

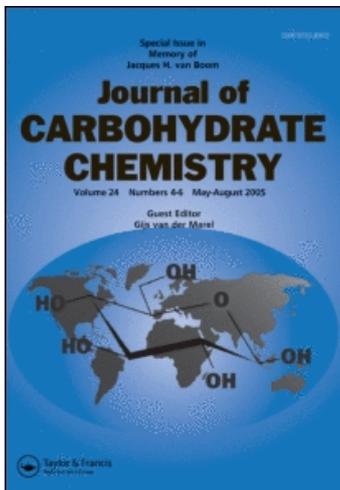
This article was downloaded by:

On: 23 January 2011

Access details: *Access Details: Free Access*

Publisher *Taylor & Francis*

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



## Journal of Carbohydrate Chemistry

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713617200>

### <sup>1</sup>H-NMR-Untersuchungen an Sialinsäuren, IV<sup>1</sup> Kinetik und Mechanismus des Austauschs von Protonen an C-3 der N-Acetyl-D-Neuraminsäure Gegen Deuterium Oder Tritium

Hermann Schmidt<sup>a</sup>; Horst Friebolin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Organisch-Chemisches Institut der Universität, Heidelberg, Fed.Rep.of Germany

**To cite this Article** Schmidt, Hermann and Friebolin, Horst(1983) '<sup>1</sup>H-NMR-Untersuchungen an Sialinsäuren, IV<sup>1</sup> Kinetik und Mechanismus des Austauschs von Protonen an C-3 der N-Acetyl-D-Neuraminsäure Gegen Deuterium Oder Tritium', *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2: 4, 405 – 413

**To link to this Article:** DOI: 10.1080/07328308308057887

**URL:** <http://dx.doi.org/10.1080/07328308308057887>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

$^1\text{H}$ -NMR-UNTERSUCHUNGEN AN SIALINSÄUREN, IV<sup>1</sup>  
KINETIK UND MECHANISMUS DES AUSTAUSCHS VON PROTONEN AN C-3 DER  
N-ACETYL-D-NEURAMINSÄURE GEGEN DEUTERIUM ODER TRITIUM

Hermann Schmidt und Horst Friebolin\*

Organisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 270, D-6900 Heidelberg, Fed. Rep. of Germany

Received June 24, 1983

ABSTRACT

Kinetic data for the deuteration of N-acetyl-D-neuraminic acid at C-3 in basic solution at different pD values are given and discussed. With the same method Tritium has been introduced. A mechanism is proposed for the exchange reaction.

EINFÜHRUNG

In einer früheren Arbeit<sup>1</sup> konnten wir mit Hilfe der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie zeigen, daß die Protonen am C-Atom 3 der N-Acetyl-D-neuraminsäure (NeuAc) in alkalischer  $\text{D}_2\text{O}$ -Lösung rasch durch Deuterium ersetzt werden, wobei 1) der Austausch des axialständigen Protons schneller erfolgt als der des äquatorialständigen, 2) die Austauschgeschwindigkeiten stark vom pD-Wert abhängen und 3) im sauren Milieu kein Austausch beobachtbar ist.

In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die quantitativen Aspekte der Markierung von NeuAc an C-3 mit Deuterium, sowie die schon in Lit. 1 erwähnte Darstellung der für biochemische Untersuchungen interessanten tritiummarkierten NeuAc. Schließlich wird noch ein Vorschlag für den Mechanismus zur Diskussion gestellt.

### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Fig. 2 sind Ausschnitte der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (300 MHz) von NeuAc mit den für diese Untersuchungen wichtigen Signalen von H-3a, H-3e und  $\text{NCOCH}_3$  wiedergegeben, die bei einem pD-Wert von 11,3 zu den Zeiten 2, 30 und 110 Minuten, sowie nach 55 Stunden aufgenommen wurden. Der Figur ist zu entnehmen, daß die Signale von H-3a schneller verschwinden als die von H-3e. Der nach 110 Minuten aufgenommene Spektrenausschnitt entspricht praktisch dem der in Axialposition an C-3 monodeuterierten NeuAc. Für H-3e erscheint nur noch ein Dublett infolge Kopplung mit H-4a. Bedingt durch den Isotopenshift überlagert sich dieses Dublett zufällig exakt mit dem rechten Teil des Dubletts von H-3e der nicht-deuterierten NeuAc und ist daher vor allem bei noch geringem Deuterierungsgrad in der Anfangsphase nicht deutlich erkennbar.

Fig. 3 gibt an, wie sich die Signalintensitäten von H-3a und H-3e beim pD=11,3 mit der Zeit ändern. Mit den diesem Diagramm zugrundeliegenden Daten bestimmten wir die Geschwindigkeitskonstanten  $k(\text{H-3a})$  und  $k(\text{H-3e})$  für den Austausch der axial- und äquatorialständigen Protonen an C-3 gegen Deuterium (s. Experimenteller Teil). In gleicher Weise wurden auch die übrigen in Tabelle 1 angegebenen Geschwindigkeitskonstanten für andere pD-Werte ermittelt.

Die Ergebnisse zeigen anschaulich die Zunahme der k-Werte und die Abnahme des Quotienten  $k(\text{H-3e}):k(\text{H-3a})$  mit steigendem pD: Bei pD = 9 ist er ungefähr 1 : 5, bei pD = 12 ungefähr 1 : 25. Bei pD  $\gg$  12 sind die Austauschgeschwindigkeiten für quantitative

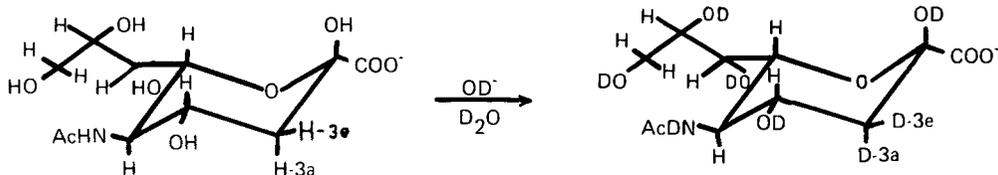


FIG. 1: Austausch der H-Atome an O, N und am C-Atom 3 der N-Acetyl-β-D-neuraminsäure in alkalischer Lösung.

TABELLE 1

Geschwindigkeitskonstanten für den Austausch von H-3a und H-3e bei verschiedenem pD.

pD	$k(\text{H-3e}) \cdot 10^8 [\text{s}^{-1}]$	$k(\text{H-3a}) \cdot 10^8 [\text{s}^{-1}]$	$k(\text{H-3e}):k(\text{H-3a})$
8,0	10	17	1 : 1,7
9,0	41	196	1 : 4,8
9,4	75	397	1 : 5,3
10,0	205	1920	1 : 9,4
10,7	903	11000	1 : 12,2
11,3	1590	32100	1 : 20,2
12,0	7780	192500	1 : 24,7

Auswertungen der NMR-Messungen zu groß. Bei  $\text{pD} < 7$  kann kein Austausch mehr beobachtet werden.

Die Experimente zeigen, daß ein quantitativer Austausch beider Protonen an C-3 problemlos erreicht werden kann. Wegen der beträchtlichen Differenzen der zwei k-Werte für den Austausch von H-3a und H-3e kann bei geschickter Versuchsführung bevorzugt das Proton in Axialposition ( H-3a ) durch Deuterium substituiert werden. Ein ausschließlich stereoselektiver Austausch nur dieses Protons, wie er kürzlich von Vliegthart et al.<sup>2</sup> berichtet wurde,

t = 55 h



t = 110 min



t = 30 min



t = 2 min

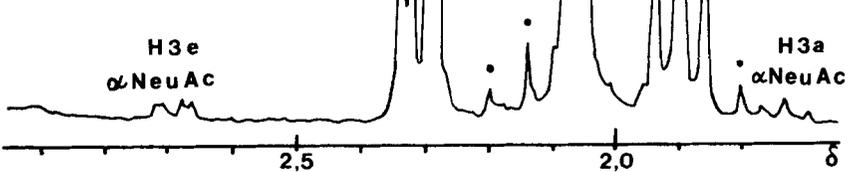


FIG. 2: 300 MHz Spektrenausschnitte von NeuAc in  $D_2O$ , pD=11,3, 20° C, aufgenommen nach 2, 30, 110 min. und 55 h; 28k, 600 Scans, gleiche Verstärkung für alle vier Spektren. ●: Rotationsseitenbänder und Verunreinigungen.

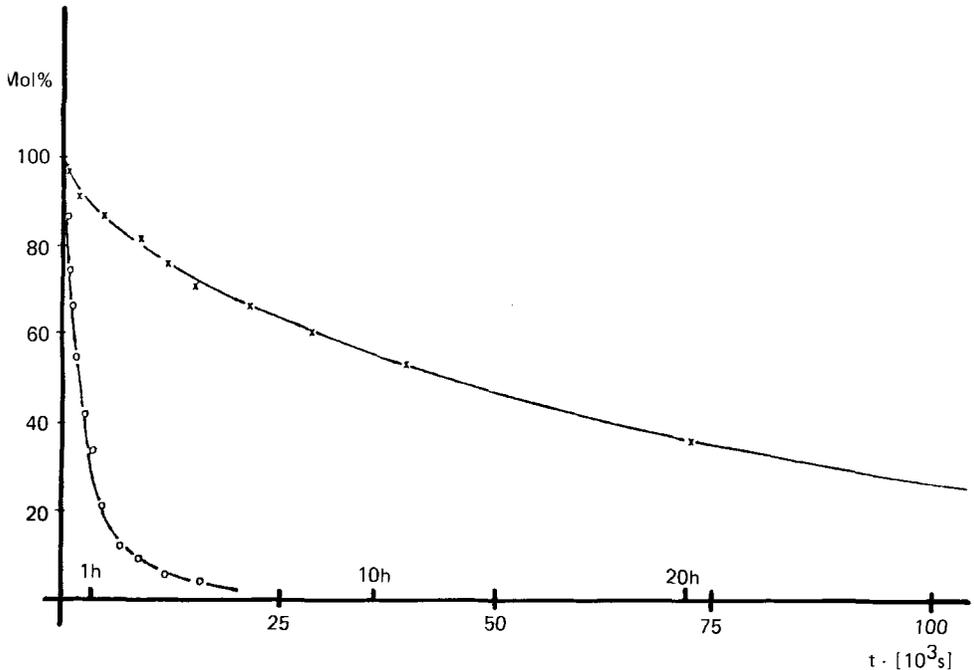


FIG. 3: Zeit-Umsatz-Kurve für den H-D-Austausch am C-Atom 3 der BNeuAc bei pD= 11,3 . o-o-o : Abnahme des H-3a-Signals; x-x-x : Abnahme des H-3e-Signals.

ist jedoch nicht möglich. Eine Überprüfung der Intensität des H-3e-Signals hätte leicht gezeigt, daß unter den in Lit. 2 angegebenen experimentellen Bedingungen auch schon ein Teil der H-3e-Protonen gegen Deuterium ausgetauscht war.

Den Spektren in Fig. 2 ist zu entnehmen, daß die gleichen Effekte auch an den Signalen von H-3e der  $\alpha$ NeuAc zu beobachten sind. Eine quantitative Auswertung führten wir nicht durch.

In gleicher Weise konnten wir, wie schon in Lit. 1 vorgeschlagen, den schwachen  $\beta$ -Strahler Tritium einführen, wobei die spezifische Aktivität der  $^3\text{H}$ -markierten NeuAc von der Aktivität des verwendeten tritiumhaltigen Wassers abhängt. In unserem Experiment erhielten wir eine spezifische Aktivität von  $3,95 \cdot 10^5$  Bq (=10,7  $\mu\text{Ci/mMol}$ ). Diese einfache Methode zur Markierung von NeuAc

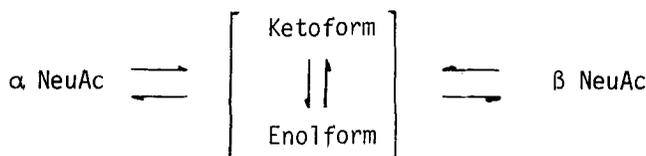


FIG. 4: Mechanismus (schematisiert) für die Mutarotation von NeuAc

mit Tritium wurde in der Zwischenzeit auch von anderen Autoren<sup>2</sup> ausgenützt, um markierte NeuAc als Ausgangsprodukt für die Synthese von tritiumhaltigen Glykokonjugaten zu erhalten.

Den Mechanismus für den H-D-Austausch an C-3 der NeuAc erklären wir wie folgt:<sup>3,4,5</sup>

In alkalischer Lösung unterliegt NeuAc einer raschen Mutarotation.<sup>6,7</sup> Dabei muß die offenkettige Ketoform durchlaufen werden, die im dynamischen Gleichgewicht mit der Enolform steht (s. Fig. 4). Bei der Umwandlung des Enols zurück in das Keton wird dann im Lösungsmittel D<sub>2</sub>O Deuterium eingeführt. Da die Geschwindigkeit der Tautomerisierung mit steigendem pD größer wird,<sup>7</sup> erhöht sich gleichermaßen die Austauschgeschwindigkeit. Außerdem sind die beiden Protonen an C-3 diastereotop, ihr Austausch kann folglich auch unterschiedlich schnell erfolgen.

Nach dem hier angegebenen Mechanismus wird auch verständlich, daß bei ketosidisch gebundener NeuAc kein H-D-Austausch mehr stattfinden kann.

Die experimentell für k(H-3a) gefundenen höheren Werte im Vergleich zu k(H-3e) (s. Tab. 1) werden verständlich, wenn man für die Keto-Enol-Tautomerie einen ähnlich stereoelektronisch begünstigten Übergangszustand annimmt, wie ihn Corey et al.<sup>8</sup> für die Deuterierung im Cyclohexanonssystem vorschlugen. Dort zeigten die Autoren, daß bevorzugt - wenn auch nicht ausschließlich - das zur Ketogruppe  $\alpha$ -ständige axiale Proton bei der Bildung des Enols oder Enolats abgespalten wird. Ganz entsprechend lagert sich ein

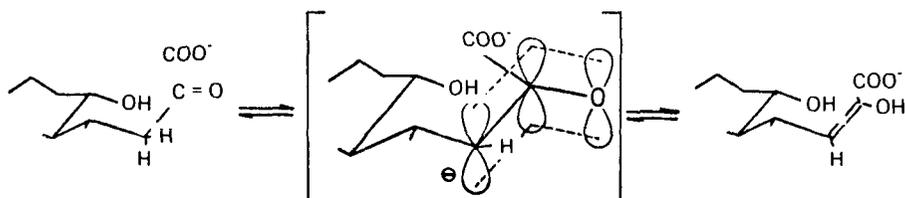


FIG. 5: Stereoelektronisch begünstigter Übergangszustand bei der Prototropie des axialen Protons an C-3 in der offenkettigen Form der NeuAc.

Proton oder Deuterium wieder bevorzugt aus axialer Richtung an. Für die NeuAc-Deuterierung können wir den Mechanismus übertragen. Auch hier ist der bevorzugte Übergangszustand für die Prototropie des axialen Protons auf eine besonders günstige Überlappung des p-Orbitals von C-3 und des  $\pi$ -Orbitals der Carbonylgruppe zurückzuführen (s. FIG. 5).

Weiteren Arbeiten ist vorbehalten zu klären, warum  $k(\text{H-3a})$  mit steigendem pD schneller ansteigt als  $k(\text{H-3e})$ .

### EXPERIMENTELLER TEIL

Für die Messungen verwendeten wir das Salz der NeuAc, das wir durch Neutralisieren der freien NeuAc (Kantoishi Pharmaceutical Co. LTD, Japan) mit NaOH in  $\text{H}_2\text{O}$  erhielten. Es empfiehlt sich auf dieser Stufe noch kein  $\text{D}_2\text{O}$  zu benutzen, um bei einem Über-titrieren einen vorzeitigen H-D-Austausch an C-3 zu vermeiden. Danach werden alle OH- und NH-Protonen durch mehrmaliges Gefrier-trocknen mit  $\text{D}_2\text{O}$  (99,75%, Fa. Merck, Darmstadt) gegen Deuterium ausgetauscht. 3-5 mg der so vorbereiteten NeuAc wurden bei  $20^\circ\text{C}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  und Glycin/NaOD-Puffer mit exakt eingestelltem pD-Wert gelöst. Nach Beendigung der bei  $20^\circ\text{C}$  durchgeführten Reaktion wurden die einzelnen Proben durch schwaches Ansäuern mit  $\text{D}_2\text{SO}_4$  auf pD  $\approx$  3 bis 5 abgestoppt.

Zur Messung der pD-Werte verwendeten wir Mikro-pH-Einstabmeßketten (Glaselektroden der Firmen Schott, Mainz und Ingold, Frankfurt). Der am pH-Meter abgelesene Wert wurde entsprechend:  $pD = \text{abgelesener Wert} + 0,4$  korrigiert.<sup>9</sup>

Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden an einem Spektrometer vom Typ WH 300 (Meßfrequenz 300 MHz) der Fa. Bruker, Karlsruhe, bei 22° C aufgenommen. Die Mengenverhältnisse bestimmten wir aus den Integralen der Signale von H-3a, H-3e und NCOCH<sub>3</sub>, wobei die Intensität des N-Acetyl-Signals als Standard 3 Protonen entspricht. Bei der Auswertung der N-Acetyl-Signale mußte die mit 8% im Mutarotationsgleichgewicht vorliegende Menge an αNeuAc berücksichtigt werden.<sup>8,9</sup>

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wurde eine Reaktion 1. Ordnung zugrundegelegt:  $A = A_0 \cdot e^{-kt}$ , wobei  $A_0$  und  $A$  die durch Integration der H-3a- bzw. H-3e-Signale bestimmten Konzentrationen zur Zeit  $t=0$  bzw.  $t$  bedeuten. Durch Auftragen von  $\ln(A/A_0)$  gegen  $t$  läßt sich aus der Steigung der Geraden die Geschwindigkeitskonstante  $k$  für den Austausch von H-3a und H-3e gegen Deuterium ermitteln.

Zur Darstellung der tritiierten NeuAc wurden 20 mg NeuAc in 1 ml tritiumhaltigem Wasser gelöst und mit festem NaOH ein pH-Wert von ungefähr 13 eingestellt. Nach 2 h wurde mit Essigsäure neutralisiert und über die Ionenaustauscher Amberlite IR 120 (H<sup>+</sup>) und Dowex 1 x 8 (HCOO<sup>-</sup>) gereinigt. Die NeuAc wurde mit 0,3 M HCOOH von der Dowexsäule eluiert und durch Gefriertrocknen rein erhalten. Ihre spezifische Aktivität bestimmten wir mit einem Beckmann LS-7000 Flüssigkeits-Szintillationszähler.

#### DANKSAGUNG

Wir danken den Herrn Dr.Szilagyí und Dr.Hercegh, Institut für Organische Chemie der Universität Debrecen, Ungarn, für Anregungen zur Erklärung des Austauschmechanismus. Herrn Prof.Dr.F.Nader, Org.-Chem. Institut der Universität Heidelberg, danken wir für

seine Hilfe bei den Untersuchungen zur Tritiierung der NeuAc. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für finanzielle Unterstützung.

### LITERATUR

1. H.Friebolin, H.Schmidt und M.Supp, Tetrahedron Lett., **22**, 5171 (1981); H.Schmidt, Diplomarbeit 1981, Universität Heidelberg und Teil der Dissertation.
2. L.Dorland, J.Haverkamp, R.Schauer, G.A.Veldink und J.F.G.Vliegthart, Biochem. Biophys. Res. Commun., **104**, 1114 (1982).
3. Vor <sup>5</sup>einigen Jahren beobachteten Szilágyi et al.<sup>4</sup> und Salo et al.<sup>5</sup> einen H-D-Austausch an C-2 von N-Acetyl-D-glucosamin und N-Acetyl-D-mannosamin bei der Epimerisierungsreaktion in alkalischer D<sub>2</sub>O-Lösung. Als Mechanismus gaben sie ein Enolat als Zwischenstufe an, das während der Keto-Enol-Tautomerie der Zucker in der offenkettigen Form gebildet wird. Einen entsprechenden Mechanismus schlagen wir für die Austauschreaktion bei der NeuAc vor.
4. L.Szilágyi, P.Herczegh und G.Bujtas, Z. Naturforsch. Teil B, **32**, 296 (1977).
5. W.L.Salo, M.Hamari und L.Hallcher, Carbohydr. Res., **50**, 287 (1976).
6. H.Friebolin, M.Supp, R.Brossmer, G.Keilich und D.Ziegler, Angew. Chem. **92**, 200 (1980), Int. Ed. **19**, 208 (1980).
7. H.Friebolin, P.Kunzelmann, M.Supp, R.Brossmer, G.Keilich und D. Ziegler, Tetrahedron Lett., **22**, 1383 (1981).
8. E.J.Corey und R.A.Sneen, J. Am. Chem. Soc., **78**, 6269 (1956).
9. P.K.Clasoe und F.A.Long, J. Phys. Chem., **64**, 188 (1960).