

Synthese substituierter Kohlenhydrate



**Arbeitsgruppenpraktikum am
Institut für Organische Chemie**

Betreuung:
Nikolas Pietrzik

Protokoll:
Stefan Mogk

Titelbild: Aus Zuckerrohr und Zuckerrübe gewonnener Haushaltszucker besteht aus Saccharose, dem nichtreduzierenden Disaccharid α -D-Glucosido-1,2- β -D-Fructose.

Inhaltsverzeichnis

1	Theorie	3
2	Material und Methoden	4
2.1	<i>Syntheseplan anomerer Azide</i>	4
2.1.1	Bromierung an C1 und Acetylierung an C2-C4, C6	4
2.1.2	Azidierung im Phasen-Transfer Verfahren	5
2.1.3	Entschützung nach Zemplen	5
2.1.4	Stannylierung und C6-Alkylierung	6
2.1.5	Einführung von Silyl-Schutzgruppen an C6	6
2.1.6	Einführung von Benzoyl-Schutzgruppen	7
2.1.7	Fluoro-Desilylierung	7
2.1.8	Glykosylierung aktivierter Alkane	7
2.2	<i>Syntheseplan von Thioacetalen</i>	8
2.2.1	PFP-Aktivierung von Carboxylverbindungen als Aktivester	8
2.2.2	Amidkopplung	9
2.2.3	Synthese von Thioglycosiden	9
2.2.4	Azidierung an C6	10
2.2.5	Staudinger-Ligation	10
2.2.6	Hydrierung von Aziden und Amidkopplung	11
2.2.7	Synthese chromogener Substrate	11
2.2.8	1,3-dipolare Cycloaddition	11
2.3	<i>Syntheseplan anomer propargylierter Glykoside</i>	12
2.3.1	Einführung von Tosyl-Schutzgruppen an O6	12
2.3.2	6-O-Cyanatoglykoside	13
2.3.3	Entschützung nach Zemplen / Acetylierung	13
2.3.4	1,3-dipolare Cycloaddition	13
2.3.5	1-O-(3-brom-prop-2-ynyl)-Glycoside	14
2.3.6	Cadiot-Chodkiewicz-Kopplung	14
2.3.7	Cadiot-Chodkiewicz-Kopplung	15
2.3.8	Bromierung von Propargyl-Aspartat	15
2.4	<i>Syntheseplan weiterer Kohlenhydrate</i>	15
2.4.1	S-Glykosylierung aktivierter Alkane	15
2.4.2	Azidierung an C6	16
2.4.3	Einführung von Silyl-Schutzgruppen an C6	16
2.4.4	Einführung von Benzoyl-Schutzgruppen	16
3	Analytische Methoden	17
3.1	<i>NMR-Spektroskopie</i>	17
3.2	<i>Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI)</i>	18
4	Literaturverzeichnis	20

1 Theorie

Kohlenhydrate wurden ursprünglich gemäß ihrer Summenformel $C_n(H_2O)_n$ als hydratisierter Kohlenstoff definiert. In ihrer offenkettigen Form liegen sie als Hydroxyaldehyde (Aldosen) oder Hydroxyketone (Ketosen) vor. Ihre nicht-kondensierten Vertreter, die Monosaccharide, bestehen aus mindestens drei C-Atomen und mindestens einem Chiralitätszentrum (Ausnahme: Dihydroxyaceton). Dieser Aufbau bedingt die Existenz einer Vielzahl von Stereoisomeren. Während physiologisch nur D-Enantiomere relevant sind, existieren allein für die D-Aldohexosen noch acht Isomere (Hexosen besitzen vier chirale Kohlenstoffatome, wovon die Position der C5-OH-Funktion durch die D-Konfiguration festgelegt ist): Allose, Altrose, Glucose, Mannose, Gulose, Idose, Galactose, Talose. Die in der Natur vorkommenden D-Aldoketosen lauten Psicose, Fructose, Sorbose und Tagatose.

Aldosen cyclisieren zu intramolekularen Halbacetalen, Ketosen zu Halbketalen. Durch diese Cyclisierung können theoretisch Pyranoside und Furanoside ausgebildet werden. Hierbei entsteht ein weiteres Chiralitätszentrum, nach dem die jeweiligen Konfigurationsisomere als α und β -Formen bezeichnet werden. Diese sogenannten Anomere gehören wie Epimere zu der Gruppe der Diastereomeren. α und β -Formen stehen über Mutarotation miteinander im Gleichgewicht.

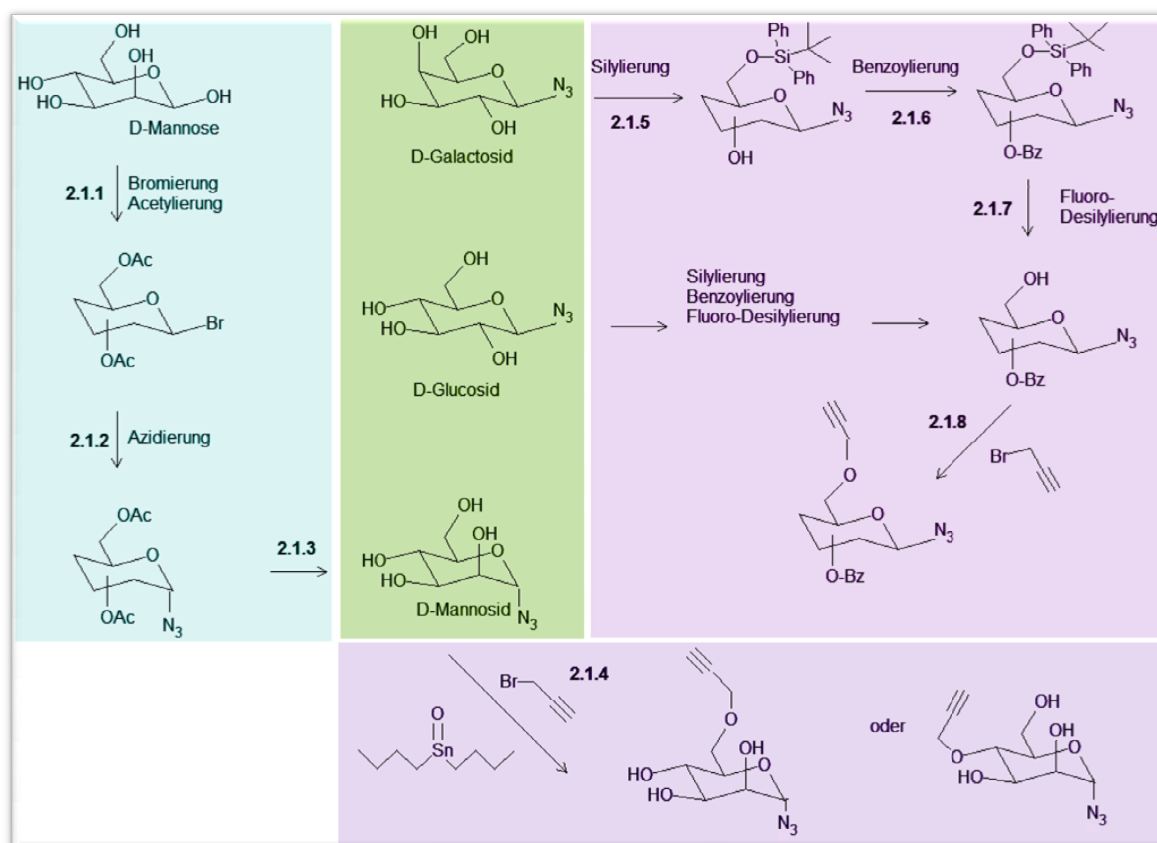
Ringförmige Pyranoside existieren in unterschiedlichen Konformationen: Den stabilen Sesselformen (1C_4 und 4C_1), der hochenergetischen Halbsesselform, den relativ stabilen Twistformen und deren „Übergangszustand“, der Wannenform. Durch die tetraedrische Anordnung der sp^3 -Kohlenstoffbindungen können die OH-Funktionen je nach Konfiguration axial oder äquatorial stehen. Dabei treten insbesondere 1,3-diaxiale und 1,2-*gauche*-Wechselwirkungen auf. Meist ist diejenige Konformation mit der höheren Zahl äquatorial stehender Substituenten begünstigt. Der anomere Effekt widerspricht diesen rein sterischen Betrachtungen: tatsächlich bevorzugen Heteroatome, welche an ein Kohlenstoffatom neben einem Heteroatom im Cyclohexanring substituiert sind, die eigentlich ungünstige axiale (β bei 1C_4) Position. Die verbreitetsten natürlichen Kohlenhydrate stellen Systeme mit fünf oder sechs Kohlenstoffatomen dar, namentlich die Monosaccharide Glucose und Fructose, über O-glykosidische Bindung vernetzte Disaccharide (Saccharose/Lactose/Maltose), Oligosaccharide (Raffinose), Polysaccharide (Amylopektin/Glycogen/Stärke/Zellulose/Chitin).

Im Rahmen der experimentellen Arbeit wurde versucht, Kohlenhydrate zu derivatisieren und auf diese Art chemisch und biologisch interessante Bausteine zu synthetisieren, die letztlich auch als Vorstufen pharmakologisch wirksamer Substanzen genutzt werden können.

2 Material und Methoden

Die zugrundeliegenden Versuche wurden so gruppiert, dass die Reaktionswege zusammenhängend und in sich geschlossen dokumentiert werden konnten. Aus diesem Grund werden im Folgenden vier Übersichtsschemata vorgestellt, aus denen einzelne (die tatsächlich im Rahmen des Praktikums durchgeführten) Reaktionen näher beschrieben werden. Bei ähnlichen Reaktionen werden ggf. nur die eingesetzten Stoffmengen angegeben und bezüglich der Durchführung auf die entsprechenden Kapitel mit ausführlicher Darstellung verwiesen.

2.1 Syntheseplan anomerer Azide



2.1.1 Bromierung an C1 und Acetylierung an C2-C4, C6

30mmol (5.4g) D-Mannose wurden in 153mmol (14.46ml) Acetanhydrid suspendiert und unter Eiskühlung gerührt. Der vorgekühlten Reaktionslösung wurden 30mmol (8.1ml) HBr-Lösung (30% in AcOH) langsam zugegeben, worauf eine exotherme Reaktion einsetzte und eine bräunliche Lösung entstand. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute

Kühlung im Eisbad mit anschließender Zugabe von weiteren 60mol (16.2ml) HBr-Lösung. Der Reaktionsverlauf (bei Raumtemperatur) wurde nun über einen Zeitraum von 150 Minuten dünnschichtchromatographisch (Hexan:Ethylacetat = 1:1) verfolgt. Überschüssige Bromwasserstoffsäure wurde vorsichtig ausgeblasen und die entstandene Essigsäure im Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit Toluol coevaporiert. Durch die dirigierende Wirkung der dem anomeren Zentrum benachbarten Acetylgruppe entstand stereoselektiv ausschliesslich die β -Form (d.h. ein 1,2-*cis*-Glycosylazid).

2.1.2 Azidierung im Phasen-Transfer Verfahren

30mmol (theoretische Ausbeute) Tetra-O-acetyl- β -D-mannopyranosylbromid aus 2.1.1 wurden in 150ml Dichlormethan (Methylenchlorid) aufgenommen und mit zwei Äquivalenten NaN_3 (3.9g) sowie 4.5mmol Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS, 1.53g) als Phasen-Transfer-Katalysator versetzt. Die Lösung wurde langsam mit 1M Na_2CO_3 (210ml) überschichtet und 90 Minuten heftig gerührt. Der Ansatz wurde mit weiteren 150ml Dichlormethan verdünnt und die organische Phase im Scheidetrichter abgetrennt. Zur Entsalzung wurde mit destilliertem Wasser ausgeschüttelt und mit Na_2SO_4 (Glaubersalz) getrocknet. Das durch einen Rückseitenangriff entstandene Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosylazid wurde im Rotationsverdampfer konzentriert und verteilungschromatographisch über SiO_2 (Kieselgel) mittels Flash-Technik gereinigt. Als Eluent diente Petrolether:Ethylacetat im Verhältnis 3:1.

2.1.3 Entschützung nach Zèmplen

Acetylierte oder benzoyleierte Kohlenhydrate lassen sich nach Zèmplen mit Natriummethoxid im Rahmen einer Umesterung entschützen: Die geschützte Spezies wird in Methanol gelöst und mit einer katalytischen Menge NaOMe versetzt. Der Reaktionsverlauf lässt sich dünnschichtchromatographisch (Petrolether:Ethylacetat = 1:1) kontrollieren, da die OH-freie Verbindung auf dem polaren Kieselgel der stationären Phase nicht wandert und sich nach Veraschen mit Schwefelsäure auf der Basislinie darstellt. Bei vollständiger Reaktion wird der basische Ansatz mit Salzsäure neutralisiert, im Rotationsverdampfer getrocknet und zweimal mit Toluol coevaporiert.

2.1.4 Stannylierung und C6-Alkylierung

Zu einer Lösung von 5mmol (1.03g) D-Mannopyranosylazid in Toluol wurden 5mmol Di(n-butyl)-zinnoxid hinzugefügt, um ein Zinnacetal an C4 und C6 zu generieren, das nur jeweils an einem Sauerstoffatom von Allylbromid elektrophil angegriffen werden kann. Die Reaktionsansatz wurde bis zum Rückfluss erhitzt und das abgespaltene Wasser in einem Dean-Stark-Wasserabscheider laufend entfernt. Das bicyclische zinnorganische Produkt wurde mit 7.5mmol (80% in Toluol, 1.10ml) Propargylbromid und 6mmol (912mg) Cäsiumfluorid versetzt und führte bei 60°C zum 6-O- (bzw. nebenproduktlich 4-O-) propargylierten Mannosylazid. Cäsiumfluorid dient in der organischen Chemie neben Tetraalkylammoniumfluoriden als Lieferant von Fluoridanionen und milde Base. Es besitzt einen stark ionischen Charakter und ist die Verbindung der beiden Elemente mit dem größten möglichen Unterschied der Elektronegativitäten. Hier ermöglicht Fluorid die Abspaltung der Schutzgruppe vom verbleibenden (an das Zinn gebundene) Sauerstoffatom nach dem elektrophilen Angriff des Alkylkations.

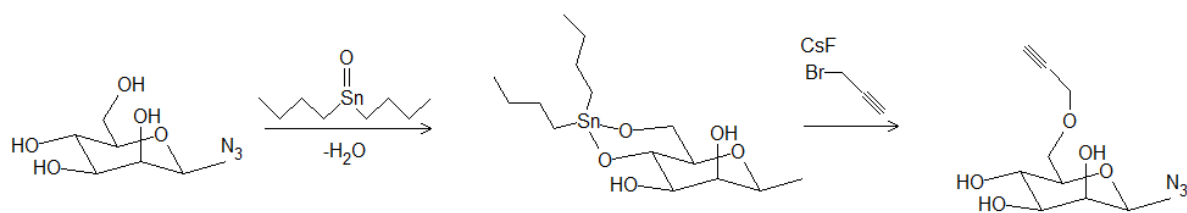


Abbildung 1: Stannylierung / Destannylierung

2.1.5 Einführung von Silyl-Schutzgruppen an C6

Um Hexopyranosen selektiv an C6 zu schützen, eignen sich sowohl Tosyl- als auch Silylschutzgruppen. Soll im weiteren Verlauf eine 6-OH-freie Verbindung erhalten werden, sind letzere zu bevorzugen, um den basischen Anforderungen einer S_N2 -Substitution der Tosylfunktion gegen Hydroxidionen zu entgehen.

Zur Einführung einer *tert*-butyldiphenylsilyl-Schutzgruppe wurden 4.88mmol (1g) D-Galactopyranosylazid in 16ml absolutiertem oder zumindest aminfreiem DMF (vorgetrocknet mit suspendiertem Bariumoxid, danach destilliert) gelöst. 10.7mmol (732mg) Imidazol dienten als Hilfsbase. Nach Zugabe von 5.37mmol (1.40ml) *tert*-butylchlorodiphenylsilan wurde der Ansatz mehrere Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung in Eiswasser überführt, der entstandene Niederschlag abgenutscht und mit Wasser und *n*-Hexan gewaschen. Da beim Waschen beträchtliche Verluste auftraten, wurde bei

wiederholten Versuchen der Ansatz direkt benzoyleiert und im Anschluß chromatographisch gereinigt.

2.1.6 Einführung von Benzoyl-Schutzgruppen

Die Einführung von Benzoyl-Schutzgruppen erfolgt als Veresterung der Alkoholfunktionen mit Benzoessäurechlorid. Im Rahmen der nachfolgenden Fluoro-Desilylierung eignen sich die stabileren Benzylester besser als Essigsäureester. 3mmol 1-Azido-6-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-D-galactopyranose wurden in Pyridin gelöst, worauf 12mmol (2.1ml) Benzoylchlorid (entsprechend 2 Äquivalente pro OH-Gruppe) langsam und unter Eiskühlung zugegeben wurden. Der Fortgang der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht und die Lösung nach vollständiger Umsetzung bei vermindertem Druck eingeeengt. Das verbleibende Öl wurde in Wasser emulgiert, um überschüssiges Benzoylchlorid zu hydrolysieren und Ionen zu entfernen. Nach dreimaligem Ausschütteln mit Dichlormethan werden die organischen Phasen vereinigt, einrotiert und mit Toluol coevaporiert bis das Produkt pyridinfrei ist.

2.1.7 Fluoro-Desilylierung

Die Abspaltung der Silylschutzgruppe erfolgte in THF bei Raumtemperatur über Nacht. Zu 3mmol 2,3,4-Tri-O-acetyl-1-azido-6-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-D-galactopyranose wurden 4mmol (1.23g) Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) gegeben. Auf Grund der starken Tendenz zur Ausbildung der energiereichen Si-F-Bindung sind schwach nukleophile (weil harte) Fluoridanionen in der Lage, Silyl-Schutzgruppen zu entfernen. Die entschützte Spezies wurde im Flash-Verfahren auf eine Kieselgel-Säule aufgetragen und mit Petroether:Ethylacetat im Verhältnis 5:1 eluiert.

2.1.8 Glykosylierung aktivierter Alkane

Die 6-OH-Funktion der Galactose wurde mit einer Hilfsbase deprotoniert und ermöglichte so einen nukleophilen bimolekularen Angriff auf das Allylbromid. Als Basen fungierten Natriumhydrid und alternativ [Ansätze in eckiger Klammer] Kaliumcarbonat. 1mmol (0.52g) [0.29mmol, 0.15g] 1-Azido-2,3,4-tri-O-benzoyl-D-galactopyranose und 1.5mmol (80% in Toluol, 218µl) [0.43mmol, 63µl] Propargylbromid wurden in DMF (THF) gelöst. Den

Nach Reaktionsende wurde dem Hydrid-Ansatz 40ml Ethanol als Scavenger zugegeben, die Lösung danach in kaltes Wasser überführt und mehrmals mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Experimentell konnte mit der NaH-Methode kein 2,3,4-Tri-O-acetyl-1-azido-6-O-(2-propinyl)-D-galactopyranose in zufriedenstellender Ausbeute synthetisiert werden.

The reaction scheme illustrates the synthesis of glycosylated Fmoc-Asp(OtBu)-PFP conjugates. It is organized into three main sections:

- Top Section (Green Background):**
 - Reaction 2.2.3:** A sugar derivative with multiple OAc groups reacts with HS- to form a thiol-protected sugar.
 - Reaction 2.2.1:** Fmoc-Asp(OtBu)-PFP (A) reacts with a fluorinated aromatic amine (B) to form the Fmoc-Asp(OtBu)-PFP conjugate (C).
 - Reaction 2.2.2:** The thiol-protected sugar reacts with an alkyne-protected Fmoc-Asp(OtBu)-PFP conjugate (C) to form the glycosylated conjugate.
- Middle Section (Pink Background):**
 - Reaction 2.2.4:** The thiol-protected sugar is converted to an azide (Azidierung).
 - Reaction 2.2.5:** The azide-protected sugar reacts with Fmoc-Asp(OtBu)-PFP (A) to form the glycosylated conjugate.
 - Reaction 2.2.6:** The azide-protected sugar reacts with Fmoc-Asp(OtBu)-PFP (B) to form the glycosylated conjugate.
 - Reaction 2.2.7:** The azide-protected sugar reacts with Nitrophenol (2.2.7) to form the glycosylated conjugate.
 - Reaction 2.2.8:** The azide-protected sugar reacts with Fmoc-Asp(OtBu)-PFP (C) to form the glycosylated conjugate.
- Bottom Section (Blue Background):**
 - Reaction 2.2.1:** The thiol-protected sugar is converted to a thiol (Umschuetzung).
 - Reaction 2.2.2:** The thiol-protected sugar reacts with Fmoc-Asp(OtBu)-PFP (A) to form the glycosylated conjugate.
 - Reaction 2.2.3:** The thiol-protected sugar reacts with Fmoc-Asp(OtBu)-PFP (B) to form the glycosylated conjugate.
 - Reaction 2.2.4:** The thiol-protected sugar reacts with Fmoc-Asp(OtBu)-PFP (C) to form the glycosylated conjugate.

Zur Herstellung von Glykopeptiden werden Bausteine benötigt, die eine kovalente Bindung zwischen Kohlenhydraten und Aminosäuren beinhalten. Ziel ist die Synthese eines Asparaginsäure-PFP-Aktivesters, der im Folgenden über eine Amidbindung an C6-azidierte Glykoside gekoppelt werden soll. Als Linker zwischen Aminosäure und Zucker dient 5-Aminovaleriansäure. Der N-Terminus der Aminosäure ist Fmoc-geschützt, als Seitenkettenschutzgruppe dient ein *tert*-Butylrest.

5mmol 5-[(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-aspartyl(*O-tert*-butyl)-amino]-valeriansäure und 6mmol (1.10g) Pentafluorphenol wurden in 0°C kaltem Ethylacetat gelöst. Dann erfolgte die Zugabe von 6mmol (1.24g) Dicyclohexylcarbodiimid in einer Portion. Der Ansatz inkubierte für 1h bei 0°C, danach bei Raumtemperatur. Nach beendeter Reaktion wurde der ausgefallene *N*-Hexylharnstoff abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

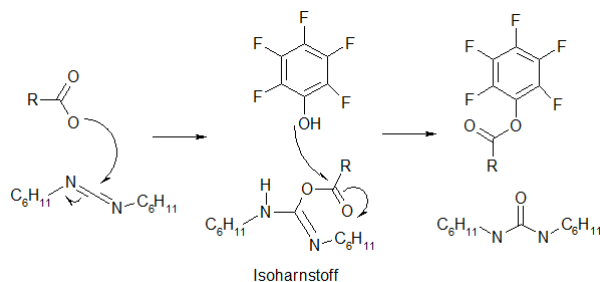


Abbildung 2: PFP-Aktivierung von Carbonsäuren

2.2.2 Amidkopplung

5mmol (9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-aspartyl(*O-tert*-butyl)-pentafluorphenol wurden mit einer äquimolaren Menge (320µl) Propargylamin in Ethylacetat gekoppelt und anschliessend verteilungschromatographisch gereinigt. Zur Abtrennung unpolarer Komponenten wurde mit Petrolether:Ethylacetat im Verhältnis 7:1 gewaschen und das Produkt im Verhältnis 1:1 eluiert.

2.2.3 Synthese von Thioglycosiden

Die Synthese eines 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thioethyl-D-galactopyranosids erfolgte mit 59.7mmol (23.3g) Pentaacetylgalactose und 178mmol (13.2ml) Ethanthiol in Dichlormethan. Zum Abfangen der Acetylgruppen dienten 173,8mmol (22ml) Bortrifluorid-Diethyletherat (BF₃·EtOEt). Bortrifluorid ist als Elektronenmangelverbindung eine starke Lewis-Säure, die in vielen chemischen Reaktionen Additionsverbindungen wie beispielsweise BF₃-Acetat bilden kann. Die Reaktion fand unter Schutzgasatmosphäre und Eiskühlung statt. Nach zwei Stunden wurde das Eisbad entfernt und weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Um die Deprotonierung zum Thiolatanion zu unterstützen, wurde gesättigte NaHCO₃-Lösung zugegeben und erneut zwei Stunden gerührt. Nach Trocknung der organischen Phase mit NaSO₄ (Glaubersalz) ergab eine Säulenchromatographische Reinigung mit Petrolether:Ethylacetat (3:1) das gewünschte Thioacetal.

2.2.4 Azidierung an C6

5.79mmol (4.0g) 2,3,4-Tri-O-benzoyl-1-thioethyl-6-O-(p-toluolsulfonyl)-D-mannopyranose und sechs Äquivalente (34.74mmol, 2.26g) Natriumazid wurden in DMF mit 10% Wasser bei 60°C über Nacht gerührt. Die Lösung wurde in Wasser aufgenommen, mit Dichlormethan extrahiert, im Rotationsverdampfer konzentriert und mehrmals mit Toluol coevaporiert.

2.2.5 Staudinger-Ligation

In der Staudinger-Reduktion reagiert ein Azid mit einem Phosphin (bzw. Phosphit [PO_3^{3-}]) zu einem intermediären Iminophosphoran und weiter unter Stickstoffabspaltung zu einem Aza-Ylid. Wird dieses hydrolysiert, so entsteht ein Phosphinoxid und ein Amin. Somit stellt die Reaktion eine milde Methode dar, ein Azid zu einem Amin zu reduzieren. Als Reduktionsmittel wird meist Triphenylphosphin verwendet, wodurch als Nebenprodukt Triphenylphosphinoxid entsteht. In Gegenwart eines Nukleophils (oft eines Methylesters), kann das Aza-Ylid-Intermediat eine Amidbindung ausbilden und so neben des Phosphinoxids zwei Moleküle ligieren.

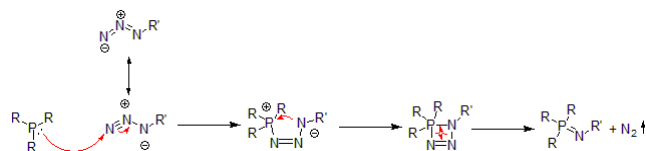


Abbildung 3: Allgemeine Staudinger-Reduktion

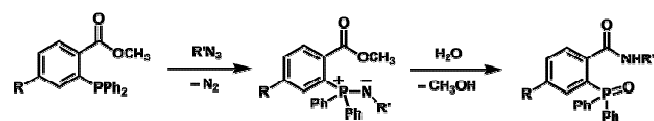


Abbildung 4: Allgemeine Staudinger-Ligation

Für den Versuch wurden 0.64mmol (0.24g) 5-[(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-aspartyl(O-*tert*-butyl)-amino]-valeriansäure in Trichlormethan (Chloroform) gelöst, und mit 1.5 Äquivalenten (0.26g) Triphenylphosphin, sowie 0.64mmol 6-Azido-2,3,4-tri-O-benzoyl-1-thioethyl-D-mannopyranose in versetzt.

Experimentell ließ sich das gewünschte Reaktionsprodukt nicht in hinreichender Menge darstellen. Fraglich erscheint hier, inwieweit eine Staudinger-Ligation überhaupt mit einem

nicht aktivierten Carboxylatanion, das auf Grund seiner Mesomerie praktisch keine Carbonylaktivität besitzt, möglich ist.

2.2.6 Hydrierung von Aziden und Amidkopplung

Je 0.64mmol (0.24g) 2,3,4-Tri-O-acetyl-1-thioethyl-6-azido-D-mannopyranose und ihr entsprechendes Galactosependant wurden mit (9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-aspartyl(*O*-*tert*-butyl)-pentafluorphenol in Ethanol gelöst und bei Raumtemperatur mit Wasserstoff begast. Auf Grund der hohen Stabilität des Wasserstoffmoleküls fand die Durchführung der Hydrierung am Palladium/Kohlenstoff Katalysator statt.

2.2.7 Synthese chromogener Substrate

Unter chromogenen Substraten versteht man Substanzen, die bei entsprechender (meist enzymatischer) Umsetzung ein Chromophor freisetzen. Hier handelt es sich um *p*-Nitrophenolat, das ein Absorptionsmaximum im gelben Spektralbereich (bei 405 nm) aufweist.

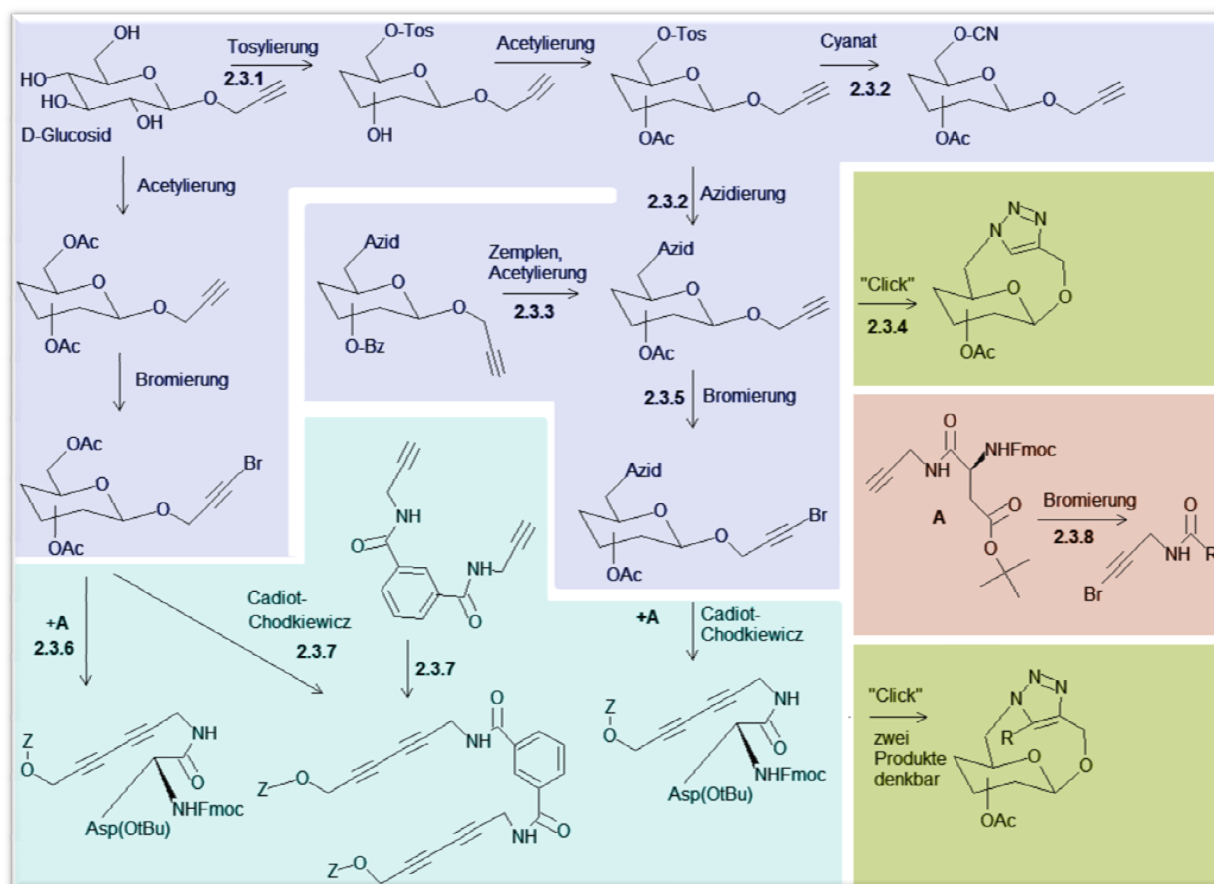
3mmol (1.13g) eines 6-Azido-2,3,4-tri-O-acetyl-1-thioethyl-pyranosids wurden mit 3.6mmol (0.5g) *p*-Nitrophenol in 30ml Dichlormethan umgesetzt. Konkurrierendes Wasser wurde durch den Einsatz von 3g eines 4Å Molekularsiebes abgefangen. Ferner wurden 15mmol (3.39g) N-Iod-succinimid (NIS) und 4.8mmol (0.843ml) Trimethylsilyltrifluoromethansulfonat ($\text{Me}_3\text{-Si-O-SO}_2\text{-CF}_3$, Trimethylsilyltriflat, TMSTf) zugegeben.

2.2.8 1,3-dipolare Cycloaddition

Die Huisgen-Cycloaddition ist eine Reaktion eines Dipolarophils mit einer 1,3-dipolaren Verbindung, welche zu 5-gliedrigen Heterocyclen führt. Beispiele für Dipolarophile sind Alkene, Alkine, aber auch mehrbindige, heteroatomhaltige Gruppen wie Nitrile und Carbonyle. 1,3-dipolare Verbindungen enthalten mindestens ein Heteroatom und können mit mindestens einer mesomeren Struktur beschrieben werden, welche zwei Ladungen enthält. 2 π Elektronen des Dipolarophils und 4 Elektronen der dipolaren Verbindung werden gleichzeitig (konzentriert) pericyclisch verschoben. Die Reaktion ist stereokonservativ (suprafacial) und somit eine [3+2]-Cycloaddition ähnlich der Diels-Alder-Reaktion.

Hier werden dipolarophile Azide mit dipolaren Acetylenen zu cyclischen Triazolen umgesetzt („Click“-Reaktion): 0.6mmol (271mg) 2,3,4-Tri-O-acetyl-6-azido-1-O-(p-nitrophenyl)-D-galactopyranosid und 0.6mmol (269mg) (9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-aspartyl(O-tert-butyl)-propargylamid wurden in Toluol gelöst. Als Hilfsbase dienten 1.8mmol (310µl) Diisopropylethylamin, katalysiert wurde die Reaktion von 0.06mmol (24mg) eines Triethoxyphosphin-Kupferiodid-Komplexes $(\text{EtO}_3)\text{P}\cdot\text{CuI}$.

2.3 Syntheseplan anomer propargylierter Glykoside



2.3.1 Einführung von Tosyl-Schutzgruppen an O6

Die Einführung einer Tosyl-Schutzgruppe erfolgte mit 36mmol (6.9g) aktiviertem p-Toluolsulfonsäurechlorid an der C6-Hydroxyfunktion von 12.1mmol (2.65g) 1-O-propargyl-β-D-glucopyranose. Die Reaktion an den sekundären Ringkohlenstoffatomen ist sterisch ungünstig und verläuft vergleichsweise langsam. Als Hilfsbase und Lösungsmittel wurden 80ml Pyridin verwendet. Nach 1.5 Tagen bei anfänglicher Kühlung und fortgesetzter

Reaktion bei Raumtemperatur wurden direkt 1.2 Äquivalente Essigsäureanhydrid pro Hydroxyfunktion zugegeben (4.3ml) und 30 Minuten gerührt.

Die Lösung wurde unter reduziertem Druck eingengt, verbleibendes Pyridin mit Toluol coevaporiert und der Rückstand in Wasser aufgenommen, um ionische Komponenten (Acetate, Tosylate) zu entfernen. Das Produkt 2,3,4-Tri-O-acetyl-1-O-propargyl-6-O-(p-toluolsulfonyl)- β -D-glucopyranose wurde mit Dichlormethan extrahiert und verteilungschromatographisch gereinigt.

2.3.2 6-O-Cyanatoglykoside

Zur Substitution der Tosyl-Schutzgruppe durch Azid (Cyanat) wurden 5.4mmol (2.7g) 2,3,4-Tri-O-acetyl-1-O-propargyl-6-O-(p-toluolsulfonyl)- β -D-glucopyranose mit drei Äquivalenten Natriumazid (Natriumcyanat) in DMF:Wasser = 9:1 bei 60°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde in 600ml Wasser aufgenommen, mit Dichormethan ausgeschüttelt, erneut mit Wasser gegengewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und mit Toluol coevaporiert. Die weitere Reinigung erfolgte an einer Kieselgelsäule im Flash-Verfahren mit Petrolether:Ethylacetat (3:1).

2.3.3 Entschützung nach Zèmplen / Acetylierung

5mmol (2.8g) 6-Azido-2,3,4-tri-O-benzoyl-1-O-propargyl- β -D-glucopyranose wurden wie unter 2.1.3 beschrieben nach Zèmplen entschützt und mit 1.2 Äquivalenten Essigsäureanhydrid pro Hydroxy-Funktion (18mmol, 1.7ml) in Pyridin acetyliert. Um gebildete Acetate zu entfernen, wurde wässrig aufgearbeitet, mit Dichlormethan extrahiert, gegengewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum konzentriert und mit Toluol coevaporiert.

2.3.4 1,3-dipolare Cycloaddition

Gemäß 2.2.8 wurden 2.71mmol (1g) 2,3,4-Tri-O-acteyl-6-azido-1-O-propargyl- β -D-glucopyranose mit 8.13mmol (1.4ml) DIPEA und 0.27mmol (108mg) $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ in Toluol zur Reaktion gebracht. Auf Grund einer geringen Ausbeute von ca 50% wurde die Cycloaddition in THF und unter Lichtausschluss (mit ähnlichem Ergebnis) wiederholt. Das reine Produkt wurde mit Ethylacetat aus einer Kieselgelsäule eluiert.

2.3.5 1-O-(3-brom-prop-2-ynyl)-Glycoside

Zur Bromierung von 2.36mmol (0.87mg) 2,3,4-Tri-O-acetyl-6-azido-1-O-propargyl- β -D-glucopyranose an der CH-aciden Dreifachbindung wurden 16.5mmol (2.95g) N-Bromsuccinimid (NBS) in Aceton bei 0°C (später bei Raumtemperatur) gelöst und 2.29mmol (389mg) Silbernitrat (AgNO_3) als Katalysator zugegeben.

Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, die Lösung einrotiert und in 200ml Eiswasser aufgenommen. Die Extraktion erfolgte mit Diethylether, welches im Anschluss mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen wurde. Die organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (Petrolether:Ethylacetat = 9:1)

2.3.6 Cadiot-Chodkiewicz-Kopplung

Die Kupfer-katalysierte Kopplung eines terminalen Alkins mit einem Halogenalkin in Anwesenheit einer Amin-Base ermöglicht die Darstellung von unsymmetrischen Produkten:

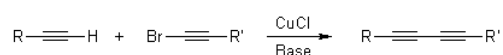


Abbildung 5: Allgemeine Cadiot-Chodkiewicz-Kopplung

Es wird vermutet, daß der Reaktionsmechanismus über das Kupfer(I)-Acetylid in einer oxidativen Addition mit dem Halogenalkin zu einer Kupfer(III)-Verbindung führt, aus der durch reduktive Eliminierung das Produkt freigesetzt wird.

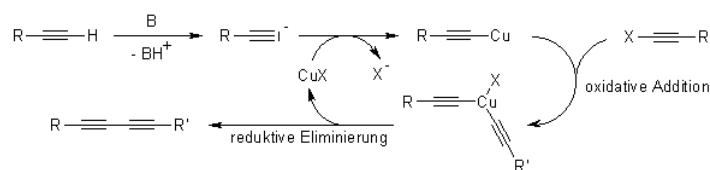


Abbildung 6: Mechanismus der Cadiot-Chodkiewicz-Kopplung

0.05mmol (23mg) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-O-(3-brom-prop-2-ynyl)- β -D-glucopyranose und 0.05mmol (22mg) (9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-aspartyl(O-*tert*-butyl)-propargylamid wurden in 137 μ l Diisopropylethylamin gelöst und mit einer katalytischen Menge CuI versetzt.

2.3.7 Cadiot-Chodkiewicz-Kopplung

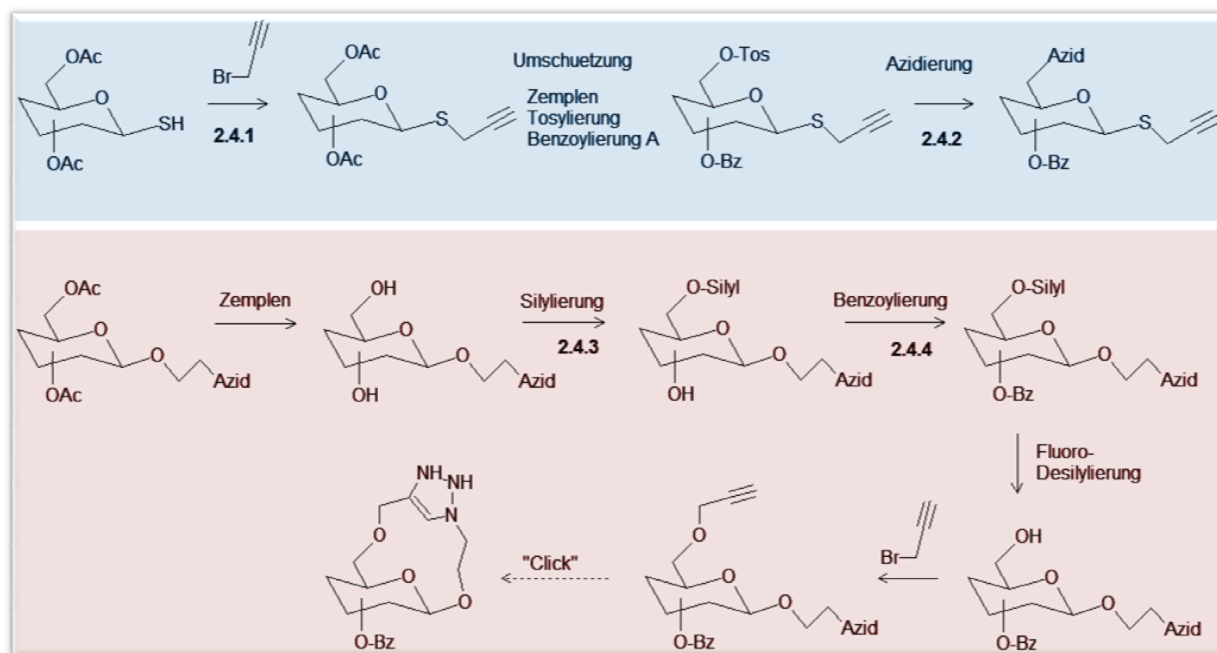
0.93mmol (0.43g) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-O-(3-brom-prop-2-ynyl)- β -D-glucopyranose und 0.47mmol (113mg) N,N'-Di-prop-2-ynyl-isophthalamid in DIPEA lieferten mit CuI entsprechend 2.2.6 das zweifache Cadiot-Chodkiewicz-Additionsprodukt.

2.3.8 Bromierung von Propargyl-Aspartat

Um für folgende Cadiot-Chodkiewicz-Kopplungen den experimentellen Aufwand der Bromierung propargylierter Kohlenhydrate reduzieren zu können, wurde nun ein bromierter Alkin-Aminosäurebaustein hergestellt:

2.23mmol (1g) (9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-aspartyl(O-*tert*-butyl)-propargylamid wurde mit 7.8mmol (1.4g) N-Bromsuccinimid und 0.9mmol (303mg) Silbernitrat entsprechend 2.3.5 bromiert.

2.4 Syntheseplan weiterer Kohlenhydrate



2.4.1 S-Glykosylierung aktivierter Alkane

31.5mmol (9.53g) einer 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio-pyranose wurden in 20ml Dichlormethan gelöst und mit einer äquimolaren Menge Diisopropylethylamin am anomeren Schwefelatom deprotoniert, um sie danach nukleophil an 31.5mmol (3.34ml, 80% in Toluol) Propargylbromid zu substituieren. Nach 2h bei Raumtemperatur wurde DIPEA-Bromid durch

Zugabe von 20ml Ethylacetat ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert und 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-(thio-prop-2-ynyl)-pyranose erhalten.

2.4.2 Azidierung an C6

12.4mmol (8.7g) einer 2,3,4-Tri-O-benzoyl-1-(thio-prop-2-ynyl)-6-O-(p-toluolsulfonyl)-pyranose wurde mit sechs Äquivalenten (4.8g) Natriumazid in Aceton gerührt. Durch nukleophile bimolekulare Substitution wurde die Tosyl-Abgangsgruppe auf diese Weise durch Azid ersetzt.

2.4.3 Einführung von Silyl-Schutzgruppen an C6

Wie unter 2.1.5 beschrieben wurden 10mmol (2.5g) einer 1-O-azidoethyl-derivatisierten Pyranose in 10ml absolutem DMF mit 22mmol Imidazol und 11mmol (2.9ml) *tert*-Butylchlorodiphenylsilan zur Reaktion gebracht.

2.4.4 Einführung von Benzoyl-Schutzgruppen

1.32mmol (0.65g) des silylierten Produkts aus 2.4.3 wurden mit 7.92mmol (7ml) Benzoylchlorid in Pyridin benzyliert und wie in 2.1.6 aufgearbeitet. Die folgende Fluoro-Desilylierung erfolgte wie in 2.1.7 mit 1.32mmol (0.42g) Tetrabutylammoniumfluorid.

3 Analytische Methoden

Zur Charakterisierung der synthetisierten Produkte dienen die im Folgenden näher beschriebenen analytischen Methoden.

3.1 NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie beruht auf dem Vorhandensein eines Eigendrehimpulses (Spins) der Atomkerne und der damit verbundenen Wechselwirkung von Atomkernen mit äußeren Magnetfeldern, von Kernen untereinander und mit ihren Elektronenhüllen.

Die meisten Atomkerne besitzen einen Kernspin I , der halb- und ganzzahlige Werte annehmen kann. Ist der Spin ungleich 0, so besitzt der Atomkern ein magnetisches Dipolmoment. Am wichtigsten in der analytischen Chemie sind Kerne mit $I=0.5$, wie ihn die Nuklide ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F und ^{31}P aufweisen, und damit in ihrer Form einer Kugel entsprechen. Kerne mit größeren Spinquantenzahlen sind geometrisch anspruchsvoller und haben ein zusätzliches Quatrupolmoment. In einem äußeren, statischen Magnetfeld richten sich die mikroskopischen Dipole in zwei diskreten Energiezuständen (parallel oder antiparallel) aus, und zwar nahezu zu gleicher Anzahl. Zwischenstellungen sind quantenmechanisch verboten. Je höher nun die externe Feldstärke ist, desto mehr verschiebt sich das Verhältnis zu Gunsten der parallel ausgerichteten Feldlinien. Als Folge resultiert ein makroskopischer Feldvektor, eine sogenannte Überschussmagnetisierung.

Zusätzlich führen die Atomkerne eine Präzessionsbewegung um die externen Feldlinien aus, deren Frequenz (Larmorfrequenz) direkt proportional zur angelegten Feldstärke ist. Da die Kerne dabei meist nicht phasengleich sind, ist makroskopisch zunächst keine Quermagnetisierung messbar. Allerdings lassen sich die Kerne mit Hilfe elektromagnetischer Strahlung mit eben dieser Resonanzfrequenz in den energetisch ungünstigeren antiparallelen Zustand überführen. Im Moment des Anregungspulses verschwindet somit die Längsmagnetisierung, während andererseits nun alle Kerne in Phase sind, was sich in einer Quermagnetisierung äußert. Makroskopisch scheint der Gesamtvektor um einen bestimmten Winkel ausgelenkt. Die longitudinale Relaxation (T_1) und die transversale Relaxation (T_2) dauern je nach Substanz und Pulssequenz von einigen Mikrosekunden (analytische Chemie) bis hin zu Sekunden (meist nur bei medizinisch-diagnostischen Verfahren). In diesem Echo-Zeitraum lässt sich ein Antwortsignal messen, das durch die wieder abgestrahlte Energie der Spins entsteht.

Da sich die elektronische Umgebung der einzelnen Atome unterscheidet, sind die Larmorfrequenzen der unterschiedlichen Kerne nicht absolut identisch. Dieser Umstand, der als chemische Verschiebung bezeichnet wird, lässt Rückschlüsse zu auf die funktionellen Gruppen, in denen das betrachtete Atom angesiedelt ist. Bei nicht Breitband-entkoppelten Verfahren (d.h. insbesondere bei ^1H -Spektren) tritt noch ein weiterer Effekt auf: die homonukleare (oder heteronukleare) Spin-Spin-Kopplung J benachbarter Atome, die zur Aufspaltung des Signals führt. Ein benachbarter Kern erscheint als Duplett-Feinstruktur, zwei Kerne als Triplet, drei Kerne als Quartett. Die Verteilung der Signalintensität entspricht dabei dem Pascalschen Dreieck.

Durch Integration lässt sich gewissermaßen das Gesamtsignal eines Peaks ermitteln, so dass auf die Anzahl der emittierenden Kerne des jeweiligen Peaks geschlossen werden kann.

3.2 Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI)

Der Begriff der Elektrospray Ionisation geht auf Arbeiten von Dole (1968) zurück und wurde durch John B. Fenn etabliert (Nobelpreis für Chemie 2002).

Elektrospray Ionisation ist eine Technik zur Erzeugung von Ionen. Sie gehört zu den Ionisationsverfahren, bei denen die Erzeugung der Ionen unter Atmosphärendruck stattfindet. Sie ist das bevorzugte Ionisationsverfahren zur Analyse von Biomolekülen, da sie schonend für das Analytmolekül ist und kaum zu Fragmentationen führt. Außerdem ist sie auch für die Ionisierung sehr großer Moleküle wie beispielsweise Proteine sehr gut geeignet. Anwendungsgebiete für ESI sind die Bestimmung der Molekülmasse, die Analyse und Sequenzierung von Proteinen und Oligonukleotiden und die quantitative Bestimmung von Arzneimitteln oder Pestiziden.

Bei der Elektrospray Ionisation wird eine Analytlösung durch eine Metallkapillare geleitet an deren Spitze eine Spannung angelegt ist. Durch die Spannung kommt es zur Bildung eines elektrischen Feldes zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode. Das elektrische Feld durchdringt die Analytlösung und in ihr befindliche Ionen bewegen sich elektrophoretisch auf die Gegenelektrode zu. Dabei bildet sich an der Spitze der Kapillare ein Überschuss gleichartig geladener Ionen, die sich gegenseitig abstoßen und über die Bildung eines *Taylor-Cone* als feines Aerosol (ca. 10 μm Tropfengröße) aus der Kapillare austreten. Ein neutrales Trägergas wie Stickstoff wird häufig benutzt um die Vernebelung der Lösung und die Verdampfung des Lösungsmittels zu unterstützen. Aufgrund der Verdampfung des Lösungsmittels verkleinert sich die Tropfengröße, während die Dichte des elektrischen Feldes auf der Tropfen-Oberfläche zunimmt. Wenn der Radius der Tropfen kleiner als das sog.

Rayleigh-Limit wird, zerfallen die Tropfen wegen der Abstoßung von gleichartigen Ladungen (→ Coulomb-Explosionen) in kleinere Tröpfchen.

Für die Bildung freier Ionen in der Gasphase existieren mehrere Modellvorstellungen. Beim *Charge Residue Model* (CRM, Modell des geladenen Rückstands) geht man davon aus, dass letztlich winzige Tropfen von ca. 1 nm Durchmesser übrigbleiben, die nur ein ionisiertes Analytmolekül enthalten. Nach dem *Ion Evaporation Model* (IEM, Ionenemissionsmodell) werden bereits aus größeren geladenen Tropfen freie Ionen in die Gasphase emittiert.

Die erzeugten Ionen werden durch die Potentialdifferenz zwischen Sprayerkapillare und Orifice in das Massenspektrometer gelenkt. Die Art der Spannung, die an der Kapillare angelegt wird, bestimmt die Ladung der Ionen, die erzeugt werden. Durch eine positive Spannung werden Kationen erzeugt und durch eine negative Spannung Anionen. Bei der Elektrospray-Ionisierung handelt es sich um eine sanfte Methode der Ionenerzeugung, bei der auch empfindliche Moleküle und nicht kovalente Aggregate ionisiert werden können. Typischer Weise werden Quasimolekül-Ionen detektiert ($[M+H]^+$ bei positiver Spannung; $[M-H]^-$ bei negativer Spannung). Ein charakteristisches Phänomen bei der ESI ist die Bildung von Addukt-Ionen mit Bestandteilen des Eluenten oder Puffers ($[M+Na]^+$; $[M+NH_4]^+$). Diese Adduktbildung ist ebenfalls mit Bestandteilen der Probenmatrix möglich. In einer Ionenfalle werden die erzeugten Ionen festgehalten. Die Speicherung der Ionen erfolgt ohne Kontakt zu einer Oberfläche. Es gibt zwei verschiedene Ausführungen der Ionenfalle:

In der *Paul-Falle* wird ein zeitlich veränderliches elektromagnetisches Feld verwendet um Ionen festzuhalten. Hat dieses Feld die Form eines Quadrupolsⁱ, wird die Falle auch als Quadrupol-Falle bezeichnet. Das

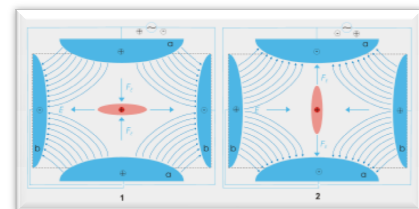


Abbildung 7: Paul-Falle

Feld wird in diesem Fall durch drei rotationssymmetrische Elektroden erzeugt: zwei Endkappenelektroden und eine mittlere Ringelektrode. Zwischen der Ringelektrode und den Endkappenelektroden liegt eine Wechselspannung mit einer Hochfrequenz von meist einem Megahertz an. Während einer Analyse wird die Amplitude der Wechselspannung erhöht. Je nach Ionen-Masse werden die Ionen bei Erreichen unterschiedlicher Amplituden aus der Ionenfalle geschleudert und gelangen zum Detektor.

In der *Penning-Falle* können elektrisch geladene Teilchen mit Hilfe eines konstanten Magnetfeldes und eines elektrostatischen Quadrupolfeldes gefangen werden. Daneben existieren auch *Flugzeit-Massenspektrometer* (TOF, time of flight), die ausnutzen, dass die

ⁱ **Quadrupol:** Anordnung zweier gleicher Dipole in entgegengesetzter Orientierung (antiparallel), so dass die einzelnen Ladungen/Magnetpole die Ecken eines Rechtecks beschreiben.

Ionen beim Eintritt in den Analysator alle die gleiche Energie haben und leichte Ionen deshalb schneller sind als schwere. Als *Detektoren* eignen sich Photomultiplier (Sekundärelektronenvervielfacher) oder Faraday-Detektoren, bei denen der Ionenstrom auf einen auf konstantem Potential gehaltenen Metallbecher trifft, was sich als Spannungsabfall an einem hochohmigen Zufluss-Widerstand bemerkbar macht.

4 Literaturverzeichnis

1. Lehmann, Georg Thieme Verlag **1996**, Kohlenhydrate, Chemie und Biologie
2. Kumar et al., Eur. J. Org. Chem. **2006**, 74-9, A Generalized Procedure for the One-Pot Preparation of Glycosyl Azides and Thioglycosides Directly from Unprotected Reducing Sugars under Phase-Transfer Reaction Conditions
3. Bandyopadhyay, Varghese and Sankararaman, J. Org. Chem. **2006**, 71, 4544-8, Synthesis of 1,4-Cyclohexadiene-Based Acetylenic Macrocycles with Cadiot-Chowkiewicz Coupling.
4. Zelinski and Meyer, J. Org. Chem. **1958**, 23, 810-3, Glucosylation of acetylenes