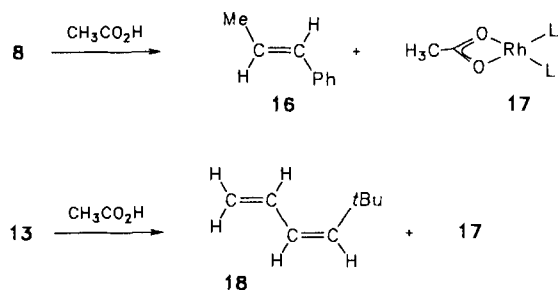


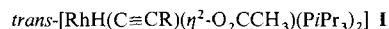
Tabelle 1. Ausgewählte spektroskopische Daten der Allyl- und Butadienyl-Komplexe **8**, **9**, **12** und **13** (ohne ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten für Phosphanliganden und Phenylgruppen; zur Bezeichnung: C^1 – dort H^1 – ist stets das substituierte C-Atom des Allyl- oder Butadienylliganden; C^2 , C^3 , C^4 dann fortlaufend; H^3 in *syn*- und H^4 in *anti*-Stellung zu H^2).

8 : ^1H -NMR (400 MHz, C_6D_6): $\delta = 5.28$ [ddd, $J(\text{H}^2\text{H}^4) = 12.2$, $J(\text{H}^1\text{H}^2) = 10.7$, $J(\text{H}^2\text{H}^3) = 6.7$ Hz, H^2], 3.40 [dd, $J(\text{H}^1\text{H}^2) = 10.7$, $J(\text{PH}) = 7.7$ Hz, H^1], 3.12 [ddd, $J(\text{H}^2\text{H}^3) = 6.7$, $J(\text{PH}) = 3.8$ und 2.2 Hz, H^3], 2.09 [dd, $J(\text{H}^2\text{H}^4) = 12.2$, $J(\text{PH}) = 5.6$ Hz, H^4]; ^{13}C -NMR (100.6 MHz, C_6D_6): $\delta = 99.90$ (m, C^2), 65.03 [ddd, $J(\text{RhC}) = 27.6$, $J(\text{PC}) = 6.9$ und 2.7 Hz, C^1], 46.24 [ddd, $J(\text{RhC}) = 21.0$, $J(\text{PC}) = 9.4$ und 5.2 Hz, C^3]; ^{31}P -NMR (162.0 MHz, C_6D_6): $\delta = 56.51$ [dd, $J(\text{RhP}) = 198.0$, $J(\text{PP}) = 22.0$ Hz], 46.20 [dd, $J(\text{RhP}) = 189.5$, $J(\text{PP}) = 22.0$ Hz]
9 : ^1H -NMR (400 MHz, C_6D_6): $\delta = 4.86$ [dddd, $J(\text{RhH}) = 2.1$, $J(\text{H}^2\text{H}^4) = 12.6$, $J(\text{H}^1\text{H}^2) = 8.2$, $J(\text{H}^2\text{H}^3) = 8.0$ Hz, H^2], 3.86 [m, im $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$ ddd, $J(\text{H}^1\text{H}^2) = 8.2$, $J(\text{PH}) = 3.6$ und 3.6 Hz, H^1], 2.74 [m, im $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$ d, br., $J(\text{H}^2\text{H}^3) = 8.0$ Hz, H^3], 2.05 [dd, br., $J(\text{H}^2\text{H}^4) = 12.6$, $J(\text{PH}) = 8.2$ Hz, H^4]; ^{13}C -NMR (100.6 MHz, C_6D_6): $\delta = 95.06$ [ddd, $J(\text{RhC}) = 5.7$, $J(\text{PC}) = 1.2$ und 1.2 Hz, C^2], 76.62 [ddd, $J(\text{RhC}) = 25.9$, $J(\text{PC}) = 10.6$ und 4.4 Hz, C^1], 45.04 [ddd, $J(\text{RhC}) = 29.9$, $J(\text{PC}) = 8.3$ und 5.2 Hz, C^3], 35.18 [dd, $J(\text{RhC}) = 0.9$, $J(\text{PC}) = 3.3$ Hz, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 34.40 [d, $J(\text{PC}) = 1.9$ Hz, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; ^{31}P -NMR (162.0 MHz, C_6D_6): $\delta = 49.02$ [dd, $J(\text{RhP}) = 206.7$, $J(\text{PP}) = 19.1$ Hz], 47.85 [dd, $J(\text{RhP}) = 211.8$, $J(\text{PP}) = 19.1$ Hz]
12 : ^1H -NMR (400 MHz, C_6D_6): $\delta = 6.34$ (m, H^1), 4.71 (m, H^2), 3.13 [ddd, $J(\text{H}^2\text{H}^3) = 7.4$, $J(\text{PH}) = 2.5$ und 2.5 Hz, H^3], Signal von H^4 von PCH-Signal verdeckt; ^{13}C -NMR (100.6 MHz, C_6D_6): $\delta = 171.23$ (m, C^2), 111.81 (s, C^1), 78.74 [d, $J(\text{RhC}) = 3.9$ Hz, C^3], 47.94 [ddd, $J(\text{RhC}) = 25.1$, $J(\text{PC}) = 5.9$ und 4.9 Hz, C^4]; ^{31}P -NMR (162.0 MHz, C_6D_6): $\delta = 52.80$ [dd, $J(\text{RhP}) = 197.0$, $J(\text{PP}) = 21.9$ Hz], 46.80 [dd, $J(\text{RhP}) = 160.5$, $J(\text{PP}) = 21.9$ Hz]
13 : ^1H -NMR (400 MHz, C_6D_6): $\delta = 5.14$ (m, H^1), 4.50 (m, H^2), 2.98 [ddd, $J(\text{H}^2\text{H}^3) = 8.0$, $J(\text{PH}) = 2.6$ und 2.6 Hz, H^3], 1.93 [dd, $J(\text{H}^2\text{H}^4) = 11.7$, $J(\text{PH}) = 6.7$ Hz, H^4], 1.30 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, C_6D_6): $\delta = 160.96$ [ddd, $J(\text{RhC}) = 43.8$, $J(\text{PC}) = 18.3$ und 9.2 Hz, C^2], 120.26 (s, C^1), 76.99 [d, $J(\text{RhC}) = 4.0$ Hz, C^3], 47.55 [ddd, $J(\text{RhC}) = 26.4$, $J(\text{PC}) = 6.9$ und 5.7 Hz, C^4], 34.19 [d, $J(\text{PC}) = 5.6$ Hz, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 31.24 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); ^{31}P -NMR (162.0 MHz, C_6D_6): $\delta = 52.24$ [dd, $J(\text{RhP}) = 196.8$, $J(\text{PP}) = 20.9$ Hz], 48.03 [dd, $J(\text{RhP}) = 164.6$, $J(\text{PP}) = 20.9$ Hz]

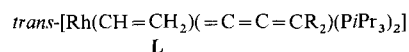
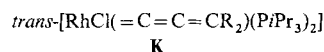


Schema 4. L = $\text{P}(\text{tPr})_3$.

$\text{HC}\equiv\text{CR}$, $\text{R}'\text{MgX}$ und $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ regio- und stereoselektiv ein Olefin $\text{RCH}=\text{CHR}'$ ($\text{R} = \text{Ph}$, $t\text{Bu}$; $\text{R}' = \text{Me}$, $\text{CH}=\text{CH}_2$) entsteht.



Vorversuche weisen darauf hin, daß sich die „Metallabutarene“ $\text{K}^{[14]}$ gegenüber Grignard-Reagentien ähnlich wie die Vinylidenkomplexe **1–3** verhalten und die Vinyl-Derivate **L** ebenfalls Umlagerungsreaktionen eingehen. Es ist damit zu erwarten, daß durch Rhodium-assistierte C-C-Verknüpfung noch höher ungesättigte Kohlenwasserstoffe als **18** erhältlich sind.



Eingegangen am 19. Januar 1995 [Z 7642]

Stichworte: Allylkomplexe · Isomerisierungen · Kohlenstoff-Kohlenstoff-Verknüpfungen · Vinylidenkomplexe

- [1] a) R. Mahé, Y. Sasaki, C. Bruneau, P. H. Dixneuf, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1518–1523; b) V. C. Gibson, G. Parkin, J. E. Bercaw, *Organometallics* **1991**, *10*, 220–231; c) B. M. Trost, J. A. Flygare, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5476–5477.
- [2] a) A. G. M. Barrett, J. Mortier, M. Sabat, M. A. Sturgess, *Organometallics* **1988**, *7*, 2553–2561; b) S. Feracin, H.-U. Hund, H. W. Bosch, E. Lippmann, W. Beck, H. Berke, *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 1305–1312; c) B. M. Trost, J. A. Martinez, R. J. Kulawiec, A. F. Indolese, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10402–10403; d) C. Bianchini, L. Glendenning, M. Peruzzini, A. Romerosa, F. Zanolini, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2219–2220.
- [3] Chloro-Komplexe: a) H. Werner, F. J. Garcia Alonso, H. Otto, J. Wolf, *Z. Naturforsch. B* **1988**, *43*, 722–726; b) H. Werner, U. Brekau, *ibid.* **1989**, *44*, 1438–1446; c) T. Rappert, O. Nürnberg, N. Mahr, J. Wolf, H. Werner, *Organometallics* **1992**, *11*, 4156–4164; d) T. Rappert, O. Nürnberg, H. Werner, *ibid.* **1993**, *12*, 1359–1364; e) H. Werner, M. Baum, D. Schneider, B. Windmüller, *ibid.* **1994**, *13*, 1089–1097.
- [4] Acetato-Komplexe: a) M. Schäfer, J. Wolf, H. Werner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1341–1343; b) *J. Organomet. Chem.* **1995**, *485*, 85–100; c) M. Schäfer, Dissertation, Universität Würzburg, **1994**.
- [5] M. Schäfer, N. Mahr, J. Wolf, H. Werner, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1377–1379; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1315–1317.
- [6] R. Wiedemann, P. Steinert, M. Schäfer, H. Werner, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9864–9865.
- [7] Über die Übertragung einer brückenbildenden Methylgruppe auf einen an Iridium gebundenen Vinylidenliganden unter Bildung einer Allyleinheit wurde schon früher berichtet: M. D. Fryzuk, L. Huang, N. T. McManus, P. Paglia, S. J. Rettig, G. S. White, *Organometallics* **1992**, *11*, 2979–2990.
- [8] H. Werner, M. Schäfer, O. Nürnberg, J. Wolf, *Chem. Ber.* **1994**, *127*, 27–38.
- [9] Zur Nomenklatur und thermodynamischen Stabilität der *syn/anti*-Isomere siehe: a) G. Wilke, B. Bogdanovic, P. Hardt, P. Heimbach, W. Keim, M. Kröner, W. Oberkirch, K. Tanaka, E. Steinrück, D. Walter, H. Zimmermann, *Angew. Chem.* **1966**, *78*, 157–172; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1966**, *5*, 151–166; b) K. Vrieze, H. C. Volger, P. W. N. M. van Leeuwen, *Inorg. Chim. Acta, Rev.* **1969**, 109–129; c) R. P. Hughes in *Comprehensive Organometallic Chemistry*, Vol. 5 (Hrsg.: G. Wilkinson, F. G. A. Stone, E. W. Abel), 1. Aufl., Pergamon, Oxford, **1982**, S. 492–540.
- [10] J. Wolf, H. Werner, *Organometallics* **1987**, *6*, 1164–1169.
- [11] S. A. Benyunes, R. J. Deeth, A. Fries, M. Green, M. McPartlin, C. B. M. Nation, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1992**, 3453–3465, zit. Lit.
- [12] Charakterisierung durch Vergleich der NMR-Daten: A. L. Segre, L. Zetta, A. Di Corato, *J. Mol. Spectrosc.* **1969**, *32*, 296–308.
- [13] H. Werner, M. Schäfer, J. Wolf, K. Peters, H. G. von Schnering, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 213–215; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 191–194.
- [14] a) H. Werner, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1992**, *40*, 435–444; b) H. Werner, T. Rappert, R. Wiedemann, J. Wolf, N. Mahr, *Organometallics* **1994**, *13*, 2721–2727.

Chemoenzymatische Synthese eines zweifach modifizierten Pentasaccharids als Substrat für einen α -Amylase-Assay durch Fluoreszenzlösung**

Nathalie Payre, Sylvain Cottaz und Hugues Driguez*

Die meisten Lebewesen, z.B. Mikroorganismen, höhere Pflanzen und Tiere, gewinnen Energie durch Metabolisierung von Stärke. An diesem Abbau sind Endoglucanasen, wie α -Amylase (1,4- α -D-Glucanglucanohydrolase, [EC 3.2.1.1]), sowie Exoglucanasen, wie Gluco-Amylase [EC 3.2.1.3] und β -Amylase [EC 3.2.1.2], maßgeblich beteiligt^[1].

Der Nachweis und die Bestimmung der α -Amylase-Aktivität sind nicht nur für katalytische Studien von Bedeutung, sondern

[*] Dr. H. Driguez, N. Payre, Dr. S. Cottaz
Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-CNRS)
BP 53 X, F-38041 Grenoble cedex 9 (Frankreich)
Telefax: Int. + 76 54 72 03
E-mail: hdriguez@cermav.grenet.fr

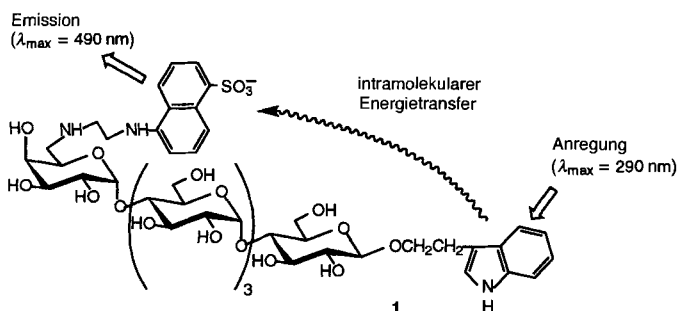
[**] Diese Arbeit wurde vom Centre National de la Recherche Scientifique (Frankreich) und vom European Biotech Program (1994–1996) gefördert. Wir danken Prof. P. Jardon (U.J.F. Grenoble) für seine Hilfe bei der Aufnahme der Fluoreszenzspektren.

auch für technische und medizinische Anwendungen, beispielsweise für Gärungsprozesse und für die Diagnostik von Krankheiten wie Parotitis (Entzündung der Ohrspeicheldrüse) und akuter Pankreatitis (Entzündung der Bauchspeicheldrüse). Im allgemeinen sind spezifische Substrate erforderlich, um die Endo- und Exoglucanasen zu unterscheiden, die gleichermaßen die α -(1 → 4)-glycosidische Bindung in D-Glc- α -(1 → 4)-D-Glc-Einheiten angreifen. Ein Überblick über die Veröffentlichungen seit Mitte der achtziger Jahre verdeutlicht den beträchtlichen Arbeitsaufwand, der nötig war, um dieses Ziel zu erreichen^[2].

Die spezifischen Substrate können in zwei Gruppen unterteilt werden: solche mit einem Chromophor oder einem Fluorophor, die in den meisten kommerziell erhältlichen Diagnostik-Kits verwendet werden, und solche mit einer fluoreszenzlöschenden Gruppe. Die chromophortragenden Substrate sind im allgemeinen Nitrophenylmaltoligosaccharide, die an ihrem nicht-reduzierenden Ende blockierende Gruppen tragen, um einen Angriff der Exoenzyme zu verhindern. Der Nitrophenyl- und der blockierende Substituent werden durch anspruchsvolle mehrstufige Reaktionen und/oder Verfahren, die zu den Produkten in niedrigen Ausbeuten führen, eingeführt. Dies geschieht entweder durch chemische Synthese ausgehend von Maltodextrinen mit geeignetem Polymerisationsgrad^[3] oder durch chemoenzymatische Methoden ausgehend von modifizierten linearen oder cyclischen Dextrinen^[4]. Da diese Substrate enzymatisch nicht an der reduzierenden Einheit hydrolysieren, müssen α - oder β -Glucosidase und Gluco-Amylase beim Assay zugegeben werden, um Nitrophenol aus den zurückbleibenden Nitrophenylmaltoligosacchariden abzuspalten. Nicht nur diese Nachteile sind kostspielig; Schwierigkeiten sind auch wegen der Vielzahl möglicher Nebenreaktionen zu erwarten.

Diese Schwierigkeiten sollten bei spezifischen Substraten mit einer fluoreszenzlöschenden Gruppe, bei denen die Änderung der Fluoreszenz zwischen einem Fluorophor/Quencher-Paar im gleichen Molekül anhand des intramolekularen resonanten Energietransfers verfolgt werden kann^[5], nicht auftreten. Diese Strategie ist analog zu der, die für den spezifischen Assay von Proteasen entwickelt wurde^[6], und wurde erstmals von Omishi und Ikenaka verfolgt, die ein zweifach substituiertes Maltopentaosid durch eine komplexe chemoenzymatische Synthese herstellen^[7]. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung beschrieben Bock et al. die Herstellung acylierter Maltotrioside^[8], die pH-empfindlich und schlechte Substrate für α -Amylasen sind.

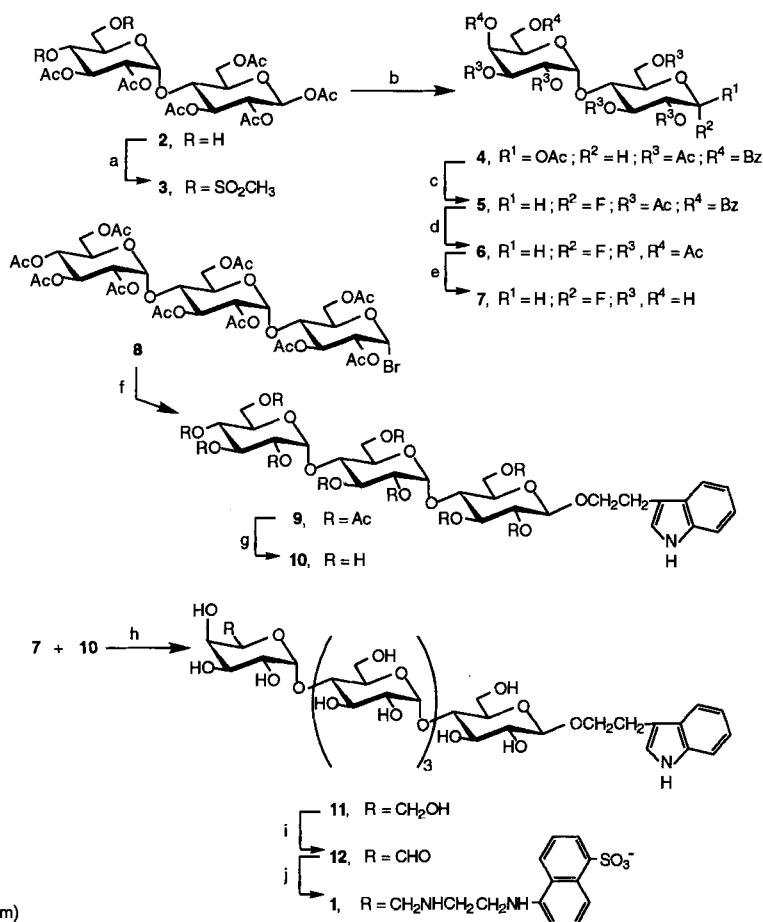
Der Wert von Substraten mit intramolekularer Fluoreszenzlöschung wird hier durch die Fähigkeit bestätigt, α -Amylase-Aktivitäten durch Fluoreszenzspektroskopie spezifisch nachzuweisen. Dabei wird als Substrat das Indolyethyl- sowie 5-(2-Aminoethylamino)-1-naphthalinsulfonat-substituierte Maltopentaosid **1** in mikromolaren Konzentrationen eingesetzt (Schema 1).



Schema 1. Fluoreszenzlöschung und intramolekularer Energietransfer bei Verbindung **1**. Nach Anregung bei 290 nm tritt eine Fluoreszenz bei 490 nm auf.

Das Design von **1** war aus mehreren Gründen naheliegend: Maltopentaose ist das am besten geeignete Substrat für unser Modellenzym, die α -Amylase aus Schweinepankreas (porcine pancreatic α -amylase, PPA)^[9], der Emissionsbereich des Fluorophors 3-(2-Hydroxyethyl)indol (Indolethanol) im angeregten Zustand ($\lambda_{\text{max}} = 345 \text{ nm}$) und der Absorptionsbereich von 5-(2-Aminoethylamino)-1-naphthalinsulfonat (EDANS) ($\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$) überlappen ausgezeichnet. Trotz der relativ geringen Lebensdauer von angeregtem Indolethanol (2 ns) ist die Effizienz der Fluoreszenzlöschung zufriedenstellend^[5]. Das EDANS/Indolethanol-Paar wurde auch aufgrund von Überlegungen zur Synthese gewählt: Unsere Strategie erfordert einen Fluorophor mit einer Aminofunktion, die mit dem Oligosaccharid eine Aminobindung eingeht, und einen anderen Fluorophor mit einer aliphatischen Hydroxygruppe für eine Etherbindung. Diese beiden Bindungen sind unter den Bedingungen der enzymatischen Assays wesentlich stabiler als Esterbindungen^[8].

Verbindung **1** wurde chemoenzymatisch hergestellt (Schema 2); diese Methode ist für die Synthese von regiospezifisch modifizierten Oligosacchariden sehr nützlich^[10]. Die Schlüsselstufen der Synthese von **1** sind die α -Amylase-katalysierte Verknüpfung des modifizierten α -Maltosylfluorid-Donors **7** mit dem Indolyethylmaltotriosid **10** und die Oxidation des Pentasaccharids **11** durch Galactose-Oxidase [EC 1.1.3.9], so daß



Schema 2. Synthese des Pentasaccharids **1**. a) MeSO_2Cl , Pyridin, 0 °C → Raumtemperatur, 94%; b) Natriumbenzoat, Hexamethylphosphorsäuretriäthylamid, 110 °C, 52%; c) HF/Pyridin, 0 °C, 86%; d) NaOMe/MeOH, dann Ac_2O , Pyridin, 90%; e) NaOMe/MeOH, quant.; f) 3-(2-Hydroxyethyl)indol, $\text{Hg}(\text{CN})_2$, HgBr_2 , Toluol/ MeNO_2 , 44%; g) NaOMe/MeOH, quant.; h) α -Amylase (*Aspergillus oryzae*), MeOH/Phosphatpuffer, 59%; i) Galactose-Oxidase (*Dactylium dendroides*), Katalase (Rinderleber), Phosphatpuffer, 37 °C; j) EDANS, MeOH, Rückfluß, dann NaBH_3CN , i)–j) 54% Gesamtausbeute.

EDANS am nichtreduzierenden Ende des Oligosaccharids regiospezifisch eingeführt werden kann. α -D-Galactosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucosylfluorid **7** und Indolyethylmaltotriosid **10** werden durch konventionelle Umsetzungen aus Hexa-*O*-acetylmaltose **2**^[11] und Maltotriosylbromid **8** erhalten^[12] (Tabelle 1).

Tabelle 1. Physikalische und spektroskopische Daten von **1**, **3**–**6**, **9** und **11**. NBA = 3-Nitrobenzylalkohol.

3: Schmp. 197–199 °C; $[\alpha]_D^{25} = +50$ ($c = 0.5$ in CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.80$ (d, $^3J(\text{H-1}^1, \text{H-2}^1) = 8.04$ Hz, 1H; H-1¹), 5.36 (d, $^3J(\text{H-1}^2, \text{H-2}^2) = 4.02$ Hz, 1H; H-1²), 3.00 (s, 6H; $2 \times \text{CH}_3\text{SO}_2$), 2.00 (m, 18H; $6 \times \text{CH}_3\text{CO}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, CDCl_3): $\delta = 95.50$ (C-1¹), 91.00 (C-1²), 38.50 und 37.50 ($2 \times \text{CH}_3\text{SO}_2$); $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_{21}\text{S}_2$ (750.5): ber.: 41.61, H 5.10, S 8.54; gef.: C 41.46, H 5.08, S 8.48.

4: Schmp. 165–166 °C; $[\alpha]_D^{25} = +62$ ($c = 0.49$ in CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.05$ –7.50 (m, 10H; Ph), 5.83 (dd, $^3J(\text{H-3}^2, \text{H-4}^2) = 3.2$ Hz, $^3J(\text{H-4}^2, \text{H-5}^2) < 1$ Hz, 1H; H-4²), 5.73 (d, $^3J(\text{H-1}^1, \text{H-2}^1) = 8.1$ Hz, 1H; H-1¹), 5.55 (d, $^3J(\text{H-1}^2, \text{H-2}^2) = 3.7$ Hz, 1H; H-1²), 5.40 (dd, 1H; H-3²), 5.30 (t, $^3J(\text{H-2}^1, \text{H-3}^1) = ^3J(\text{H-3}^1, \text{H-4}^1) = 9.5$ Hz, 1H; H-3¹), 5.23 (dd, $^3J(\text{H-2}^2, \text{H-3}^2) = 7.3$ Hz, 1H; H-2²), 4.95 (dd, 1H; H-2¹), 4.53 (dd, $^2J(\text{H-6a}^1, \text{H-6b}^1) = 12.3$ Hz, $^3J(\text{H-5}^1, \text{H-6b}^1) = 2.5$ Hz, 1H; H-6b¹), 4.48 (dd, $^2J(\text{H-6a}^2, \text{H-6b}^2) = 9.3$ Hz, 1H; H-6b²), 4.42 (ddd, 1H; H-5²), 4.26 (dd, $^3J(\text{H-5}^2, \text{H-6a}^2) = 4.0$ Hz, 1H; H-6a²), 4.20 (dd, $^3J(\text{H-5}^1, \text{H-6a}^1) = 4.6$ Hz, 1H; H-6a¹), 4.05 (t, $^3J(\text{H-4}^1, \text{H-5}^1) = 9.5$ Hz, 1H; H-4¹), 3.80 (ddd, 1H; H-5¹), 2.07–1.93 (m, 18H; CH_3CO); $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{O}_{19}$ (802.7): ber.: C 56.86, H 5.27; gef.: C 56.65, H 5.25.

5: Schmp. 113–114 °C; $[\alpha]_D^{25} = +91$ ($c = 0.5$ in CHCl_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.62$, 169.93, 169.76, 169.56 ($5 \times \text{CO}$, Acetate), 165.52, 165.26 ($2 \times \text{CO}$, Benzoate), 103.4 (d, $^1J(\text{C-1}^1, \text{F}) = 229$ Hz; C-1¹), 96.0 (C-1²), 20.66, 20.45, 20.39, 20.29, 20.18 ($5 \times \text{CH}_3\text{CO}$); $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{FO}_{17}$ (762.7): ber.: C 56.69, H 5.15, F 2.49; gef.: C 56.39, H 5.10, F 2.50.

6: Schmp. 117 °C; $[\alpha]_D^{25} = +109$ ($c = 0.5$ in CHCl_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.64$ –169.51 ($7 \times \text{CO}$, Acetate), 103.4 (d, $^1J(\text{C-1}^1, \text{F}) = 229$ Hz; C-1¹), 95.9 (C-1²), 20.61–20.21 ($7 \times \text{CH}_3\text{CO}$); $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{FO}_{17}$ (638.6): ber.: C 48.91, H 5.52, F 2.98; gef.: C 48.77, H 5.52, F 2.91.

9: $[\alpha]_D^{25} = +58.5$ ($c = 0.9$ in CHCl_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.4 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.33$ –169.19 ($10 \times \text{CO}$, Acetate), 135.94, 122.04, 121.66, 119.06, 118.43, 112.12, 110.88 (Indol), 99.97 (C-1¹), 95.46 (C-1², C-1³), 62.84, 62.15, 61.19 (C-6¹, C-6², C-6³), 25.32 (OCH_2CH_3), 20.61–20.19 ($10 \times \text{CH}_3\text{CO}$); FAB-MS (NBA + KCl, positiv): m/z : 1067 [M^+]; $\text{C}_{48}\text{H}_{61}\text{NO}_{26}$ (1068.0): ber.: C 53.98, H 5.76, N 1.31; gef.: C 53.90, H 6.04, N 1.45.

11: $[\alpha]_D^{25} = +99$ ($c = 0.54$ in H_2O); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta = 7.63$ –7.08 (m, 5H; Indol), 5.27, 5.25, 5.24, 5.22 (jeweils d, 4H; H-1², H-1³, H-1⁴, H-1⁵), 4.26 (d, $^3J(\text{H-1}^1, \text{H-2}^1) = 8.04$ Hz, 1H; H-1¹); FAB-MS (NBA + KCl, positiv): m/z : 972 [M^+].

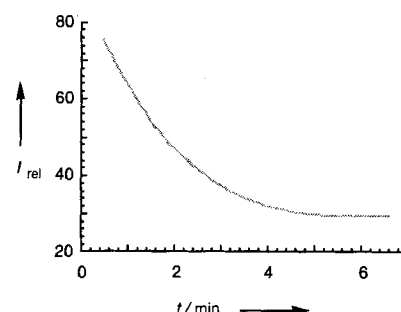
1: $[\alpha]_D^{25} = +87$ ($c = 0.42$ in DMSO); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta = 8.20$ –6.75 (m, 11H; H Arom.), 5.20 (d, $^3J(\text{H-1}^2, \text{H-2}^2) = 3.83$ Hz, 1H; H-1²), 5.16 (d, $^3J(\text{H-1}^3, \text{H-2}^3) = 3.83$ Hz, 1H; H-1³), 5.05 (d, $^3J(\text{H-1}^4, \text{H-2}^4) = 3.97$ Hz, 1H; H-1⁴), 4.94 (d, $^3J(\text{H-1}^5, \text{H-2}^5) = 3.28$ Hz, 1H; H-1⁵), 4.73 (d, $J = 2.25$ Hz, 1H; H-4⁵), 4.10 (d, $^3J(\text{H-1}^1, \text{H-2}^1) = 7.95$ Hz, 1H; H-1¹); FAB-MS (positiv): m/z : 1246.364, ber. für $\text{C}_{52}\text{H}_{72}\text{N}_3\text{NaO}_{28}\text{S}$ [$M - \text{H}_2\text{O} + \text{Na}^+$]: 1246.371.

Die Glycosylierung von **10** mit **7** wird unter Bedingungen durchgeführt, die ursprünglich von Kobayashi et al. für die enzymatische Polymerisation von α -Maltosylfluorid mit α -Amylase als Katalysator beschrieben wurden^[13]. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde **11** in 78% Ausbeute erhalten (bestimmt durch HPLC, 59% isolierte Ausbeute; Tabelle 1). Die Epimerisierung an der 4'-Position bei der Bildung von **4** ist aus zwei Gründen von Vorteil: Erstens wird **7** von der α -Amylase als Donor akzeptiert, aber weder **7** noch **11** als Acceptoren, da sich am nichtreduzierenden Ende jeweils eine axiale 4-OH-Gruppe befindet. Daher wird nur ein Disaccharidbaustein addiert und man erhält **11** in guter Ausbeute. Zweitens kann **11** an C-6 des nichtreduzierenden Galactosylrestes durch Galactose-Oxidase/Katalase regiospezifisch zum Aldehyd **12** oxidiert werden^[14], so daß die EDANS-Gruppe im letzten Schritt durch reduktive Aminierung unter Bildung von **1** in 54% isolierter Ausbeute eingeführt werden kann (Tabelle 1).

Die intramolekulare Fluoreszenzlöschung in **1** wurde in ersten Experimenten nachgewiesen: Nach Anregung bei 290 nm ist die bei 490 nm emittierte Fluoreszenz von EDANS in **1** 12mal intensiver als die von freiem EDANS. Die Konzentrationen betrugen jeweils 10 μM . Darüber hinaus stellten wir eine Abnahme der Emissionsintensität von Indolyethyl bei 345 nm um den Faktor fünf fest. Bei dieser Konzentration können wir davon ausgehen, daß die Änderung der Fluoreszenzintensität infolge von Löschung durch Kollision zu vernachlässigen ist. Tatsächlich nimmt die Intensität der Fluoreszenz von freiem EDANS bei 490 nm in Gegenwart des Indolyethylpentasaccharids **11** um 2% zu, wenn die EDANS-Konzentration von 10 auf 20 μM erhöht wird.

Inkubiert man eine 5 μM Lösung von **1** mit PPA, nimmt die Intensität der Fluoreszenz bei 490 nm schnell ab. Nach 6 min ist das Substrat vollständig hydrolysiert (Abb. 1). Eine HPLC-Analyse zu diesem Zeitpunkt bestätigt die vollständige Umwandlung von **1** in zwei kürzere Oligosaccharide (EDANS-Galactosyl- α -(1 \rightarrow 4)-maltose und Indolyethylmaltosid; Vergleich der Retentionszeiten mit denen authentischer, unabhängig hergestellter Standards).

Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der PPA-katalysierten Hydrolyse von **1**, verfolgt anhand der relativen Fluoreszenzintensität I_{rel} bei 490 nm durch Steady-State-Fluoreszenz. Eine 5 μM Lösung von **1** in Phosphatpuffer (0.02 M, pH = 7) wurde mit PPA (Sigma, 100 U L⁻¹) bei 30 °C inkubiert [16].



Wird das gleiche Experiment mit unterschiedlichen Konzentrationen an α -Amylase durchgeführt, wird ein linearer Zusammenhang zwischen der Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse von **1** und der Enzymkonzentration erhalten. Dagegen waren α -Galactosidase, β -Amylase, α -Glucosidase und Gluco-Amylase unter optimalen Bedingungen inaktiv^[15].

Verbindung **1** ist also das erste spezifische, empfindliche und leicht erhältliche Substrat für den In-vitro-Assay der α -Amylasen im Speichel und im Pankreas des Menschen. Weiterführende Untersuchungen mit **1** sowie zur Herstellung von Substraten mit verbesserten Eigenschaften werden derzeit durchgeführt.

Eingegangen am 28. Dezember 1994 [Z 7591]

Stichworte: α -Amylase-Assay · Chemoenzymatische Synthesen · Enzyme · Fluoreszenz · Oligosaccharide

- [1] a) D. French in *Biochemistry of Carbohydrates, Serie one, Vol. 5* (Hrsg.: W. J. Whelan), Butterworth, London, 1975, S. 267–331; b) P. J. Reilly, *Food Sci. Technol.* **1985**, 14, 101–142.
- [2] Siehe beispielsweise: a) K. Omishi, T. Ikenaka, *J. Biochem.* **1985**, 97, 977–982; b) S. Satomura, T. Iwata, Y. Sakata, *Carbohydr. Res.* **1988**, 176, 107–115; c) S. Satomura, K. Omishi, T. Ikenaka, *ibid.* **1988**, 180, 137–146; d) E. O. Hägele, M. Kratzer, E. Schaich, E. Rauscher, *Clin. Chem. (Winston-Salem NC)* **1989**, 35, 188–189; e) K. Ogawa, H. Matsui, T. Usui, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, 56, 1933–1936; f) K. Ogawa, Y. Taki, H. Ishida, Y. Yamagata, S. Satomura, M. Kiso, A. Hasegawa, *ibid.* **1993**, 57, 821–828; g) S. Tokutake, T. Oguma, K. Tobe, K. Kotani, K. Saito, N. Yamaji, *Carbohydr. Res.* **1993**, 238, 193–213; h) K. Ozawa, Y. Yamagata, S. Satomura, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *ibid.* **1994**, 262, 137–145.
- [3] Siehe Lit. [2c, d, f–h].

- [4] Siehe Lit. [2a, b, e, g].
- [5] R. H. Fairclough, C. R. Cantor, *Methods Enzymol.* **1978**, *48*, 347–379.
- [6] a) A. Yaron, A. Carmel, E. Katchalski-Katzir, *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 228–235; b) E. D. Matayoshi, G. T. Wang, G. A. Krafft, J. Erickson, *Science* **1990**, *247*, 954–958.
- [7] K. Omishi, T. Ikenaka, *J. Biochem.* **1986**, *99*, 291–294.
- [8] V. Ferro, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 2169–2176.
- [9] C. Seigner, E. Prodanov, G. Marchis-Mouren, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *913*, 200–209.
- [10] a) D. G. Drueckhammer, W. J. Hennen, R. L. Pedersen, C. F. Barbas III, C. M. Gautheron, T. Krack, C.-H. Wong, *Synthesis* **1990**, 499–525, zit. Lit.; b) S. Cottaz, C. Apparu, H. Driguez, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 2235–2241; c) C. Simiand, S. Cottaz, C. Bosso, H. Driguez, *Biochimie* **1992**, *74*, 75–79; d) B. Evers, P. Mischnick, J. Thiem, *Carbohydr. Res.* **1994**, *262*, 335–341.
- [11] K. Takeo, K. Shinmitsu, *Carbohydr. Res.* **1984**, *133*, 135–145.
- [12] K. Takeo, K. Mine, T. Kuge, *Carbohydr. Res.* **1976**, *48*, 197–208.
- [13] S. Kobayashi, J. Shimada, K. Kashiwa, S.-I. Koda, *Macromolecules* **1992**, *25*, 3237–3241.
- [14] a) G. Avigad, D. Amaral, C. Asensio, B. L. Horecker, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 2736–2743; b) R. A. Schlegel, C. M. Gerbeck, R. Montgomery, *Carbohydr. Res.* **1968**, *7*, 193–199.
- [15] Für die verwendete Gluco-Amylase (Sigma) wurde eine geringe hydrolytische Aktivität festgestellt, die einer Verunreinigung mit α -Amylase zuzuschreiben ist.
- [16] Die Aktivität der α -Amylase ist kürzlich mit dem Amylase-Diagnostic-Kit (Sigma) und Nitrophenyl-4,6-ethylidenmaltoheptaosid als Substrat bestimmt worden.

Berichtigung

In der Zuschrift „Bildung und Struktur neuer Metallo- und Metallapolysulfane $[\text{MS}_y]^+$ ($y = 2-16$)“ von I. Dance, K. Fisher und G. Willett (*Angew. Chem.* **1995**, *107*, 215) muß in der Legende zu Abbildung 1 der Nebensatz „d.h. nach der völligen Umsetzung von Mn^{+4} “ gestrichen werden. Die Struktur rechts oben in Abbildung 4 entspricht dem $[\text{CuS}_{12}]^+$ -Isomer **3d** und nicht **3b**.