

DANIEL BROWN, MME. FRANÇOISE HAYES und SIR ALEXANDER TODD
 DER ABBAU VON GLUCOSE-3-PHOSPHAT DURCH ALKALI

Aus dem University Chemical Laboratory, Cambridge, England,
 und dem
 Institut du Cancer, Villejuif (Seine), Frankreich
 (Eingegangen am 21. Januar 1957)

Herrn Professor Dr. B. Helferich zum 70. Geburtstag

Aus einer Diskussion über den Abbau von Zuckerphosphaten wird gefolgert, daß die durch Alkali bewirkte schnelle Zersetzung von Zuckerphosphaten mit freier reduzierender Gruppe in bestimmten Fällen auf Eliminierungsreaktionen und nicht auf einfache Hydrolyse zurückzuführen ist. — So wird Glucose-3-phosphat (I), für das eine bequeme Synthese beschrieben wird, durch Alkali zu Glucometasaccharinsäure (IV) umgesetzt. In analoger Weise wird Ribose-3-phosphat in eine C₅-Saccharinsäure umgewandelt.

Die Einwirkung von Basen auf Zuckerphosphate und ihre Derivate wurde schon viel bearbeitet¹⁾; die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden: Bei Verbindungen mit freier reduzierender Gruppe verläuft der Abbau unter Bildung anorganischen Phosphats schnell. So wird Glucose-6-phosphat durch 0.2*n* Alkali bei 100° in 3 Min. zu 60% abgebaut²⁾. Zu den schnell umgesetzten Verbindungen gehören auch Glucose-2-phosphat³⁾, Ribose-2-, -3- und -5-phosphat^{4,5)}, Fructose-1.6-diphosphat²⁾ und Glycerinaldehyd-3-phosphat^{6,7)}. Ganz anders verhalten sich Phosphate von Glucosiden. So werden z. B. Methylglucosid-3- und -6-phosphat⁸⁾, 1.2-Isopropyliden-glucose-3- und -6-phosphate⁸⁾, Glucose-1-phosphat²⁾ und -1.6-diphosphat⁹⁾ und die Nucleotide¹⁰⁾ vergleichsweise erheblich weniger leicht hydrolysiert. Ihre Stabilität nähert sich der von Alkyl- und Hydroxyalkylphosphaten. Diese Tatsachen sind jedoch wenig diskutiert worden. H. M. KALCKAR¹¹⁾ hat darauf hingewiesen, daß viele labile organische Phosphate, wie Enolphosphate, Acylphosphate und Amidinophosphate die Gruppierung $\begin{array}{c} \text{X}' \\ \parallel \\ \text{C}-\text{X}-\text{PO}_3\text{H}_2 \end{array}$ aufweisen. K. R. FARRAR³⁾ machte darauf aufmerksam, daß Glucose-2-phosphat in seiner Enolform diesem Typ angehört (X = O, X' = CHO) und sprach die Vermutung aus, daß das Verhalten der Verbindung beim alkalischen Abbau damit zusammenhängt. Das mag in der Tat so sein, aber uns schien,

¹⁾ L. F. LELOIR, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] **8**, 47 [1951].

²⁾ W. KISSLING, Biochem. Z. **298**, 421 [1938].

³⁾ K. R. FARRAR, J. chem. Soc. [London] **1949**, 3131.

⁴⁾ F. BARON und D. M. BROWN, J. chem. Soc. [London] **1955**, 2855.

⁵⁾ J. X. KHYM, D. G. DOHERTY und W. E. COHN, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5523 [1954].

⁶⁾ O. MEYERHOF und K. LOHMANN, Biochem. Z. **271**, 89 [1934].

⁷⁾ E. BAER und H. O. L. FISCHER, J. biol. Chemistry **150**, 223 [1943].

⁸⁾ E. E. PERCIVAL und E. G. V. PERCIVAL, J. chem. Soc. [London] **1945**, 874.

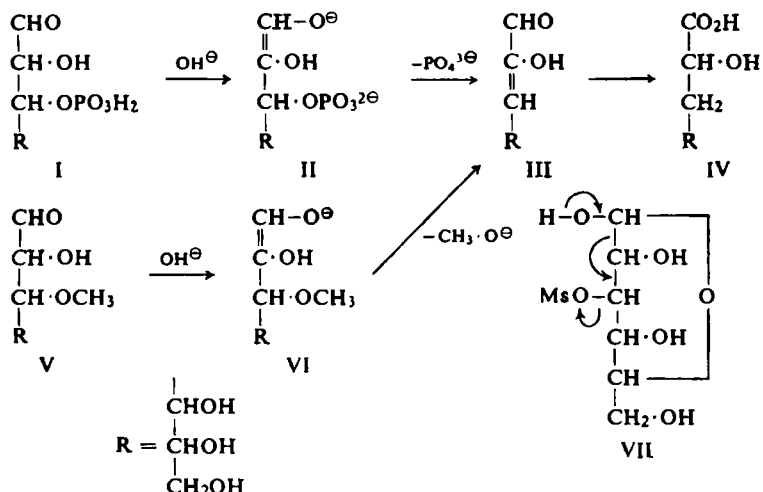
⁹⁾ C. E. CARDINI und Mitarbb., Arch. Biochemistry **22**, 87 [1949].

¹⁰⁾ Lit. siehe bei D. M. BROWN und A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] **1952**, 52.

¹¹⁾ Chem. Reviews **28**, 71 [1941].

daß für den Abbau anderer Zuckerphosphate eine andere Erklärung erforderlich sei, obgleich es denkbar ist, daß eine basenkatalysierte Wanderung ein Enolsystem in Beziehung zu einem Phosphorsäurerest an jedem Punkt der Zuckerkette bringen könnte. Dagegen spricht jedoch, daß Glucose-6-phosphat, und, wie wir nun fanden, Glucose-3-phosphat gegen Alkali erheblich labiler sind als Glucose-2-phosphat. Neuere Arbeiten ergaben, daß auch Ribose-3- und -5-phosphat erheblich schneller anorganisches Phosphat abspalten als Ribose-2-phosphat^{4,5}.

Wir⁴) sprachen die Vermutung aus, daß die Labilität von Ribose-3-phosphat gegen Alkali analog derjenigen von Glycerinaldehyd-3-phosphat¹²⁾ auf eine β -Eliminierungsreaktion anstatt auf einfache Hydrolyse zurückzuführen sei. Im letzteren Fall ist das organische Produkt Milchsäure, deren Bildung einwandfrei auf eine wohlbekannte basenkatalysierte Umlagerung⁶⁾ aus dem Eliminierungsprodukt Brenztraubenaldehyd zurückzuführen ist. J. KENNER und G. N. RICHARDS¹³⁾ haben im Rahmen einer umfassenderen Untersuchung gezeigt, daß aus 3-Methyl-glucose (V) in verdünntem Kalkwasser unter Eliminierung von Methanol α - und β -Glucometasaccharinsäure gebildet werden und haben den Mechanismus der Reaktion (V–VI–III–IV) klar beschrieben¹⁴⁾. Die hier veröffentlichte Arbeit über Glucose-3-phosphat zeigt, daß dieses ebenfalls in Glucometasaccharinsäure umgewandelt wird.



Glucose-3-phosphat, das bereits von P. A. LEVENE und A. L. RAYMOND¹⁵⁾ sowie von PERCIVAL und PERCIVAL⁸⁾ erhalten worden war, wurde bequemer und in hoher Ausbeute durch Phosphorylierung von 1,2,5,6-Di-isopropyliden-glucose mit Phosphorsäure-diphenylester-chlorid und anschließende Hydrogenolyse zur Entfernung der Phenylreste dargestellt. Die 5,6-Isopropylidengruppe wurde durch die Acidität der

¹²⁾ D. M. BROWN, M. FRIED und A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] 1955, 2206; R. P. LINSTEAD, L. N. OWEN und R. F. WEBB, ebenda 1953, 1211.

¹³⁾ J. chem. Soc. [London] 1954, 278.

¹⁴⁾ Siehe auch A. L. RAYMOND in Organic Chemistry ed. H. Gilman, II, S. 1605 (2nd ed.), Wiley & Sons Inc., New York 1942.

¹⁵⁾ J. biol. Chemistry 89, 484 [1930].

Lösung abgespalten, der zweite Isopropylidenrest durch kurzes Kochen einer wäßrigen Lösung mit dem Sulfonsäureharz Dowex-50 entfernt. Das Produkt ließ sich als kristallines Cyclohexylaminsalz leicht charakterisieren.

Da Hydroxyalkylphosphate in saurem Milieu zu Phosphorylwanderungen neigen¹⁰⁾, wurde das Produkt auf Einheitlichkeit geprüft. Es ergab auf Papierchromatogrammen einen Fleck, dessen R_F -Wert dem eines nach der Methode von PERCIVAL und PERCIVAL dargestellten Vergleichspräparats entsprach und von denen von Glucose-2-, -4-¹⁶⁾ und -6-phosphat, die alle durch Ionenaustausch-Chromatographie im Borat-System voneinander getrennt werden konnten, verschieden war. Wir fanden, daß die säurekatalysierte Phosphatwanderung bei Glucose-3-phosphat weniger leicht erfolgt als bei den Ribosephosphaten⁵⁾.

Glucose-3-phosphat wird durch Natrium- oder Bariumhydroxydlösung rasch in ein einziges saures Produkt umgewandelt (100% in 3 Min. mit 0.2*n* NaOH bei 100°). Dieses wurde in hoher Ausbeute als Calciumsalz isoliert und erwies sich als eine Mischung der α - und β -Glucometasaccharinsäuren (IV). Das reine β -Isomere wurde durch fraktionierte Kristallisation erhalten und als Anilid charakterisiert. Zum weiteren Beweis, daß es sich um eine geradkettige Saccharinsäure handelte, wurde das Produkt durch RUFFSchen Abbau in 2-Desoxy-D-ribose übergeführt, die als kristallines Anilid charakterisiert wurde.

Diese Experimente zeigen, daß unter den angewandten Bedingungen eine basenkatalysierte Eliminierung von Phosphat aus Glucose-3-phosphat unter Bildung von Glucometasaccharinsäure als stabilem Endprodukt stattfindet, analog zum Abbau der 3-Methyl-glucose. Es ist von einigem Interesse, daß das Zuckerphosphat nicht in derselben Weise abgebaut wird wie 3-Methansulfonyl-glucose, die unter Einwirkung von Alkali (schon bei Zimmertemperatur) in 2-Desoxy-D-ribose übergeführt wird. Wir glauben, daß die Eliminierung von Phosphat aus Glucose-3-phosphat durch Entfernung eines Protons von C-2 eingeleitet wird und so das offenkettige Enolation II entsteht, während D. C. C. SMITH¹⁷⁾ aus gutem Grund annimmt, daß der Abbau der 3-Methansulfonyl-glucose durch Verlust des Protons der Hydroxylgruppe an C-1 der Pyranoseform des Zuckerderivats VII verursacht wird. Es ist unklar, welche Faktoren den Verlauf der Reaktion in jedem Fall bestimmen, und es mag sein, daß, wie bei der Einwirkung von Alkali auf die freien Zucker selbst, geringe Änderungen der Reaktionsbedingungen zu anderen Produkten führen^{18,19,20)}.

Nach Behandlung von Ribose-3-phosphat mit Alkali ergab die papierchromatographische Untersuchung, daß eine einzige saure Substanz entstanden war, die sich von Milchsäure und Ribonsäure unterschied, jedoch die gleichen Charakteristika aufwies wie 2.4.5-Trihydroxy-valeriansäure, die durch Oxydation von 3-Desoxy-L-xylose²⁰⁾ dargestellt worden war. Das Produkt wurde als amorphes Bariumsalz isoliert. Die Analyse ergab nahezu die für eine C₅-Saccharinsäure berechneten Werte. Wegen der

16) F. J. REITHEL und C. K. CLAYCOMB, J. Amer. chem. Soc. **71**, 3669 [1949].

17) Chem. and Ind. **1955**, 92.

18) A. KUSIN, Ber. dtsch. chem. Ges. **69**, 1041 [1936].

19) W. L. EVANS, Chem. Reviews **31**, 537 [1942].

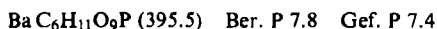
20) S. MUKHERJEE und A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] **1947**, 969.

relativen Unzugänglichkeit des Ribose-3-phosphats war es nicht möglich, die Struktur ihres Abbauprodukts vollständig sicherzustellen, aber es spricht alles dafür, daß auch die alkalische Dephosphorylierung von Ribose-3-phosphat ein β -Eliminierungsprozeß ist.

Glucose-6-phosphat und Ribose-5-phosphat werden durch Alkali etwa ebenso schnell entphosphoryliert wie die entsprechenden 3-Phosphate. Obgleich wir sie noch nicht untersucht haben, möchten wir vermuten, daß auch sie im wesentlichen nach dem gleichen Schema abgebaut werden, daß jedoch eine Wanderung der Carbonylfunktion in die β -Stellung zur Phosphatgruppe oder, wahrscheinlicher, eine Retroaldolspaltung der Zuckerkette vorangehen muß.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Glucose-3-phosphat: Eine Lösung von 36 ccm *Phosphorsäure-diphenylester-chlorid* in 100 ccm trockenem Pyridin wurde bei Zimmertemperatur langsam einer Lösung von 38 g *1.2.5.6-Di-isopropyliden-glucose* in trockenem Pyridin (200 ccm) zugefügt. Nach zweitägigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur unter Ausschluß von Feuchtigkeit wurde Pyridin-hydrochlorid abfiltriert und die Lösung in Eiswasser gegossen. Die Mischung wurde mit Chloroform extrahiert, der Extrakt mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. unterhalb von 40° zum Sirup konzentriert. Der Sirup (72 g) wurde zweimal mit wäbr. Äthanol eingedampft und schließlich in 200 ccm Äthanol gelöst. Die Lösung wurde bei Zimmertemperatur unter Druck über Platinoxid (1.8 g) hydriert, bis keine Wasserstoffaufnahme mehr erfolgte (32 l). Nach Entfernung des Katalysators wurde mit Wasser versetzt und der größte Teil des Äthanols i. Vak. entfernt. Die wäbr. Lösung wurde mit einem Überschuß von Dowex-50 (H-Form) 5 Min. auf 100° erhitzt. Nach Abkühlen und Entfernung des Ionenaustauschers wurde die Lösung mit methanol. Brucin auf p_{H} 5.4 gebracht. Das sofort auskristallisierende Brucinsalz, 123 g (90% d. Th.), wurde umkristallisiert und nach LEVENE und RAYMOND¹⁵⁾ in das *Bariumsalz* umgewandelt.



Das Bariumsalz (0.27 g) wurde in Wasser gelöst und die Lösung durch eine Säule mit Dowex-50 (Cyclohexylammonium-Form) gegeben. Durch Eindampfen des Durchlaufs und der wäßrigen Waschlösungen i. Vak. wurde *Cyclohexylammonium-glucose-3-phosphat* (0.17 g) erhalten, das aus wäbr. Methanol umkristallisiert wurde. Schmp. 144° . Zur Analyse wurde das Material bei $50^\circ/0.1$ Torr getrocknet.



Wenn man eine Lösung direkt nach der Hydrierung in der üblichen Weise mit Bariumhydroxyd behandelte, auf ein kleines Volumen eindampfte und 4 Vol.-Tle. Äthanol zusetzte, so erhielt man *Barium-1.2-isopropyliden-glucose-3-phosphat*⁸⁾ in hoher Ausbeute. Dieses wurde aus wäbr. Lösung durch Aceton als amorphes Pulver gefällt.



Die Salze des Glucose-3-phosphats wurden durch Papierchromatographie im System Propanol-(2) – Ammoniak – Wasser (70:10:20) mit einem nach der Methode von PERCIVAL und PERCIVAL⁸⁾ gewonnenen Präparat verglichen. Es trat nur je ein Fleck mit identischen R_{F} -Werten (0.17) auf. Die Mono- und Di-isopropylidenderivate hatten R_{F} -Werte von 0.36 und 0.48.

Glucose-2-phosphat wurde aus einem von K. R. FARRAR³⁾ freundlicherweise zur Verfügung gestellten Präparat von 1.3.4.6-Tetraacetyl-glucose-2-diphenylphosphat dargestellt.

Glucose-4-phosphat wurde freundlicherweise von Dr. F. J. REITHEL als Natriumsalz zur Verfügung gestellt¹⁶⁾.

Die Glucosephosphate konnten durch Papierchromatographie im System Propanol-(2)–1-proz. wäbr. Borsäure–10-proz. wäbr. Ammoniak (50:25:1) getrennt werden. Die 2-, 3- und 4-Phosphate hatten in dieser Reihenfolge R_F 0.19, 0.11 und 0.21.

Anionen-Austauscher-Analyse der Glucose-phosphate: Die angewandten Methoden waren den in einer früheren Untersuchung der Ribose-phosphate⁴⁾ beschriebenen ähnlich. Eine Säule (1 cm Querschnitt, 9 cm Länge) mit Dowex-2 (Chlorid-Form) wurde benutzt, 10-ccm-Fractionen wurden gesammelt. Die Glucose-Derivate wurden in jeder Fraktion nach der Anthron-Methode²¹⁾ bestimmt. Glucose-2- und -4-phosphat (Maxima in Frakt. 27 bzw. 22) wurden durch 0.05 *m* Ammoniumchlorid-0.01 *m* Borax (Lösung A) eluiert.

Glucose-3-phosphat wurde nach Durchlauf von 500 ccm Lösung A durch 0.06 *m* Ammoniumchlorid (Lösung B) (Maximum in Frakt. 11 von Lösung B) eluiert. Glucose-6-phosphat wurde nach Durchlauf von 500 ccm Lösung A durch 0.05 *m* Ammoniumchlorid-0.001 *m* Borax (Lösung C) (Fraktion 18 von Lösung C) eluiert.

Die Analysen zeigten, daß Glucose-3-phosphat weder durch -2- noch -4- oder -6-phosphat verunreinigt war.

In einem Versuch, bei dem 150 mg reines Barium-glucose-3-phosphat in 30 ccm Wasser unter Rühren mit Dowex-50 (H-Form) 2 Stdn. auf 100° erhitzt wurden, zeigte die Ionenaustauscher-Analyse, daß 44% zu Glucose hydrolysiert worden waren, 49% unverändert waren und die übrigen 6% aus einer Mischung von Glucose-2- und -4-phosphat bestanden.

Alkalischer Abbau von Glucose-3-phosphat

a) *Kinetik der Phosphatabspaltung:* Das reine Cyclohexylaminsalz wurde in Natronlauge auf 100° erhitzt; nach bestimmten Zeitabständen wurden aliquote Teile zur Bestimmung von anorganischem Phosphat entnommen. In 0.2 *n* Alkali war die Abspaltung von anorganischem Phosphat nach 3 Min. vollständig, in 0.01 *n* Alkali wurden 50% nach 6 Min., 100% nach 80 Min. abgespalten.

b) *Isolierung der Glucometasaccharinsäure:* Barium-glucose-3-phosphat (21.5 g) wurde mit 0.2 *n* Bariumhydroxyd 1 Stde. auf 100° erhitzt. Nach Abfiltrieren von Bariumphosphat wurde die phosphatfreie Lösung zunächst zur Entfernung der Bariumionen mit Dowex-50 (H-Form), anschließend mit Tierkohle behandelt. Die Lösung, die auf Papierchromatogrammen nur einen, der Metasaccharinsäure entsprechenden Fleck lieferte, wurde mit gesätt. Kalkwasser neutralisiert und zur Trockne eingedampft. Aus dem sirupösen Rückstand wurde durch Behandlung mit Äthanol ein weißes Pulver (9 g; 83% d. Th.) erhalten, das aus wäbr. Methanol fraktioniert umkristallisiert wurde. Die erste Fraktion (3.2 g) lieferte nach zwei Umkristallisationen 1.8 g *Calcium-β-glucometasaccharinat*, $[\alpha]_D^{21}$: -25.5° ($c = 2$, in Wasser) (Lit.: -22.5° ¹³⁾ bzw. -23.25° ²²⁾).



Die übrigen Fraktionen, Mischungen des α - und β -Isomeren, wurden als amorphe Pulver erhalten.

²¹⁾ D. L. MORRIS, Science [New York] **107**, 254 [1948].

²²⁾ J. U. NEF, Liebigs Ann. Chem. **376**, 1 [1910].

Anilid der β -Glucometasaccharinsäure: Dieses wurde nach der Methode von J. W. GREEN²³⁾ aus dem krist. Calciumsalz (0.6 g) dargestellt. Es wurde aus Äthylacetat-Äthanol umkristallisiert (0.35 g); Plättchen vom Schmp. 126–127°; $[\alpha]_D^{20}$: -60° ($c = 1.55$, in 95-proz. Äthanol).

$C_{12}H_{17}O_5N$ (155.0) Ber. C 56.7 H 6.7 N 5.5 Gef. C 56.4 H 7.0 N 5.7

2-Desoxy-N-phenyl-ribosylamin: Die Lösung von 2 g Bariumacetat und 0.5 g Eisen(III)-sulfat in 25 ccm Wasser wurde mit 5 g des oben beschriebenen amorphen Calciumsalzes in 400 ccm Wasser versetzt und auf 100° erhitzt. Nach Filtrieren und Abkühlen wurden 5 ccm 30-proz. Wasserstoffperoxyd hinzugefügt. Die Temperatur stieg auf 55°. Nach 30 Min. wurden noch 5 ccm Wasserstoffperoxyd zugesetzt. Die Lösung wurde über Nacht stehen gelassen, filtriert, nacheinander mit Dowex-50 (H-Form) und Amberlite IR-4B behandelt und i. Vak. zum Sirup konzentriert. 125 g Anilin in 50 ccm Äthanol wurden hinzugefügt und die Lösung 5 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Über Nacht schied sich bei Zimmertemperatur 1.6 g *2-Desoxy-N-phenyl-ribosylamin*, Schmp. 166–170°, ab. Nach dreimaligem Umkristallisieren wurden 0.4 g Plättchen vom Schmp. 171–173° erhalten (Lit.²⁴⁾: 172–173°).

$C_{11}H_{15}O_3N$ (209.0) Ber. C 63.1 H 7.2 N 6.7 Gef. C 62.7 H 7.2 N 6.75

Alkalischer Abbau von Ribose-3-phosphat

a) *Chromatographische Untersuchung*: 11 mg Barium-ribose-3-phosphat wurden mit 1 ccm 0.2 n $Ba(OH)_2$ 1 Stde. auf 100° erhitzt. Nach Entfernung der Barium-Ionen mit Dowex-50 (H-Form) wurde mit Ammoniak neutralisiert. Die Papierchromatographie in Äthanol–Ammoniak–Wasser (80:4:16) ergab einen Fleck (R_F 0.38), der durch Besprühen mit Bleitetraacetat oder Perjodat sichtbar gemacht wurde. Milchsäure (R_F 0.48), Brenztraubensäure (R_F 0.22), Ribonsäure (R_F 0.24) und *L-erythro-2.4.5-Trihydroxy-valeriansäure* (R_F 0.38) wurden als Vergleichssubstanzen chromatographiert.

b) *Isolierung von Ribosaccharinsäure*: 220 mg *Dibrucin-ribose-3-phosphat* wurden mit 12 ccm 0.2 n $Ba(OH)_2$ behandelt. Das Brucin schied sich sofort ab; die Mischung wurde 1 Stde. auf 100° erhitzt, der unlösliche Rückstand durch Zentrifugieren entfernt, der Überstand mit Kohlendioxyd neutralisiert und das Bariumcarbonat entfernt. Das Filtrat wurde i. Vak. konzentriert und das Bariumsalz mit 4 Vol.-Tln. Äthanol gefällt. Das hygroskop. amorphe Pulver wurde durch Umfällen gereinigt und bei 50° getrocknet.

$BaC_{10}H_{18}O_{10} \cdot 3H_2O$ (489.5) Ber. C 24.5 H 4.9 Gef. C 24.8 H 4.6

Ein kleiner Teil der Substanz wurde nach J.W. GREEN²³⁾ über das Lacton in das Anilid übergeführt und chromatographiert. Im System Aceton–Wasser–Benzol (19:1:2) wurde ein einziger Fleck beobachtet. Den gleichen R_F -Wert zeigte ein bei der Chromatographie der rohen Saccharinsäuren, die durch die Einwirkung von Alkali auf D-Ribose erhalten worden waren, auftretender Fleck.

²³⁾ J. Amer. chem. Soc. 76, 5791 [1954]; 78, 1894 [1956].

²⁴⁾ G. N. RICHARDS, Chem. and Ind. 1953, 1035.