

DIE IDENTIFIZIERUNG UND UNTERSUCHUNG VON ISOMEREN O-ACYLRIBONUCLEOSIDEN MIT HILFE DES CIRCULARDICHROISMUS

A. F. USATYI*, W. N. NESAWBATKO und M. N. SEMJENOWA

I. W. Kurtschatow-Institut für Atomenergie, Moskau

(Received in Germany, 2 April 1974.; Received in the UK for publication 17 October 1974)

Abstract—The CD spectra of benzoyl, *p*-nitrobenzoyl and anisoyl derivatives of adenosine, uridine, 1-methylriboside and 1-D-ribofuranosylbenzimidazole are registered. The possibility of identification of 2'-, 3'-O-acylribonucleosides and observation of acyl groups isomerisation kinetics is shown. The kinetics of 2'↔3' migration of a number of 2'(3')-O-derivatives, the dependence of kinetic constants on the pH are studied. The features of acyl derivated ribonucleosides CD spectra are discussed.

Kürzlich¹ haben wir über die Verwendung des Circulardichroismus (CD) für die Identifizierung einiger 2'- und 3'-O-Benzoyl (Bz)-derivate von Adenosin (A) und Uridin (U) berichtet. Die von uns entwickelte Methode zur selektiven Benzoylierung des 2',3'-cis-Diolsystems von Nucleosiden und das chromatographische Trennverfahren von dabei entstehenden Isomeren^{1,2} gelten auch für die Darstellung anderer 2'- und 3'-O-Aroylnucleoside. In diesem Bericht handelt es sich um die Untersuchung einer Reihe von isomeren Aroylnucleosiden und der Kinetik der Acylwanderung.

EXPERIMENTELLES

2'(3')-O-Bz-, -*p*-Nitrobenzoyl (NBz)-, -Anisoyl(Ans)-derivate von A, U, 1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol (BI) und Methylribosid (Mr) wurden mit der Azidmethode hergestellt und auf Silicagel (Woelm DC) getrennt². Anschliessend wurden die einzelnen Isomeren Spektraluntersuchungen unterworfen. UV-Spektren wurden mit dem Spektrophotometer Perkin-Elmer 402 registriert, CD-Spektren mit dem CD-Zusatz 6001 zum CARY Spektropolarimeter 60 im Messbereich 200–300 nm; Küvettendicke 0.1 und 1.0 cm. Das Spaltprogramm wurde auf konstante Auflösung 15 Å eingestellt. Die Lösungskonzentration von Acylnucleosiden betrug 0.03–0.25 mmole. Für kinetische Messungen wurden folgende Puffer benutzt: (1) Phosphatpuffer, pH = 7.5; (2) Acetatpuffer, pH = 8.0; (3) gesättigte NaHCO₃-Lösung, pH = 8.8; (4) Boratpuffer, pH = 9.1. Alle Messungen wurden bei 27°C durchgeführt.

DISKUSSION

Die Entwicklung von Methoden, die isomere 2'- und 3'-O-Acylnucleoside unterscheiden lassen, hat eine grosse Bedeutung für die Chemie dieser Naturstoffe. Die UV-Spektren dieser Verbindungen weichen sehr wenig von der Summe der Absorptionsbanden zweier Chromophore—the Base und der Acylgruppe ab.³ Die Absorptionsbande der Bz-gruppe liegt bei 232 nm, aber diejenigen von NBz- und Ans-gruppen stimmen praktisch mit den Banden von Adenin und Uracil überein. Deshalb besteht das Spektrum dieser Derivate aus zwei breiten Banden bei den Wellenlängen 260 und 210–212 nm, und

das Spektrum des 2'-Isomeren unterscheidet sich kaum von dem des 3'-Isomeren.

Gegenwärtig bestehen bereits einige chemische⁴ und physikalische⁵ Methoden, die über die Substitutionsstellung urteilen lassen. Dabei kommt der NMR-Spektroskopie die grösste Bedeutung zu. Für die NMR-Messungen werden jedoch beträchtliche Substanzmengen gebraucht, außerdem müssen die zu untersuchenden Verbindungen gut löslich sein. Diese Schwierigkeiten werden bei der CD-Methode umgangen. Der Substanzverbrauch für eine messung beträgt kaum 0.3 mg. Die CD-Spektren aller von uns untersuchten Acylisomeren unterscheiden sich wesentlich voneinander und auch von den Spektren der Nucleoside, was eine zuverlässige Identifizierung (Abb. 1) sowie eine direkte Verfolgung der Kinetik von Acylwanderung (Abb. 2a) und Hydrolyse (Abb. 2b) ermöglicht.

Im folgenden wollen wir die kinetischen Gesetzmässigkeiten der Acylwanderung von einzelnen 2'- und 3'-Isomeren betrachten. Im basischen pH-Bereich gehen die CD-Spektren von einzelnen 2'-und 3'-Isomeren nach einer bestimmten Zeitspanne in das CD-Spektrum des Gleichgewichtsgemisches über (Abb. 2a.1): $[θ]_2 N_2^* + [θ]_3 N_3^*$, wobei $[θ]_2, [θ]_3$ die molare Elliptizität der entsprechenden Isomeren (Circulardichroismus $Δε \cong 0.3 \times 10^{-3} [\theta]$) und N_2^*, N_3^* ihre Gleichgewichtskonzentrationen sind.

Da sich die Acylwanderung zwischen zwei Hydroxylgruppen der Ribose vollzieht, kann man diesen Vorgang durch die Wahrscheinlichkeit des entsprechenden Überganges oder—for eine Gesamtheit der Moleküle N_0 , die sich in einem (N_1) oder in anderem Zustand (N_2) ($N_1 + N_2 = N_0$) befinden—durch die Gleichgewichtskonstanten $k_{2 \rightarrow 3}$ und $k_{3 \rightarrow 2}$ beschreiben:

$$\begin{aligned}\frac{dN_1}{dt} &= -k_{1,2}N_1 + k_{2,1}N_2 \\ \frac{dN_2}{dt} &= k_{1,2}N_1 - k_{2,1}N_2\end{aligned}\quad (1)$$

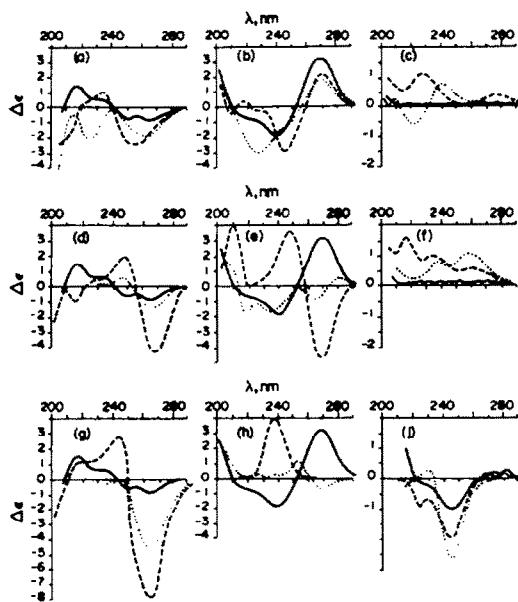


Abb. 1. CD-Spektren $\Delta\epsilon(\lambda)$ einiger Nucleoside (—) und ihrer 2'-(- - -) und 3'-(- - -) -O-Acylderivate; (a) A, BzA; (b) U, BzU; (c) Mr, BzMr; (d) A, AnsA; (e) U, AnsU; (f) Mr, AnsMr; (g) A, NBzA; (h) U, NBzU; (i) BI, BzBI (unbesetztes 1-Methylribosid besitzt keinen CD im angegebenen Messbereich).

Daraus ergibt sich

$$\begin{aligned} N_1 &= N_1^0 + (N_0 - N_1^0) e^{-(k_{1,2} + k_{2,1})t} \\ N_2 &= N_2^0 [1 - e^{-(k_{1,2} + k_{2,1})t}] \end{aligned} \quad (2)$$

wobei

$$N_1^0 = \frac{k_{2,1}}{k_{1,2} + k_{2,1}} N_0$$

und

$$N_2^0 = \frac{k_{1,2}}{k_{1,2} + k_{2,1}} N_0$$

sind.

Sind die Unterschiede zwischen den CD-Spektren von beiden Isomeren scharf ausgeprägt, besteht die Möglichkeit einer direkten kinetischen Verfolgung der Umwandlung von jedem einzelnen Isomeren. Es gilt

$$\begin{aligned} k_{1,2} + k_{2,1} &= -\frac{1}{t} \ln \frac{N_1 - N_1^0}{N_1^0 - N_1^0} = -\frac{1}{t} \ln \frac{N_2 - N_2^0}{N_2^0 - N_2^0} \\ \frac{k_{1,2}}{k_{2,1}} &= \frac{N_2^0}{N_1^0} = \frac{N_1^0}{N_2^0} - 1. \end{aligned} \quad (3)$$

Wenn eine charakteristische Isomerenbande fehlt, aber die spezifischen Elliptizitäten einzelner Derivate sich genügend stark in irgendeinem Spektralbereich unterscheiden, kann man für die Berechnung der Geschwindig-

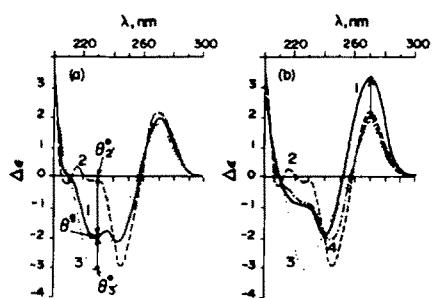


Abb. 2. CD-Spektren $\Delta\epsilon(\lambda)$ [$l \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$] der Bz-derivate von U; (a) (1) Gleichgewichtsgemisch von 2'- und 3'-Isomeren bei pH 8.8; (2) 2'-O-BzU; (3) 3'-O-BzU; (b) (1) U; (2) 2'-O-BzU; (3) 3'-O-BzU; (4) 5'-O-BzU. Die Wellenlängen, bei denen die Acylwanderung bzw. die Hydrolyse verfolgt werden können, sind mit einem Pfeil angegeben.

keitskonstanten der Acylwanderung folgende Beziehungen verwenden, in denen die Summe der Elliptizitäten bei bestimmter Wellenlänge benutzt wird:

$$\theta(\lambda, t) = \theta_1(\lambda, t) + \theta_2(\lambda, t)$$

dabei ist

$$\theta(\lambda, t) = [\theta(\lambda)]N(t)$$

$$k_{1,2} + k_{2,1} = -\frac{1}{t} \ln \frac{\theta - \theta^0}{\theta^0 - \theta^0}$$

$$\frac{k_{2,1}}{k_{1,2}} = \frac{\theta_2^0 - \theta^0}{\theta^0 - \theta_1^0} \quad (4)$$

In Abb. 3a ist die kinetische Untersuchung der $2' \rightarrow 3'$ - und $3' \rightarrow 2'$ -Benzoylwanderung in 2'(3')-BzU bei pH = 8.8 als Beispiel angeführt. Bei Zugabe des Puffers ändern sich die CD-Spektren, das Gleichgewichtsspektrum anstrebt; die Kinetik wird bei $\lambda = 230$ nm verfolgt. Die logarithmische Darstellung der kinetischen Daten (Abb. 3b) zeigt, dass die Geschwindigkeitskonstanten der Bz-Wanderung bei der Verwendung von 2'- und 3'-Isomeren entsprechend der Beziehung (2) innerhalb der Fehlergrenze gleich sind ($k_{2 \rightarrow 3'} + k_{3' \rightarrow 2'} = 0.7 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$). Die daraus berechneten kinetischen Konstanten $k_{2 \rightarrow 3'}$ und $k_{3' \rightarrow 2'}$ sowie $k_{2 \rightarrow 3'}/k_{3' \rightarrow 2'}$ der von uns untersuchten Acylderivate sind in der Tabelle 1 angeführt.

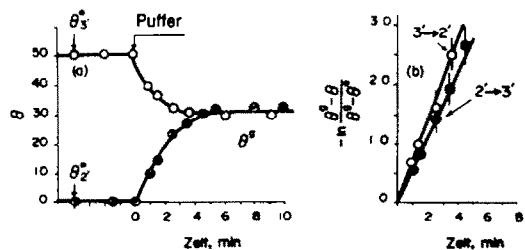
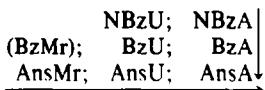


Abb. 3. Die Wanderungskinetik von 2'-(-○-) und 3'-O-BzU (○); (a) Änderung von θ_{230} mit der Zeit; (b) die logarithmische Darstellung der kinetischen Daten.

Tabelle 1. Die kinetischen Wanderungskonstanten von Acyl-O-ribofuranosiden

Acyldebravat	$k_{2 \rightarrow 3} / k_{3 \rightarrow 2'}$	$k_{2 \rightarrow 3} + k_{3 \rightarrow 2'} \times 10^3 \text{ sek}^{-1}$	pH	Wellenlänge (nm)
AnsA	3.2	1.3	8.8	269
AnsU	2.3	8.0	8.8	270
AnsMr	5.0	10.0	8.8	215
BzA	4.2	6.9	8.8	225
BzBI	4.6	1.0	8.8	245
BzU	1.7	12.0	8.8	230
BzMr	2.2	—	9.1	232
NBzA	4.4	—	8.8	245
NBzU	3.3	—	8.8	240

Die Analyse dieser Daten zeigt einen strengen Zusammenhang zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit und dem pK_a -Wert der betreffenden Säure⁶. Obwohl bis jetzt keine eindeutigen $k_{2 \rightarrow 3} + k_{3 \rightarrow 2'}$ -Werte für die NBz-Derivate wegen sehr grosser Geschwindigkeit des Prozesses erhalten werden konnten, kann man die untersuchten Verbindungen auf Grund ihrer Geschwindigkeitskonstanten in einer Reihe zusammenstellen:



Dabei zeigt der senkrechte Pfeil die Abnahme von $k_{2 \rightarrow 3} + k_{3 \rightarrow 2'}$. Aus diesem Schema ist auch der Einfluss des Substituenten am C(1')-Atom ersichtlich (Abnahme der Geschwindigkeitskonstanten von links nach rechts). Möglicherweise dürfte der Grund dafür darin liegen, dass eine der beiden Stellungen des 2', 3'-cis-Diolysystems durch den induktiven Effekt des Aglycons vorteilhafter ist als die andere.

Abb. 4a zeigt die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit des BzU vom pH-Wert. Wie aus den Untersuchungen an Modellsubstanzen folgt,⁷ ist die Geschwindigkeitskonstante direkt proportional der $\log [\text{OH}^-]$ Ionenkonzentration. Die Gleichgewichtskonstante aber, die wohl nur von der Struktur bestimmt wird, hängt vom pH-Wert nicht ab (Abb. 4b).

Ein visueller Vergleich der CD-Spektren von U und 2', 3'- und 5'-O-BzU zeigt das Vorhandensein von zwei isosbestischen Punkten bei 212 und 240 nm. Das heisst, dass die optische Aktivität von Bz-Derivaten eine Summe der optischen Aktivitäten der Base, des Substituenten und deren Wechselwirkung darstellt. Abb. 5a zeigt ein Differenzspektrum, das sich durch Substrahieren der CD-Spektren der Bz-Derivate aus dem CD-Spektrum des Uridins ergibt. Eine Reihe von Besonderheiten der Differenzspektren legt die Annahme nahe, dass die zusätzlichen Komponenten der CD-Spektren des BzU durch eine vereinzelte negative Bande $\Delta\epsilon_{225}$ (s. Abb. 5b.1) sowie durch eine Bande mit wechselndem Vorzeichen, die bei einer Wechselwirkung der Übergänge entsteht (s. Abb. 5b.2) und denen die Absorptionsbanden bei

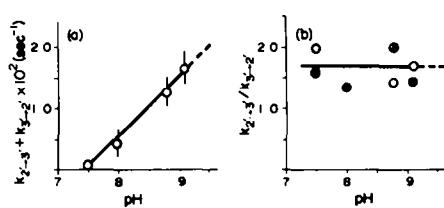


Abb. 4. Die Abhängigkeit der Wanderungskinetik von pH; (a) Geschwindigkeitskonstante $k_{2 \rightarrow 3} + k_{3 \rightarrow 2'}$; (b) Gleichgewichtskonstante $k_{2'}/k_{3 \rightarrow 2'}$ (○ — 2' → 3'; ○ — 3' → 2').

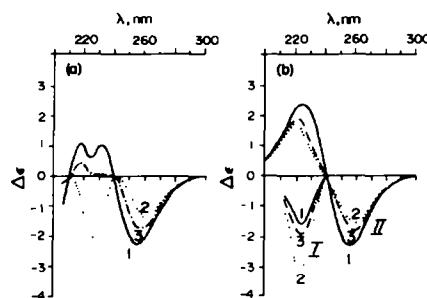


Abb. 5. Differenzspektren von U und 2'-(1), 3'-(2), 5'-(3)-Bz-Derivate; (a) die beobachteten Differenzspektren (erhalten durch Subtrahieren der CD-Spektren der Bz-Derivate aus dem CD-Spektrum des Uridins); (b) die Analyse von Differenzspektren.

Wellenlängen 225 und 258 nm entsprechen charakterisiert sind. Die Analyse der Differenzspektren lässt die Spektalkomponenten gleicher Art sichtbar werden, die sich nur durch die Amplitude unterscheiden. Die Bandenintensität $\Delta\epsilon_{225}$ (Abb. 5b.1) nimmt bei der Entfernung des Bz-Restes vom C(1')-Atom der Robose zu; die Intensität der Wechselwirkungsbande (Abb. 5b.2) nimmt bei zunehmendem Abstand zwischen den Chromophoren ab. Dieser Standpunkt erklärt qualitativ die Änderungen der CD-Spektren der von uns untersuchten Acyldebravate von U und A. So ist die Polaritätsänderung der CD-Spektren von AnsU (Abb. 1e) durch einen bedeutenden Beitrag der Chromophorenwechselwirkung und nicht etwa durch die Konfigurationsänderung vom Nucleosid zu deuten. Deren eingehende Analyse geht über den Rahmen dieses Berichtes hinaus.

LITERATUR

- L. N. Nikolenko, W. N. Nesawibatko, A. F. Usatyj und M. N. Semjenowa, *Tetrahedron Letters*, 5193 (1970)
- W. N. Nesawibatko, L. N. Nikolenko, M. N. Semjenowa, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 210, 1355 (1973)
- R. J. Cedergren, B. Larne, P. Laporte, *Can. J. Biochem.* 49, 730 (1971)
- C. B. Reese, D. R. Trentham, *Tetrahedron Letters* 2467 (1965)
- H. P. M. Fromageot, B. E. Griffin, C. B. Reese, J. E. Sulston, D. R. Trentham, *Tetrahedron* 22, 705 (1966)
- B. E. Griffin, M. Jarman, C. B. Reese, J. E. Sulston, D. R. Trentham, *Biochemistry* 5, 3638 (1966)
- R. Wolfenden, D. H. Rammel, F. Lipmann, *Ibid.* 3, 329 (1964)