

Wolfgang Voelter, Giesela Kuhfittig, Oskar Oster und Ernst Bayer

Untersuchungen von Di- und Trisacchariden mit Circular dichroismus

Aus dem Chemischen Institut der Universität, D-74 Tübingen

(Eingegangen am 22. Dezember 1970)

Die CD-Spektren von Gentiobiose- (**18**), Isomaltose- (**19**) und Melibiose- (**20**) Molybdat-Lösungen zeigen alle bei 275 m μ einen positiven und bei 242 nm einen negativen Cotton-Effekt, während 1- und 4-*O*-Pyranosyl-pyranosen keinen Effekt aufweisen. Damit können also 6-*O*-Pyranosyl-pyranosen mit einer Messung erkannt werden.

Investigations of Di- and Trisaccharides with Circular Dichroism

The CD-spectra of gentiobiose (**18**), isomaltose (**19**) and melibiose (**20**) molybdate solutions show at 275 nm a positive and at 242 nm a negative Cotton Effect in contrast to molybdate solutions of 1- and 4-*O*-pyranosylpyranoses. By this method therefore 6-*O*-pyranosylpyranoses may be determined by one measurement.

Cotton-Effekte können nur bei Verbindungen gemessen werden, die optische Aktivität zeigen und gleichzeitig einen meßbaren Chromophor besitzen. Reine Kohlenhydrate haben nur eine dieser Voraussetzungen; daher zeigen Zuckerlösungen keine Cotton-Effekt-Maxima¹⁾ und der Circular dichroismus (CD) vermag nur wenig spezifische Aussagen über diese Verbindungsklasse zu machen. Werden jedoch längerwellig absorbierende Chromophore mit einem Zuckerrest verknüpft, wie z. B. Pyrimidine^{2,3)}, Purine²⁻⁵⁾ oder Flavone⁶⁾, dann liegt ein inhärent symmetrischer, durch die Umgebung dissymmetrisch gestörter Chromophor vor, der meßbare Cotton-Effekte zeigt.

Spezifische Aussagen über die Konfiguration von Hydroxylgruppen können bei Pyranosen⁷⁻¹⁰⁾ und eventuell auch bei Polyalkoholen^{11,12)} durch die Circular dichroismus-Spektren ihrer Molybdat-Komplexe gewonnen werden. In dieser Arbeit dehnten wir diese Metallkomplexuntersuchungen auf Di- und Trisaccharide aus.

1) I. Listowsky und S. England, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **30**, 329 (1968).

2) D. W. Miles, R. K. Robins und H. Eyring, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **57**, 1138 (1967).

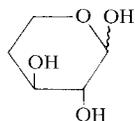
3) W. Voelter, R. Records, E. Bunnenberg und C. Djerassi, *J. Amer. chem. Soc.* **90**, 6163 (1968).

4) W. Voelter, G. Barth, R. Records, E. Bunnenberg und C. Djerassi, *J. Amer. chem. Soc.* **91**, 6165 (1969).

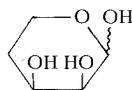
5) D. L. Elder, E. Bunnenberg, C. Djerassi, M. Ikehara und W. Voelter, *Tetrahedron Letters* [London] **1970**, 727.

6) W. Voelter, O. Oster, G. Jung und E. Breitmaier, *Chimia* [Aarau, Schweiz] **25**, 26 (1971).

Die Monosaccharide teilen wir⁹⁾ aufgrund der CD-Spektren ihrer Molybdat-Komplexe in zwei Gruppen ein: die Schwermetall-Komplexe der Gruppe **1** zeigen im Wellenlängenbereich 200–350 m μ zwei Cotton-Effekte, die der Gruppe **2** drei oder gar vier wesentlich intensivere Cotton-Effekte. Bei sämtlichen Pyranosen der Gruppe **1** sind die Hydroxylgruppen an C-2 und C-3 *trans*-ständig, bei den Pyranosen der Gruppe **2** sind die Hydroxylgruppen an C-2 und C-3 *cis*-ständig.



Typ 1



Typ 2

Kohlenhydrate vom

Wird die Hydroxylgruppe an C-1 durch eine OCH₃-Gruppe ersetzt (α - oder β -Methyl-D-glykopyranosid), dann verliert der Zucker sein Komplexbildungsvermögen mit Molybdat⁷⁻⁹⁾. Di- und Trisaccharide vom Trehalosetyp oder ohne glykosidische Hydroxylgruppe **3–6** sollten daher mit Molybdat keine Komplexe bilden können. Diese Vorhersage wird durch das Experiment bestätigt: Molybdatlösungen der in Tab. 1 aufgeführten Kohlenhydrate **3–6** zeigen im Wellenlängenbereich 200–350 m μ keinerlei Cotton-Effekte. Dadurch zeigt sich erneut, daß die glykosidische Hydroxylgruppe als Ligand für die Komplexbildung mit Molybdat notwendig ist.

Tab. 1. Di- und Trisaccharide ohne glykosidische Hydroxylgruppe. Die Kohlenhydrat-Molybdat-Lösungen zeigen bei den angegebenen pH-Werten und Konzentrationen keinen Circular dichroismus bei 200–350 m μ

Name	pH	Konzentration (<i>m</i>)	
		Zucker	Molybdat
Trehalose 3	5.4	0.02 0.06	0.04 0.12
Saccharose 4	5.3	0.04	0.04
Melezitose 5	5.4	0.02 0.06	0.04 0.12
Raffinose 6	5.4	0.04 0.06	0.04 0.12

7) *W. Voelter, E. Bayer, R. Records, E. Bunnenberg und C. Djerassi, Liebigs Ann. Chem.* **718**, 238 (1968).

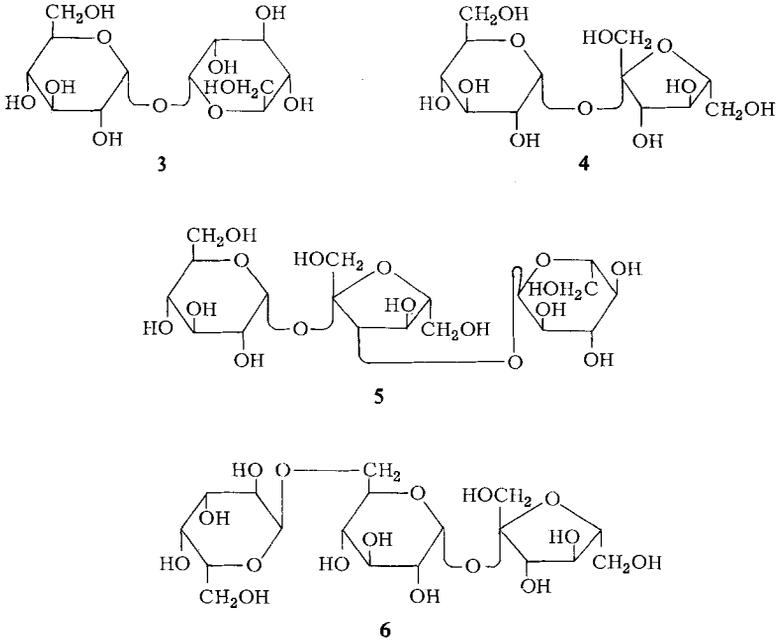
8) *W. Voelter, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **350**, 15 (1969).

9) *W. Voelter, G. Kuhfittig, G. Schneider und E. Bayer, Liebigs Ann. Chem.* **734**, 126 (1970).

10) *W. Voelter, G. Kuhfittig und E. Bayer, Angew. Chem.* **82**, 985 (1970); *Angew. Chem. internat. Edit.* **9**, 964 (1970).

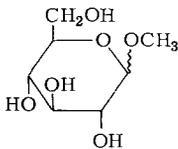
11) *W. Voelter, E. Bayer, R. Records, E. Bunnenberg und C. Djerassi, Chem. Ber.* **102**, 1005 (1969).

12) *W. Voelter, E. Bayer, G. Barth, E. Bunnenberg und C. Djerassi, Chem. Ber.* **102**, 2003 (1969).



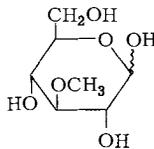
Bei Monosacchariden können wir die Hydroxylgruppe an C-4 des Pyranoserings als Komplexligand für Molybdat aus folgenden Gründen ausschließen:

1.) Außer der glykosidischen Hydroxylgruppe ist sicherlich die OH-Gruppe an C-3 von Pyranosen zur Komplexbildung notwendig. Molybdatlösungen von α - oder β -D-Methyl-glucopyranosid (7) und solche von 3-O-Methyl-D-glucose (8) zeigen zwischen pH 5–6 keinerlei Cotton-Effekte.



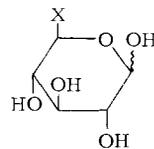
α -, β -D-Methyl-glucopyranosid

7



3-O-Methyl-D-glucose

8

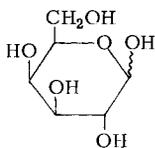


9, D-Xylose: X = H

10, D-Glucose: X = CH₂OH

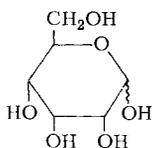
Im Falle von D-Xylose (9) oder D-Glucose (10) ist eine Komplexbildung mit Molybdat bei gleichzeitiger Beanspruchung der Hydroxylgruppen an C-1, C-3 und C-4 aus sterischen Gründen undenkbar, da die beiden OH-Gruppen an C-3 und C-4 *trans*-ständig sind.

2.) Das Schema der Circular dichroismus-Spektren von Zucker-Molybdat-Lösungen wird nicht davon beeinflusst, ob die Hydroxylgruppen an C-3 und C-4 *cis*- oder *trans*-ständig sind. Beispiele hierfür sind die Paare D-Galaktose (11), D-Glucose (10) und D-Allose (12), D-Gulose (13), lediglich die molaren Elliptizitäten der einzelnen Cotton-Effekte sind verschieden.



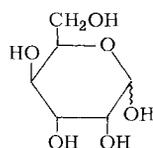
D-Galaktose

11



D-Allose

12

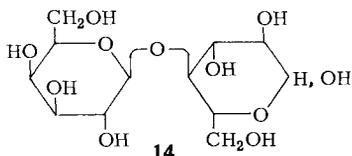


D-Gulose

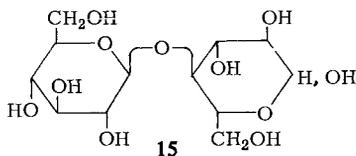
13

Nach diesen Ausführungen sollte man erwarten, daß Disaccharide mit freien Hydroxylgruppen an C-1 bis C-3 Komplexe mit Molybdat bilden sollten.

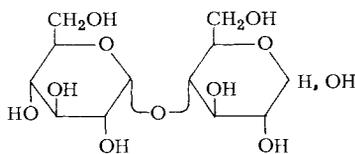
Ogleich 4-*O*-Pyranosyl-pyranosen diese Voraussetzungen erfüllen, konnten wir bei keinem der von uns untersuchten Di- und Trisaccharide (vgl. Tab. 2, 14–17) in Molybdatlösungen Cotton-Effekte nachweisen. Bei 4-*O*-Pyranosyl-pyranosen muß die Komplexbildung daher aus sterischen Gründen behindert sein.



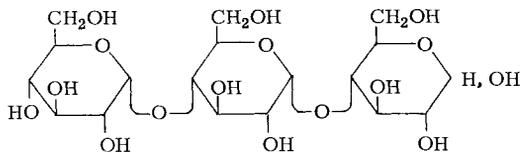
14



15



16



17

Tab. 2. Di- und Trisaccharide mit 4-*O*-Pyranosyl-pyranose-Struktur.

Die Kohlenhydrat-Molybdat-Lösungen zeigen bei den angegebenen pH-Werten und Konzentrationen keinen Circular dichroismus

Name	pH	Konzentration (<i>m</i>)	
		Zucker	Molybdat
Lactose 14	5.2	0.04 0.06	0.04 0.12
Cellobiose 15	5.4	0.02 0.06	0.04 0.12
Maltose 16	5.4	0.04 0.06	0.04 0.12
Maltotriose 17	5.4	0.02	0.04

Die Molybdatlösungen von 6-*O*-Pyranosyl-pyranosen (18–20) dagegen zeigen das für D-Glucose⁷⁾ charakteristische Circular dichroismus-Spektrum: Einen positiven Cotton-Effekt bei 275 m μ (Bande I) und einen negativen bei 243 m μ (Bande II). Die genauen Daten entnehme man Tab. 3 und den Abbildungen 1 und 2.

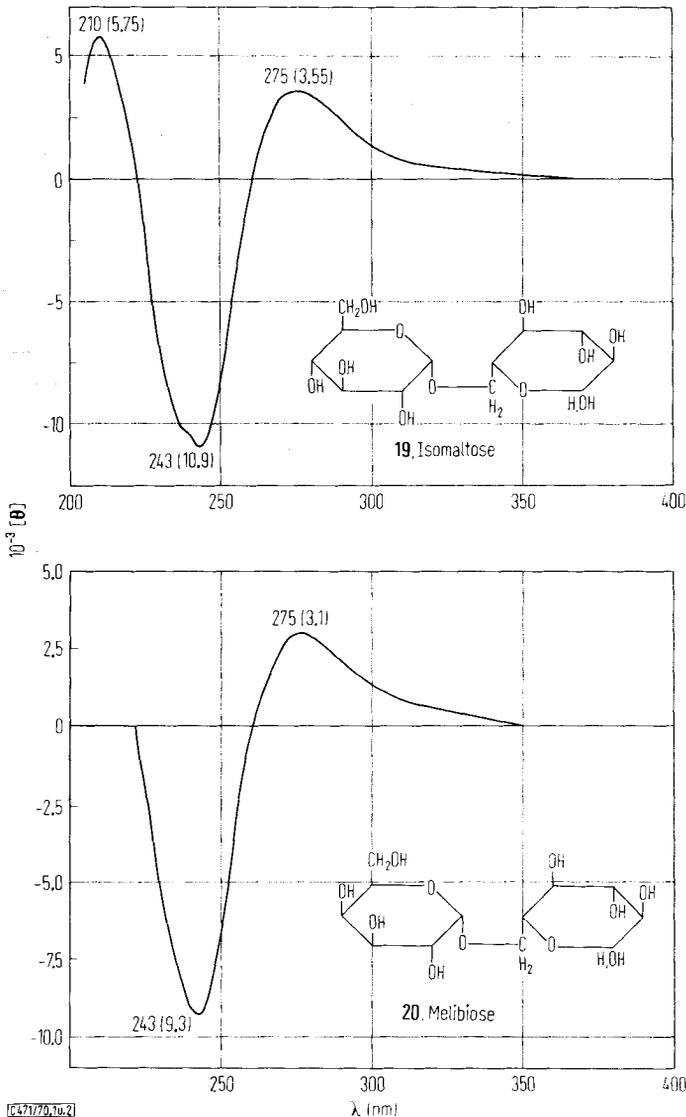
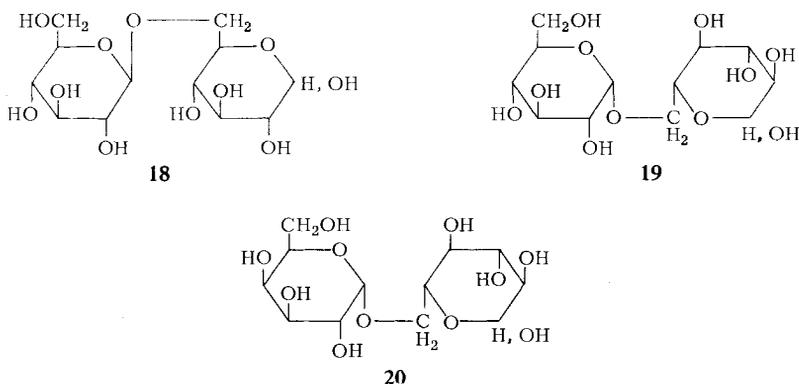


Abbildung. 1 (oben). Circulardichroismus des Isomaltose-Molybdat-Komplexes. Meßbedingungen vgl. Tab. 3

Abbildung. 2 (unten). Circulardichroismus des Melibiose-Molybdat-Komplexes. Meßbedingungen vgl. Tab. 3

In der Natur kommen meist Disaccharide vom Trehalose-, 4-*O*-Pyranosyl-pyranose- und 6-*O*-Pyranosyl-pyranose-Typ vor. Aufgrund der unterschiedlichen dichroitischen Eigenschaften ihrer Molybdatlösungen können nach den obigen Ausführungen mit der hier beschriebenen Methode 4-*O*-Pyranosyl- leicht von 6-*O*-Pyranosyl-pyranosen

unterschieden werden. Unproblematisch ist die Differenzierung zwischen Trehalosen und Pyranosyl-pyranosen, nur die letzteren zeigen reduzierende Eigenschaften.



Tab. 3. Vorzeichen, λ_{\max} und $[\Theta]$ -Werte von 6-O-Pyranosyl-pyranose-Molybdat-Komplexen^{a)}

Name	pH gemessen	Bande I		Bande II	
		λ_{\max}	$[\Theta]$	λ_{\max}	$[\Theta]$
Gentiobiose 18	5.2	275	+2 500	242	-7 100
Isomaltose 19	5.2	275	+3 550	243	-10 900
Melibiose 20	5.2	275	+3 100	243	-9 300

a) Konzentration von Zucker : Molybdat = 0.02 : 0.04

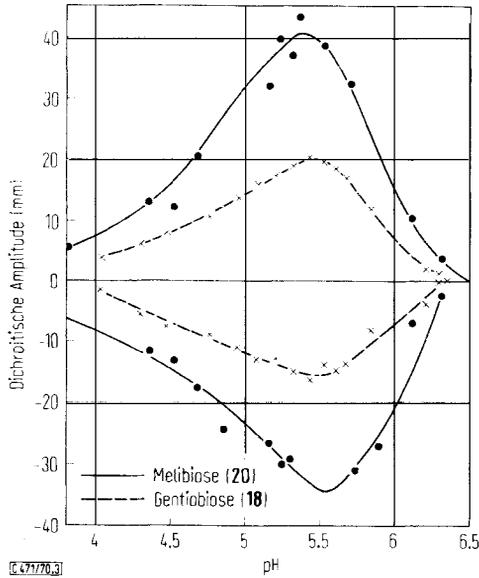
Wie bereits früher berichtet⁷⁾, nehmen wir an, daß im pH-Bereich 5—6 die Molybdatspezies HMoO_4^- mit dem Kohlenhydrat reagiert. Analog zur pH-Abhängigkeit der Cotton-Effekt-Intensitäten von Monosaccharid-Molybdat-Komplexen verhält sich die der Disaccharidkomplexe von Gentiobiose (**18**) und Melibiose (**20**) (vgl. Abbild. 3).

Die Maximalwerte der Kurven von Abbildung 3 liegen alle zwischen pH 5 und 6. Wir nehmen dies als Beweis dafür, daß weder das im alkalischen Bereich stabile MoO_4^{2-} -Ion, noch die bei pH-Werten < 5 existenten Polymolybdate^{13, 14)} mit Pyranosen eine Reaktion eingehen.

Im pH-Bereich maximaler Komplexstabilität bestimmten wir außerdem das Verhältnis von Ligand: Metall der Gentiobiose-Molybdat-Verbindung mit 2 : 1 nach der Methode von Job (vgl. Abbild. 4). Das Verhältnis stimmt mit dem des Glucose-Molybdat-Komplexes überein und ist charakteristisch für Kohlenhydrate der Gruppe **1**⁹⁾ (vgl. oben).

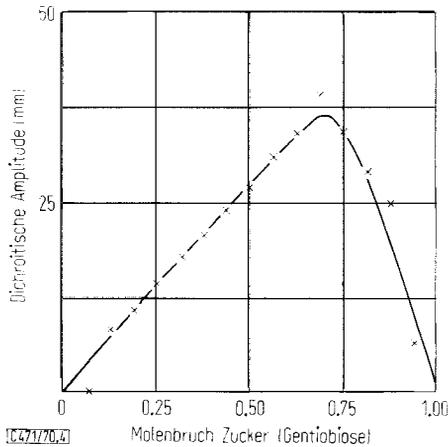
¹³⁾ G. Jander und K. F. Jahr, Kolloid-Beitr. **41**, 1 (1935).

¹⁴⁾ Y. Sasaki, I. Lindqvist und L. G. Sillén, J. inorg. nuclear Chem. **9**, 93 (1959).



Abbild. 3. pH-Abhängigkeit der dichroitischen Amplitude (bez. auf $d = 0.198$ mm beim positiven Cotton-Effekt und $d = 0.054$ mm beim negativen Cotton-Effekt und eine Empfindlichkeit von $1 \cdot 10^{-5}$ Absorptionseinheiten/mm) von Zucker-Molybdat-Komplexen. Konzentration an Zucker = 0.02, an Molybdat = 0.04 Mol/l.

Melibiose (20), Banden bei $\lambda = 275$ nm (positiv), $\lambda = 243$ nm (negativ) ———
 Gentiobiose (18), Banden bei $\lambda = 275$ nm positiv, $\lambda = 242$ nm negativ - - -



Abbild. 4. Circulardichroitische Bestimmung des Verhältnisses von Metall: Ligand im Gentiobiose-Molybdat-Komplex nach der Methode von Job

Beschreibung der Versuche

Für die Untersuchungen wurden ein Potentiometer E 353 B der Fa. Metrohm und ein Dichrograph der Fa. Roussel-Jouan, Modell CD 185, verwendet.

Die molaren Elliptizitäten $[\Theta]$ errechnen sich nach der Beziehung $[\Theta] = \Delta\varepsilon \cdot 3300$. Die Dimension von $[\Theta]$ ist Grad \cdot cm²/Decimol.

Molybdatkomplexe der Disaccharide: Die berechnete Menge (vgl. Tabellen 1–3) *Natriummolybdat* (p.a. Merck AG, Darmstadt) und *Di-* bzw. *Trisaccharid* (Baker Chemikalien, Groß-Gerau) werden in ein Meßkölbchen gewogen. Mit *Salzsäure* wird auf den in den Tabellen angegebenen pH-Wert eingestellt. Die Reaktionszeit ist 1–3 Tage.

Zur Bestimmung des Verhältnisses Zucker:Metall nach der Methode von *Job* wird eine 0.5 *m Gentiobiose-* und eine 0.5 *m Natriummolybdat-*Standard-Lösung hergestellt; dabei wird Gentiobiose in Wasser und Natriummolybdat in 0.5 *n HCl* gelöst. Gemessen werden Lösungen, die 1.6 ccm Zucker- und Molybdat-Standard in 10 ccm enthalten. Mit Natronlauge werden die Lösungen auf pH 5.5 eingestellt. Die Schichtdicken der Küvetten sind $d = 0.198$ mm, die Empfindlichkeit beträgt 10^{-5} differentielle Absorptionseinheiten/mm. Die $[\Theta]$ -Werte sind auf die Konzentration des Zuckers bezogen.

[471/70]
