

2-DESOXY-2-(D-GLYKOFURANOSYLURONO-6,3-LACTON)AMINO-D-GALAKTOPYRANOSEN*

ALMUTH KLEMER, GUNTHER MÜLLER UND ALFRED LUDWIG

Organisch-Chemisches Institut der Universität Münster, 44 Münster (Deutschland)

(Eingegangen am 2. Juli 1973, angenommen in revidierter Form am 17. Dezember 1973)

ABSTRACT

Condensation of 2-amino-2-deoxy-D-galactopyranose with D-glucuronic acid or D-mannurono-6,3-lactone gave, after ion-exchange chromatography, the 2-deoxy-2-(D-glycofuranosylurono-6,3-lactone)amino-D-galactose derivatives **1** or **2**, respectively, characterized as crystalline hexaacetates

ZUSAMMENFASSUNG

2-Amino-2-desoxy-D-galaktopyranose reagiert mit D-Glucuronsäure oder D-Mannurono-6,3-lacton und führt zu den entsprechenden 2-Desoxy-2-(D-glykofuranosylurono-6,3-lacton)amino-D-galaktopyranosen **1** und **2**, die durch Ionenaustauscherchromatographie in reiner Form isoliert wurden. Mit Pyridin-Acetanhydrid wurden kristalline Hexa-acetate erhalten.

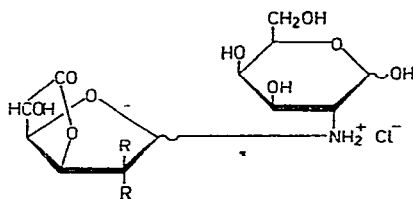
EINLEITUNG

2-Desoxy-2-(glykosyl)amino-aldosen sind bisher kaum bekannt. Über den ersten Vertreter dieser Stoffklasse berichteten Stacey und Mitarbeiter in einer Kurzmittteilung¹. Sie erhielten beim Erhitzen eines Gemisches aus D-Mannose, 2-Amino-2-desoxy-D-glucopyranose-hydrochlorid und Cellulosepulver u. a. ein Kondensationsprodukt, dem sie auf Grund der raschen Hydrolyse in neutraler Lösung unter Rückbildung der Ausgangszucker die Struktur einer 2-Desoxy-2-(D-mannosyl)amino-D-glucopyranose zuordneten. Micheel und Mitarbeiter² synthetisierten 2-Desoxy-2-(D-glucopyranosyl)amino-D-glucopyranose und einige ihrer Derivate im Rahmen ihrer Untersuchungen zum Mechanismus der Amadori-Umlagerung. Sie setzten 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-amino-2-desoxy-D-glucopyranose mit 2,3,4,5,6-Penta-O-acetyl-aldehydo-D-glucose zu einem Kondensationsprodukt vom Typ einer Schiff'schen Base um, welches sich bei der Zemplén-Verseifung spontan zum genannten N-Glykosyl-aminozucker cyclisierte.

*Reaktionen von 2-Amino-2-desoxy-hexosen mit Alduronsäuren. Teil III

Wir stießen auf diese Stoffklasse im Rahmen unserer Untersuchungen an Chondroitinsulfat-peptiden. Wie früher berichtet^{3,4}, treten im Aminosäurespektrum dieses Mucopolysaccharids unbekannte Komponenten (U_1 , U_2 und U_3) auf. Zwei davon (U_1 und U_3) sind Artefakte, die in guten Ausbeuten auch aus D-Glucuronsäure und 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose mit Salzsäure durch Dehydratisierung entstehen. Analoge Produkte wurden bei der Umsetzung von D-Mannurono-6,3-lacton mit 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose erhalten. Die Verbindungen des Typs U_3 wurden isoliert und aufgeklärt^{4,5}. Es handelt sich um Disaccharide und zwar um 2-Amino-2-desoxy-6-[D-gluco(bzw. D-manno)furanosylurono-6,3-lacton]-D-galactopyranosen.

Im Folgenden berichten wir über die Isolierung und Strukturaufklärung von U_1 (**1**) und seinem Mannuronsäure-Analogen (**2**). Diese Stoffe gehören zur Gruppe der N-Glykosyl-aminozucker. U_1 ist eine 2-Desoxy-2-(D-glucofuranosylurono-6,3-lacton)amino-D-galaktopyranose⁵ (**1**) und **2** hat entsprechend die Struktur einer 2-Desoxy-2-(D-mannofuranosylurono-6,3-lacton)amino-D-galaktopyranose.



1 R = H , R = OH

2 R = OH , R = H

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Kondensation von 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose mit D-Glucuronsäure bzw. D-Mannurono-6,3-lacton führten wir, wie beschrieben⁴, durch. Wie die Produktanalysen im Aminosäure-Analysator ergaben, entstanden hierbei **1** und **2** in Ausbeuten bis zu 50% bezogen auf den eingesetzten Aminozucker. Für die Isolierung, die allerdings auf Grund der Instabilität von **1** und **2** ziemlich verlustreich war, wählten wir die Chromatographie an Kationenaustauschern, die sich auch für die Reindarstellung der Disaccharide (Typ U_3) bewährt hatte. Die Verbindungen **1** und **2** wurden auf diese Weise in etwa 20-prozentiger Ausbeute in analytisch und chromatographisch reiner Form erhalten.

Hinweise auf eine von den Disacchariden völlig abweichende Struktur ergaben sich schon aus dem Verhalten von **1** und **2** in wässriger Lösung bei verschiedenen pH-Werten. Zwar sind die Verbindungen bei Raumtemperatur gegenüber 0,1M Salzsäure recht stabil, aber Einwirkung von 2M Salzsäure bei 50° führt schon rasch zu vollständiger Hydrolyse. Hierbei werden molare Mengen Aminozucker und Uron-

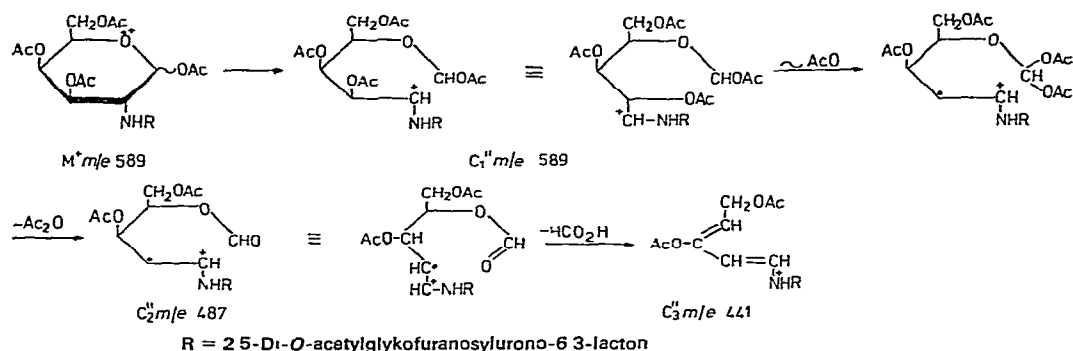
säure in Freiheit gesetzt. Im Gegensatz zu den Disacchariden zerfallen 1 und 2 auch im schwach basischen Bereich (bei pH 8) und zwar ebenfalls unter Bildung der Ausgangsstoffe. Dieses Verhalten spricht für einen Glykosylamin-Typ.

Die elektrophoretischen Untersuchungen bei verschiedenen pH-Werten (pH 1,9–5,6) zeigen, daß 1 und 2 als Lactone vorliegen. Sie wandern als einheitliche Substanzen und unterscheiden sich in ihren Wanderungsgeschwindigkeiten nur unbedeutend von den genannten Disacchariden, deren Lactonstruktur bereits bewiesen ist. Die i.r.-Spektren von 1 und 2 besitzen in Übereinstimmung mit der Lactonstruktur eine C=O-Bande bei 1870 cm^{-1} . Mit wäßrigem Pyridin kann der Lactonring von 1 in begrenztem Umfange geöffnet werden, wobei jedoch bereits Hydrolyse unter Bildung der Ausgangsstoffe vorherrscht. Die resultierende *N*-Glucosyluronsäure verhält sich deutlich saurer als 1. Dies läßt sich aus der erheblich kürzeren Retentionszeit im Aminosäureanalysator im Vergleich zu 1 ableiten.

Auf Grund der Instabilität von 1 und 2 wurde die Strukturaufklärung sehr erschwert. So konnte keine Natriumborhydrid-Reduktion oder eine Methylierungsanalyse durchgeführt werden. Immerhin gelang die Darstellung kristalliner Acetate mit Pyridin-Acetanhydrid bei 0° bis $+5^\circ$. Aber selbst unter diesen milden Bedingungen war eine Spaltung der Kondensationsprodukte nicht vollständig zu vermeiden. Auch mehrfach umkristallisierte Acetylierungsprodukte enthielten immer noch geringe Mengen 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-desoxy-D-galactopyranose. Die 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-desoxy-2-(2,5-di-*O*-acetyl-D-glykofuranosylurono-6,3-lacton)amino-D-galactopyranosen 3 und 4 zeigen ungewöhnliche Löslichkeitseigenschaften. Im Gegensatz zu den erwähnten Disaccharidacetaten oder den vollacetylierten 2-Amino-2-desoxyhexosen sind sie außer in Chloroform auch gut in Wasser löslich.

Das i.r.-Spektrum von 3 (oder 4) gibt Aufschluß über analoge und abweichende Strukturelemente im Vergleich zu den Spektren der Disaccharidacetate vom Typ U_3 . Die CH-Banden und die C=O-Banden des Lactonringes und der *O*-Acetylgruppen stimmen genau mit den Spektren der Disaccharidacetate überein. Danach folgt eine wesentliche Abweichung. Die erste Säureamidbande und die NH-Deformationsschwingung sind nur sehr schwach vorhanden und die zweite Amidbande bei 1550 cm^{-1} fehlt völlig. Der Stickstoff der Acetate 3 und 4 ist demnach nicht acetyliert. Die n.m.r.-Spektren von 3 bzw. 4 stehen in Übereinstimmung mit diesem Befund. Sie weisen die Methylprotonen von sechs *O*-Acetylgruppen auf.

Aus den Massenspektren von 3 und 4 (Schema 1) lassen sich folgende Angaben zur Struktur machen: Es findet sich deutlich der Molekulationenpeak bei 589. In Analogie zu bekannten Fragmentierungen von acylierten 2-Amino-2-desoxyhexosen⁶ wird daraus nach Aufspaltung der Bindung zwischen C-1 und C-2, Wanderung der C-3-Acetylgruppe an C-1 und Abspaltung von Acetanhydrid das Ion mit der Massenzahl 487 gebildet. Eine 1,3-Verknüpfung liegt also mit Sicherheit nicht vor. Dieser Befund ist wichtig, weil 1,3-verknüpfte Disaccharide ebenfalls alkalilabil sind. Ebenfalls auszuschließen ist die Struktur einer Schiffischen Base, da diese sieben *O*-Acetylgruppen enthalten mußte.



Schema 1

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine, analytische und präparative Methoden — Die meisten der angewendeten Methoden sind mit den bereits beschriebenen⁴ identisch. Die Papier-elektrophorese wurde mit dem Papier Whatman 3 MM bei der Feldstärke 20 V/cm, Stromstärke 2–10 mA/cm (je nach Puffer), Kühlstufe 0°, Laufzeit 90 min durchgeführt. Entwickelt wurde mit Anilinthalat, Puffersysteme: pH 1,9, Essigsäure–Ameisensäure–Wasser (3:1:6); pH 3,6, Essigsäure–Pyridin–Wasser (10:1:89), pH 5,6, Essigsäure–Pyridin–Wasser (1:10:89).

2-Desoxy-2-(D-glucofuranosylurono-6,3-lacton)amino-D-galaktopyranosehydrochlorid dihydrat (1) — 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose-hydrochlorid (500 mg) wurde wie beschrieben⁴ mit D-Glucuronsäure (1,0 g) umgesetzt und aufgearbeitet. Die Produktanalyse des Reaktionsgemisches am Aminosäure-Analysator ergab **1** (42–52%). Die wäßrige Lösung des Reaktionsgemisches wurde am Ionenaustauscher Dowex 50 (WX-8, H⁺, mesh 200–400), in einer Säule 2,2 cm × 100 cm mit 0,1M Salzsäure bei Raumtemperatur chromatographiert. Die Durchflußmenge betrug etwa 100 ml/h. Verbindung **1** wurde nach etwa 10 h aufgefangen und die gesammelten Fraktionen (insgesamt 500 ml) auf Dowex 1 (X-2, Ac[−], mesh 50–100) zum Austausch des Chlorid-Ions gegeben. Das nunmehr essigsaure Eluat wurde nach Zusatz von 2M Salzsäure *in vacuo* bei 1 Torr und einer Badtemperatur unter 10° auf 20 ml eingengt, wobei **1** als weißes amorphes Pulver ausfiel (120 mg, 18,9%), ein großer Teil von **1** befand sich noch in der Mutterlauge. Eine Aufarbeitung war nicht sinnvoll, da **1** sehr instabil ist, $[\alpha]_D^{22} +17^\circ$ (c 1, Wasser).

Anal. Ber. für C₁₂H₂₀ClNO₁₀ · 2H₂O. C, 35,17; H, 5,90, N, 3,41. Gef. C, 35,19; H, 5,41, N, 3,11.

Anal. Ber. für das wasserfreie **1** C₁₂H₂₀ClNO₁₀ · C, 38,52, H, 5,39, N, 3,75.

2-Desoxy-2-(D-mannofuranosylurono-6,3-lacton)amino-D-galaktopyranosehydroacetat (2) — 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose (300 mg) und D-Mannurono-6,3-lacton (500 mg) wurden wie beschrieben⁴ umgesetzt, aufgearbeitet und chromatographiert. Die 2-enhaltende Fraktion wurde nach 180 min aufgefangen, *in vacuo* eingengt und

gefriergetrocknet, wobei **2** als hellgelbes Pulver anfiel (100 mg, 17%), $[\alpha]_D^{20} +10^\circ$ (c 1, Wasser)

Anal Ber für $C_{14}H_{23}NO_{12}$ C, 42,30, H, 5,80, N, 3,52 Gef · C, 41,60, H, 5,77, N 3,48

1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-(2,5-di-O-acetyl-D-glucofuranosylurono-6,3-lacton)amino-D-galaktopyranose (3) — Verbindung **1** wurde wie beschrieben⁶ mit Acetanhydrid und Pyridin acetyliert und in Eiswasser getropft. Zur Aufarbeitung wurde dreimal mit Chloroform (je 30 ml) ausgeschüttelt, die Chloroformauszüge dreimal mit Wasser (je 10 ml) gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und bei 20° *in vacuo* zur Trockne gedampft. Das Rohprodukt wurde in wenig Acetonitril bei 40° gelöst. Bei Raumtemperatur kristallisierte zunächst reine 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-desoxy-D-galaktose. Aus der Mutterlauge kristallisierte **3** beim weiteren Abkühlen auf 0° (10%), Schmp 206°, $[\alpha]_D^{22} +115^\circ$ (c 1, Acetonitril), i r -Spektrum 3450 (NH), 1840 (C=O Lacton), 1780 cm^{-1} (C=O), m s (Kathode 300 A, Quelle 165°). *m/e* 546 (25), 530 (35), 487 (22), 441 (100), 399 (48), 381 (25), 356 (18), 304 (20), 288 (25), 243 (78)

Anal Ber. für $C_{24}H_{31}NO_{16}$ C, 48,89, H, 5,30, N, 2,37. Gef C, 48,35, H, 5,30, N, 2,45

1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-(2,5-di-O-acetyl-D-mannofuranosylurono-6,3-lacton)amino-D-galaktopyranose (4) — Verbindung **2** wurde wie für **1** beschrieben acetyliert. Das wäßrige Reaktionsgemisch wurde vier-fünfmal mit Chloroform (je 10 ml) extrahiert und die vereinigten Extrakte mit Natriumhydrogencarbonatlösung (10 ml) ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und die Chloroformlösung *in vacuo* eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Äthanol gelöst und **4** durch Zugabe von Äther kristallin erhalten (28%), Schmp 155°, $[\alpha]_D^{23} +48,6^\circ$ (c 1, Chloroform), i r -Spektrum 3440 (NH), 1800 (C=O Lacton), 1750 cm^{-1} (C=O), m s *m/e* 589 (1,0), 546 (8), 530 (11), 487 (12), 441 (63), 399 (28), 288 (5), 243 (220), 146 (170), 126 (100)

Anal Ber für $C_{24}H_{31}NO_{16}$. C, 48,89, H, 5,30, N, 2,37 Gef C, 48,40, H, 4,79, N, 2,39

DANK

Wir danken dem Landesamt für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen und dem Verband der chemischen Industrie „Fonds der Chemie“ für die finanzielle Unterstützung

LITERATUR

- 1 S. A. BARKER, K. MURRAY UND M. STACEY, *Nature*, 191 (1961) 142
- 2 F. MICHEEL, K. H. HEINEMANN, K. H. SCHWIEGER UND A. FROWEIN, *Tetrahedron Lett*, (1965) 3769
- 3 A. KLEMER UND D. MEMPEL, *Z. Naturforsch., B*, 204 (1965) 553
- 4 A. KLEMER, G. MÜLLER UND A. LUDWIG, *Carbohydr. Res.*, 33 (1974) 263
- 5 A. KLEMER UND G. MÜLLER, *Tetrahedron Lett*, (1972) 2313
- 6 K. HEYNS, G. GIESLING UND D. MÜLLER, *Carbohydr. Res.*, 4 (1967) 452