

Synthesen biologisch wichtiger Kohlenhydrate, 11¹⁾

Synthese und Massenspektrometrie des Forosamins (4-Dimethylamino-2,3,4,6-tetraosexy-D-erythro-hexopyranose)

Ingolf Dyong*, Rainer Knollmann, Norbert Jersch und Heinrich Luftmann

Organisch-Chemisches Institut der Universität Münster,
Orléans-Ring 23, D-4400 Münster

Eingegangen am 28. April 1977

Es wird eine besonders einfache Synthese des Forosamins (9), des basischen Tetraoseoxy-Zuckers der Spiramycine beschrieben. *trans*-4,5-Epoxy-DL-*threo*-hex-2-ensäure (DL-2) (durch Epoxidierung von Sorbinsäure (1)) wird in die Enantiomeren getrennt und der Oxiranring in D-2 regioselektiv zu den 4- und 5-Dimethylamino-hex-2-ensäuren 3 und 4 geöffnet. Nach Hydrierung zu den Hexonsäuren 5 und 6 und Lactonisierung zu 7 und 8 wird das 4-Dimethylamino-2,3,4,6-tetraoseoxy-D-erythro-hexono- δ -lacton (7) abgetrennt und mit Diisobutylaluminiumhydrid zu Forosamin (9) reduziert.

Syntheses of Biologically Important Carbohydrates, 11¹⁾

Synthesis and Mass Spectrometry of Forosamine (4-Dimethylamino-2,3,4,6-tetraoseoxy-D-erythro-hexopyranose)

An especially simple synthesis of forosamine (9) the basic tetraoseoxy sugar of the spiramycins is described. *trans*-4,5-Epoxy-DL-*threo*-hex-2-enoic acid (DL-2) (from sorbic acid (1)) is resolved into the enantiomeric forms and the epoxy ring in D-2 is regioselectively opened with formation of the 4- and 5-dimethylamino-hex-2-enoic acids 3 and 4. After hydrogenation to the hexonic acids 5 and 6 and lactonisation to 7 and 8 the 4-dimethylamino-2,3,4,6-tetraoseoxy-D-erythro-hexono- δ -lactone (7) is separated by chromatography. Reduction of 7 with diisobutylaluminiumhydride yields forosamine (9).

1954 wurde von Pinnert-Sindico und Mitarbb.²⁾ aus dem Kulturfiltrat von *Streptomyces ambifaciens* das Spiramycin isoliert, ein Macrolid-Antibiotikum, das aus drei nahe verwandten Komponenten besteht, die ähnliche chemotherapeutische Eigenschaften besitzen wie das Erythromycin³⁾.

Die Spiramycine⁴⁾ enthalten neben einem α -L(1,4)-verknüpfte(n) Disaccharid aus Mycarose (2,6-Dideoxy-3-C-methyl-L-ribo-hexose) und Mycaminose (3,6-Dideoxy-

¹⁾ 10. Mittel.: I. Dyong und W. Hohenbrink, Chem. Ber. **110**, 3655 (1977).

²⁾ S. Pinnert-Sindico, L. Ninet, J. Preud'Homme und C. Cosar, Antibiot. Annu. **1954**, 724.

³⁾ Die Spiramycine I–III sind identisch mit den Foromacidinen A–C (R. Corbaz, L. Ettlinger, E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, F. Kradolfer, E. Kyburz, L. Neipp, V. Prelog, A. Wettstein und H. Zähler, Helv. Chim. Acta **39**, 304 (1956)).

⁴⁾ Strukturauflklärung durch R. Corbaz et al.³⁾, R. Paul und S. Tchelitcheff, Bull. Soc. Chim. Fr. **1965**, 650; M. E. Kuehne und B. W. Benson, J. Am. Chem. Soc. **87**, 4660 (1965), und S. Omura, A. Nakagawa, M. Otani, T. Hata, H. Ogura und K. Furukate, ebenda **91**, 3401 (1969).

3-dimethylamino-D-glucose) das Forosamin (**9**)⁵⁾, einen 4-Dimethylamino-tetradesoxy-Zucker.

Die D-*erythro*-Konfiguration des Forosamins wurde von Stevens und Mitarbb.⁶⁾ durch eine dreizehnstufige Synthese aus Penta-O-acetyl-D-glucose bewiesen (Gesamtausbeute 0.1%). In einer späteren Synthese von Albano und Horton⁷⁾ entstand **9** aus α -D-Glucopyranosid in ebenfalls dreizehn Stufen mit einer Gesamtausbeute von ca. 1%.

Beide Synthesen sind aufwendig und zu wenig ergiebig, wenn **9** für präparative Arbeiten benötigt wird. In einer kurzen Mitteilung haben wir die Prinzipien einer ungewöhnlich einfachen Darstellung beschrieben⁸⁾, die hier ausführlich veröffentlicht wird.

Synthese des D-Forosamins

Ausgangsprodukt ist die Sorbinsäure (*trans,trans*-Hexa-2,4-diensäure, **1**), die sich bei mehreren Synthesen von *threo*- und *erythro*-konfigurierten 2,3,6-Tridesoxy-⁹⁾ sowie von 3-Amino- bzw. 3-Dimethylamino-2,3,6-tridesoxyhexosen mit *ribo/arabino*- und *xylolyxo*-Konfiguration¹⁰⁾ sehr bewährt hat. **1** liefert mit überschüssiger 40proz. Peressigsäure in Eisessig/Chloroform die schon bekannten⁹⁾ enantiomeren *trans*-4,5-Epoxy-*threo*-hex-2-ensäuren (DL-**2**), von denen die D-Form **2** durch Racemattrennung mit D-(+)-Phenylethylamin in ca. 90proz. Ausbeute erhalten werden kann. Behandlung des Phenylethylammoniumsalzes mit verdünnter Mineralsäure führt quantitativ zum kristallisierten D-Isomeren **2**. Versuche, die Doppelbindung in **2** *selektiv* zu hydrieren, blieben ohne Erfolg. Je nach den Reaktionsbedingungen wird entweder nur der Oxiraning ring reaktiv geöffnet oder sowohl dieser als auch die Doppelbindung werden angegriffen. Dagegen gelingt es ohne Schwierigkeiten, das Epoxid mit 40proz. wäßrigem Dimethylamin bei Raumtemperatur zu öffnen, ohne daß nucleophile β -Addition an die Doppelbindung erfolgt. Das kristalline Gemisch aus 4-Dimethylamino-2,3,4,6-tetradesoxy-D-*erythro*- (**3**) und 5-Dimethylamino-2,3,5,6-tetradesoxy-L-*erythro*-hex-2-enonsäure (**4**) (zusammen 87%) wird in Methanol mit 10% Pd auf Aktivkohle bei 4 at Wasserstoffdruck zu den Dimethylamino-hexonsäuren **5** und **6** hydriert (88%). Die IR-Spektren von **3/4** und **5/6** zeigen keine der im Bereich von 1690–1725 cm⁻¹ zu erwartenden Carbonsäure-Carbonylabsorptionen. Stattdessen absorbieren **3** und **4** bei 1585 und **5** und **6** bei 1575 cm⁻¹ (Carboxylat), d. h. die Aminosäuren **3–6** liegen offenbar als Zwitterionen vor.

Die Lactonisierung von **5** und **6** mit Eisessig in der Hitze verläuft nur sehr zögernd und bleibt unvollständig. Dagegen ist die Lactonbildung zu **7** und **8** durch Erhitzen in Acetanhydrid nach drei Stunden abgeschlossen. Aus der unterschiedlichen Molekülgeometrie des δ -Lactons **7** und des γ -Lactons **8** resultiert ein so großer R_F-Unterschied, daß auf dieser Stufe eine sehr einfache chromatographische Trennung mit Aceton/Benzol/Dioxan (1 : 1 : 1) an Kieselgel gelingt. Die Laufmittel müssen jedoch wasser- und alkohol-

⁵⁾ R. Paul und S. Tchelitcheff, Bull. Soc. Chim. Fr. **1957**, 734.

⁶⁾ C. L. Stevens, G. E. Gutowski, K. G. Taylor und C. P. Bryant, Tetrahedron Lett. **1966**, 5717.

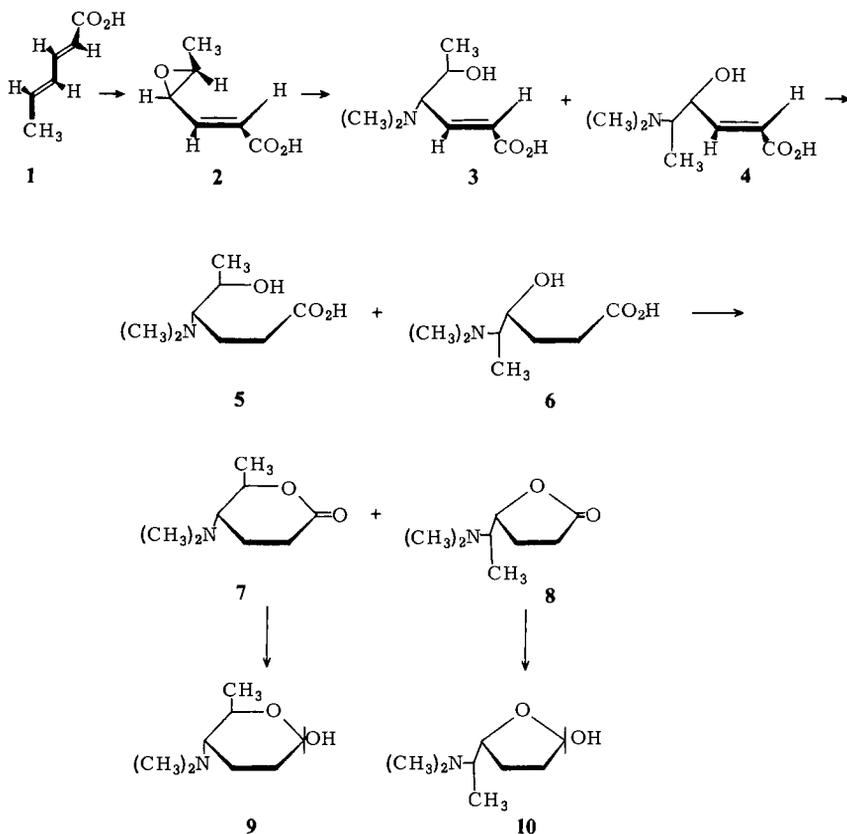
⁷⁾ E. L. Albano und D. Horton, Carbohydr. Res. **11**, 485 (1969).

⁸⁾ I. Dyong, R. Knollmann und N. Jersch, Angew. Chem. **88**, 301 (1976); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **15**, 302 (1976).

⁹⁾ I. Dyong und N. Jersch, Chem. Ber. **109**, 896 (1976).

¹⁰⁾ I. Dyong und R. Wiemann, unveröffentlicht.

frei sein, da beide Lactone sehr leicht zu den entsprechenden Säuren bzw. Estern reagieren. Die Strukturzuordnung ist einfach und gelingt durch IR-Spektroskopie: das Hauptprodukt (70%) zeigt eine Carbonylabsorption bei 1730 cm^{-1} , während das Nebenprodukt (16%) bei 1770 cm^{-1} absorbiert. Diese Wellenzahlen sind charakteristisch für δ - bzw. γ -Lactone, so daß es sich bei dem Hauptprodukt um das gesuchte 4-Dimethyl-amino-2,3,4,6-tetraosexy-D-erythro-hexono- δ -lacton (7) handelt ¹¹⁾.



Von den verschiedenen Hydriden, mit denen wir bei früheren Kohlenhydrat-Synthesen γ -Lactone reduzierten, hat sich Diisobutylaluminiumhydrid bezüglich Handhabung und Ausbeuten am besten bewährt. Auch das δ -Lacton 7 (in THF) läßt sich mit 20proz. DIBAL

¹¹⁾ Während die sauer katalysierte Addition von Alkoholen an das Epoxid 2 fast ausschließlich an C-4 erfolgt ^{12,13)} und den mechanistischen Vorstellungen entspricht, war die hohe Regio-selektivität bei der Addition von Dimethylamin an 2 nicht ohne weiteres voraussagbar. Sie steht jedoch in Übereinstimmung mit der Regel, daß das Nucleophil bevorzugt eine allylische oder benzyllische Position angreift ¹⁴⁾

¹²⁾ I. Dyong und H. Bendlin, Chem. Ber., im Druck.

¹³⁾ M. S. Malinovskii, L. P. Glushko und N. J. Pokhodenko, Khim. Geterotsikl. Soedin. 1974, 164 [Chem. Abstr. 81, 3312m (1974)].

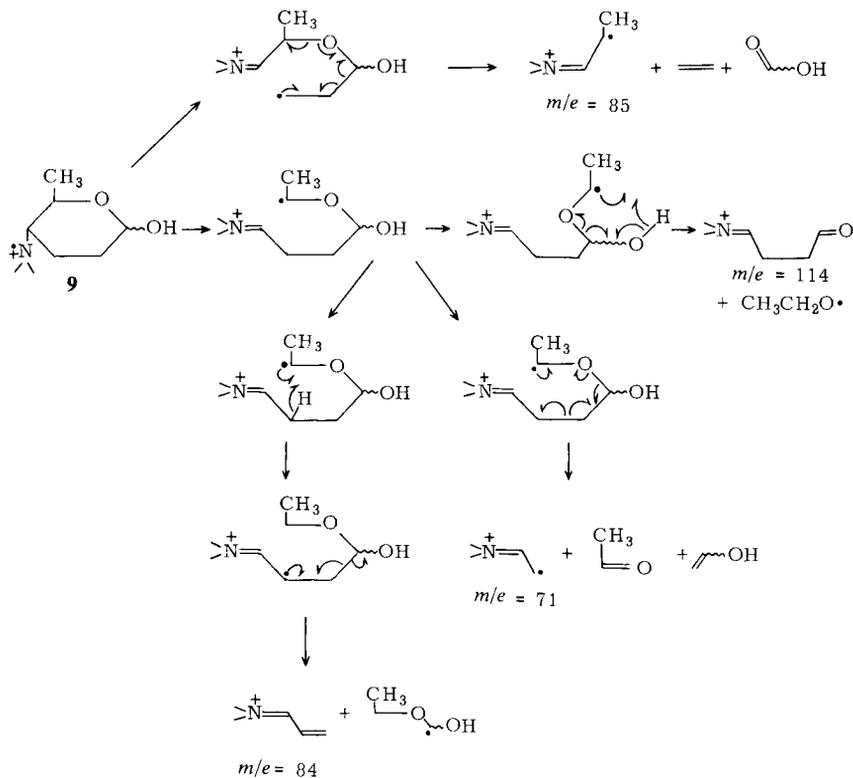
¹⁴⁾ H. O. House, Modern Synthetic Reactions, 2. Aufl., S. 302, W. A. Benjamin, Inc., London, Amsterdam 1972.

in Toluol bei -30°C glatt reduzieren, wobei das Forosamin (**9**) ohne Nebenprodukte als farblose Flüssigkeit anfällt, die in der Kälte kristallisiert (70%). Schmelzpunkt ($58-60^{\circ}\text{C}$), optische Drehung ($[\alpha]_D^{25} = +86.1^{\circ}$ in Methanol)⁵⁻⁷) und $^1\text{H-NMR}$ -Parameter⁷) entsprechen denen, die in der Literatur mitgeteilt wurden. Die Gesamtausbeute dieser Synthese beträgt, bezogen auf **1** 12 und auf **D-2** 37–38%, wobei die Gewinnung im Gramm-Maßstab problemlos ist.

Da sich die massenspektrometrischen Fragmentierungen von *N*-alkylierten und *N*-acylierten Polydesoxy-aminozuckern deutlich unterscheiden sollten, wurde auch das γ -Lacton **8** (als DL-Form) analog **7** \rightarrow **9** zur 5-Dimethylamino-2,3,5,6-tetradesoxy-erythro-hexofuranose (**10**) reduziert, obwohl dieser Zucker nach jetziger Kenntnis keine Bedeutung als natives Antibiotikum-glycon besitzt.

Massenspektrometrische Fragmentierungen von **9** und **10**

Das Spektrum der Furanose **10** zeigt nur ein schwaches Molekülion. Der Basispeak mit $m/e = 72$ kann durch Ladungslokalisierung am Stickstoff mit anschließender α -Spaltung der Bindung zwischen C-4 und C-5 erklärt werden. Hieraus entsteht durch Eliminierung von Ethylen das Fragment mit $m/e = 44$. Alle weiteren Fragmente besitzen nur geringe Intensität und die Abwesenheit von Ionen mit $m/e = 87$ (E_1 ¹⁵⁾) oder 142



¹⁵⁾ Nomenklatur: N. K. Kochetkov und O. S. Chizhov, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. **21**, 39 (1966).

(A₁) zeigt, daß die bei Kohlenhydraten normalerweise durch den Ringsauerstoff induzierte Fragmentierung nicht auftritt.

Analoge Verhältnisse findet man bei der Pyranose **9**. Das Molekülion ist allerdings recht intensiv, da bei diesem im Gegensatz zu **10** der bevorzugte Bindungsbruch zwischen C-4/C-5 (bzw. C-3/C-4) nicht mit einer Abspaltung verbunden ist. Durch Hochauflösung läßt sich zeigen, daß die starken Fragmente mit $m/e = 114, 85, 84, 71$ und 44 sämtlich Stickstoff enthalten. $m/e = 114$ ist also nicht durch Abspaltung von Dimethylamin aus dem Molekülion entstanden. Dieses Ion tritt auch auf, wenn der Wasserstoff des 1-OH in **9** durch Deuterium ersetzt wird (Äquilibrierung in D₂O bei Raumtemperatur), d.h. die Markierung muß sich im abgespaltenen C₂H₅O-Radikal befinden. Da auch das Ion mit $m/e = 44$ Stickstoff enthält (N(CH₃)₂), kann es sich nicht um ein H₁⁺-Fragment (H₂C=CH-OH) handeln. Die durch den Ringsauerstoff induzierten Fragmentierungen, die über B₁ (Abspaltung von Acetaldehyd aus dem Molekülion) oder durch synchronen Zerfall zu H-Ionen führen, scheiden daher aus. Die Bildung von $m/e = 84$ dürfte dem bekannten Zerfall von Cyclohexylamin-Derivaten entsprechen, der ebenfalls durch eine Ladungslokalisierung am Stickstoff eingeleitet wird¹⁶⁾.

Damit unterscheidet sich auch die Fragmentierung der *N*-alkylierten Amino-pyranose **9** in charakteristischer Weise von *N*-acetylierten Polydesoxy-aminozuckern, etwa des *N*-Acetylacosamins (3-*N*-Acetylamino-2,3,6-tridesoxy-*arabino*-hexose), deren Zerfall vom Ringsauerstoff gesteuert wird¹²⁾.

Diese Arbeit wurde vom *Fonds der Chemischen Industrie* und dem *Landesamt für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen* unterstützt.

Experimenteller Teil

Spektren: IR-Spektrometer 157, 177 und 257 (Perkin-Elmer). Kernresonanzspektrometer HA 100 (Varian), TMS als innerer Standard. Massenspektrometer SM-1-B und GC/MS-Kombination 111 (Varian MAT). – Drehwerte: Polarimeter 141 (Perkin-Elmer), 10-cm-Küvetten. – Schmelzpunkte (unkorrigiert): Kofler-Heizmikroskop. – Chromatographie: analytisch: Polygram Sil G-Fertigfolien (Macherey-Nagel), Entwicklung: konz. Schwefelsäure, 120°C; präparativ: Glassäulen mit Kieselgel 60 < 0.063 (Merck).

trans-4,5-Epoxy-*D*-threo-hex-2-ensäure (**2**): 12.8 g *trans*-4,5-Epoxy-DL-threo-hex-2-ensäure⁹⁾ in 800 ml Ether werden bei Raumtemp. mit 6.1 g *D*-(+)-Phenylethylamin versetzt. Der Niederschlag wird dreimal aus Aceton/*n*-Hexan umkristallisiert. Die vereinigten Mutterlaugen werden eingedampft, vorsichtig mit *n*-Hexan versetzt und auf ca. –15°C gekühlt. Der Niederschlag wird dreimal wie vorstehend beschrieben umkristallisiert. Mit den Mutterlaugen wird das Verfahren wiederholt. Ausb. 11.2 g (90%). $[\alpha]_D^{25} = -23.7^\circ$ ($c = 1.6$ in H₂O).

5.06 g des Salzes in 50 ml Wasser werden bei 0°C mit 20.3 ml 1 N HCl versetzt. **2** wird zweimal mit je 40 ml Ether extrahiert, die Etherphase getrocknet und eingedampft. Der kristalline Rückstand wird für analytische Zwecke aus Ether/Petrolether umkristallisiert. Ausb. 2.5 g (96%). $[\alpha]_D^{25} = +11.0^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl₃).

Gemisch aus 4-Dimethylamino-2,3,4,6-tetradesoxy-*D*-erythro-hex-2-enensäure (**3**) und 5-Dimethylamino-2,3,5,6-tetradesoxy-*L*-erythro-hex-2-enensäure (**4**): 1.0 g **2** werden in 10 ml 40proz. wäbr.

¹⁶⁾ H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams, Mass Spectrometry of Organic Compounds, S. 307, Holden-Day Inc., San Francisco 1967.

Dimethylamin-Lösung 60 h bei Raumtemp. aufbewahrt. Die Lösung wird i. Vak. eingedampft und zur Entfernung von Wasser mehrfach mit Methanol/Toluol eingengt. Der Rückstand wird mit Methanol/Ether zur Kristallisation gebracht. Ausb. 1.17 g (87%). Schmp. 213–215°C. $[\alpha]_D^{25} = +39.0^\circ$ ($c = 1.35$ in H_2O). – IR (KBr): 3600–3060 (OH), 1650 (C=C) und 1585 cm^{-1} (Carboxylat).

$C_8H_{15}NO_3$ (173.2) Ber. C 55.48 H 8.73 N 8.09 Gef.*) C 54.06 H 9.05 N 7.90

Gemisch aus 4-Dimethylamino-2,3,4,6-tetradesoxy-D-erythro-hexonsäure (5) und 5-Dimethylamino-2,3,5,6-tetradesoxy-L-erythro-hexonsäure (6): 1.17 g 3 + 4 werden in 110 ml Methanol bei Raumtemp. und 4at H_2 innerhalb 15 min an 110 mg 10proz. Pd/C hydriert. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt und der Rückstand aus Methanol/Ether umkristallisiert. Ausb. 1.03 g (88%). Schmp. 175–177°C. $[\alpha]_D^{25} = +8.5^\circ$ ($c = 1.37$ in H_2O). – IR (KBr): 3240 (OH) und 1575 cm^{-1} (Carboxylat).

$C_8H_{17}NO_3$ (175.2) Ber. C 54.84 H 9.78 N 7.99 Gef. C 54.24 H 9.75 N 7.79

4-Dimethylamino-2,3,4,6-tetradesoxy-D-erythro-hexono- δ -lacton (7): 1.03 g 5 + 6 werden in 100 ml Acetanhydrid 3 h auf dem Dampfbad erhitzt. Die Lösung wird i. Vak. eingedampft, restliches Acetanhydrid durch mehrfaches Einengen mit Benzol entfernt. Der Rückstand wird durch präp. Chromatographie mit absol. Aceton/absol. Benzol/absol. Dioxan (1:1:1) getrennt. Farbloser Sirup. Ausb. 0.65 g (70%). $[\alpha]_D^{25} = +116.2^\circ$ ($c = 1.19$ in Benzol).

IR (NaCl): 1730 cm^{-1} (δ -Lacton-CO). – 1H -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): dq $\delta = 4.36$ (5-H), m 2.69–2.17 (2-, 2', 4-H), s 2.25 (2CH₃), m 2.02–1.72 (3-, 3'-H), d 1.39 (6-, 6', 6''-H); $^3J_{5,6} = 6.5$ Hz. – MS: $m/e = 158$ (5%, $M^+ + 1$), 157 (30, M^+), 86 (9, $M^+ - Me_2N-CH=CH_2$), 85 (100, $Me_2\overset{+}{N}-CH=CH-CH_3$), 84 (55, $Me_2\overset{+}{N}=CH-CH=CH_2$), 70 (55, $Me_2\overset{+}{N}=C=CH_2$), 44 (30, $Me_2\overset{+}{N}$).

$C_8H_{15}NO_2$ (157.2) Ber. C 61.12 H 9.62 N 8.91 Gef. C 61.23 H 9.66 N 9.27

5-Dimethylamino-2,3,5,6-tetradesoxy-L-erythro-hexono- γ -lacton (8): Bei der vorstehend beschriebenen chromatographischen Trennung wird ein zweites Produkt erhalten. Farbloser Sirup. Ausb. 0.15 g (16%). $[\alpha]_D^{25} = -27.1^\circ$ ($c = 1.00$ in Benzol).

IR (NaCl): 1770 cm^{-1} (γ -Lacton-CO). – 1H -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): dt $\delta = 4.43$ (4-H), s 2.24 (2CH₃), m 2.75–1.88 (2-, 2', 3-, 3', 5-H), d 1.04 (6-, 6', 6''-H); $^3J_{5,6} = 6.5$ Hz. – MS: $m/e = 158$ (2%, $M^+ + 1$), 157 (5, M^+), 114 (7), 85 (16, $M^+ - \text{Seitenkette}$), 73 (10, $Me_2\overset{+}{N}-CH_2-CH_3$), 72 (100, $Me_2\overset{+}{N}=CH-CH_3$), 44 (74, $Me_2\overset{+}{N}$).

$C_8H_{15}NO_2$ (157.2) Ber. C 61.12 H 9.62 N 8.91 Gef. C 61.09 H 9.67 N 9.08

4-Dimethylamino-2,3,4,6-tetradesoxy-D-erythro-hexopyranose (Forosamin, 9): Zu 285 mg 7 in 8 ml Tetrahydrofuran (frisch über $LiAlH_4$ destilliert) werden im N_2 -Strom unter Rühren bei $-30^\circ C$ 1.7 ml 20proz. Diisobutylaluminiumhydrid in Toluol getropft. Nach je 1 h bei -30 und $-20^\circ C$ werden 0.5 ml Wasser in 1.5 ml Methanol zugegeben. Es wird auf Raumtemp. erwärmt und von ausgefallenem Aluminiumhydroxid abfiltriert. Der Rückstand wird gut mit Aceton gewaschen und das Filtrat i. Vak. eingedampft. Der farblose Sirup kristallisiert beim Kühlen. Ausb. 200 mg (70%). Schmp. 58–60°C (Lit.⁵⁻⁷): 60, 60 und 58–60°C. $[\alpha]_D^{25} = +86.1^\circ$ ($c = 0.9$ in CH_3OH) (Lit.⁵⁻⁷): +83.9, +88 und $+90 \pm 1^\circ$ (alle in CH_3OH).

MS: $m/e = 159$ (13%, M^+ (Hochauflösung: Ber. 159.1259, gef. 159.1274)), 114 (41, $M^+ - C_2H_5O$ (HA: Ber. 114.0918, gef. 114.0911)), 98 (5), 85 (23, $C_5H_{11}\overset{+}{N}$ (HA: Ber. 85.0891, gef. 85.0873)), 84

* 3/4 enthält wechselnde Restmengen Wasser, die schwer zu entfernen sind.

(31, $C_5H_{10}N^+$ (HA: Ber. 84.0813, gef. 84.0792)), 71 (100, $(CH_3)_2N^+-CH=CH_2$), 56 (14), 44 (23, $(CH_3)_2N^+$ (HA: Ber. 44.0500, gef. 44.0452)).

$C_8H_{17}NO_2$ (159.2) Ber. C 60.35 H 10.76 N 8.80 Gef. C 60.31 H 10.74 N 8.61

5-Dimethylamino-2,3,5,6-tetradesoxy-DL-erythro-hexofuranose (**10**): 380 mg **8** (DL-Form) werden mit 3 ml 20proz. DIBAH in Toluol reduziert und nach Zugabe von 1 ml Wasser in 3 ml Methanol aufgearbeitet, wie vorstehend beschrieben. **10** wird durch Chromatographie mit Aceton/Benzol/Dioxan (1:1:1) von nicht reduziertem **8** abgetrennt. Ausb. 70 mg (18%) Sirup. Für analytische Zwecke wird **10** durch Kugelrohrdestillation weiter gereinigt.

MS: $m/e = 159$ (1%, M^+), 141 (3, $M^+ - H_2O$), 72 (100, $(CH_3)_2N^+=CH-CH_3$), 44 (27, $72 - C_2H_4$).

$C_8H_{17}NO_2$ (159.2) Ber. C 60.35 H 10.76 N 8.80 Gef. C 60.40 H 10.48 N 9.16

[135/77]