

HELMUT SIMON und DIETER PALM

Kinetik und Mechanismus der Hydrolyse von *N*-Glykosiden

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München

(Eingegangen am 3. Juli 1964)

Für die *N*-Glucoside von *p*-Nitranilin (I), *p*-Toluidin (II), Benzylamin (III) und Piperidin (IV) wurde die Hydrolysegeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration bei 0.2° mit Hilfe der radioaktiven Verdünnungsanalyse untersucht. In allen Fällen zeigt sich ein ausgeprägtes *RG**)-Maximum. Es liegt für I in 44-proz. Perchlorsäure ($H_0 = -2.3$), für II, III und IV bei pH 1.5, 5.0 und 5.0. In 2*n* HCl ist IV bei 0° völlig stabil. Die Verhältnisse der *RG* im Maximum zu denen im Bereich von pH 9–13 sind bei den vier Glucosiden um Größenordnungen verschieden. Ab pH 12 bis 13 wird bei II, III, IV mit zunehmender Alkalität ein starker Anstieg der Amin-Freisetzung gefunden. Es ist jedoch fraglich, ob es sich hierbei um eine Hydrolyse handelt. Für I und II wurden bei je einem pH-Wert die Aktivierungsgrößen bestimmt. Die Reaktion zeigt allgemeine Säurekatalyse. Die *RG* der I und II entsprechenden Mannoside sind ca. 6 mal größer, wie bei einem pH-Wert bestimmt wurde. Es wird ein Mechanismus vorgeschlagen.

Den *N*-Glykosiden kommt in verschiedener Hinsicht Bedeutung zu. Sie stehen im Mittelpunkt der zahlreichen Reaktionen, derer das System Zucker/Amin fähig ist¹⁾. Weiterhin sind sie Bestandteile der Nucleinsäuren und wichtiger Co-Enzyme.

Über die ungefähre relative Stabilität von *N*-Glykosiden liegen zahlreiche Befunde vor^{1,2)}. Es wurden sowohl verschiedene Zucker^{1,3,3a)} mit dem gleichen Aglykon wie der gleiche Zucker mit verschiedenen Aminen⁴⁾ verglichen.

Dabei wurde meist die Hydrolysegeschwindigkeit auf indirektem Wege bestimmt, indem man die Änderung der optischen Drehung verfolgte. Es ist jedoch fraglich, wie weit dieses Verfahren eindeutig ist, da Folge- bzw. evtl. Nebenreaktionen zu Produkten mit einem unbekanntem Drehungsbeitrag führen können. Nach dieser Methode bestimmten S. HOLTON und O. RUNQUIST⁵⁾ auch die Gleichgewichtskonstanten der Hydrolyse einiger *N*-Aryl-D-glucosylamine.

Erstaunlicherweise liegen praktisch keine qualitativen oder quantitativen Untersuchungen über die Hydrolysekinetik in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration vor. Lediglich von ISBELL und FRUSH³⁾ wurden einige Untersuchungen an Glucosyl-, Mannosyl-, Arabinosyl- und Xylosylamin durchgeführt. Es erhebt sich jedoch die Frage, wie weit die von diesen Autoren erhaltenen Ergebnisse für eigentliche

*) *RG* = Reaktionsgeschwindigkeit.

1) G. P. ELLIS und J. HONEYMAN, *Advances Carbohydrate Chem.* **10**, 95 [1955]; J. E. HODGE, *ebenda* **10**, 169 [1955].

2) F. MICHEEL und A. HEESING, *Chem. Ber.* **94**, 1814 [1961], siehe dort auch weitere Literatur.

3) H. S. ISBELL und H. L. FRUSH, *J. org. Chemistry* **23**, 1309 [1958]. a) B. N. STEPANENKO, V. A. IGNATYUK-M. und M. G. CHENTSOVA, *Doklady Akad. Nauk SSSR* **154**, 650 [1964]; *C. A.* **60**, 12096 [1964].

4) A. WACKER und L. TRÄGER, *Z. Naturforsch.* **18b**, 13 [1963].

5) *J. org. Chemistry* **26**, 5193 [1961].

N-Glykoside typisch sind, da schon E. MITTS und R. M. HIXON⁶⁾ darauf hinwiesen, daß *D*-Glucosylamin in der Stabilität der *N*-Glykoside eine Ausnahmestellung einnimmt. Über den Mechanismus der Hydrolyse existieren bisher nur zwei Vorschläge^{2,3)}.

Wir untersuchten deshalb die Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration für folgende vier *N*-Glucoside: *p*-Nitranilin-*N*- β -*D*-glucosid (I), *p*-Toluidin-*N*- β -*D*-glucosid (II), Benzylamin-*N*-*D*-glucosid *) (III) und Piperidin-*N*- β -*D*-glucosid (IV).



I: R = (*p*)O₂N-C₆H₄-NH-

II: R = (*p*)H₃C-C₆H₄-NH-

III: R = C₆H₅-CH₂-NH-

IV: R = N-

Die von uns gewählten Amine unterscheiden sich sehr stark in ihren pK_s -Werten. Diese betragen für *p*-Nitranilin 1.1⁷⁾, *p*-Toluidin 5.05⁷⁾, Benzylamin 9.4⁷⁾ und Piperidin 11.1⁸⁾.

Die Temperaturabhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit bestimmten wir bei einem pH-Wert für I, II und III. Der Einfluß der Konfiguration an C-2 der Hexose wurde durch Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeit von I und II mit *p*-Nitranilin-*N*- β -*D*-mannosid und *p*-Toluidin-*N*- β -*D*-mannosid ermittelt.

METHODIK

Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten wurden die 0.01 *m* Lösungen der *N*-Glykoside in einem Puffer oder reiner Säure bzw. Lauge in einem Thermostaten bei einer Temperaturkonstanz von $\pm 0.1^\circ$ gehalten. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen, evtl. abgekühlt und sehr rasch auf einen pH-Wert gebracht, bei dem die Hydrolysegeschwindigkeit vernachlässigbar gering ist. Die Menge des durch Hydrolyse freigesetzten Amins wurde meist durch Zugabe von tritiummarkiertem Amin und anschließende radioaktive Verdünnungsanalyse im allgemeinen mit einem Fehler $< \pm 2\%$ bestimmt. Es wurde sorgfältig geprüft, daß der T-Gehalt der für die Verdünnungsanalyse verwendeten Amine unter den Aufarbeitungsbedingungen konstant blieb. Da die Mutarotation sehr viel rascher abläuft als die Hydrolyse, spielt es keine Rolle, ob man von α - oder β -Formen der *N*-Glykoside ausgeht. Bei der für die Hydrolyse gewählten Konzentration zeigte sich bis zu 2 Halbwertszeiten keine Rückreaktion, wie durch Linearität der Konzentrations-Zeitkurven im halblogarithmischen Maßstab festgestellt wurde. Bei der Untersuchung von III und IV wurden einzelne Punkte durch titrimetrische Bestimmung der freigesetzten Amine, die mit Äther extrahiert worden waren, ermittelt. Bei den angewandten Reaktionsbedingungen sind die freigesetzten Amine völlig stabil. Die Glykoside erfuhren, wie durch papierchromato-

*) Aufgrund der Richtung der Drehwertsänderung bei der Mutarotation die β -Form.

6) J. Amer. chem. Soc. 66, 483 [1944].

7) LANDOLT BÖRNSTEIN, Physik.-Chem. Tabellen, 2. Ergänzungsband, S. 1092, 5. Aufl., J. Springer, Berlin 1932.

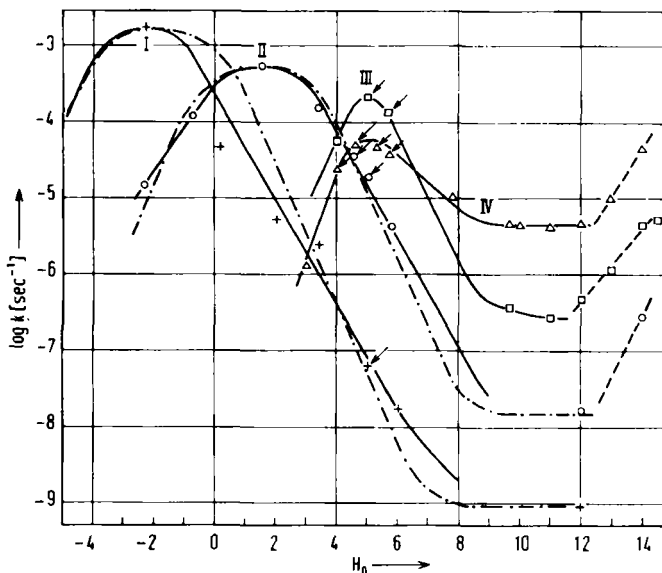
8) Handbook of Chemistry and Physics, S. 1742, 41. Aufl., Chemical Rubber Publishing Co. 1960.

graphische Produktanalyse und durch Test mit Tillmans-Reagenz geprüft wurde, keine Amadori-Umlagerung oder sonstige Veränderungen. Ob dies auch für den stark alkalischen Bereich gilt, wurde nicht geprüft.

Auch bei Hydrolyse in 0.5*m* Lösungen (50fache Konzentration im Vergleich mit den kinetischen Hydrolyseansätzen der *N*-Glykoside) konnte keine Bildung von Disacchariden festgestellt werden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Abbild. 1 ist der Logarithmus der *RG*-Konstanten 1. Ordnung der *N*-Glucoside I, II, III und IV von H_0 -4 bis pH 14 bei 0.2° dargestellt. Es zeigt sich in jedem Fall ein ausgeprägtes *RG*-Maximum, das in umso stärker saurem Gebiet liegt, je schwächer



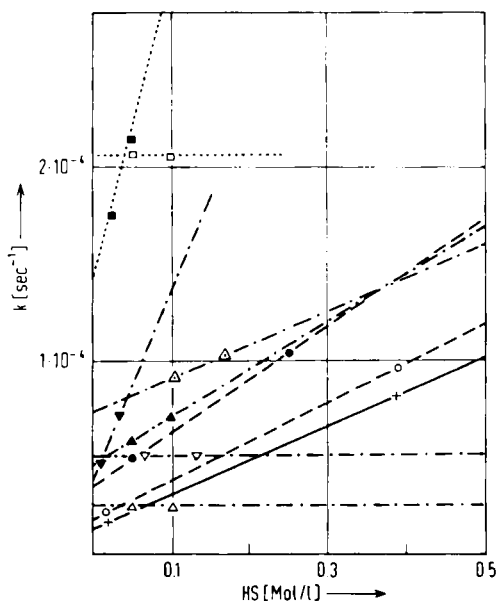
Abbild. 1. Abhängigkeit der Hydrolysekonstante von *p*-Nitranilin- (I), *p*-Toluidin- (II), Benzylamin- (III) und Piperidin-*N*- β -D-glucosid (IV) von der Säurefunktion H_0 . Für I und II sind neben den experimentellen Kurven die für Fall E gerechneten Kurven gezeichnet - · - · - (vgl. Text). An den mit Pfeilen versehenen Stellen wurde die Abhängigkeit der *RG* von der Gesamtsäurekonzentration bestimmt

basisch die Aminkomponente des Glucosids ist. Das Maximum von I liegt erst in 44-proz. Perchlorsäure. Im Gegensatz dazu ist, wie z. B. in einem gesonderten Versuch festgestellt wurde, die Hydrolysegeschwindigkeit von Piperidin-*N*- β -D-glucosid (IV) bei 0° schon in 2*n* HCl unmeßbar langsam, so daß nach 17 Std. weder eine Hydrolyse noch sonstige Veränderungen feststellbar waren. Nach Einstellen von pH 5.8 stimmte der Hydrolyseverlauf mit früheren Messungen überein. Das Maximum der Geschwindigkeit liegt für III und IV bei pH 5. Das mit der Basizität zwischen I und III bzw. IV liegende II hat sein *RG*-Maximum bei pH 1.5. Die Hydrolysegeschwindigkeit ist bei III und IV im alkalischen Milieu über einen gewissen Bereich unabhängig vom pH-Wert. Auffallend ist der starke Anstieg der *RG* bei II, III und IV ab pH 12–13. Die

vier Glucoside unterscheiden sich nicht nur stark in der Lage des *RG*-Maximums, sondern auch im Verhältnis der größten und kleinsten *RG*. Diese Verhältnisse sind für I $2 \cdot 10^6$, für II $3 \cdot 10^4$, für III $8 \cdot 10^2$ und für IV $1.5 \cdot 10^1$.

Die Hydrolyse zeigt im Bereich von geringeren Säurekonzentrationen bis zum Geschwindigkeitsmaximum allgemeine Säurekatalyse. Da insbesondere bei I und II dieser Bereich nicht mit dem gleichen Puffer untersucht werden konnte, wurden zum Ausschluß der Abhängigkeit der *RG* vom Puffer jeweils die Werte der *RG* für die Pufferkonzentration Null bestimmt. Dazu wurde bei konstantem pH und verschiedenen Pufferkonzentrationen gearbeitet und auf die Konzentration Null extrapoliert.

Den Einfluß der undissoziierten Säure (allgemeine Säurekatalyse) für I–IV gibt Abbild. 2 zu erkennen. Da nur ein sehr kleiner positiver Salzeffekt gefunden wurde,



Abbild. 2

Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von der Konzentration der undissoziierten Säure bei konstantem pH.

+ I bei pH 5.03; ○ II bei pH 5.03; ● II bei pH 4.56; □ III bei pH 5.0; ■ III bei pH 5.65; △ IV bei pH 4.0; ▽ IV bei pH 4.6; ▲ IV bei pH 5.3; ▼ IV bei pH 5.7; △ IV bei pH 6.4

bedingt dessen Nichtbeachtung bei den geringen Pufferkonzentrationen nur einen vernachlässigbaren Fehler. Bei pH-Werten in der Nähe des *RG*-Maximums wird die Größe der allgemeinen Säurekatalyse sehr gering. Sie wurde an den in Abbild. 1 mit Pfeilen bezeichneten Stellen bestimmt. Die zahlenmäßige Wiedergabe der Hydrolysegeschwindigkeitskonstanten unter verschiedenen Bedingungen ist für die vier *N*-Glucoside sowie für *p*-Nitranilin- und *p*-Toluidin-*N*- β -*D*-mannosid in Tab. 1 zusammengestellt. Wie man ersieht, hydrolysieren die Mannoside 6–6.5 mal rascher.

Die bei pH 5.03 für I und bei pH 5.78 für II ermittelte Temperaturabhängigkeit der *RG*-Konstanten und die daraus berechnete Aktivierungsenergie und Aktivierungsentropie sind in Tab. 2 wiedergegeben.

Welche Schlüsse lassen die kinetischen Daten und die sonstigen Befunde in bezug auf den Mechanismus zu?

Tab. 1. Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse von *N*-Glykosiden unter verschiedenen Bedingungen

Reaktionsmedium	pH ^{a)}	Temp.	10 ⁷ k ₁ (sec ⁻¹) ^{d)}
<i>p</i> -Nitranilin- <i>N</i> -β- <i>D</i> -glucosid (I)			
0.01 <i>n</i> NaOH extrapoliert auf 0.2° ^{b)}	12	60.0° 0.2°	2.2 ± 0.2 0.0094 ± 0.0009
0.0323 <i>n</i> KH ₂ PO ₄ , 0.0059 <i>n</i> Na ₂ HPO ₄ extrapoliert auf 0.2° ^{b)}	6.05	76.0° 0.2°	130 ± 6 0.175 ± 0.008
0.0194 <i>n</i> Essigsäure, 0.05 <i>n</i> Natriumacetat 0.388 <i>n</i> Essigsäure, 1.00 <i>n</i> Natriumacetat extrapoliert auf 0.2° ^{b)} u. Pufferkonz. Null	5.03	60.0° 60.0° 0.2°	171 ± 12 814 ± 20 0.62 ± 0.05
0.6 <i>n</i> Essigsäure, 0.05 <i>n</i> Natriumacetat extrapoliert auf 0.2° ^{b)} u. Pufferkonz. Null	3.46	40.0° 0.2°	1360 ± 70 24.5 ± 2.5
0.013 <i>n</i> HCl, 0.087 <i>n</i> KCl	2.02	0.2°	54.7 ± 45
1 <i>n</i> HClO ₄	0.20	0.2°	453 ± 40
6 <i>n</i> HClO ₄	-2.31	0.2°	16050 ± 1500
9.2 <i>n</i> HClO ₄	-4.68	0.2°	1870 ± 150
<i>p</i> -Toluidin- <i>N</i> -β- <i>D</i> -glucosid (II)			
0.01 <i>n</i> NaOH extrapoliert auf 0.2°	12.0	60.2° 0.2°	35.8 ± 1.8 0.162 ± 0.008
0.0038 <i>n</i> Essigsäure, 0.05 <i>n</i> Natriumacetat extrapoliert auf Säurekonz. Null	5.78	0.3° 0.3°	51.2 ± 3 43.3 ± 3.7
0.0194 <i>n</i> Essigsäure, 0.05 <i>n</i> Natriumacetat 0.388 <i>n</i> Essigsäure, 1.0 <i>n</i> Natriumacetat extrapoliert auf Säurekonz. Null	5.03	0.2° 0.2° 0.2°	220 ± 15 979 ± 40 185 ± 16
0.05 <i>n</i> Essigsäure, 0.04 <i>n</i> Natriumacetat 0.25 <i>n</i> Essigsäure, 0.2 <i>n</i> Natriumacetat extrapoliert auf Säurekonz. Null	4.56	0.15° 0.2° 0.2°	500 ± 40 1040 ± 30 365 ± 30
0.089 <i>n</i> Ameisensäure, 0.0166 <i>n</i> Natriumformiat	3.35	0.15°	1560 ± 80
0.0514 <i>n</i> HCl, 0.048 <i>n</i> KCl	1.50	0.2°	5050 ± 800
3 <i>n</i> HClO ₄	-0.75	0.2°	1130 ± 50
6 <i>n</i> HClO ₄	-2.32	0.2°	144 ± 7
0.0038 <i>n</i> Essigsäure, 0.05 <i>n</i> Natriumacetat	5.78	14.9°	234 ± 15
<i>Benzylamin-N</i> -β- <i>D</i> -glucosid (III)			
0.0804 <i>n</i> NaHCO ₃ , 0.0398 <i>n</i> Na ₂ CO ₃	9.69	0.2°	3.7 ± 2
0.024 <i>n</i> Essigsäure, 0.2 <i>n</i> Natriumacetat 0.048 <i>n</i> Essigsäure, 0.4 <i>n</i> Natriumacetat extrapoliert auf Säurekonz. Null	5.65	0.2° 0.2° 0.2°	1750 ± 100 2140 ± 100 1360 ± 100
0.05 <i>n</i> Essigsäure, 0.1 <i>n</i> Natriumacetat 0.097 <i>n</i> Essigsäure, 0.2 <i>n</i> Natriumacetat extrapoliert auf Säurekonz. Null	5.0	0.2° 0.2° 0.2°	2074 ± 100 2045 ± 100 2055 ± 70
0.051 <i>n</i> Ameisensäure, 0.1 <i>n</i> Natriumformiat	4.0	0.2°	578 ± 30

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Reaktionsmedium	pH ^{a)}	Temp.	10 ⁷ k ₁ (sec ⁻¹) ^{d)}
<i>Piperidin-N-β-D-glucosid (IV)</i>			
0.0804 n NaHCO ₃ , 0.0398 n Na ₂ CO ₃	9.62	0.2°	48.4 ± 2
0.00605 n KH ₂ PO ₄ , 0.645 n Na ₂ HPO ₄	7.8	0.2°	111 ± 5
extrapoliert auf Säurekonz. Null		0.2°	106 ± 5
0.102 n KH ₂ PO ₄ , 0.0327 n Na ₂ HPO ₄	6.3	0.2°	917 ± 50
0.153 n KH ₂ PO ₄ , 0.044 n Na ₂ HPO ₄		0.2°	1020 ± 50
0.0053 n Essigsäure, 0.05 n Natriumacetat ^{c)}	5.7	0.2°	413 ± 20
0.0315 n Essigsäure, 0.3 n Natriumacetat		0.2°	704.4 ± 30
extrapoliert auf Säurekonz. Null		0.2°	375 ± 26
0.049 n Essigsäure, 0.2 n Natriumacetat	5.3	0.2°	599 ± 30
0.098 n Essigsäure, 0.4 n Natriumacetat		0.2°	718 ± 60
extrapoliert auf Säurekonz. Null		0.2°	477 ± 46
0.065 n Essigsäure, 0.05 n Natriumacetat	4.6	0.2°	508 ± 20
0.130 n Essigsäure, 0.1 n Natriumacetat		0.2°	508 ± 20
0.05 n Ameisensäure, 0.1 n Natriumformiat	4.0	0.2°	250 ± 12
0.1 n Ameisensäure, 0.2 n Natriumformiat		0.2°	247 ± 12
0.133 n Ameisensäure, 0.025 n Natriumformiat ^{c)}	3.0	0.2°	13.6 ± 2.5
<i>p-Nitranilin-β-D-mannosid</i>			
0.0194 n Essigsäure, 0.05 n Natriumacetat	5.03	60.0°	980 ± 49
<i>p-Toluidin-β-D-mannosid</i>			
0.0038 n Essigsäure, 0.05 n Natriumacetat	5.78	14.9°	1380 ± 50

^{a)} Bei hohen Säurekonzentrationen durch die Aciditätsfunktion H_0 ersetzt. ^{b)} Die Extrapolation erfolgte mit der bei pH 5.03 bestimmten Temperaturabhängigkeit, vgl. Tab. 2. ^{c)} Der pH-Wert wurde durch Säurezugabe am pH-Statgerät konstant gehalten. ^{d)} Mittelwerte aus meist 4–6 Meßpunkten pro Kinetik.

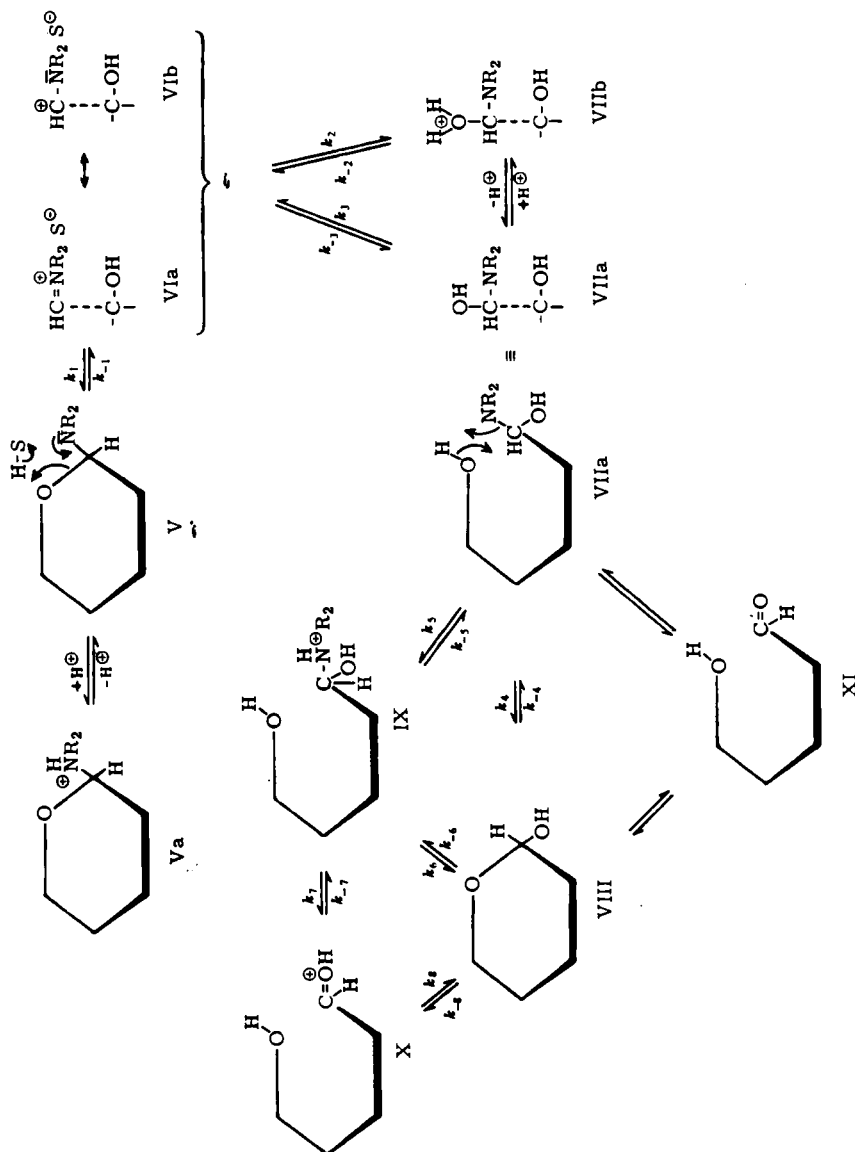
Tab. 2. Temperaturabhängigkeit von k bei der Hydrolyse verschiedener *N*-Glykoside

<i>N</i> -β-D-Glucosid	Temp. °C	10 ⁷ k ₁ (sec ⁻¹)	Δ <i>H</i> [‡] (kcal/Mol)	Δ <i>S</i> [‡] (cal/Grad·Mol)
<i>p</i> -Nitranilin- (I)	39.8	31.7	16.7 ± 0.7	-9.9
	40.0	39.6		
	59.4	150		
	60.0	175		
	76.0	621		
	76.5	550		
<i>p</i> -Toluidin- (II)	0.3	51.2	16.1 ± 0.9	-0.8
	14.9	234		
	30.0	939		
Benzylamin- (III) ^{a)}	0.2	2000	16.7	
	15.0	9650		

^{a)} Titrimetrische Bestimmungen (vgl. Methodik u. Beschreibung der Versuche).

Sowohl die Produktanalyse wie die ausgeprägten Maxima der *RG* in Abhängigkeit vom pH schließen einen Carboniumionen-Mechanismus, wie er für die Hydrolyse von *O*-Glykosiden und *S*-Glykosiden von OVEREND und Mitarbb.^{9,10)} gefunden wurde, aus.

Man muß vielmehr annehmen, wie dies auch bereits ISBELL und FRUSH³⁾ taten, daß die Protonierung des Stickstoffs ($V \rightarrow Va$) (vgl. Formelschema), nicht wie von MICHEEL



9) W. G. OVEREND, C. W. REES und J. S. SEQUEIRA, J. chem. Soc. [London] 1962, 3429.

10) C. BAMFORD, B. CAPON und W. G. OVEREND, J. chem. Soc. [London] 1962, 5138.

und HEESING²⁾ vorgeschlagen, der erste Schritt zur Hydrolyse ist, sondern ganz im Gegenteil die Hydrolyse verhindert. Je höher der Prozentsatz an *N*-protoniertem Glykosid (Va) ist, desto geringer ist die Konzentration der Form V, die zur Hydrolyse führt.

Nachdem die Hydrolyse jedoch säurekatalysiert ist und offensichtlich die *N*-Protonierung nicht zum Ziele führt, wird ein Angriff der Säure am Ringsauerstoff erfolgen. Wir nehmen an, daß sich unter Öffnung des Halbacetalrings eine Imoniumstruktur (VIa) ausbildet. Es wird von der Art des Amins abhängen, welches Gewicht die mesomere Form VIb hat. Am elektrophilen Kohlenstoff kann ein Nucleophil wie Wasser

oder ein Hydroxylion angreifen ($VIa \leftrightarrow VIb \begin{matrix} \nearrow VIIa \\ \parallel \\ \searrow VIIb \end{matrix}$). Falls der Angriff durch Wasser erfolgt, muß anschließend ein Proton abgespalten werden ($VIIb \rightarrow VIIa$), um zum Aminol (VIIa) zu kommen, das sich bei OH^- -Angriff unmittelbar bildet.

Die Weiterreaktion kann nun auf folgenden Wegen vonstatten gehen:

a) Austritt des Amins nach vorheriger Protonierung des Stickstoffs ($VIIa \rightarrow IX \rightarrow X$)³⁾. Anschließend erfolgt Ringschluß.

b) Intramolekulare Verdrängung des Amins durch eine OH-Gruppe des Zuckers unter Ringschluß ($VIIa \rightarrow VIII$).

c) Austritt des Amins beim Ringschluß nach vorheriger *N*-Protonierung ($VIIa \rightarrow IX \rightarrow VIII$).

d) Abspaltung des Amins unter Bildung der Carbonylform des Zuckers ($VIIa \rightarrow XI$)¹¹⁾.

Man kann die Frage, ob die Hydrolyse nach a), c) oder d) bzw. auf dem direkten Weg b) erfolgt, auch vom Standpunkt der Glykosidbildung betrachten.

So gestellt, heißt dann die Frage: Greift das Amin bei der Glykosidbildung die ringoffene oder die Halbacetalform des Zuckers an?

Vor einigen Jahren berichteten wir¹²⁾, daß bei der Mannosephenylhydrazon-Bildung aus β -Mannose-[1-¹⁴C] und Phenylhydrazin anfänglich ein inverser Isotopeneffekt auftritt, wenn man eine Lösung von β -Mannose und Phenylhydrazin in 0.6-proz. Essigsäure unmittelbar nach Lösen der Mannose vereinigt. Dieser inverse Isotopeneffekt wird bei nachfolgenden Produktfraktionen ständig kleiner und geht schließlich in einen normalen Wert über.

Läßt man dagegen die Mannose vor der Zugabe des Phenylhydrazins 20 Stdn. in 0.6-proz. Essigsäure stehen, so ergibt sich bereits bei der ersten Fraktion ein normaler Isotopeneffekt. Die einfachste Erklärung für diese Befunde ist, daß die β -D-Mannose neben der Mannosephenylhydrazon-Bildung eine andere Reaktion eingeht, die mit einem normalen Isotopeneffekt abläuft, und dabei die β -Form der Mannose eine Anreicherung an ¹⁴C erfährt. Das daraus sich bildende Phenylhydrazon hat daher einen höheren ¹⁴C-Gehalt als die eingesetzte Mannose. Die neben der Mannosephenylhydrazon-Bildung ablaufende Reaktion ist sicher die Mutarotation. Wird jedoch das Phenylhydrazin nach 20 Stdn. zugegeben, dann haben sich die mit ¹⁴C markierten

¹¹⁾ B. CAPON und B. E. CONNETT, Tetrahedron Letters [London] 1964, 1395.

¹²⁾ H. SIMON und D. PALM, Chem. Ber. 93, 1289 [1960].

Mannosemoleküle, von einem: sehr kleinen Gleichgewichts-Isotopeneffekt abgesehen, gleichmäßig zwischen der α - und β -Form verteilt, und es tritt ein gleichbleibender, normaler Isotopeneffekt auf. Aus den Befunden ist der Schluß zu ziehen, daß die Mannosephenylhydrazon-Bildung aus der Ringform des Zuckers erfolgt, und zwar bevorzugt aus der β -Form, da diese bei der Mutarotation der β -Mannose zur α -Mannose eine ^{14}C -Anreicherung erfährt. Dies entspräche einem Übergang VIII \rightarrow VII a oder VIII \rightarrow IX \rightarrow VII a ($\text{NR}_2 = \text{HNNHPh}$), d. h., für die Umkehrung ergibt sich der Weg b) oder c). Daß das Mannosephenylhydrazon zu einem wesentlichen Teil als *N*-Glykosid und nicht als Hydrazon vorliegt, zeigt die ausgeprägte Mutarotation, die bereits von C. L. BUTLER und L. CRETCHER¹³⁾ beobachtet wurde.

Wir untersuchten nun, wie weit die im obigen Formelschema dargestellten Mechanismen mit Hilfe von kinetischen Gleichungen überprüft werden können und wie weit dadurch die eine oder andere Möglichkeit ausgeschlossen werden kann. Aufgrund der allgemeinen Säurekatalyse könnte die Protonierung ($\text{V} \rightarrow \text{VI a} \leftrightarrow \text{VI b}$) *RG*-bestimmend sein. Bei der rechnerischen Behandlung zeigt sich jedoch, daß dabei kein *RG*-Maximum auftritt, sondern von einem gewissen pH-Wert an kompensieren sich die H^{\oplus} -Katalyse und die *N*-Protonierung. Wir nehmen daher an, daß der *RG*-bestimmende Schritt zwischen VII a und VIII liegt.

Unter dieser Voraussetzung ergeben sich aus vorstehendem Formelschema 7 Möglichkeiten. Für diese wurden kinetische Gleichungen aufgestellt. Zur Bestimmung der darin vorkommenden 3, 4 oder 5 Unbekannten wurden einige Kombinationen der bei verschiedenen pH-Werten gefundenen *RG*-Konstanten der vier Glucoside benutzt. Die sich daraus ergebenden rechnerischen Kurven wurden mit dem gefundenen Kurvenverlauf, und damit allen experimentell erhaltenen Werten, graphisch verglichen. Die rechnerische Ermittlung der Konstanten und die Tabellierung der theoretischen Kurven erfolgte mit Hilfe eines ALGOL-Programms für eine elektronische Rechenanlage^{*)}. Durch eine Fehlerrechnung nach der Methode der kleinsten Quadrate, wobei die relativen Fehler verwendet wurden, konnte ein teilweiser Ausgleich erreicht werden.

Nachfolgend sollen die oben erwähnten 7 Fälle, die zu ihrer Aufstellung gemachten Annahmen sowie der Vergleich der sie beschreibenden Gleichungen mit den experimentellen Befunden dargelegt werden.

Fall A. Annahme: Die Konzentrationen von VI und VII sind quasi-stationär. Die Reaktionsfolge $\text{V} \rightarrow \text{VI} \rightarrow \text{VII b} \rightarrow \text{VII a} \rightarrow \text{VIII}$ wird nach dem Prinzip der Quasi-Stationarität behandelt.

$$\text{Gleichung: } k = \frac{[\text{H}^+]}{a_1[\text{H}^+]^2 + b_1[\text{H}^+] + c_1} \quad (1)$$

Es ergibt sich keine Übereinstimmung mit den experimentellen Befunden.

Fall B. Annahmen wie bei A. Es wird jedoch zusätzlich berücksichtigt, daß in einer Parallelreaktion an VI außer Wasser auch OH^{\ominus} angreift.

$$\text{Gleichung: } k = \frac{[\text{H}^+]^2 + a_2[\text{H}^+]}{b_2[\text{H}^+]^3 + c_2[\text{H}^+]^2 + d_2[\text{H}^+] + e_2} \quad (2)$$

^{*)} Die Rechnung wurde an der PERM des Rechenzentrums der Technischen Hochschule München durchgeführt. Wir danken Herrn Dr. F. PEISCHL und Herrn Dipl.-Math. D. KRÖNIG für ihre Bemühungen.

¹³⁾ J. Amer. chem. Soc. 53, 4358 [1931].

Im sauren Gebiet ergibt sich relativ gute Übereinstimmung mit den experimentellen Befunden, jedoch nicht im alkalischen Bereich.

Fall C. Annahme: Vor dem Austritt der Amingruppe aus VII wird der Stickstoff protoniert. Die Reaktionsfolge $V \rightarrow VI \begin{cases} \nearrow VIIa \\ \parallel \\ \searrow VIIb \end{cases} \rightarrow IX \rightarrow VIII$ wird nach dem Prinzip der Quasi-Stationarität behandelt.

$$\text{Gleichung: } k = \frac{[H^+]^2 + a_3[H^+]}{b_3[H^+]^2 + c_3[H^+] + d_3} \quad (3)$$

Es ergibt sich keine Übereinstimmung mit den experimentellen Befunden. Die errechnete Kurve zeigt im sauren Gebiet, kurz nach dem Maximum, keine weitere Abnahme der *RG*. Außerdem führt die Berechnung der Konstanten bei I und IV teilweise zu sinnlosen negativen Werten. Damit kann dieser Fall ausgeschlossen werden.

Fälle D, E, F. Zwischen V und VI besteht ein Gleichgewicht, und D entspricht im übrigen A, E entspricht B, und F entspricht C.

$$\text{Gleichung für Fall E: } k = \frac{[H^+] + a_4}{b_4[H^+]^2 + c_4[H^+] + d_4} \quad (4)$$

Weitgehend gute Übereinstimmung des rechnerischen Kurvenzugs mit der experimentell gefundenen Kurve. Im alkalischen Bereich ergibt sich Unabhängigkeit der *RG* vom pH.

Bei pH-Werten > 13 steigt, wie bei II, III und IV gefunden wurde, die *RG* jedoch wieder stark an. Man kann mit Sicherheit annehmen, daß es sich dabei um einen Mechanismus der Freisetzung von Amin handelt, der von den diskutierten Mechanismen grundsätzlich verschieden ist. Es erhebt sich die Frage, ob die Unabhängigkeit der *RG* bei III zwischen pH 9.5 und 11.5 sowie bei IV zwischen pH 9.5 und 12 durch eine Kompensation der evtl. weiter absinkenden *RG* nach dem Hydrolysemechanismus und einem anderen „Amin-Freisetzungsmechanismus“ bewirkt wird.

Da der Fall B und der unten als letzter erwähnte Fall G zwar keine pH-Unabhängigkeit im alkalischen Bereich zeigen, jedoch die sie beschreibenden Gleichungen bei pH-Werten in der Nähe der *RG*-Maxima in die den Fall E beschreibende Gleichung übergehen, können sie nur ausgeschlossen werden, wenn die experimentell gefundene pH-Unabhängigkeit nicht durch Kompensation zustande kommt. Eine solche Kompensation ist jedoch nicht sehr wahrscheinlich. Im übrigen unterscheiden sich die Mechanismen B und G von E nicht in ihrem Chemismus, sondern lediglich in der Frage, ob Rückreaktionen zur Gleichgewichtseinstellung führen oder nicht.

Fall G. Annahme: Für alle Protonierungen und Deprotonierungen ($V \rightleftharpoons VI$, $VIIa \rightleftharpoons VIIb$, $VIIa \rightleftharpoons IX$) bestehen echte Gleichgewichte. Die übrigen Schritte werden nach dem Prinzip der Quasi-Stationarität behandelt.

Die Gleichung für Fall G ist mit der für B identisch.

Aus diesen Befunden und den Argumenten, die aufgrund des Verhaltens der Isotopeneffekte bei der fraktionierten Phenylhydrazonbildung diskutiert wurden, ist der durch die Reaktionsfolge $V \rightarrow VIa \leftrightarrow VIb \rightarrow VIIa \rightleftharpoons VIIb \rightarrow VIII$ zu kennzeichnende Mechanismus der wahrscheinlichste. Zwischen V und VI stellt sich ein echtes Gleichgewicht ein. Die Imoniumform VIa bzw. Carboniumionenform VIb addieren Wasser oder ein Hydroxylion. Insbesondere bei I dürfte VIb besonderes Gewicht

haben. Dies könnte der Grund dafür sein, daß das in 44-proz. Perchlorsäure liegende *RG*-Maximum trotz der hier schon wesentlich verringerten Wasseraktivität von allen untersuchten Fällen den höchsten Wert hat. Aus der Form VIIa wird in einer intramolekularen Reaktion das Amin verdrängt.

Die explizite Geschwindigkeitsgleichung für Fall E lautet:

$$k = \frac{k_2 k_4 K_{1a} [\text{H}_2\text{O}] [\text{H}^+] + k_3 k_4 K_{1a} \cdot 10^{-14}}{\{(K_{1a} + K_2) [\text{H}^+] + K_{1a} \cdot K_2\} (k_{-2} [\text{H}^+] + k_{-3} + k_4)} \quad (5)$$

$$\text{dabei bedeuten } K_{1a} = \frac{[\text{H}^+][\text{V}]}{[\text{Va}]} \quad K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{V}]}{[\text{VI}]}$$

Die Geschwindigkeitskonstanten sind die im Formelschema angegebenen.

Die Übereinstimmung der nach Fall E gerechneten Kurve (— · — ·) mit der experimentell gefundenen ist für die Glucoside I und II aus Abbild. 1 zu ersehen.

Entsprechend dem experimentellen Befund ergibt die Differentiation von Gleichung (5) für die Abhängigkeit zwischen Wasserstoffionenkonzentration im *RG*-Maximum und *pK*-Wert des *N*-Glucosids, wie Formel (6) zeigt,

$$[\text{H}^+]_{\text{max}} = \left(\frac{k_4 K_{1a} K_2}{(K_{1a} + K_2) k_{-2}} \right)^{1/2} \quad (6)$$

keinen einfachen Zusammenhang. Bei Gültigkeit von Fall B wäre die H^\oplus -Konzentration im *RG*-Maximum der Wurzel der Gleichgewichtskonstanten $\text{Va} \rightleftharpoons \text{V}$ proportional.

Das bei II, III und IV beobachtete starke Ansteigen der *RG* bei pH-Werten von 13–14 wird sehr wahrscheinlich durch einen gänzlich anderen Mechanismus bewirkt. So könnte z. B. von der OH-Gruppe an C-2 des Zuckers ein Proton abgespalten und in einer intramolekularen nucleophilen Verdrängung das Amin aus der Ringform des Zuckers entfernt werden.

Der von uns angenommene Mechanismus unterscheidet sich von dem kürzlich von E. H. CORDES und W. P. JENCKS¹⁴⁾ für die Hydrolyse von Schiffischen Basen angegebenen hauptsächlich durch die intramolekulare Verdrängung desamins durch eine OH-Gruppe. Das ausgeprägte *RG*-Maximum im Falle der Glucoside muß dabei nicht einen Wechsel des *RG*-bestimmenden Schritts als Ursache haben, wie dies CORDES und JENCKS¹⁴⁾ zur Erklärung des *RG*-Maximums bei der Hydrolyse der Schiffischen Base in Abhängigkeit vom pH annehmen.

Nach Abschluß unserer Untersuchungen erschien eine Arbeit von B. CAPON und B. E. CONNETT¹¹⁾, in der für die Hydrolyse von *N*-Glucosiden ebenfalls allgemeine Säurekatalyse und Abhängigkeit des *RG*-Maximums von der H^\oplus -Ionenkonzentration gefunden wurde.

Werte und sonstige Einzelheiten werden allerdings nicht angegeben. Die Autoren haben das Anomenenverhältnis der bei der Hydrolyse entstehenden Glucose durch Drehungsmessungen bestimmt und kommen, da die Drehwerte ($62 \pm 5\%$ α -D-Glucose und $38 \pm 5\%$ β -D-Glucose) innerhalb der Fehlergrenze mit dem Drehwert übereinstimmen, der für wäßrige Glucoselösungen bei Ringbildung aus Aldehydglucose zu erwarten ist, zu dem Schluß, daß die Abspaltung desamins aus Form VIIa zu XI erfolgt. Nach den Werten der Literatur für die Geschwindigkeit der Mutarotation¹⁵⁾ und den von uns gefundenen Werten für die Hydrolysegeschwindigkeiten, gibt es keine Bedingungen, unter denen die Hydrolyse so viel rascher ist

¹⁴⁾ J. Amer. chem. Soc. **85**, 2843 [1963].

¹⁵⁾ H. S. ISBELL und W. W. PIGMAN, J. Res. nat. Bur. Standards **18**, 141 [1937].

als die Mutarotation, um zu einer solchen Aussage zu kommen. Dies zeigte auch ein von uns durchgeführtes Experiment. Die Beobachtung der Autoren, wonach die Glucose noch nicht ihr Anomerengleichgewicht erreicht hat, läßt dann vielmehr vermuten, daß die Glucose zunächst in der α -Form entsteht und zum Zeitpunkt der Messung teilweise mutarotiert ist.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden vom MINISTERIUM FÜR WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG durch ein Stipendium großzügig unterstützt. Hierfür, wie für die Hilfe durch den FONDS DER CHEMISCHEN INDUSTRIE, sei an dieser Stelle bestens gedankt. Unser besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. F. WEYGAND für sein Interesse und seine Förderung. Schließlich gilt unsere Anerkennung Fräulein E. WOLF und Fräulein H. PFLAUMER für geschickte Mitarbeit und die Durchführung zahlreicher Tritiumanalysen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. Darstellung der *N*-Glykoside

p-Nitranilin-*N*- β -*D*-glucosid (I) wurde nach WEYGAND und Mitarbb.¹⁶⁾ durch Erhitzen von Glucosehydrat mit *p*-Nitranilin in 0.007 *n* methanol. HCl dargestellt. Im allgemeinen ergab sich nach einmaligem Umkristallisieren aus Methanol ein schmelzpunktkonstantes Präparat mit dem in der Literatur angegebenen Drehwert.

p-Toluidin-*N*- β -*D*-glucosid (II) wurde nach F. WEYGAND¹⁷⁾ durch Zusammenschmelzen von Glucose, *p*-Toluidin und Wasser gewonnen. Nach 2–3maligem Umkristallisieren aus 95-proz. Äthanol wurde das Monohydrat mit Schmp. 133° erhalten.

Benzylamin-*N*-*D*-glucosid (III) wurde nach C. N. CAMERON¹⁸⁾ durch Erhitzen von Glucosehydrat mit Benzylamin in 95-proz. Äthanol dargestellt. Zur Reinigung wurde in Äthanol gelöst und mit trockenem Äther bis zur Trübung versetzt. Dies wurde — im allgemeinen 4–5 mal — wiederholt, bis ein farbloses Produkt resultierte. Schmp. des gelatinös wirkenden Materials 80°.

Piperidin-*N*- β -*D*-glucosid (IV) wurde nach J. E. HODGE und C. E. RIST¹⁹⁾ durch Erhitzen (15 Min.) von wasserfreier Glucose und Piperidin auf 80° erhalten. Umkristallisiert wurde 2 mal aus Aceton/Methanol (3 : 1); Schmp. 135–136°.

p-Nitranilin-*N*- β -*D*-mannosid wurde analog I durch Erhitzen von *p*-Nitranilin und *D*-Mannose in 0.01 *n* methanol. HCl gewonnen. Umkristallisation aus Methanol und 4stdg. Trocknen i. Vak. über P₂O₅ bei 80° ergab ein Produkt vom Schmp. 227°.

p-Toluidin-*N*- β -*D*-mannosid wurde nach G. P. ELLIS und J. HONEYMAN²⁰⁾ aus Mannose und *p*-Toluidin in einer Mischung von Äthanol/0.001 *n* H₂SO₄ (2.4 : 2) dargestellt. Nach 4 Std. wurde das ausgeschiedene Produkt abgesaugt und aus 20-proz. Äthanol umkristallisiert. Schmp. 180°.

2. Darstellung der *T*-markierten Amine²¹⁾

T-markiertes Nitranilin wurde durch 3stdg. Erhitzen von 1.0 g *p*-Nitranilin, 10 ccm *HOT* und 2 ccm konz. Salzsäure im geschlossenen Rohr bei 130–140° dargestellt. Die spezif. Radioaktivität des *p*-Nitranilins betrug nach Umkristallisation aus Äthanol ca. 65%, bez. auf die halbe molare Aktivität des Wassers.

16) F. WEYGAND, W. PERKOW und P. KUHNER, Chem. Ber. **84**, 594 [1951].

17) Ber. dtsch. chem. Ges. **72**, 1663 [1939].

18) J. Amer. chem. Soc. **49**, 1759 [1927].

19) J. Amer. chem. Soc. **74**, 1494 [1952].

20) J. chem. Soc. [London] **1952**, 1490.

21) Alle *T*-Messungen wurden in der Gasphase vorgenommen; vgl. H. SIMON und F. BERTHOLD, Atomwirtschaft **1962**, 498.

Zur Darstellung von *T*-markiertem *p*-Toluidin wurden 2.00 g (14.6 mMol) *p*-Nitro-toluol, gelöst in einer Mischung von 25 mg KOH, 3 ccm Äthanol und 1.5 ccm *HOT* (2 mC/ccm), in einem geschlossenen Supremaxglasrohr 50 Stdn. auf 150° erhitzt. Zur Isolierung wurde mit Wasser ausgefällt, sodann aus Äthanol umkristallisiert. Radioaktivität $2.6 \cdot 10^7$ tpm/mMol.

Zur Reduktion wurde das *p*-Nitro-toluol in Äthanol mit Palladium/Kohle hydriert. Das *p*-Toluidin wurde als Hydrochlorid isoliert und die daraus freigesetzte Base i. Vak. sublimiert. Durch *C*-Methylbestimmung wurde ermittelt, daß sich >95% des T-Gehaltes von *p*-Toluidin in der Methylgruppe befinden.

T-markiertes Benzylamin wurde wie bei *p*-Nitro-toluidin durch Austausch markiert. Die Austauschlösung wurde mit Äther versetzt und 3 mal mit verd. Natronlauge ausgeschüttelt. Aus dem getrockneten Äther wurde das Benzylamin als Hydrochlorid isoliert. Radioaktivität $6 \cdot 10^6$ tpm/mMol.

Oxydation mit alkalischer Permanganatlösung ergab Benzoesäure, die 4% des T-Gehaltes von Benzylamin hatte. Die Hauptaktivität befand sich in der Methylengruppe.

T-markiertes Piperidin wurde durch Reduktion von Pyridin in Äthanol, dessen OH-Gruppe T-markiert war, und Natrium nach A. LADENBURG²²⁾ gewonnen.

3. Kinetische Messung durch Verdünnungsanalyse

Im allgemeinen wurden 500 ccm der entsprechenden Pufferlösung in einem Thermostaten auf die Reaktionstemp. gebracht und zur Zeit Null 5 mMol *N*-Glykosid unter Rühren zugefügt. 4–6 mal wurden nach entsprechenden Zeiten aliquote Teile entnommen und sehr rasch in vorgelegte Natronlauge gebracht. Zur Verdünnungsanalyse wurde eine genau gewogene Menge des T-markierten Amins zugesetzt.

4. Isolierung der Amine für die Verdünnungsanalyse

Das *p*-Nitrilanilin wurde mit Äther extrahiert und nach Abdestillieren des Äthers der Rückstand aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Im Falle von *p*-Toluidin, Benzylamin und Piperidin wurde ebenfalls mit Äther extrahiert, die Lösungen wurden getrocknet und durch Einleiten von Salzsäure die Hydrochloride ausgefällt. Nach Trocknen über P₂O₅ i. Vak. wurden sie auf ihren T-Gehalt analysiert.

5. Titrimetrische Bestimmung der freigesetzten Amine

Ein entsprechendes Aliquot wurde mit Lauge versetzt und rasch mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Nach Rückwaschen des Äthers mit Wasser wurde das Amin titrimetrisch bestimmt. Die Isolierung der Amine wurde für jedes Amin mit standardisierten Mengen Lauge bzw. Äther durchgeführt. In Kontrollexperimenten wurde festgestellt, wieviel von dem im Wasser befindlichen Amin auf diese Weise erfaßt wird.

²²⁾ Liebigs Ann. Chem. 247, 1 [1883]; vgl. Methoden der organ. Chemie (Houben-Weyl), Bd. XI/1, S. 728, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1957.