

¹H-NMR-UNTERSUCHUNGEN AN SIALINSÄUREN

MARKIERUNG VON N-ACETYL-D-NEURAMINSÄURE MIT DEUTERIUM⁺

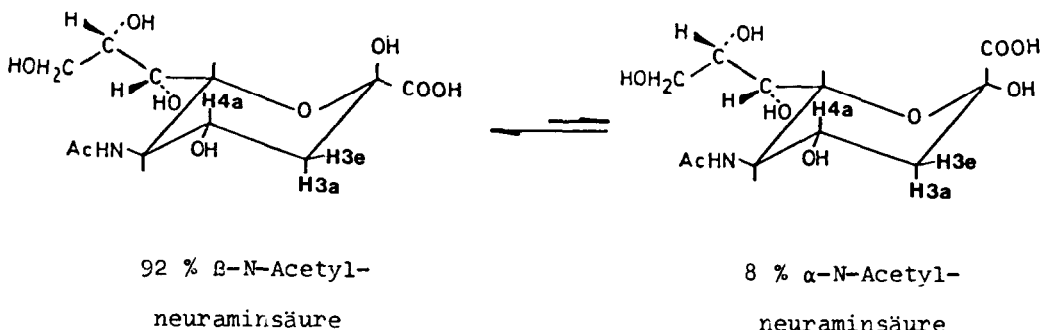
Horst Friebolin[§], Hermann Schmidt und Martin Supp^{*}

Organisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg,
Im Neuenheimer Feld 270, D-6900 Heidelberg

*Höhenbergstraße 9, D-8132 Tutzing/Obb.

Abstract: An efficient method for the deuteration of N-acetyl-D-neuraminic acid (NeuAc) at C-3 is described. In alkaline D₂O solution both protons of NeuAc (H_{3a} and H_{3e}) will be substituted by deuterium, whereby the substitution effect was found to be faster for H_{3a} than for H_{3e}. The rate of this exchange depends strongly on the pD value: the rate increases with increasing pD value. In acidic solution no effect could be observed. The process of H-D-exchange is reversible.

Einführung. Mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie konnten wir zeigen, daß die Mutarotationsgeschwindigkeit der N-Acetyl-D-neuraminsäure (NeuAc) eine ausgeprägte Abhängigkeit vom pH- bzw. pD-Wert aufweist [1,2]. Im Rahmen dieser



Untersuchungen, bei welchen wir aus meßtechnischen Gründen stets D₂O als Lösungsmittel verwendeten, stellten wir fest, daß in alkalischer Lösung die Signale von H_{3a} und H_{3e} verschwanden, und zwar umso schneller, je höher der pD-Wert war. Die Resonanzen der anderen Protonen der NeuAc blieben dabei

⁺ III. Mitteilung; I. und II. Mitteilung s. [1,2].

[§] Author to whom correspondence should be addressed.

nahezu unbeeinflusst, wenn man von kleinen Verschiebungsänderungen und einer Vereinfachung des für H_{4a} registrierten Multipletts absieht [3]. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Ursache dieses Effektes.

Substanzen und Methoden. Die Isolierung der NeuAc aus Meconium erfolgte am Institut für Biochemie II (Med. Fak.) der Universität Heidelberg; es wurde hierfür die Vorschrift von F. Zilliken und P.J.O'Brien [4] modifiziert. Alle austauschbaren OH- und NH-Protonen wurden durch mehrmaliges Auflösen in D_2O (99,75% D, Fa. Merck, Darmstadt) und Gefriertrocknen durch Deuterium ersetzt.

Zur Messung der pD-Werte verwendeten wir Mikro-pH-Einstabmeßketten (Glas-elektroden) der Firmen Schott, Mainz, bzw. Ingold, Frankfurt. Den am pH-Meter abgelesenen Wert korrigierten wir entsprechend den Angaben in [5] :

pD = abgelesener Wert + 0,4.

Die 1H -NMR-Spektren wurden an einem Spektrometer vom Typ WH 300 (Meßfrequenz 300 MHz) der Fa. Bruker, Karlsruhe, bei $22^\circ C$ in D_2O aufgenommen. Jede Einzelmessung dauerte durchschnittlich 5-10 Minuten bei 400 bis 800 Pulsen und 8k Datenpunkten. Als Bezugspunkt diente uns das $NCOCH_3$ -Signal bei $\delta = 2.04$ (gemessen gegen Trimethylsilyl-Na-propionat- d_4). Die in Abbildung 1b und 1c angegebenen Zeiten stellen Mittelwerte über die für die Aufnahme erforderlichen Meßzeiten dar.

Ergebnisse und Diskussion. Die für diese Untersuchungen wichtigen Signale der NeuAc, H_{3a} und H_{3e} , liegen im Bereich von $\delta = 1.5$ bis 3. Den entsprechenden Ausschnitt des NMR-Spektrums, aufgenommen bei pD 2.2, zeigt Abb. 1a. Entsprechende Teilspektren, aufgenommen bei pD 12.4, sind in Abb. 1b und 1c dargestellt. Die Messungen erfolgten 10 Minuten (1b), sowie ca. 2 Stunden (1c) nach Einstellen des pD-Wertes. In Versuchen bei $pD < 12.4$ läuft der beobachtete Prozeß langsamer ab, in solchen bei $pD > 12.4$ dagegen schneller. In saurer Lösung ($pD < 7$) tritt keine Veränderung im Spektrum auf. Der Effekt ist somit stark pD-abhängig. Beide Multipletts für H_{3a} und H_{3e} tauchen jedoch im Spektrum wieder auf, wenn die alkalische D_2O -Lösung der NeuAc gefriergetrocknet, der Rückstand in H_2O gelöst und dann gemessen wird. Das Spektrum dieser Substanz entspricht völlig dem der NeuAc (Abb. 1a).

Die Experimente lassen sich wie folgt deuten: Im alkalischen Bereich werden im Lösungsmittel D_2O die beiden Protonen H_{3a} und H_{3e} durch Deuterium ersetzt, wobei der Austausch des axialständigen Protons schneller erfolgt als der des äquatorialständigen. Dieser H-D-Austausch ist reversibel. Nach den vorliegenden Befunden ist eine Diskussion über den Mechanismus dieses H-D-Austausches verfrüht. Ob bzw. wie er mit der in alkalischer Lösung sehr rasch ablaufenden Mutarotation der NeuAc zusammenhängt, ist noch ungeklärt, zumal die Mutarotation auch in saurer Lösung schnell erfolgt, jedoch dort der H-D-Austausch nicht stattfindet.

Unsere Beobachtungen sind für alle NMR-Experimente wichtig, bei denen die

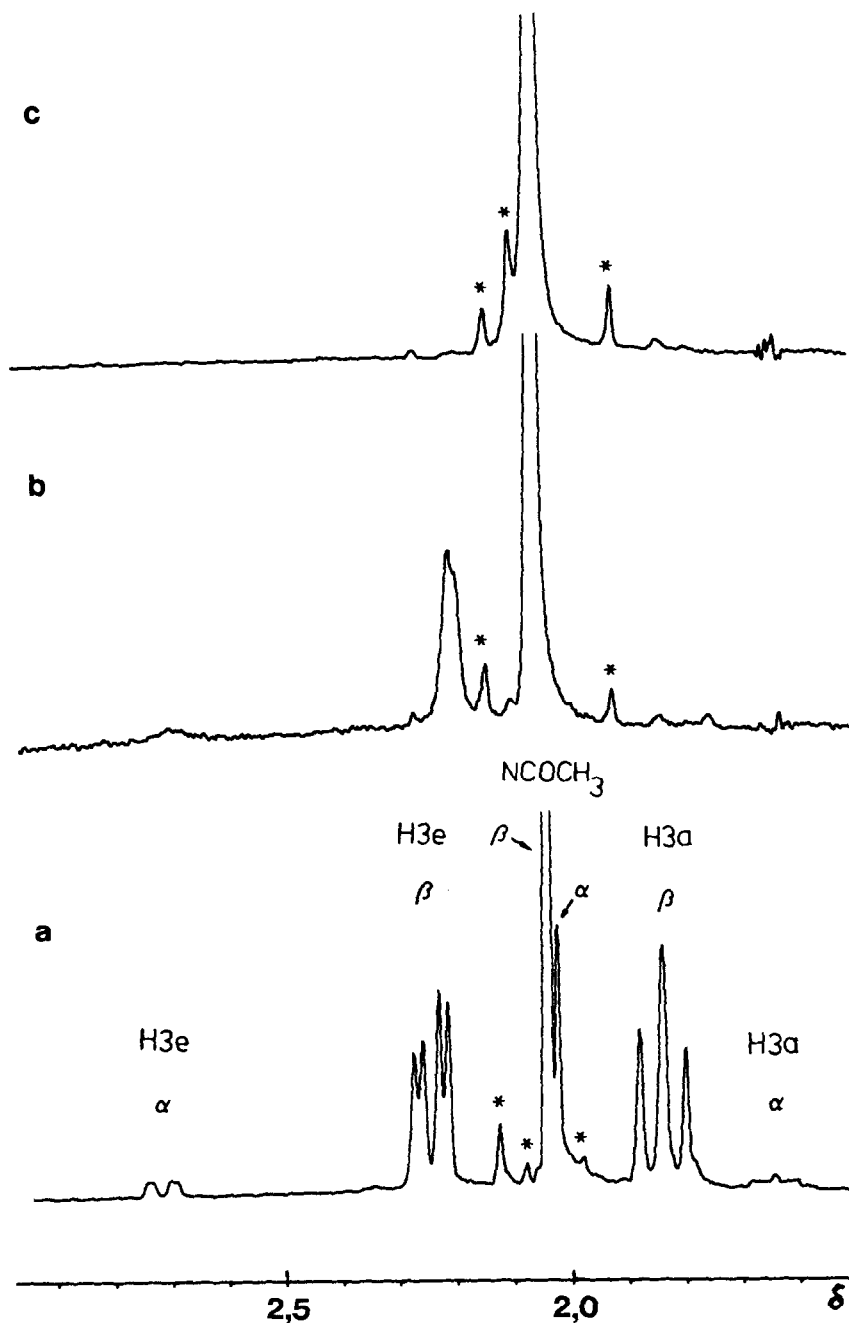


Abb.1 Ausschnitte aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von NeuAc in D_2O bei 22°C , Meßfrequenz 300 MHz ; innerer Standard: Trimethylsilyl-Na-propionat- d_4 ($\delta = 0$). a: pD 2.2 (800 Pulse, 8k Datenpunkte); b: pD 12.4 (400 Pulse, 8k), aufgenommen ungefähr 10 Minuten nach Einstellung des pD-Wertes mit NaOD. c: pD 12.4 (2932 Pulse, 8k), aufgenommen ungefähr nach 2 Stunden (Endspektrum). α : αNeuAc ; β : βNeuAc . Die mit einem Stern (*) bezeichneten Signale stammen von Rotationsseitenbändern und Verunreinigungen.

NeuAc in D_2O neutralisiert wird. Beim Neutralisieren darf die Lösung nie alkalisch werden, da sofort der H-D-Austausch einsetzt und zwar bevorzugt der des Protons in der Axialposition an C-3 (H_{3a}).

Bei Untersuchungen über den Einfluß von Ca^{2+} -Ionen auf N-Glycolyl-D-neuraminsäure in neutraler D_2O -Lösung stellten JAQUES et al [6] in den Spektren unterschiedliche Intensitäten der H_{3a} - und H_{3e} -Signale fest. Diesen Befund führten die Autoren auf Sättigungseffekte beim NMR-Experiment zurück. Wir vermuten jedoch, daß auch bei diesem Versuch eine partielle Substitution von H_{3a} durch D erfolgte. MELTON et al. [7] zeigen in ihrer Arbeit über die spektroskopische Charakterisierung von Kohlenhydraten der Zelloberfläche zum Vergleich ein 300 MHz NMR-Spektrum der NeuAc, das in D_2O bei pH 7 aufgenommen worden war. Auch diesem Spektrum entnehmen wir, daß ein Teil der H_{3a} -Protonen durch D ersetzt ist.

Der H-D-Austausch wurde unserer Ansicht nach bisher nur deswegen nicht gefunden weil bei der in Axialposition deuterierten NeuAc durch die Isotopenverschiebung das H_{3e} -Signal genau mit dem rechten Dublett des H_{3e} -Signals der nicht-deuterierten NeuAc zusammenfällt.

Ausblick. In gleicher Weise wie H durch D ersetzt werden kann, sollte mit tritiumhaltigem Wasser der schwache β -Strahler Tritium, 3H , in NeuAc einzuführen sein. Dieses Verfahren wäre wesentlich einfacher und schneller als die chemischen Synthesen, nach denen bisher markierte Sialinsäuren hergestellt wurden [8,9]. Somit stünden für biochemische Untersuchungen deuterium- und tritiummarkierte Neuraminsäuren zur Verfügung. Untersuchungen zur Darstellung der tritiierten NeuAc, solche zur Bestimmung der kinetischen Daten des Austausches und zur Klärung des Mechanismus sind im Gange.

Danksagung. Wir danken Herrn Professor Dr. Dr. R. Brossmer für die Überlassung der Neuraminsäure und Frau Dr. G. Keilich und Herrn Dr. D. Ziegler für viele wertvolle Diskussionen. Dem "Fonds der Chemischen Industrie" sei für die finanzielle Unterstützung gedankt.

Literatur.

- [1] H. Friebolin, M. Supp, R. Brossmer, G. Keilich, D. Ziegler, *Angew. Chem.* **92**, 200 (1980)
- [2] H. Friebolin, P. Kunzelmann, M. Supp, R. Brossmer, G. Keilich, D. Ziegler, *Tetrahedron Lett.* **22**, 1383 (1981)
- [3] H. Schmidt, Diplomarbeit 1981, Universität Heidelberg
- [4] F. Zilliken, P. J. O'Brien, *Biochem. Präparat.* **7**, 1 (1960)
- [5] P. K. Glasoe, F. A. Long, *J. Phys. Chem.* **64**, 188 (1960)
- [6] L. W. Jaques, B. F. Riesco, W. Weltner jr., *Carbohydr. Res.* **83**, 21 (1980)
- [7] L. D. Melton, E. R. Morris, D. A. Rees, D. Thom, S. M. Bociek, *Carbohydr. Res.* **81**, 295 (1980)
- [8] R. Schauer, H.-P. Buscher, *Biochim. Biophys. Acta* **338**, 369 (1974)
- [9] J.-M. Beau, R. Schauer, *Eur. J. Biochem.* **106**, 531 (1980)

(Received in Germany 21 September 1981)