

## Über synthetische Ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure, 3. Mitt.:

Darstellung des Phenyl- $\alpha$ -ketosides der N-Acetyl-  
D-neuraminsäure und seines  $\beta$ -Anomeren

Von

**P. Meindl** und **H. Tuppy**

Aus dem chemischen Laboratorium der Arzneimittelforschung Ges. m. b. H. \*  
und dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 11. Oktober 1966)

Das Phenyl- $\alpha$ - und - $\beta$ -ketosid der N-Acetyl-D-neuraminsäure wurden durch Umsetzung von 2-Chlor-2-desoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure mit Phenol in Gegenwart von Silbercarbonat und nachfolgende Entfernung der O-Acetylgruppen dargestellt. Dem weniger stark linksdrehenden, durch Neuraminidase spaltbaren Phenylketosid wird die  $\alpha$ -glykosidische Konfiguration zugeschrieben. Beide Anomeren gaben gut kristallisierende Methylester und 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-Derivate.

The phenyl  $\alpha$ - and  $\beta$ -ketosides of N-acetyl-D-neuraminic acid have been synthesized by the reaction of 2-chloro-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminic acid with phenol in the presence of silver carbonate and subsequent removal of the O-acetyl groups. The ketoside which is less laevorotatory and is cleaved by neuraminidase has been assigned the  $\alpha$ -glycosidic configuration. Both anomers gave readily crystallizing methyl esters and 4,7,8,9-tetra-O-acetyl derivatives.

Über die Darstellung einer Reihe durch *Vibrio cholerae*-Neuraminidase spaltbarer  $\alpha$ -Ketoside der N-Acetyl-<sup>1, 2</sup> und der N-Glykolyl-D-neuraminsäure<sup>3</sup> wurde kürzlich berichtet. Als Aglycon enthielten sie aliphatische oder araliphatische Reste. Die enzymatische Hydrolyse der Ketoside<sup>4</sup>

\* A-1121 Wien, Laskegasse 5—11.

<sup>1</sup> P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **96**, 802 (1965).

<sup>2</sup> R. Kuhn, P. Lutz und D. L. MacDonald, Chem. Ber. **99**, 611 (1966).

<sup>3</sup> P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **97**, 654 (1966).

<sup>4</sup> P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **97**, 990 (1966).

wurde durch Bestimmung der freigesetzten Sialinsäuren mit der Thio-barbitursäure-Reaktion nach *Aminoff*<sup>5</sup> verfolgt.

In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Synthese des durch *V. cholerae*-Neuraminidase spaltbaren Phenyl- $\alpha$ -ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure und des anomeren enzymatisch nicht spaltbaren  $\beta$ -Ketosides, das als Nebenprodukt anfiel. Acetochlorneuraminsäure<sup>1</sup> wurde mit überschüssigem Phenol bei 40° in Gegenwart von Silbercarbonat zur Reaktion gebracht. Dünnschichtchromatographisch konnten wir nachweisen, daß die Umsetzung zu den anomeren Phenylketosiden der Tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure schon nach 2 Stunden im wesentlichen beendet war; wurde länger erwärmt, so nahm die Menge des Phenyl- $\beta$ -ketosides auf Kosten seines  $\alpha$ -Anomeren zu. Die Reinigung der acetylierten Phenylketoside erfolgte durch Adsorption an einem Dowex 1-X8 Ionenaustauscher in der Acetat-Form und nachfolgende Elution mittels 4*n*-Essigsäure. Die im Resorcin-Test<sup>6</sup> positiv reagierenden Eluate hinterließen, im Vakuum bei 40° eingedampft, einen teilweise kristallinen Rückstand, der mit wenig Wasser digeriert wurde. Die nicht wasserlöslichen Kristalle waren ein Anomerengemisch, dessen Auftrennung auf einfache Weise gelang. 2-Phenyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure war in heißem Wasser viel schwerer löslich als sein  $\beta$ -Anomeres. Aus ihren O-Acetyl-Derivaten waren das Phenyl- $\alpha$ - und - $\beta$ -ketosid der N-Acetyl-D-neuraminsäure durch milde alkalische Verseifung zugänglich. Nur das  $\alpha$ -Anomere konnte kristallisiert erhalten werden; beide Ketoside gaben jedoch mit Diazomethan gut kristallisierende Methylester.

Der Thiobarbitursäure-Reaktion nach *Aminoff*<sup>5</sup> unterworfen, welche in der Regel die freie, nicht jedoch die ketosidisch gebundene N-Acetyl-D-neuraminsäure erfaßt, gab die 2-Phenyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure eine intensive Färbung; sie war etwa halb so stark wie die unter gleichen Bedingungen mit einer äquivalenten Menge freier N-Acetyl-D-neuraminsäure entstehende Färbung. Dieser überraschende Befund erklärt sich durch die Geschwindigkeit der sauren Hydrolyse der 2-Phenyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure. Es zeigte sich nämlich, daß das Ketosid bei pH 1 und 37°, also unter Bedingungen, wie sie etwa bei der Inkubation eines Neuraminsäurederivates mit Perjodsäure/Schwefelsäure (pH 1,2)<sup>5</sup> in der ersten Phase der Thiobarbitursäure-Reaktion<sup>5</sup> vorliegen, innerhalb von 30 Min. zur Hälfte in N-Acetyl-D-neuraminsäure und Phenol gespalten wird (Abb. 1).

In Tab. 1 sind die Schmelzpunkte, optischen Drehwerte und chromatographischen Daten der anomeren Phenylketoside, ihrer Methylester und O-Acetyl-Derivate zusammengestellt. Sowohl bei den Methylestern als auch bei den O-Acetylderivaten unterscheiden sich die Schmelzpunkte

<sup>5</sup> *D. Aminoff*, Biochem. J. **81**, 384 (1961).

<sup>6</sup> *L. Svennerholm*, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **24**, 604 (1957).

Tabelle 1. Die anomeren 2-Phenyl-N-acetyl-D-neuraminsäuren und ihre Derivate

	Summenformel	%C	%H	%N	Schmp., °C	Optische Drehung		$R_{NA}^h$	$R_{NA}^b$	Ansb., %	
						$[\alpha]_D^{24}$	c				
2-Phenyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure	$C_{17}H_{23}O_9N$	Ber. 53,00	6,02	3,63							
	$C_{17}H_{23}O_9N \cdot \frac{1}{2} H_2O$	Ber. 51,78	6,14	3,55	132—135	—13,5°	0,55	$Me_2SO$	2,50	2,50	43 <sup>c</sup>
		Gef. 51,77	6,12	3,54							
2-Phenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-neuraminsäure	$C_{17}H_{23}O_9N$	Ber. 53,00	6,02	3,63	nicht krist.	—69,1°	0,49	$Me_2SO$	1,78	2,00	49 <sup>c</sup>
2-Phenyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure-methylester	$C_{18}H_{25}O_9N$	Ber. 54,14	6,31	3,51							
	$C_{18}H_{25}O_9N \cdot \frac{1}{2} H_2O$	Ber. 52,95	6,42	3,43	95—100	—18,2°	0,55	$Me_2SO$	3,73	3,56	71 <sup>d</sup>
		Gef. 52,96	6,32	3,51							
2-Phenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-neuraminsäure-methylester	$C_{18}H_{25}O_9N$	Ber. 54,14	6,31	3,51	189—194	69,3°	0,55	$Me_2SO$	3,57	3,44	49 <sup>d</sup>
		Gef. 53,96	6,54	3,30							
2-Phenyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure	$C_{25}H_{31}O_{13}N$	Ber. 54,26	5,65	2,53	182—185	0,0°	0,21	$AcOH$		3,25	18 <sup>e</sup>
		Gef. 54,20	5,60	2,57	Zers.						
2-Phenyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\beta$ -D-neuraminsäure	$C_{25}H_{31}O_{13}N$	Ber. 54,26	5,65	2,53							
	$C_{25}H_{31}O_{13}N \cdot \frac{1}{2} H_2O$	Ber. 52,55	5,82	2,45	126—136	59,4°	0,64	$AcOH$		3,06	6 <sup>c</sup>
		Gef. 52,35	5,73	2,58							

<sup>a</sup> Papierchromatographie mit Äthylacetat-Eisessig-Wasser (3:1:3)

<sup>b</sup> Dünnschichtchromatographie mit *n*-Butanol-*n*-Propanol-0,1*N*-HCl (1:2:1)

<sup>c</sup> Ausbeute bezogen auf das Tetra-O-acetyl-Derivat, durch dessen alkalische Verseifung das Ketosid erhalten wurde

<sup>d</sup> Ausbeute bezogen auf das Ketosid, durch dessen Umsetzung mit  $CH_3N_2$  der Methylester dargestellt wurde

<sup>e</sup> Ausbeute bezogen auf Acetochlorneuraminsäure, durch deren Umsetzung mit Phenol in Gegenwart von  $Ag_2CO_3$  das tetra-O-acetylierte Ketosid erhalten wurde

der Anomeren signifikant. Das optische Drehvermögen der Ketoside entsprach insofern den Erwartungen, als das durch *V. cholerae*-Neuraminidase in N-Acetyl-D-neuraminsäure und Phenol spaltbare Phenylketosid stärker nach rechts drehte als sein enzymatisch nicht spaltbares Anomeres. Unter der Voraussetzung, daß die Regel von Hudson<sup>7</sup> auch für Glykoside

der N-Acetyl-D-neuraminsäure gültig ist, muß man das durch Neuraminidase spaltbare und eine geringere Lävorotation aufweisende Phenylketosid als das  $\alpha$ -

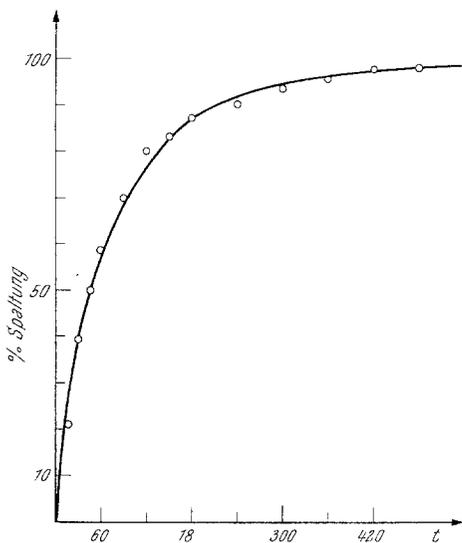


Abb. 1.

Abb. 1. Hydrolytische Spaltung des Phenyl- $\alpha$ -ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure bei 37° in wässriger Lösung (—●—●—●—●—) und in 0,1n-HCl (—○—○—○—○—). t: Inkubationsdauer in Min.

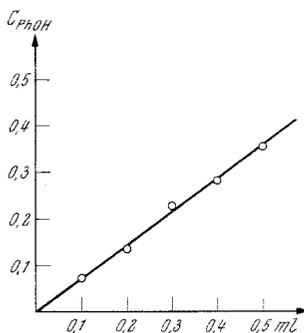


Abb. 2.

Abb. 2. Spaltung des Phenyl- $\alpha$ -ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure durch *V. cholerae*-Neuraminidase als Funktion der Enzymmenge. 1 ml Inkubationslösung enthielt 1  $\mu$ Mol Phenyl- $\alpha$ -ketosid und eine variable Menge (0,10 bis 0,50 ml) Enzymlösung. Es wurde 30 Min. bei pH 6,4 und 37° inkubiert.  $c_{PHOH}$ :  $\mu$ Mol/ml enzymatisch freigesetztes Phenol.

sein Anomeres als das  $\beta$ -Ketosid bezeichnen. In Übereinstimmung mit der nach Hudson<sup>7</sup> getroffenen Zuordnung fanden wir auch für die von uns untersuchten Derivate des Phenyl- $\alpha$ -ketosides — im Gegensatz zu den früher geprüften O-Acetylderivaten des *n*-Amyl- $\alpha$ -ketosides<sup>8</sup> — durchwegs positivere spezifische Drehwerte als für die Verbindungen, die sich vom  $\beta$ -Ketosid ableiten. Bei der Papier- und Dünnschichtchromatographie zeigten die  $\alpha$ -Ketoside stets größere  $R_f$ -Werte als die  $\beta$ -Ketoside.

Wie schon erwähnt, ist das Phenyl- $\alpha$ -ketosid der N-Acetyl-D-neuraminsäure durch *Vibrio cholerae*-Neuraminidase und Influenza-A-Virus, Stamm *Melbourne*, in N-Acetyl-D-neuraminsäure und Phenol spaltbar.

<sup>7</sup> C. S. Hudson, J. Amer. Chem. Soc. **31**, 66 (1909); Adv. Carbohydr. Chem. **3**, 15 (1948).

<sup>8</sup> P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **96**, 816 (1965).

Sein  $\beta$ -Anomeres sowie die Methylester des Phenyl- $\alpha$ - und Phenyl- $\beta$ -ketosides sind hingegen nicht spaltbar. Die enzymatische Hydrolyse wurde durch Bestimmung des freigesetzten Phenols verfolgt. Bei  $1 \cdot 10^{-3} m$  Substratkonzentration war die Spaltungsgeschwindigkeit in weiten Grenzen der zugesetzten Enzymmenge proportional (Abb. 2). Das Phenyl- $\alpha$ -ketosid wurde, wie aus Abb. 3

ersichtlich ist, durch *Vibrio cholerae*-Neuraminidase vollständig gespalten. Die Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration ge-

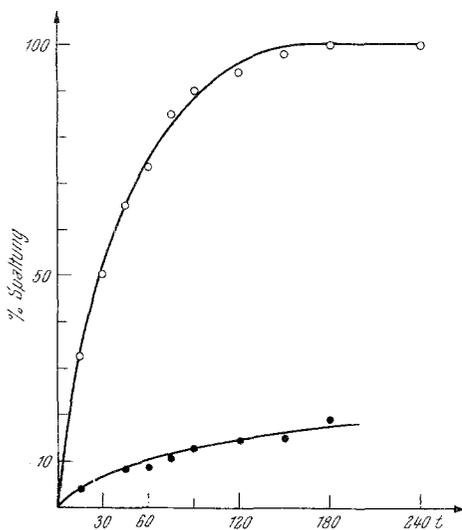


Abb. 3.

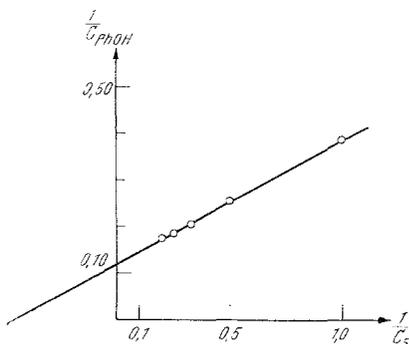


Abb. 4.

Abb. 3. Spaltung des Phenyl- $\alpha$ -ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure durch *V. cholerae*-Neuraminidase als Funktion der Inkubationsdauer. 1 ml Inkubationslösung enthielt 1  $\mu$ Mol Phenyl- $\alpha$ -ketosid und 0,30 ml Enzymlösung. Es wurde bei pH 6,4 und 37° inkubiert.  $t$ : Inkubationsdauer in Min.

Abb. 4. Spaltung des Phenyl- $\alpha$ -ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure durch *V. cholerae*-Neuraminidase als Funktion der Substratkonzentration. 1 ml Inkubationslösung enthielt 0,30 ml Enzymlösung. Es wurde 30 Min. bei pH 6,4 und 37° inkubiert.  $c_s$ :  $\mu$ Mol/ml Phenyl- $\alpha$ -ketosid;  $c_{phOH}$ :  $\mu$ Mol/ml enzymatisch freigesetztes Phenol. [In der Ordinatenbeschriftung lese man (statt 0,10 bzw. 0,50) 1,0 bzw. 5,0].

horchte der *Michaelis—Mentenschen* Kinetik (Abb. 4). Wurden nach *Lineweaver* und *Burk*<sup>9</sup> die Reziprokwerte der Substratkonzentration gegen die Reziprokwerte der Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen, so erhielt man erwartungsgemäß eine Gerade. Die *Michaelis*-Konstante beträgt  $2 \cdot 10^{-3} m$ .

Das Phenyl- $\alpha$ -ketosid der N-Acetyl-D-neuraminsäure ist für die Bestimmung der Aktivität von Neuraminidase-Präparaten bestens geeignet. Die Verwendung synthetischer Sialinsäure-Arylketoside sollte auch die Möglichkeit eröffnen, Neuraminidaseaktivität histochemisch darzustellen.

<sup>9</sup> H. *Lineweaver* und D. *Burk*, J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934).

Herrn Dr. G. Bodo, Arzneimittelforschung, Wien, sind wir für die Vermehrung und Reinigung von Influenza-Virus, Stamm *Melbourne*, aufrecht verbunden. Frau A. Edelmann und Herrn H. Mahr danken wir für ausgezeichnete technische Mitarbeit.

### Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Heitztischmikroskop nach *Kofler* bestimmt.

Die Elementaranalysen wurden von Herrn Dr. J. Zak, Univ. Wien, ausgeführt; die in dieser Arbeit angegebenen Werte sind jeweils das Mittel aus den Ergebnissen einer Doppelbestimmung.

Die optischen Drehungen wurden mit einem lichtelektrischen *Perkin-Elmer* Polarimeter in 1-dm-Polarimeterrohren gemessen.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel G nach *Stahl* und das Laufmittel *n*-Butanol—*n*-Propanol—0,1 *n*-HCl (1 : 2 : 1, v/v/v), für die Papierchromatographie *Schleicher & Schüll*-Papier 2043 a und als Laufmittel Äthylacetat—Eisessig—Wasser (3 : 1 : 3, v/v/v) verwendet. Um die Neuraminsäurederivate sichtbar zu machen, wurden die Dünnschichtchromatogramme mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>—Wasser (1 : 1, v/v) besprüht und erhitzt<sup>10</sup>, die Papierchromatogramme mit Natriummetaperjodat und Benzidin<sup>11</sup> behandelt. Als *R<sub>NA</sub>* bezeichnen wir die auf den *R<sub>F</sub>*-Wert der N-Acetyl-D-neuraminsäure (= 1,00) bezogenen „relativen“ *R<sub>F</sub>*-Werte der Neuraminsäurederivate.

#### *Darstellung der anomeren 2-Phenyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäuren*

5,8 g Acetochlorneuraminsäure<sup>1</sup> wurden mit 19 g geschmolzenem Phenol (etwa 45—50°) und 4 g Silbercarbonat versetzt. Das Gemisch blieb 2 Stdn. bei 40—45°. In den ersten 10 Min. der Reaktion beobachteten wir eine starke Gasentwicklung. Nach beendeter Reaktion wurde in 50 ml Aceton aufgenommen, durch Hyflo-Supercel filtriert, die nunmehr klare, aber dunkelrot gefärbte Lösung mit etwa 30 ml Wasser versetzt und auf Dowex 1-X8 (350 ml Ionenaustauscher, Acetat-Form) gebracht. Man ließ die Lösung langsam einsickern und wusch sodann das Austauscherharz mit 3 l Aceton : Wasser (2 : 1, v/v) nach. Die O-acetylierten Phenylketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure wurden mit 4 *n*-Essigsäure in Aceton : Wasser (1 : 1, v/v) eluiert. Die im Resorcin-Test<sup>6</sup> positiv reagierenden Eluat-Fractionen wurden vereinigt und hinterließen nach dem Eindampfen im Vak. bei 40° einen teilweise kristallinen Rückstand, der mit wenig Wasser verrieben wurde. Das Kristallisat wurde isoliert, in 40 ml Wasser und 10 ml Aceton wieder gelöst und etwas Aktivkohle zugesetzt. Nachdem filtriert und die Lösung auf ein Volumen von etwa 30 ml eingeeengt worden war, konnten 1,6 g eines farblosen Kristallisates erhalten werden, das aus einem Gemisch der beiden anomeren 2-Phenyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäuren (Dünnschichtchromatogramm: *R<sub>F</sub>* = 0,49 und 0,45 für das α- bzw. β-Anomere) bestand. Das Substanzgemisch wurde 4mal mit je 30 ml heißem Wasser (80—90°) digeriert. Nach dieser Behandlung

<sup>10</sup> K. Randerath, Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie G. m. b. H.

<sup>11</sup> Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, E. Merck A. G., Darmstadt, 5 (Reagens Nr. 22).

blieben 980 mg reine 2-Phenyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure zurück (vgl. Tab. 1). Die vereinigten wäßrigen Auszüge (zusammen etwa 120 ml) wurden im Vak. bei 40° eingedampft. Wir erhielten ein Kristallisat (441 mg), das im Dünnschichtchromatogramm als Hauptmenge 2-Phenyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\beta$ -D-neuraminsäure und nur wenig vom  $\alpha$ -Anomeren aufzeigte. Das Gemisch wurde in 55 ml Aceton : Wasser (1 : 1, v/v) gelöst. Nach dem Einengen am siedenden Wasserbad auf etwa 25 ml wurde die Lösung bei Zimmertemperatur stengelassen. Es kristallisierte zuerst das schwerer lösliche Tetra-O-acetyl-phenyl- $\alpha$ -ketosid, das mit  $\beta$ -Anomerem vermischt war. Sodann konnten wir aus der Mutterlauge 300 mg reine 2-Phenyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\beta$ -D-neuraminsäure isolieren (vgl. Tab. 1).

#### 2-Phenyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure

980 mg 2-Phenyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure wurden in 20 ml Wasser aufgenommen und nach Zugabe von 9,8 ml 1*n*-NaOH 15 min. bei 40° verseift. Die Na<sup>+</sup>-Ionen wurden mit Amberlite IR 120 (H<sup>+</sup>-Form) bei 0° entfernt und die nun sauer reagierende Lösung lyophilisiert. Das  $\alpha$ -Ketosid wurde in Wasser (0,8 ml) und Methanol (10 ml) gelöst. Nach der Zugabe von Äther (140 ml) wurde eine ölige Fällung (336 mg) abgetrennt und mit Petroläther (P.Ä., 130 ml) das  $\alpha$ -Ketosid langsam zur Kristallisation gebracht. Ausb. 292 mg (vgl. Tab. 1).

In einem anderen Versuch wurde 2-Phenyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure nach Zemplén<sup>12</sup> verseift. Das Phenyl- $\alpha$ -ketosid fiel in 25% Ausb. an.

#### 2-Phenyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure-methylester

50 mg 2-Phenyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure wurden in 1 ml absol. Methanol gelöst und mit einer äther. Lösung von Diazomethan (4 ml) versetzt. Von einer flockigen Fällung wurde abfiltriert und zu der Lösung Äther (30 ml) und P.Ä. (30 ml) bis zur bleibenden Trübung hinzugegeben. Nach einigen Stdn. bei 4° war der Ester vollkommen auskristallisiert. Er wurde für die Elementaranalyse aus Methanol und Äther umgelöst. Die Ausb. betrug 37 mg (vgl. Tab. 1).

#### 2-Phenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-neuraminsäure

Aus 2-Phenyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\beta$ -D-neuraminsäure wurde das Phenyl- $\beta$ -ketosid der N-Acetyl-D-neuraminsäure nach der für das Phenyl- $\alpha$ -ketosid gegebenen Vorschrift erhalten (vgl. Tab. 1).

#### 2-Phenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-neuraminsäure-methylester

Auf die gleiche Weise wie den Methylester des Phenyl- $\alpha$ -ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure erhielten wir aus 274 mg 2-Phenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-neuraminsäure mit CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> den entsprechenden Methylester (158 mg), der für die Analyse aus Methanol (4 ml) und Äther (37 ml) umkristallisiert wurde. Ausb. 140 mg (vgl. Tab. 1).

<sup>12</sup> G. Zemplén und A. Kunz, Ber. dt. chem. Ges. **56**, 1705 (1923).

*Saure Hydrolyse des Phenyl- $\alpha$ -ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure*

Je 10,0 ml einer  $5,02 \cdot 10^{-4}m$ -Lösung von 2-Phenyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure in Wasser und in 0,1*n*-HCl (pH = 1) wurden bei 37° inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben (0,50 ml) entnommen und für die Bestimmung des freigesetzten Phenols verwendet.

Jede Probe wurde mit 0,50 ml Wasser und nacheinander mit 3,5 ml kalt gesätt. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung, 5,0 ml Wasser und unter Schütteln mit 1,0 ml *Folin—Ciocalteu*-Reagens<sup>13</sup> versetzt. Die Kölbchen ließ man sodann 25 Min. bei Zimmertemp. stehen. Die Extinktion der entstandenen Färbungen wurde mit einem *Zeiss*-Spektralphotometer PMQ II bei 750 m $\mu$  gegen einen Reagens-Blindwert gemessen. Aus einer mit p. a. Phenol erstellten Eichkurve ließ sich die hydrolytisch freigesetzte Menge Phenol ermitteln.

*Versuche mit Neuraminidase*

Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* (Behringwerke A. G., Marburg/Lahn) war in einem 0,05*m*-Acetatpuffer (pH 5,5), der 9 mg/ml NaCl und 1 mg/ml CaCl<sub>2</sub> enthielt, gelöst und besaß laut Angabe der Erzeugerfirma eine Aktivität von 500 Einheiten/ml. 1 ml dieser Lösung wurde mit 4 ml eines 0,1*m*-Maleinsäure—NaOH-Puffers<sup>14</sup>, pH 6,4, der 0,002*m* CaCl<sub>2</sub> enthielt, auf 5 ml gebracht. 0,30 ml der auf diese Weise erhaltenen Enzymlösung setzten aus 1 ml  $10^{-3}m$ -N-Acetylneuraminyllactose<sup>4</sup>,<sup>15</sup> in 1 Stde. bei pH 6,4 und 37° 0,152  $\mu$ Mole N-Acetyl-D-neuraminsäure in Freiheit.

Influenza-A-Virus, Stamm *Melbourne*, stammte vom World Influenza Center, London. Die in unsere Versuche eingesetzten Virus-Präparate<sup>4</sup> enthielten 2<sup>12</sup> hämagglutinierende Einheiten/ml.

Die Spaltungsversuche mit *V. cholerae*-Enzym wurden bei pH 6,4 in einem 0,1*m*-Maleinsäure—NaOH-Puffer, der 0,002*m* CaCl<sub>2</sub> enthielt, mit Influenza-A-Virus, Stamm *Melbourne*, hingegen bei pH 6,5 in einem 0,067*m*-Phosphatpuffer ausgeführt. Die Inkubationstemp. betrug immer 37°. Wurde länger als 3 Stdn. inkubiert, so enthielt 1 ml der Inkubationslösung neben dem Substrat und dem Enzym (bzw. Virus) noch 50 Einheiten Penicillin. Jeder Versuch wurde als Doppelbestimmung ausgeführt und von einem gleich behandelten Kontrollansatz, der kein Enzym enthielt, begleitet. Nach beendeter Inkubation wurden die Spaltungsansätze (1,0 ml) in kochendes Wasser gebracht, dort 3 Min. belassen und nach dem Abkühlen mit 1,0 ml Puffer versetzt. War die Lösung trüb, so wurde 5 Min. bei 4000—5000 Umdr./min. zentrifugiert. Aus der Lösung bzw. aus dem klaren Überstand nach dem Zentrifugieren wurde sodann 1 ml entnommen und darin das enzymatisch aus dem Ketosid freigesetzte Phenol bestimmt (s. o.). Eine Kontrolle, die Enzym bzw. Virus allein enthielt, gab auf Zugabe von *Folin—Ciocalteu*-Reagens<sup>13</sup> keine Färbung.

<sup>13</sup> O. *Folin* und V. *Ciocalteu*, J. Biol. Chem. **73**, 627 (1927); „Methods in Enzymology“ (Hrsg.: S. P. Colowick und N. O. Kaplan) **3**, 448, Academic Press 1957.

<sup>14</sup> „Methods in Enzymology“ (Hrsg.: S. P. Colowick und N. O. Kaplan) **1**, 142, Academic Press 1955.

<sup>15</sup> M. *Schneir*, R. J. *Winzler* und M. E. *Rafelson*, Biochem. Prepar. **9**, 1 (1962).