

Jochen Lehmann, Eduard Pfeiffer und Hellmuth Reinshagen

Reaktionen enolischer Zuckerderivate, 6¹⁾

Über den Mechanismus der säurekatalysierten Glykosidspaltung

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br. und dem Sandoz Forschungsinstitut Wien

(Eingegangen am 17. Januar 1969)

Durch säurekatalysierte Addition von Methanol an Methyl-6-desoxy- α -D- Δ^5 -xylo-hexenopyranosid (**1**) wurden die Bisglykopyranoside Methyl-5-C-methoxy-6-desoxy- α -D-glucopyranosid (**2**) und Methyl-5-C-methoxy-6-desoxy- β -L-idopyranosid (**3**) erhalten. Die Geschwindigkeit der Addition sowie die gegenseitige Umwandlung von **2** und **3** wurden gaschromatographisch verfolgt. Da keine Epimerisierung an C-1 erfolgt, wird abgeleitet, daß die saure Glykosidspaltung hier über ein cyclisches Carbonium-Oxonium-Ion verläuft.

Trotz zahlreicher Untersuchungen zum Mechanismus der säurekatalysierten Glykosidspaltung ist bis heute der Reaktionsweg unklar. Einleitender Schritt der Reaktion ist zweifellos die Protonierung von einem der beiden mit C-1 verbundenen Sauerstoffatome. Anschließend wird eine der —O—C-Bindungen gelöst und die Spaltung kann den beiden Wegen A und B folgen^{2,3)}. Bestimmend dafür, welche —O—C-Bindung geöffnet wird, ist das Ausmaß der Protonierung der einzelnen Sauerstoffatome im Gleichgewicht und die relative Stabilität des entstehenden Carbonium-Oxonium-Ions.

Beide Wege führen zum gleichen Produkt, so daß eine Produktanalyse normalerweise keine Auskunft über den Mechanismus gibt.

Allein kinetische Untersuchungen von Capon et al.⁴⁾ sowie Ferrier et al.⁵⁾ mit Hilfe isotope-markierter Verbindungen machten bisher den Mechanismus A wahrscheinlich.

In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Typ von Glykosiden für die Untersuchung der säurekatalysierten Glykosidspaltung verwendet. Die Substanzen sind so aufgebaut, daß aus den isolierbaren Produkten einer unter kontrollierten Bedingungen ausgeführten Spaltung der Mechanismus der Reaktion abzuleiten ist. Die neuen Verbindungen **2** und **3**, das Methyl-5-C-methoxy-6-desoxy- α -D-glucopyranosid und das Methyl-5-C-methoxy-6-desoxy- β -L-idopyranosid, sind Bisglykoside der 6-Desoxy-D-xylo-hex-5-ulose (**4**) und besitzen neben der aldosidischen Glykosidbindung an C-1 eine ketosidische Glykosidbindung an C-5 mit identischem Aglykon.

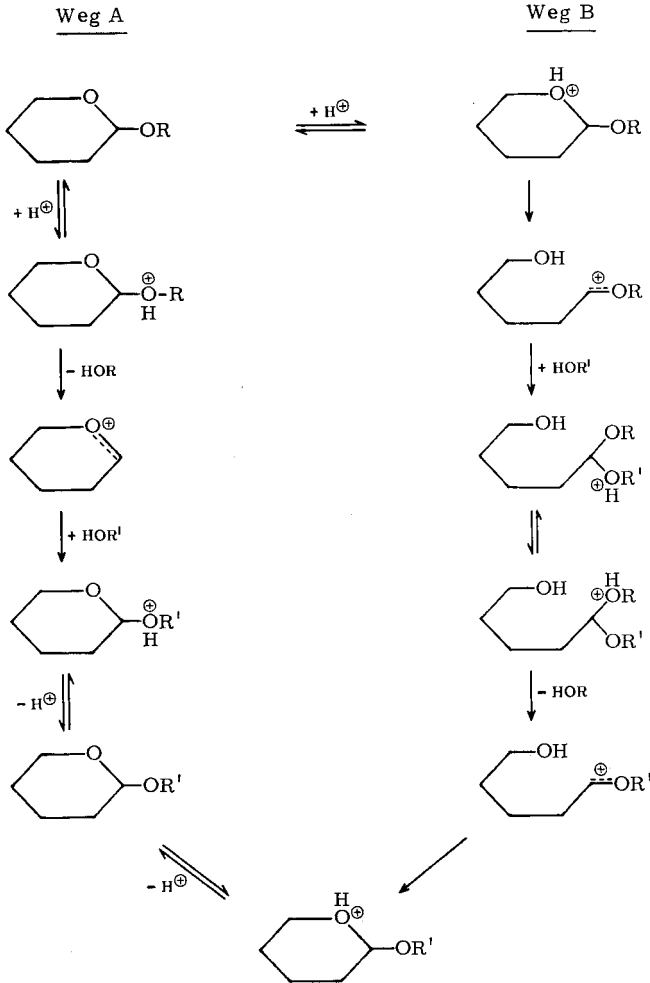
¹⁾ 5. Mitteil.: K. Herrmann und J. Lehmann, *European J. Biochem.* **3**, 369 (1968).

²⁾ E. L. Eliel, N. L. Allinger, S. J. Angyal und G. A. Morrison, *Conformational Analysis*, S. 419, Intersc. Publ., New York 1965.

³⁾ J. N. Be Miller, *Advances Carbohydrate Chem.* **22**, 27 (1967).

⁴⁾ B. Capon und D. Thacker, *J. chem. Soc. [London] B* **1967**, 1010.

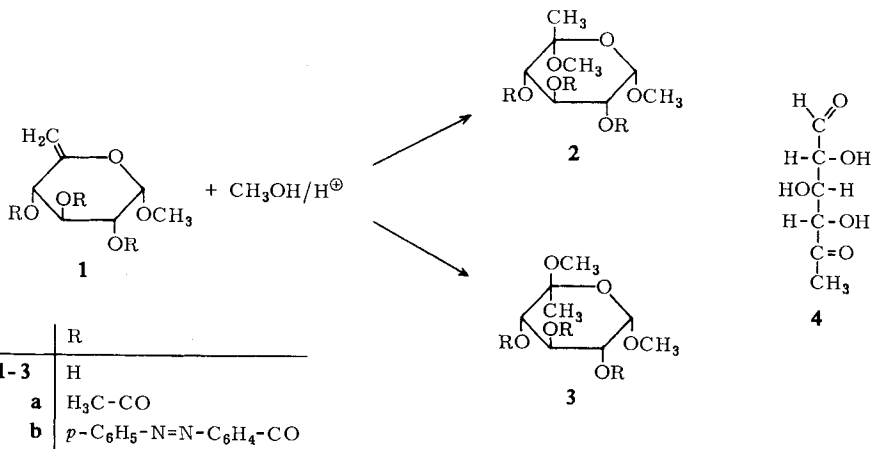
⁵⁾ R. J. Ferrier, L. R. Hatton und W. G. Overend, *Carbohydrate Res.* **8**, 56 (1968).



Ausgangsmaterial für die Synthese von **2** und **3** war das von *Helferich* et al.⁶⁾ erstmals dargestellte Methyl-6-desoxy- α -D- Δ^5 -xylo-hexenopyranosid (**1**). Durch säurekatalysierte Addition von Methanol an die enolische Doppelbindung von **1** entstanden **2** und **3** im Verhältnis 22:78.

Beim gaschromatographischen Verfolgen der Reaktion durch Probenahme in kurzen Zeitabständen und Abstoppen der Reaktion durch Acetylieren zeigte sich, daß bereits nach einer Minute **2** und **3** aus **1** entstanden waren. Nach einer Stunde war **1** fast vollständig umgesetzt, und nach 24 Stunden hatte sich das Gleichgewicht zwischen **2** und **3** eingestellt (Tab.). Diese Ergebnisse sind so zu deuten, daß zunächst die rasche Additionsreaktion einsetzt unter Bildung der beiden Anomeren **2** und **3** in etwa gleicher Menge und daß sich dieser Reaktion die Anomerisierung an C-5 durch Methanolyse überlagert. Dabei stellt sich dank der tiefen Reaktionstemperatur

⁶⁾ *B. Helferich* und *E. Himmen*, Ber. dtsch. chem. Ges. **61**, 1825 (1928).



von -16° das thermodynamische Gleichgewicht zwischen **2** und **3** nur langsam ein. Wurde die isolierte Verbindung **3** unter den beschriebenen Bedingungen allein methanolysiert, so wandelte sie sich langsam in ein Gemisch von **2** und **3** um. Nach 24 Stunden war auch hier das Gleichgewicht erreicht (siehe Tab.). Die gewählten Reaktionsbedingungen reichen — wie gezeigt werden konnte — nicht aus, eine Anomerisierung an C-1 herbeizuführen. Daß sich **2** und **3** nur in der Konfiguration an C-5 unterscheiden, geht sowohl aus den NMR-Spektren als auch aus der Tatsache hervor, daß das β -Anomere von **1** mit Methanol/HCl ein von **2** und **3** gaschromatographisch verschiedenes Anomerenpaar liefert. Im Gegensatz zu **2a** und **3a** konnten die acetylierten Produkte aus der β -Verbindung nicht in kristalliner Form isoliert werden.

Quantitative Analyse der Reaktionsgemische (exp. Teil 1) und 3)) durch Gaschromatographie^{a)}

Reaktionszeit	1	2	3	2/3
1 Min.	88.5	5.3	6.2	0.85
3 Min.	45.3	25.2	29.5	0.85
10 Min.	20.0	32.0	48.0	0.67
30 Min.	13.3	30.9	55.8	0.55
1 Stde.	5.5	29.1	65.4	0.45
24 Stdn.	—	21.8	78.2	0.28
120 Stdn.	—	22.0	78.0	0.28
24 Stdn. b)	—	22.0	78.0	0.28

^{a)} Gemessen werden die Flächeninhalte für die Einzelkomponenten im Verhältnis zur Gesamtfläche der peaks.

^{b)} Anomerisierung von **3** (exp. Teil 3)).

Die Strukturen der Verbindungen **2a** und **3a** und damit auch von **2** und **3** ergaben sich aus den Kernresonanzspektren.

2a*): τ s 8.68 (3H), 6-CH₃; 8.01 und 7.93 (9H), CH₃CO; s 6.70 und s 6.51 (je 3H), CH₃O; q 5.18 (1H), 2-H ($J_{1,2} = 5.0$, $J_{2,3} = 9.5$ Hz); t 5.01 (2H), 1-H, 4-H (Überlagerung von zwei Dubletts mit $J_{1,2} = 5$, $J_{3,4} = 9.5$ Hz); t 4.30 (1H), 3-H ($J_{2,3} = 9.5$ bzw. $J_{3,4} = 9.5$ Hz).

3a: τ s 8.51 (3H), 6-CH₃; 7.97 und 7.93 (9H), CH₃CO; s 6.69 und s 6.56 (je 3H), CH₃O; 5.03 (2H), 1-H, 2-H (Überlagerungen eines Quadrupletts mit einem Dublett: $J_{1,2} = 4.5$; $J_{2,3} = 8.5$ Hz); d 4.86 (1H), 4-H ($J_{3,4} = 8.5$ Hz); t 4.62 (1H), 3-H ($J_{2,3} = 8.5$ bzw. $J_{3,4} = 8.5$ Hz). (s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quadruplett.)

Aus den Kopplungskonstanten der Signale der Ringprotonen an den C-Atomen 1, 2, 3 und 4 geht hervor, daß die H-Atome an C-1 in beiden Verbindungen äquatorial, die an C-2, -3 und -4 axial stehen. Die Methoxygruppen an C-1 nehmen somit die axiale Lage ein. Die Konfiguration an C-1 in den Verbindungen **2** und **3** ist also gegenüber **1** unverändert.

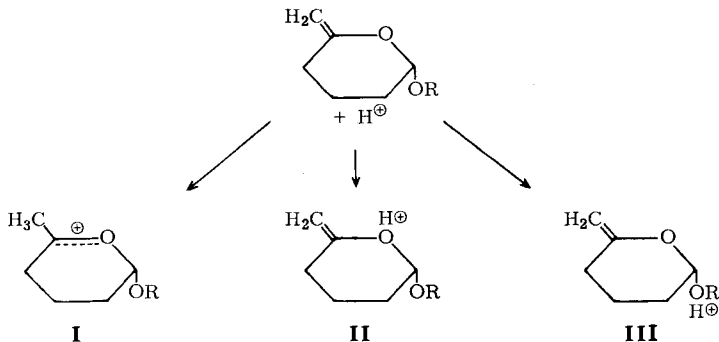
Zu klären bleibt noch die Verteilung der Methyl- und Methoxygruppen an C-5 in den Verbindungen **2a** und **3a** und somit in **2** und **3**.

Das axiale Proton an C-3 in der Verbindung, die die Methoxygruppe an C-5 axial trägt, sollte wegen der Beeinflussung durch die beiden Methoxygruppen in 1- und 5-Stellung sein Signal bei niedrigerem Feld haben als das axiale H-Atom, das 1,3-Beziehungen zu einer Methoxy- und Methylgruppe hat. Das Resonanzsignal von 3-H in **2a** liegt gegenüber **3a** um τ 0.32 (= 71 Hz) nach niedrigerer Feldstärke verschoben. Somit steht in **2a** die 5-Methoxygruppe in *cis*-Stellung, die Methylgruppe in *trans*-Stellung zur 1-Methoxygruppe. In **3a** (und folglich **3**) sind die Substituenten an C-5 gegenüber **2a** (und **2**) vertauscht.

Diskussion der Ergebnisse

In den Verbindungen **1**, **2** und **3** gibt es jeweils drei Möglichkeiten für die Addition des Protons, die zu Folgeprodukten führen kann:

a) In **1** sind dies das anomere Sauerstoffatom an C-1, das Sauerstoffatom des Ringes und das C-Atom 6. Nur bei der Addition des Protons an C-6 entsteht ein Carbonium-Oxonium-Ion (**I**), ohne daß eine Bindung gespalten werden muß. Da dieses Carbonium-Oxonium-Ion die Ladung über 2 Atome verteilen kann, wird es deutlich stabiler sein als die durch bloße Protonaddition entstehenden Oxonium-Ionen **II** und **III**.

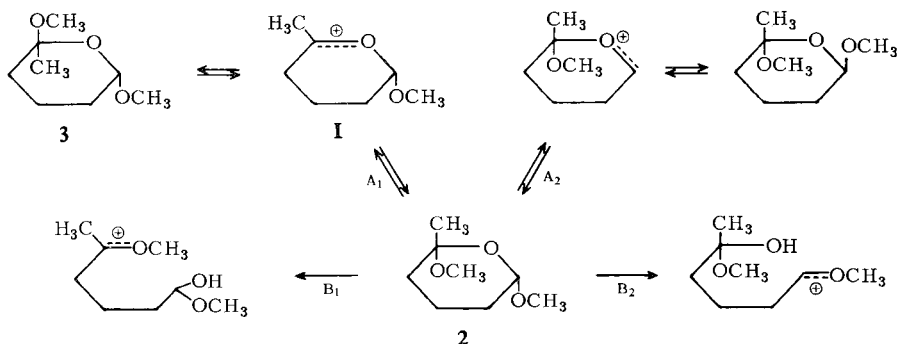


* Die NMR-Spektren wurden mit dem Varian HR 220 in CDCl₃ mit Trimethylsilan als innerem Standard gemessen.

Die Addition von Methanol an das Ion **1** führt zur Bildung der beiden anomeren Glykoside **2** und **3**. Es darf geschlossen werden, daß die von *Helferich* et al. beschriebene, außerordentlich leicht verlaufende Hydrolyse von **1** zu **4** durch eine analoge Addition von Wasser an die Doppelbindung eingeleitet wird.

b) In **2** und **3** kann sich das Proton an die anomeren Sauerstoffatome in Position 1 und 5 sowie an das Ring-Sauerstoffatom anlagern. Öffnung zwischen dem glykosidischen O und C-1 sowie C-1 und dem Ring-O führen zur Anomerisierung in C-1 (A_2 und B_2). Bei Ringöffnung zwischen C-5 und Ring-O entsteht in C-1 das Hemiacetal, das mit der Aldehydform im Gleichgewicht steht. Diese Gleichgewichtseinstellung erfolgt erfahrungsgemäß sehr rasch⁷⁾, so daß das Auftreten des offenkettigen stabilen C-5-Carbonium-Oxonium-Ions von einer Anomerisierung an C-1 begleitet sein müßte (B_1).

Die unter b) beschriebenen Möglichkeiten (A_2 , B_1 und B_2) sind nach unseren Versuchen auszuschließen bzw. höchst unwahrscheinlich, da unter den gewählten Bedingungen weder an C-1 anomerisierte Pyranoside, Furanoside, noch offenkettige Formen nachgewiesen werden konnten.



Wir können daher schließen, daß bei der säurekatalysierten Spaltung von Glykosiden der Mechanismus über das cyclische Carbonium-Oxonium-Ion bevorzugt wird (Weg A im Schema S. 2746). Es ist sicher möglich, durch die Wahl geeigneter Substrate das offenkettige Carbonium-Oxonium-Ion energetisch zu begünstigen und damit Weg B zu beschreiten. Die Versuche sind eine Bestätigung dafür, daß Ketoside viel säureempfindlicher sind als Aldoside. Die Verbindungen **2** und **3** geben zum ersten Mal die Möglichkeit des Vergleichs innerhalb desselben Moleküls.

Derzeit wird untersucht, inwieweit die Wirkung von Glykosidasen in ihrem Mechanismus der säurekatalysierten Glykosidspaltung entspricht.

E. P. dankt der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für ein Stipendium, J. L. für eine Sachbeihilfe. Die NMR-Spektren verdanken wir Dr. *H. Friebolin* (Institut für Makromolekulare Chemie der Universität Freiburg).

⁷⁾ *W. Pigman* und *H. S. Isbell*, *Advances in Carbohydrate Chem.* **23**, 37 (1968).

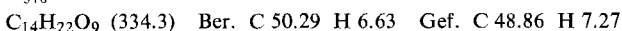
Beschreibung der Versuche

1) *Gaschromatographische Untersuchung der Addition von Methanol an Methyl-6-desoxy- α -D- Δ^5 -xylo-hexenopyranosid (1) und Methyl-6-desoxy- β -D- Δ^5 -xylo-hexenopyranosid*: 50 mg **1** in 100 μ l absol. *Methanol* wurden bei -16° mit 20 μ l einer ebenfalls auf -16° gekühlten 0.3 n *HCl*-Lösung in absol. *Methanol* versetzt, kräftig umgeschüttelt und bei -16° aufbewahrt. Zu den in der Tab. angegebenen Zeiten wurden Proben von jeweils 5 μ l entnommen und mit 750 μ l *Pyridin*/*Acetanhydrid* (2 : 1) mehr als 10 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Als Vergleich wurde das zu **1** anomere β -Glykosid auf gleiche Weise umgesetzt und das Reaktionsgemisch nach 24 Stdn. acetyliert. Die Acetylierungsansätze wurden direkt gaschromatographisch analysiert. Dabei ergaben sich folgende Retentionszeiten:

Verbindung	Retentionszeit in Min.
Methyl-2.3.4-tri- <i>O</i> -acetyl-6-desoxy- β -D- Δ^5 -xylo-hexenopyranosid	8.8
Methyl-2.3.4-tri- <i>O</i> -acetyl-6-desoxy- α -D- Δ^5 -xylo-hexenopyranosid (1a)	9.5
Methyl-5- <i>C</i> -methoxy-2.3.4-tri- <i>O</i> -acetyl-6-desoxy- β -L-idopyranosid (3a)	10.6
Methyl-5- <i>C</i> -methoxy-2.3.4-tri- <i>O</i> -acetyl-6-desoxy- α -D-glucopyranosid (2a)	12.3
Methyl-5- <i>C</i> -methoxy-2.3.4-tri- <i>O</i> -acetyl-6-desoxy- α -L-idopyranosid und Methyl-5- <i>C</i> -methoxy-2.3.4-tri- <i>O</i> -acetyl-6-desoxy- β -D-glucopyranosid	10.3 und 11.9

Die Meßbedingungen mit dem Modell 402 Gaschromatograph der Hewlett Packard/F u. M Scientific Division waren die folgenden: Säulendimension: 3 mm, 180 cm; stationäre Phase: SE 52 Silicongummi (F u. M Scientific Corporation); Trägermaterial: siliconiertes Gaschrom P (Applied Science Laboratories); Trägergas: Stickstoff, 50 ccm/Min.; Ofentemperatur bei der Injektion 150°C .; Temperaturprogramm $5^\circ\text{C}/\text{Min}$.

2) *Präparative Darstellung von Methyl-5-*C*-methoxy-2.3.4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy- α -D-glucopyranosid (2a) und Methyl-5-*C*-methoxy-2.3.4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy- β -L-idopyranosid (3a)*: 500 mg **1** wurden in 1.0 ccm absol. *Methanol* bei -16° mit 40 μ l einer 0.3 n absol. Lösung von *HCl* in *Methanol* versetzt. Nach 24 Stdn. Stehenlassen bei -16° wurde mit 7.0 ccm *Pyridin*/*Acetanhydrid* (2 : 1) versetzt, 15 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen, dann in 100 ccm Eiswasser gegossen und 2 Stdn. gerührt. Nach mehrfachem Extrahieren mit insgesamt 200 ccm Chloroform wurde die organische Phase mit Hydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Sikkon getrocknet, i. Vak. zur Trockne eingedampft und das zurückbleibende Öl in Petroläther ($60-70^\circ$) aufgenommen. **3a** kristallisierte nach Abkühlen auf 0° aus und war nach einmaligem Umkristallisieren gaschromatographisch rein (Ausb. 54%), Schmp. $105.5-106^\circ$, $[\alpha]_{578}^{25}$: $+35^\circ$ ($c = 0.6$ in CHCl_3).



3a ist stark hygroskopisch. Hierauf sind die unbefriedigenden Analysenwerte zurückzuführen. **3** wurde deshalb durch zusätzliche Darstellung des Tris-benzolazobenzoyl-Derivats charakterisiert (s. unten). Aus der Mutterlauge der Kristallisation von **3a** wurde nach weiterer Abkühlung eine Mischfraktion erhalten, die nach gaschromatographischer Analyse zum

größten Teil aus **2a** bestand. Mehrmaliges Umkristallisieren aus Petroläther ergab gaschromatographisch reines **2a** (Ausb. 8%), Schmp. 119–120°, $[\alpha]_{578}^{21}$: +117° ($c = 0.6$ in CHCl_3).

$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_9$ (334.3) Ber. C 50.29 H 6.63 Gef. C 50.37 H 7.04

3) *Anomerisierung von Verbindung 3*: 30 mg reines **3a** wurden in 1.0 ccm Methanol durch 10 μl 1 *n* Natriummethylatlösung in Methanol entacetyliert⁸⁾ und nach Entfernen des Lösungsmittels wie unter 1) methanolysiert. Nach 24stdg. Stehenlassen bei -16° wurde wie unter 1) acetyliert. Die Gaschromatographie lieferte das Verhältnis **2a**:**3a** = 22:78.

4) *Methyl-5-C-methoxy-2.3.4-tris-O-[4-benzolazo-benzoyl]-6-desoxy- β -L-idopyranosid (3b)*: 148 mg **3a** wurden in 5.00 ccm absol. Methanol mit 50 μl einer 1 *n* Natriummethylatlösung in Methanol 1 Stde. bei Raumtemp. entacetyliert⁸⁾. Nach Eindampfen i. Vak. wurde der Rückstand in 4.0 ccm trockenem Pyridin mit 800 mg *Azobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid* 3 Stdn. bei 100° umgesetzt. Dann gaben wir 100 μl Wasser zu und beließen weitere 20 Min. bei 100°. Nach Eingießen in eiskalte Hydrogencarbonatlösung und einstdg. Rühren wurde die feste Substanz abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Reste an *Azobenzol-carbonsäure* wurden durch Chromatographie an Aluminiumoxid mit Chloroform abgetrennt. Eindampfen der Chloroformlösung ergab ein kristallines Produkt. Nach mehrfachem Umkristallisieren aus Benzol/Petroläther blieb der Schmp. konstant (Ausb. 66%), Schmp. 105–106°.

$\text{C}_{47}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_9$ (832.9) Ber. C 67.78 H 4.84 N 10.09 Gef. C 67.77 H 4.98 N 10.05

⁸⁾ A. Thompson, M. L. Wolfrom und E. Pacsu, *Methods in Carbohydrate Chem.* **II**, 215 (1963).