchmesser von 35 ± 5 nm.

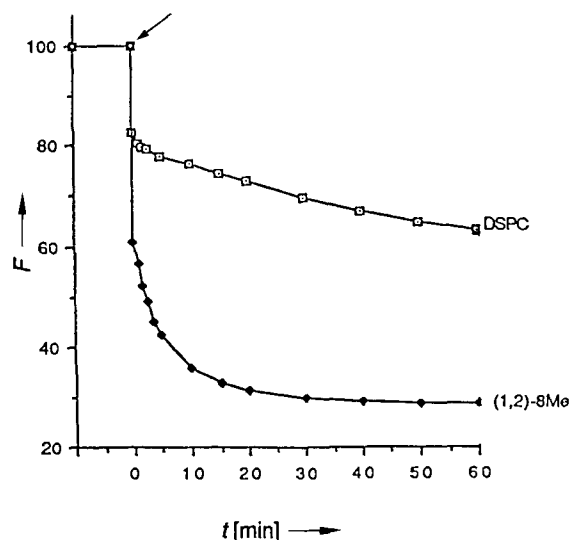


Abb. 1. Fluoreszenz-Zeit-Diagramm nach der Zugabe von HCl (Pfeil) zu Vesikeln, die einen pH-empfindlichen Farbstoff enthalten. Die Auftragungen zeigen, daß Methylsubstituenten an Position 8 der Phosphatidylketten den Eintritt von Protonen relativ zum unverzweigten DSPC erleichtern. Man erkennt deutlich, daß es sich um einen zweiphasigen Prozeß handelt (die Fluoreszenzabnahme ist dabei am Anfang zu schnell, um mit konventionellen Methoden gemessen zu werden).

[\*] Prof. F. M. Menger, P. Aikens  
Department of Chemistry  
Emory University  
Atlanta, GA 30322 (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health gefördert.