



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Azidonitratisierung und anomerer Effekt“

verfasst von

Peter Christoph Burdis

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

O. Univ. Prof. Mag. Dr. Helmut Vierstein

Danksagung:

Für das zu Stande kommen dieser Arbeit möchte ich mich zunächst bei O. Univ. Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein für die schnelle und unkomplizierte Vermittlung des Diplomarbeitsplatzes und bei Hon. Prof. Univ. Doz. Frank Michael Unger, Ph.D. für die wissenschaftliche Vorarbeit und Führung ohne die es das Thema nicht gegeben hätte bedanken. Mein Dank geht weiters an MMag. DI. Dr. Monika Müller, in deren Büro ich unzählige DC-Platten scannen durfte, obwohl es dort wegen meiner Versuche mehr als einmal einen sehr „chemisch-synthetischen“ Duft hatte.

Für ihre Hilfe in praktischen Fragen, die mir letztlich einiges an Zeit erspart hat, und das Hervorzaubern von dringend benötigten Materialien, gilt mein nächster Dank Natasha Djordjevic und Ing. Herbert Sulzbacher.

Schließlich möchte ich mich noch an dieser Stelle bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die meine oft körperliche und noch öfters geistige Abwesenheit immer mit Verständnis und nur selten mit Kopfschütteln ertragen haben.

Abstract:

Azidonitration and the anomeric effect

The case of per-O-acetyl-cellobial [2,3,4,6- tetra-O-acetyl- β -D-gluco-pyranosyl(1-4)-3,6-di-O-acetyl-1,5-anhydro-1,2-eno-D-glucitol]

Azidonitration of per-O-acetylcellobial (1) under the conditions described by Lemieux and Ratcliffe (1976) affords essentially four chromatographically separable fractions of products.

Fraction I (app. 32%) is composed of the 2-azido-desoxy- β -D-gluco-1-O-nitro derivate (2) and the 2-azido-desoxy- α -D-manno-1-O-nitro isomer (3) in ratios varying from 15-20 : 1. Fraction II (app. 59%) is the pure 2-azido-desoxy- α -D-gluco-1-O-nitro derivative. (4).

Fractions III and IV are the 2-azido-1,2-didesoxy- α and β -D-gluco-1-acetamido derivatives (7) and (8) (ca. 9%). Components (2) and (3) of Fraction I are inseparable by ordinary flash chromatography. Treatment of Fraction I with tetrabutylammonium nitrate converts the mayor portions of (2) into its α -anomer (4) whereas the α -D-manno derivative (3) remains largely unchanged. By contrast, treatment of Fraction II (4) with tetrabutylammonium nitrate affords only app. 10% of the pure β -D-gluco-azido-1-O-nitro derivate (2) while app. 90% of (4) remain unchanged. Treatment of Fraction I with sodium acetate in acetic acid affords mainly the α -D-gluco acetate (9) and the α -D-manno-acetate (10). By contrast, analogous treatment of the α -D-gluco nitrate (4) gives app. 30% of the α -and β -acetates (9) and (11) while app. 40% of (4) remains unchanged.

The observed differences between the reactivity of β -nitrate (2) and the relative stability of the α -nitrates (3) and (4) towards tetrabutylammonium nitrate confirm the operation, in these systems, of the anomeric effect, which causes the axial anomer of a pair of glycosyl derivatives with electronegative substituents to be more stable than the equatorial anomer. Considering the anomeric effect, the rather modest yields of 2-azido-1,2-dideoxycellobiose obtainable by azidonitration of per-O-acetylclobial are explained by the following theory.

The initially formed products of the azidonitration reaction are thus contained in Fraction I, namely the 1,2-trans-products (2) and (3). While the α -D-manno-product (3) is stable under the reaction conditions, the (equatorially disposed) β -D-gluco derivative isomer is thermodynamically unstable and reacts with the nitrate and ammonium ions formed by the reductive decomposition of the cerium (IV)-ammonium hexanitrate complex to form the α -D-gluconitrate (4) and the α -glycosylamine (5). Compound (5) will react with any of the acetate-protected compounds present in the system to form acetamide (7) and partially de-protected polar derivatives which presumably escape chromatographic isolation and contribute to the over-all loss of yield. Compound (4) is also subject to reaction with ammonia to form the β -glycosylamine (6) and the acetamido derivative (8). Presently, experiments are under way to trap the unstable intermediate 2 in stable form during the azidonitration reaction, so as to avoid the formation of (4), (7) and (8) and increase the yield of 2-azido-2-desoxy-cellobiose.

Kurzfassung:

Die Azidonitratisierung von per-O-Acetylcellobial (1) führt zur Bildung von vier Produktfraktionen:

Fraktion I besteht aus dem 2-azido-2-desoxy- β -D-gluco-1-O-nitro Derivat (2) und seinem 2-azido-2-desoxy- α -D-manno-1-O-nitro (3) Isomer. Fraktion II aus dem reinen 2-azido-2-desoxy- α -D-gluco-1-O-nitro-Derivat (4). Die Fraktionen III und IV beinhalten die 2-azido-1,2-didesoxy- α und β -D-gluco-1-acetamido Derivate (7) (8). Durch Umsetzung von Fraktion I mit Tetrabutylammoniumnitrat kann der Großteil von (2) in sein α -Anomer (4) übergeführt werden, während (3) von dieser Reaktion unverändert bleibt. Dies führte zur Entwicklung einer Methode zur Trennung von (2) und (3) über den Umweg der Abreicherung von (2) durch seine Umsetzung in (4) welches eine deutlich andere Retentionszeit gegenüber (2) besitzt. Im Fall der Behandlung von Fraktion II (4) mit Tetrabutylammoniumnitrat werden nur etwa 10% zum 2-azido-2-desoxy- β -D-gluco-1-O-nitro Derivat (2) umgewandelt, während die restlichen 90% von (4) unverändert bleiben. Weiters zeigte sich, dass bei der Umsetzung von Fraktion I mit Eisessig und Natriumacetat hauptsächlich das α -D-glucoacetat (9) und das α -D-mannoacetat (10) entstehen.

Wird analog dazu das 2-azido-desoxy- α -D-gluco-1-O-nitro Derivat (4) aus Fraktion II in gleicher Weise mit Eisessig und Natriumacetat behandelt, entstehen ca. 30% der α - und β -Acetate (9) und (11), während etwa 40% von (4) unverändert bleiben. Der festgestellte Unterschied in der Reaktivität des β -Nitrats (2) und die relativ hohe Stabilität der α -Nitrats (3) und (4) gegenüber Tetrabutylammoniumnitrat bestätigt das Auftreten des Anomeren Effekts unter diesen Reaktionsbedingungen, welcher dazu führt, dass das axiale Anomer eines Paares von Glycosyl Derivaten mit elektronegativen Substituenten stabiler als das äquatoriale Anomer ist.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1. Historisches	8
1.2. Problemstellung	16
1.3. Zielsetzung	17
2. Experimenteller Teil	18
2.1. Methoden	18
2.1. Dünnschichtchromatographie	18
2.2. Säulenchromatographie	20
2.3. Schmelzpunktbestimmung	21
2.4. NMR-Spektroskopie	22
2.1.4.1. Grundlage	22
2.1.4.2. H-NMR-Spektroskopie	22
2.1.4.3. C-NMR-Spektroskopie	23
2.2. Materialien und Reagenzien	24

2.3. Synthesen und Trennungen	
2.3.1. Cellobiose in Cellobial	28
2.3.2. Azidonitrierung von Hexa-acetyl-D-cellobial nach Leumieux und Ratcliffe	31
2.3.3. Fraktion I und Tetrabutylammoniumnitrat	35
2.3.4. 2-Azido-desoxy- α -D-manno-1-O-nitro-cellobiosyl-hexaacetat (3) und Natriumacetat	38
2.3.5. Fraktion I und Natriumacetat	39
2.3.6. Fraktion II und Tetrabutylammoniumnitrat	41
2.3.7. Fraktion II und Natriumacetat	43
2.3.8. Umsetzung von Cellobial mit Natriumazid und Cer(IV)ammoniumnitrat mit DOWEX-Ionenaustauscher	45
3. Diskussion	46
4. Zusammenfassung	48
4.1. Deutsch	48
4.2. Englisch	49
5. Literatur	50
6. Lebenslauf	52

1. Einleitung

1.1 Historisches

Im Jahr 1901 beschrieb der Wiener Arzt Karl Landsteiner in seiner Arbeit „Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes“ vier verschiedene Blutgruppen nach dem von ihm neu entwickelten AB0-System.

Zu diesem Zeitpunkt waren die seinen Beobachtungen zu Grunde liegenden Unterschiede in der Beschaffenheit der Oberflächenstrukturen der Roten Blutkörperchen und die daraus folgenden Konsequenzen noch nicht bekannt. Heute kennen wir die Ursache für die Inkompatibilitäten zwischen den Blutgruppen und die sie charakterisierenden Strukturen auf den Oberflächen von Erythrozyten und wissen, dass es sich dabei um einen, im Verhältnis zur Größe des Gesamtgebildes, kleinen Unterschied in einer Zuckerkette handelt.

Bei dieser Kette kann es sich um eine dreigliedrige Kette (Blutgruppe 0) oder durch ein zusätzliches N-Acetyl-D-Galaktosamin (Blutgruppe A) beziehungsweise eine D-Galaktose (Blutgruppe B) auf vier Glieder erweiterte Kette handeln. Kommen beide dieser Ketten nebeneinander vor, sprechen wir von der Blutgruppe AB. Diese Unterschiede aufzuklären setzten sich D. Aminoff, W.T.J Morgan und W.M. Watkins zum Ziel. Aufbauend auf den in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts durch ethanolische Auszüge von Erythrozyten gewonnen Erkenntnisse über die grundlegende Beschaffenheit der „Blutgruppen-Substanzen“ als Kohlenhydrate¹² und ihrem freien Vorkommen unter anderem in Speichel, Urin und in relativ hohen Konzentrationen in Ovarialzysten³, gelang es eine erste Charakterisierung vorzunehmen.

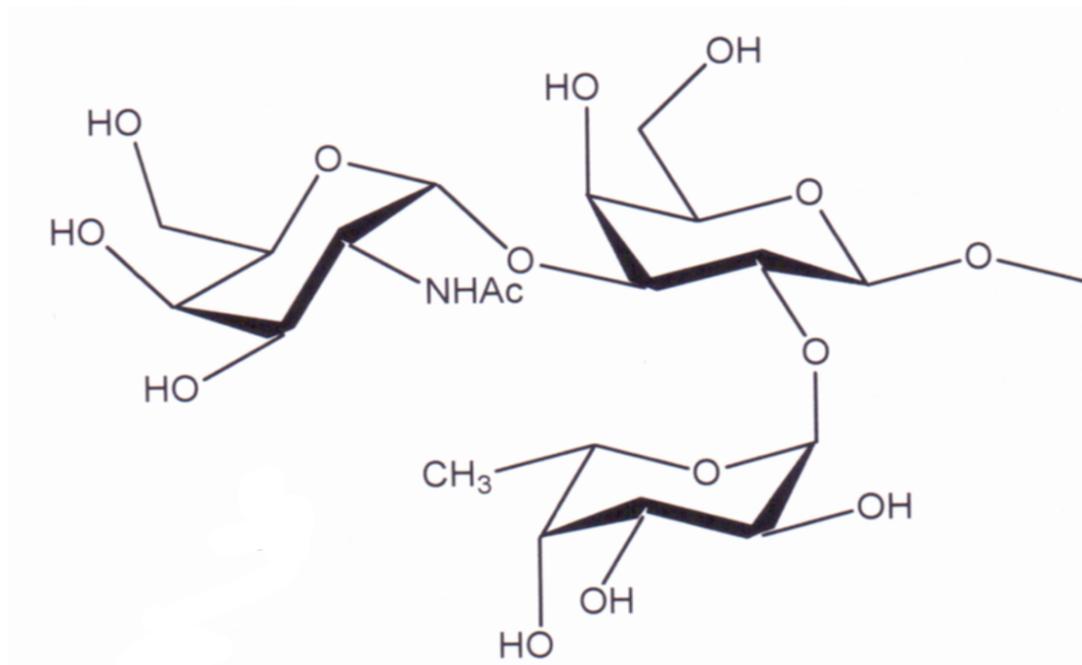
1 Dr. B. Brahn, Dr. F. Schiff; Über die komplexe Natur der Blutgruppensubstanz A des Menschen; Klinische Wochenschrift, 6. August 1926, Volume 5, Issue 32:1455-1456

2 H. Dold, R. Rosenberg; Nachweis von Isopräcipitinen im Menschlichen Blut. Nachweis der Vier Menschlichen Blutgruppen Durch Isopräcipitation; Klinische Wochenschrift, 1928, Volume 7, Issue 9: 394-395

3 H.K. King , W.T.J. Morgan; Proceedings of the Biochemical Society X; Biochem. J., 1944, Volume 38, Part 1,

Die Fortschritte bei der Bestimmung von quantitativer Zusammensetzung, qualitativer Zusammensetzung (dünnschicht-chromatographisch nach Consden, Gordon & Martin 1944) und Homogenität⁴ führten zur Bestimmung der „Blutgruppen-Substanzen“ als großteils homogene Kohlenhydrat-Aminosäure-Komplexe.

Abbildung 1: Das A-Trisaccharid, α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)-(α -L-Fuc-[1 \rightarrow 2])-D-Gal



Die nun aufgeklärte Struktur des die Blutgruppe A⁵ definierenden Trisaccharids wurde zu einem Ziel von synthetischem Interesse. Die chemische Gewinnung von bisher nicht zugänglichen Oligosacchariden barg das Potenzial zur Entwicklung von neuen Antibiotika, Enzymsubstraten und weiteren Erkenntnissen über Oberflächenantigene.

4 R.A. Kekwick; The Electrophoretic Analysis of Normal Human Serum, *Biochem. J.*, 1939 vol:33 Issue:7:1122-9

5 R. U. Lemieux, D. R. Bundle, D. A. Baker; Properties of a synthetic antigen related to the human blood-group Lewis a; *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97 (14); 4076–4083

Diese Entdeckung ließ auch gleichzeitig die Bedeutung von Glykosidasen, ubiquitär vorkommenden Enzymen, welche die Hydrolyse und damit Spaltung von Bindungen zwischen Zuckern und nicht-Zuckern katalysieren, steigen. Nun ist es möglich, dass durch gezielte Veränderungen an Zuckermolekülen in diese Reaktionen eingegriffen werden kann. So bewirkt etwa, wie T. Desmet et al.⁶ gezeigt haben, in manchen Fällen der Austausch einer Hydroxy-Gruppe gegen eine Amino- oder Azido-Gruppe an einem Zuckermolekül die Steigerung der Affinität einer Zuckerverbindung zu seiner spezifischen Glykosidase in einem derart hohen Ausmaß, dass durch die eintretende sterische Hemmung eine Verminderung der katalytischen Aktivität der Glykosidase erreicht werden kann. Dieses Prinzip befindet sich bereits heute im praktischen Einsatz. Durch das auf biotechnologischem Weg gewonnene Tetrasaccharid Acarbose lassen sich die im Dünndarm vorhandenen α -Glykosidasen und damit die Verdauung von Kohlenhydraten hemmen. Dies wiederum führt zu einer Verminderung der Zuckeraufnahme und kann so bei Patienten mit Typ-2 Diabetes mithelfen, den Blutzuckerspiegel speziell nach der Nahrungsaufnahme, stabil zu halten. Das Anwendungsgebiet von modifizierten Zuckermolekülen ist aber nicht nur auf augenscheinlich mit Zuckern und ihrer komplexeren Form, den Kohlenhydraten in Verbindung stehenden Erkrankungen beschränkt. Ein weiteres Beispiel für die mögliche Anwendung von Glykosidase hemmenden Molekülen, welches zur Zeit stark an Bedeutung gewonnen hat, ist der Wirkstoff Oseltamivir.

Eine Schlüsselrolle bei der Ausbreitung von viralen Infektionen, speziell mit Influenzaviren, im erkrankten Organismus spielt das Enzym Neuraminidase. Seine Fähigkeit von Glykopeptiden der Zelloberfläche Sialinsäure-Reste abspalten zu können ermöglicht es Krankheitserregern einerseits in diese Zellen einzudringen um sie zu infizieren und ist gleichzeitig, nach der Synthese von neuen Viruspartikeln durch die Wirtszelle,

6 T. Desmet, M. Claeysens, K. Piens, W. Nerinckx; Synthesis and Evaluation of 2-Deoxy-2-amino- β -cellobiosides as Cellulase Inhibitors; J. Carbohydr. Chem., 29: 164-180, 2010;

für die anschließende Freisetzung dieser und damit die Weiterverbreitung der Krankheitserreger unerlässlich.

Die Hemmung der Neuraminidase, wie sie durch Oseltamivir bewirkt wird, kann daher zu einer signifikanten Abnahme des Schweregrades und der Dauer einer viralen Erkrankung führen. Dieses Beispiel soll die enorme Bedeutung von Zuckern und speziell Zuckerketten an biologischen Molekülen für ihre Funktion und Immunogenität, aber auch unser Verständnis darüber veranschaulichen und bewusst machen. Seit dies erkannt wurde, hat die synthetische Gewinnung von ihren natürlichen Vorbildern entsprechenden Oligosacchariden und deren Derivaten erheblich an Bedeutung gewonnen.

Die Darstellung von solch komplexen Strukturen war zunächst mit Schwierigkeiten verbunden, deren Lösung schließlich zu neuen Methoden und Theorien bei der Steuerung von chemischen Reaktionen bei der Synthese von Kohlenhydraten führte. So gelang es, bei der Entdeckung eines chemischen Weges zur Gewinnung des Blutgruppe B Antigens durch R.U. Lemieux und H. Driguez,⁷ ein besseres Verständnis über die einen Einfluss auf die stereochemische Beschaffenheit des Endproduktes und ihm verwandte Strukturen ausübenden Effekte zu erlangen. Erste Hoffnungen der Gewinnung von Ausgangsmaterial für weitere Synthesen und damit verbundene weitere Erkenntnisse zu Glykoproteinen stützten sich auf N-Acetylgalactosamin. Dessen Darstellung beruhte zunächst auf der Spaltung des Polymers Chondroitin, einer Gerüstsubstanz, die aber auch etliche Regulationsaufgaben, etwa bei Wachstum und Regeneration des Nervensystems, bewerkstelligt.

7 R. U. Lemieux , H. Driguez; Chemical synthesis of 2-O-(.alpha.-L-fucopyranosyl)-3-O-(alpha-D-galactopyranosyl)-D-galactose. Terminal structure of the blood-group B antigenic determinant;

J. Am. Chem. Soc., 1975, 97 (14); 4069–4075

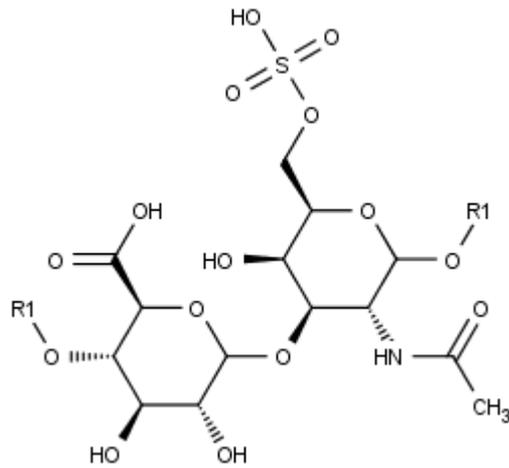


Abbildung 2: Chondroitinsulfat

Die Ausbeute der bei der Spaltung gewonnenen Monomerkomponenten N-Acetylgalaktosamin und Glucuronsäure lag aber im Milligramm-Bereich und lieferte daher nur sehr unbefriedigende Ergebnisse. Ein in vielen Glykoproteinen, wie etwa die schon beschriebenen Oberflächenantigene von Erythrozyten, Epiglycanin oder Anti-Frost-Proteinen vorhandenes Grundelement ist die 2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranose (N-Acetylgalaktosamin).

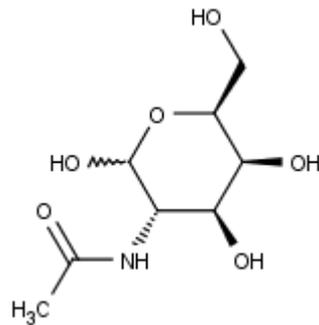


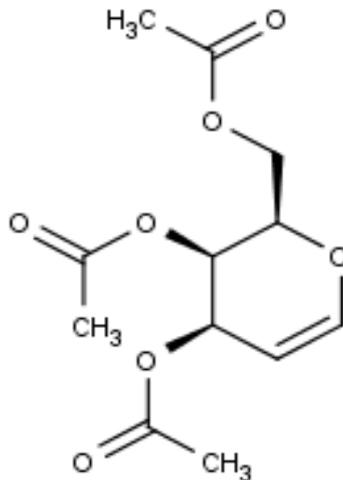
Abbildung 3: 2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranose

Durch sein verbreitetes Vorkommen in biologischen Systemen war dieser Grundkörper schon bald von großem Interesse sowohl für immunologische als auch für enzymatische Studien.

Der Mangel an leicht zugänglichen Quellen von 2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranose oder seinen Vorstufen führte jedoch dazu, dass die entsprechenden Projekte nur langsam voran kamen. Es mussten also Bemühungen gestartet werden eine einfach zugängliche Methode der Gewinnung zu finden.

Ausgehend von den Erfahrungen bei der Synthese von die Blutgruppe-A-determinierenden Oberflächenstrukturen wurden durch Paulsen et al. erste Erfolge erzielt. Jedoch sollte sich der von ihnen entwickelte zehnstufige Syntheseweg wegen des hohen Aufwandes und mangels der Möglichkeit die Ausbeute zu steuern, als für die gezielte quantitative Gewinnung weniger geeignet erweisen.

Abbildung 4: 3,4,6-tri-O-acetyl-D-galactal



Der Durchbruch hin zur synthetisch-technischen Gewinnung war die Entwicklung der Azidonitratisierung von Lemieux und Ratcliffe⁸, bei der ausgehend von D-Galactose über 3,4,6-tri-O-acetyl-D-galactal unter Einsatz eines Überschusses von Natriumazid und Cer(IV)ammoniumnitrat gearbeitet wird.

Durch diese nur fünfstufige Umsetzung kann der überwiegende Teil des Galaktals in das Galactose-2-azid übergeführt werden. Angewandt auf Glucal liefert diese Methode neben dem Glucosamin auch das Mannosamin im Verhältnis 1:1.

In ihre Acetate übergeführt, sind diese zwei Verbindungen durch normale chromatographische Methoden trennbar.

Anders verhält es sich jedoch bei der Azidonitratisierung von Disacchariden wie Cellobial bzw. seinen Acetaten. Die entstehenden Verbindungen (2) und (3) unterscheiden sich zwar in ihrer jeweiligen Konformation sind aber „equatorial-trans“ bzw. „axial-trans“, wodurch der hier entstehende Unterschied zwischen den Isomeren keinen we-

⁸ R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe; The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal; Can.J.Chem. 1979, 57(10): 1244-1251, 10.1139/v79-203;

sentlichen Unterschied etwa in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in chromatographischen Systemen zur Folge hat. Durch eine Abwandlung und Erweiterung der von A.S. Perlin und T.K.M. Shing in „Synthesis of benzyl 2-azido-2-deoxy-4- O-β- d-glucopyranosyl-α- d-glucopyranoside and 1,6-anhydro-2-azido-2-deoxy-4- O-β- d-glucopyranosyl-β- d-glucopyranose“ verwendeten Umsetzung kann es aber gelingen die entstehenden Produkte auf zwei wesentliche und vor allem chromatographisch trennbare Verbindungen zu reduzieren.

Hierbei wird die Azidonitratisierung möglichst bald nach Bildung der ersten Fraktion mit den 2-azido-desoxy-β-D-gluco-1-O-nitro (2) und 2-azido-desoxy-β-D-manno-1-O-nitro (3) Derivaten und noch vor dem vollständigen Verbrauch des Glykals gestoppt. So können anders als bei R.U. Lemieux und R.M. Rattcliffe so wie bei A.S. Perlin und T.K.M. Shing aus der mangels stabilisierenden Anomeren Effekts reaktionsfreudigeren Verbindung (2) mit aus dem Zerfall des Cer(VI)Ammoniumnitrats freigesetztem NO₃ und NH₄⁺ neben der 2-azido-desoxy-α-D-gluco-1-O-nitro Verbindung (4) kaum weitere Nebenprodukte entstehen. Die Fraktionen I und II aus (2) und (3) bzw. (4) lassen sich nun chromatographisch trennen und können so gezielt mit Tetrabutylammoniumnitrat behandelt werden.

Dadurch lässt sich Fraktion I aus (2) und (3) in (3) und (4) umsetzen, was wiederum eine Trennung und damit eine Reindarstellung von (3) erlaubt.

Weiters kann mit einem Überschuss von Tetrabutylammoniumnitrat Fraktion II (4) in (2) umgewandelt werden, was wieder eine Trennung und Reindarstellung von (2) ermöglicht.

Um die Synthesen solcher Zucker wirtschaftlich gestalten zu können, musste ein in großer Menge verfügbarer und dadurch gleichzeitig auch günstiger Ausgangspunkt gefunden werden. Als ergiebigster Rohstofflieferant bot sich dabei wie in vielen Fällen die Natur an. Die Grundsubstanz pflanzlicher Strukturen, Cellulose, hat neben ihrer günstigen chemischen Struktur den weiteren Vorteil, dass sie in enormen Mengen zur Verfügung steht, was sie zu einer guten, grundsätzlichen Ausgangssubstanz macht.

Durch saure Hydrolyse und enzymatischen Abbau lässt sich aus ihr Cellobiose (4-O-β-D-Glucopyranosyl-D-glucose), ein Disaccharid, herstellen, welches als Ausgangssubstanz für die hier besprochene Synthesereihe diene.

In einigen, schon von E. Fischer und K. Fodor 1914 beschriebenen, Schritten kann aus Cellobiose das Glykal Cellobial (Hexa-O-Acetyl-cellobial) synthetisiert werden.

Von dieser Verbindung ausgehend kann wiederum die besonders interessante und bereits weiter oben erwähnte Reaktion, die Umsetzung von Cellobial nach R.U. Lemieux und M. Ratcliffe, mit Natrium Azid und Cerium(IV)Ammoniumnitrat (CAN) durchgeführt werden. Hierbei entsteht aus der Ausgangssubstanz ein Gemisch aus mindestens drei Azidozuckern, wie es schon etwa von T. Desmet et al. in „Synthesis and Evaluation of 2-Deoxy-2-amino-β-cellobiosides as Cellulase Inhibitors“ beschrieben wurde.

Abweichend zu den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen fand sich unter den Produkten aber auch die D-Glukosyl-β(1'-4)-2-deoxy-2-azido-1-α-nitro D-Mannose.

Um diese scheinbar sehr schwer fassbare Verbindung und die Synthese bei der sie entsteht näher zu beleuchten und zu charakterisieren und um eventuelle Irrtümer aufzulösen was ihre Produkte anbelangt sowie Möglichkeiten aufzuzeigen diese zu trennen, soll die hier vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten.

1.2. Problemstellung

Gute Arzneimittel zeichnen sich besonders durch Wirksamkeit und Verträglichkeit aus. Speziell bei modernen Wirkstoffen, die auf den natürlichen Strukturen in lebenden Organismen basieren, kann für diese beiden Parameter das schon am Beispiel der Erythrozyten beschriebene Zuckerkettengerüst an der Oberfläche von entscheidender Wichtigkeit sein. Weiters birgt die gezielte Abänderung dieser Strukturen das Potential noch andere Faktoren wie Wirkziel und Wirkdauer eines Medikaments im Sinne der

Therapie positiv zu beeinflussen. Die Grundlage dafür stellt aber die Fähigkeit zur gezielten Darstellung von Zuckern und Zucker-Derivaten dar.

Um verlässliche und ergiebige Wege zur Synthese beliebiger Saccharide zu erschließen, ist es zu allererst notwendig, die den Umsetzungen zugrunde liegenden Mechanismen genau zu verstehen und die daraus entstehenden Produkte zu charakterisieren.

Eine wichtige Umsetzung, die möglicherweise die Grundlage für eine Vielzahl an unterschiedlich einsetzbaren biologischen Produkten liefern kann, ist die Azidonitratisierung nach Lemieux und Ratcliffe, da diese je nach Ausgangsmaterial flexibel einsetzbare Produkte liefert. Ausgehend von per-O-Acetylcellobial (siehe 1) führt sie zur Bildung von vier chromatographisch trennbaren Fraktionen. Die erste Fraktion besteht aus dem 2-azido-2-desoxy- β -D-gluco-1-O-nitro Derivat (2) und seinem 2-azido-desoxy- α -D-manno-1-O-nitro (3) Isomer. Fraktion II besteht aus dem reinen 2-azido-desoxy- α -D-gluco-1-O-nitro Derivat (4). Die Fraktionen III und IV aus 2-azido-1,2-didesoxy- α und dem β -D-gluco-1-acetamido Derivat (7) (8) sind zur Zeit noch nicht von weiterem Interesse. Die Komponenten (2) und (3) aus Fraktion I sind mit normalen chromatographischen Methoden nicht auftrennbar, was aber für eine genauere Untersuchung und Bestätigung der beiden Komponenten unbedingt notwendig wäre.

1.3. Zielsetzung

Gewonnen durch die Umsetzung von Fraktion I mit Tetrabutylammoniumnitrat soll das 2-azido-2-desoxy- β -D-gluco-1-O-nitro Derivat (2) in sein α Anomer (4) umgewandelt werden. Dieses wäre dann durch die veränderte Retentionszeit über Säulen- chromatographie von seinem 2-azido-2-desoxy- α -D-manno-1-O-nitro (3) Isomer trennbar.

2. Experimenteller Teil

2.1. Methoden

2.1.1. Dünnschichtchromatographie

Hierbei handelt es sich um eine Methode zur nicht präparativen Auftrennung von Stoffgemischen und deren Analyse mittels geeigneter Reaktionen, die im besten Fall eine Identifikation der Einzelnen in dem Gemisch vorhandenen Substanzen ermöglicht. Die physikalische Grundlage hierfür bildet die unterschiedlich starke Interaktion der in dem Gemisch vorhandener Substanzen mit den funktionellen Gruppen der stationären Phase und der mobilen Phase und der sich daraus ergebenden unterschiedlichen Retention, die wiederum unterschiedliche Laufstrecken bedingt. Die Auswahl der geeigneten Phasen-Kombination für die zu trennenden Substanzen ist für die Qualität der Trennleistung entscheidend. Als stationäre Phase dient zum Beispiel ein auf eine dünne Trägerschicht, etwa Aluminiumblech, Glas aber auch Kunststofffolien, aufgetragene zuvor zu einer Paste angerührte Schicht eines adsorptionsfähigen Materials wie Kieselgel, Aluminiumoxid oder Cellulose. Zusammen bilden diese zwei Komponenten die „DC-Platte“. Die mobile Phase bildet eine oder ein Gemisch mehrerer Flüssigkeiten, die unterschiedlicher Polarität sein können. Die eigentliche Auftrennung erfolgt in einer zur Verbesserung von Qualität und Geschwindigkeit abgeschlossenen Kammer, üblicherweise aus Glas. Zur Durchführung eines Trennungsvorganges wird zunächst eine kleine Menge einer Lösung des Substanzgemisches mit ausreichendem Abstand zur Unterkante der Platte, so dass der Auftragepunkt gerade nicht in die mobile Phase eintaucht, auf die stationäre Phase aufgetragen. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird die nun mit den Substanzen beladene stationäre Phase in eine Kammer, welche mit ausreichender Menge mobiler Phase befüllt wurde, übergeführt.

Die verbreitetste Methode der Entwicklung hierbei ist die „vertikal aufsteigende“, so, dass die DC-Platte mit dem Substanzenfleck nach unten, jedoch ohne dass dieser in das Laufmittel eintaucht, in die Kammer gestellt wird.

Alternativ dazu gibt es auch die horizontale Entwicklung von Dünnschichtchromatographieplatten.

Die mobile Phase wandert nun, angetrieben durch die Kapillarkräfte, langsam durch die stationäre Phase nach oben.

Sobald die Substanzen vom Fließmittel erreicht werden, bewegen sie sich nun, je nach Differenz der Wechselwirkungskräfte zwischen Substanz und stationäre Phase und Substanz und mobiler Phase, schneller oder langsamer mit dem Lösungsmittel mit. Nachdem das Laufmittel eine im Vorfeld markierte Strecke zurück gelegt hat, wird die Entwicklung durch Herausnehmen der DC-Platte aus der Kammer gestoppt. Zur Detektion der nun vom Auftragspunkt in Richtung Laufmittelfluss in einer Linie aufgetrennten Substanzen wird die Platte zunächst von restlichem Laufmittel befreit. Dann wird, um die Substanzen mit bloßem Auge sichtbar zu machen, ein Detektionsmittel, in meinem Fall ein modifiziertes Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz, auf die DC-Platte aufgebracht. (Anisaldehyd 0.5 ml; Ethanol 9 ml; konzentrierte Schwefelsäure 0.5 ml; konzentrierte Essigsäure 0.1 ml)⁹ Dies kann durch Besprühen der Platte mit dem Reagenz oder durch Eintauchen dieser in das Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz geschehen. Nach dem Aufbringen des Detektionsmittels wird die DC-Platte zur Beschleunigung der Farbreaktion für 2-3 Minuten bei 150 Grad Celsius erhitzt. Die Auswertung erfolgt anhand der Position, Farbe und Farbintensität der nun gefärbten Substanzflecken. Beim Besprühen ist darauf zu achten, dass der Vorgang unter einem gut ziehenden Abzug durchgeführt wird und vor dem Herausnehmen genügend Zeit vergangen ist, so dass das überschüssige Sprühreagenz abgesaugt wurde. Auch das Eintauchen der Platte sollte unter einem Abzug vorgenommen werden. Weiters sollte hierbei auch darauf geachtet werden, die DC-Platte lange genug im Reagenz zu belassen.

Das Besprühen eignet sich besonders für große Platten bei denen ein schneller Überblick gewünscht ist, etwa bei der Kontrolle von Fraktionen bei der Säulenchromatographie und durch die weniger intensive Färbung zum Vergleich ähnlicher gefärbter Substanzen. Das Aufbringen des Reagenz durch Tauchen wiederum eignet sich wegen

⁹ K.G. Krebs; D. Heusser, H. Wimmer; Sprühreagentien, 813-859

der höheren Reproduzierbarkeit des Färbeergebnisses besonders für die Verlaufskontrolle bei Umsetzungen und durch die schärfere Abgrenzung der Flecken bei Substanzen mit ähnlichem Retentionsfaktor.

2.1.2. Säulenchromatographie

Eine Methode bei der Substanzen anhand unterschiedlicher physikalisch chemischer Eigenschaften und ihrer dadurch unterschiedlichen Wechselwirkungen mit einer mobilen Phase und einer stationären Phase beim Durchlaufen einer „Säule“ voneinander getrennt werden können. Bei der Normaldruck-Säulenchromatographie besteht die Säule üblicherweise aus einem Glasrohr, welches an einem Ende offen ist und am anderen durch einen an einer abschließenden Verjüngung sitzenden Hahn geöffnet und geschlossen werden kann. Das Glasrohr dient als Behälter für die beiden Phasen durch welche die eigentliche Trennung stattfindet. Die stationäre Phase wird, suspendiert in der mobilen Phase, luftblasenfrei in die Säule gefüllt. Gebräuchliche Beispiele für die stationäre Phase sind neben Kieselgel und RP-Kieselgel (reversed phase Kieselgel, das Gel wurde durch das Anbringen von hydrophoben Gruppen an hydrophilen Si-OH Gruppen in seiner Affinität umgedreht) auch Aluminiumoxid. Als mobile Phase können verschiedene Flüssigkeiten unterschiedlichster Polarität und deren Mischungen eingesetzt werden. Zum Auftragen der zu trennenden Substanzen muss die mobile Phase bis auf die Höhe der stationären Phase abgelassen werden. Dabei ist darauf zu achten dass die Oberfläche der stationären Phase möglichst eben ist. Nun wird eine möglichst konzentrierte Lösung der zu trennenden Substanzen so nah als möglich an der Oberfläche der stationären Phase langsam an der Innenseite der Glassäule entlang aufgetragen. Um bessere Trennleistungen zu erreichen empfiehlt es sich, sobald eine kleine Menge dieser Lösung aufgetragen wurde und über der stationären Phase steht, etwas mobile Phase abzulassen bis der Flüssigkeitspegel wieder auf die Höhe der stationären Phase abgesunken ist.

Nach dem Auftragen wird kontinuierlich mobile Phase durch die Säule geleitet und fraktioniert gesammelt. Nun kommt es aufgrund der unterschiedlich starken Wechselwirkungen der Substanzen mit der mobilen Phase und der Substanzen mit der stationären Phase zu unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten, sodass in den früher gesammelten Fraktionen zuerst die weniger stark zurückgehaltenen Substanzen und in den später gesammelten Fraktionen die stärker zurückgehaltenen Substanzen zu finden sind. Durch Vereinen der jeweils eine bestimmte Substanz oder Mischung enthaltenden Fraktionen kann eine Trennung erreicht werden.

2.1.3. Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunktbestimmung ist eine Identitäts- und Reinheitsprüfung für (kristalline) Substanzen.

Die Durchführung erfolgt mittels eines um eine Schmelzpunktbestimmungsapparatur erweiterten Mikroskops. Dabei handelt es sich um eine am Objektisch angebrachte Heizplatte mit Abdeckplatte die über ein Thermostat reguliert werden kann, sowie ein Thermometer um die aktuelle Temperatur der Platte ablesen zu können.

Eine Schmelzpunktbestimmung läuft folgendermaßen ab:

Einige gut getrocknete Kristalle der zu prüfenden Substanz werden auf einen Objektträger überführt und mit einem Deckglas versehen.

Der so beladene Objektträger wird auf die kalte, ausgeschaltete Heizplatte gebracht und mit der Abdeckplatte abgeschlossen.

Unter geeigneter Vergrößerung wird ein mittelgroßer Kristall gesucht und darauf zentriert und fokussiert.

Nun wird mittels Thermostat die Temperatur der Heizplatte langsam erhöht.

Gleichzeitig wird der ausgewählte Kristall unter dem Mikroskop beobachtet.

Sobald sich ein Flüssigkeitsfilm um den Kristall gebildet hat, ohne dass der Kristall selbst schon geschmolzen ist, wird die momentane Temperatur der Heizplatte vom Thermometer abgelesen.

2.1.4. NMR-Spektroskopie

2.1.4.1. Grundlagen

NMR (nuclear magnetic resonance)-Methoden beruhen auf der Interaktion von Magnetfeldern sich „bewegender“ Ladungen im Atomkern mit starken von außen angelegten homogenen Magnetfeldern. Die Ladungsträger können dabei zwei energetisch verschiedene Zustände einnehmen. Durch die Zufuhr von Energie in Form von niederfrequenten Radiowellen in der passenden Frequenz kann der Übergang vom energetisch niedrigeren in den energetisch höheren Zustand angeregt werden. Die so bei einer bestimmten Frequenz absorbierte Energie kann gemessen werden und ist die Grundlage für das NMR-Spektrum. Die Absorption ist charakteristisch für einen Kern und seine molekulare Umgebung und wird einerseits von „elektronenziehenden“ bzw. „elektronenschiebenden“ Gruppen in der Verbindung andererseits auch von den benachbarten Kernen und deren Magnetfeldern beeinflusst.

Aufgrund dieser spezifischen Spektren lässt sich den gewonnenen Messdaten eine molekulare Struktur und ihre Umgebung zuordnen.

2.1.4.2. H-NMR-Spektroskopie

Wasserstoffatome besitzen in ihrer natürlichen Form einen magnetisch aktiven Kern und eignen sich dadurch besonders für diese Art der Strukturaufklärung (Protonenresonanzspektroskopie). Wasserstoffhaltige, wie etwa die organischen, Verbindungen können daher mit verhältnismäßig geringem Aufwand auf diese Weise analysiert werden.

2.1.4.3. C-NMR-Spektroskopie:

Das C-13 Isotop des Kohlenstoffes besitzt einen Eigendrehimpuls und verhält sich daher in einem angelegten Magnetfeld selbst wie ein kleiner Magnet und ermöglicht so die Messung von aufgenommenen Energien. Durch sein natürliches Vorkommen mit einer Häufigkeit von etwa 1,1% und der wichtigen Rolle von Kohlenstoffatomen speziell in organischen Verbindungen ermöglicht es so die Strukturaufklärung.

2.2. Materialien und Reagenzien

Alfa Aesar GmbH & Co KG

Drierite, Siebgröße 4-6 (Lot# G13W020)

Bartelt Labor & Datentechnik:

Kieselgel 60, Korngröße 0.062 - 0.2 mm, getrocknet, (Lot# 073533309)

J.T. Baker, Avantor Performance Materials B.V.

Dichlormethane, getrocknet (Lot# 1101301017)

Chloroform, getrocknet (Lot# 1304221801)

Methanol (Lot# 1229207004)

Merck KGaA:

Ethylacetat, (Lot# S5674077)

Essigsäure, 99-100% (Lot# K43839455, K44447155)

Natriumazid (Lot# K39252688)

SICAPENT™, mit Indikator (Lot# ZC890743)

Kupfer-(II)-sulfate (Lot# A0377890)

Sigma Aldrich Chemie GmbH:

Acetonitril, 99%, getrocknet (Lot# S89249-269)

Acetanhydrid (Lot# SZBD0860V)

Celite 545 (Lot# BCBG8453V)

Cerium-(IV) Ammonium nitrate (Lot#BCBK9552V)

DRIERITE™, Siebgröße 4 (Lot# MKBL7943V)

Diethylether (Lot# SHBF0954V, SHBF1435V)

Magnesium sulfate (Lot# SLBG1581V)

Molecular sieves, 4 Å (Lot# MKBK3395V)

Natriumacetat (Lot# BCBG2921V)

Natrumhydrogencarbonate (Lot#087K0257)

Schwefelsäure, 95-98% (Lot# BCBG6728V)

Tetrabutylammonium nitrate (Lot# BCBF8194V)

Toluol (Lot# STBF0202V)

Zinkstaub (Lot# 06896TK)

W.A. Hammond Drierite Company, Ltd

DRIERITE™, mit Indikator, Siebgröße 6 (Lot# 22001)

Trocknung und Vorbereitung der Reagenzien und Materialien¹⁰

Chloroform:

Chloroform wurde unter einem Abzug für vier Stunden über Diphosphorpentoxid (P_4O_{10}) unter Rückflusskühlung und Feuchtigkeitsausschluss zum Sieden erhitzt und anschließend in einen vorbereiteten Kolben abdestilliert. Die kurzfristige Lagerung über bei 150°C getrocknetem „molecular sieves“ in einem dicht verschlossen Behältnis ist möglich

Dichlormethan:

Unter einem Abzug wurde Dichlormethan für zwei Stunden über Calciumhydrid unter Rückflusskühlung zum Sieden gebracht und anschließend unter Feuchtigkeitsausschluss in einen Kolben abdestilliert. Die Lagerung erfolgte dicht verschlossen über zuvor bei 150°C getrocknetem „molecular sieves“.

Acetonitril:

Das nicht wasserfreie Acetonitril wurde unter einem Abzug unter Rückflusskühlung und Feuchtigkeitsausschluss für vier Stunden über Calciumhydrid zum Sieden erhitzt und anschließend in einen Kolben abdestilliert. Die Lagerung erfolgte dicht verschlossen über bei 150°C getrocknetem „molecular sieves“.

Kieselgel:

In einem weiten Glasgefäß (Kristallisierschale) wurde das Kieselgel in einem Trockenschrank bei 160°C über Nacht, mindestens aber für sechs Stunden, erhitzt. Nach dem Herausnehmen des getrockneten Kieselgels ist rasches Befüllen der Säule und damit Luftabschluss anzuraten.

¹⁰ W. L. F. Armarego, D. D. Perrin; Purification of Laboratory Chemicals, 4th Edition,

2.3. Synthesen und Trennungen

2.3.1. Cellobiose in Cellobial

2.3.1.1. Cellobiose in Cellobiose-octa-acetat

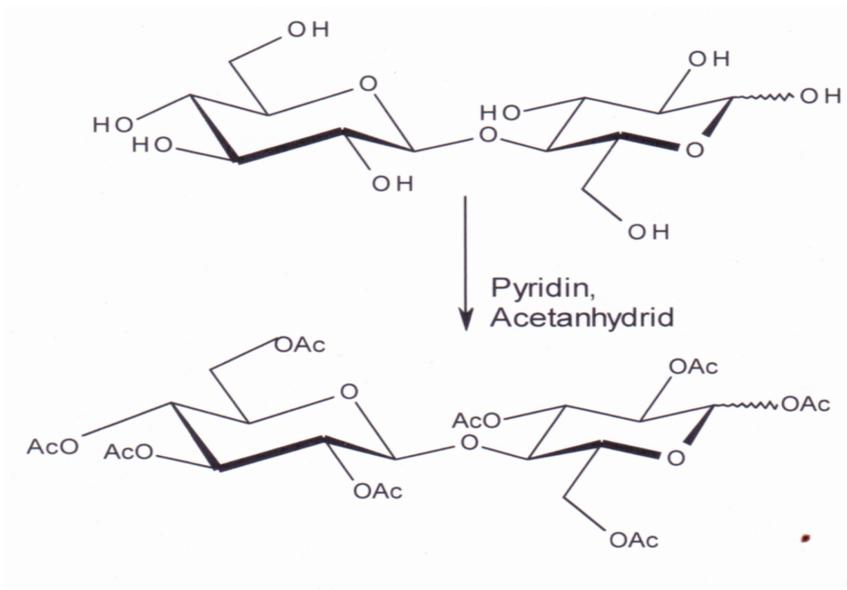


Abbildung 5: Die Umsetzung von Cellobiose zu Cellobiose-octa-acetat(per-O-Acetylcellobial) in Pyridin mit Essigsäureanhydrid

Die Ausgangssubstanz (25g) wurde in getrocknetem Pyridin (75ml) gelöst und unter Eiswasserkühlung und Ausschluss der Luftfeuchtigkeit mit Essigsäureanhydrid (75ml) acetyliert. Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde mittels DC festgestellt.

Das Reaktionsgemisch wurde nun in Eiswasser gegossen und bei 6°C für mehrere Stunden zur Kristallisation stehen gelassen. Das Reaktionsprodukt wurde durch Abnutschen aus dem Eiswasser extrahiert und mehrmals am Filter mit kaltem Wasser nach gewaschen. Noch verbliebenes Pyridin wurde durch Lösen in Chloroform und Ausschütteln dieser Lösung mit Wasser, Kaliumhydrogensulfat-Lösung und letztlich Natriumhydrogencarbonat-Lösung entfernt. Die organische Phase wurde anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotavapor eingedampft.

2.3.1.2. Cellobiose-octa-acetat in Cellobiosyl-bromid-hepta-acetat

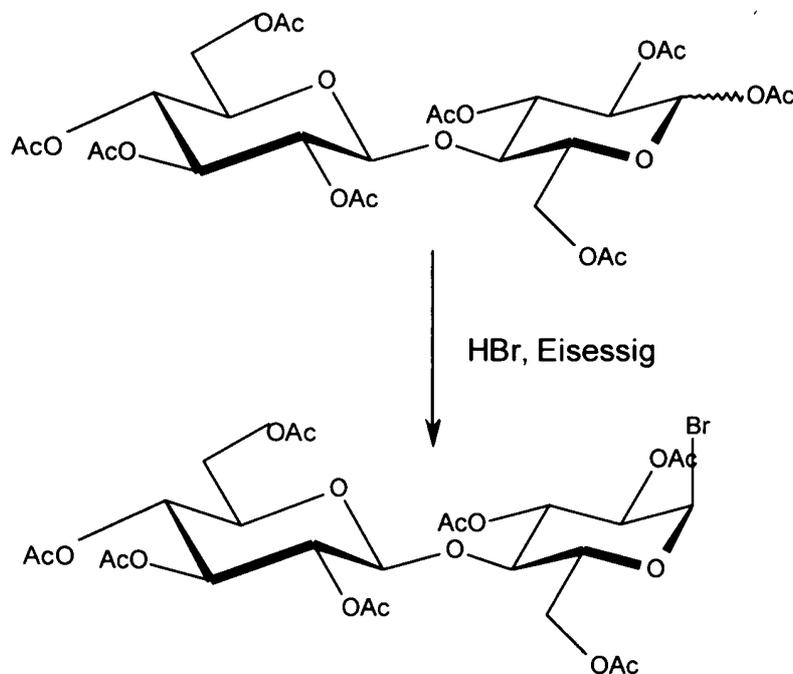


Abbildung 6: Reaktion von Cellobiose-octa-acetat in Chloroform mit Bromwasserstofflösung zu Cellobiosyl-bromid-hepta-acetat

Nach dem Lösen des Ausgangsmaterials (25g) in Chloroform wurde langsam unter Rühren essigsaurer Bromwasserstoff-Lösung (40ml) zugetropft. Der Verlauf der Reaktion konnte per DC verfolgt werden. Die gesamte Reaktion fand unter Feuchtigkeitsausschluss und unter Eiswasserkühlung statt.

Nach der vollständigen Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch in kaltes Wasser gegossen und daraus durch Ausschütteln mit Chloroform das Produkt gewonnen. Diese Produkt-Lösung wurde mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft.

2.3.1.3. Cellobiosyl-bromid-hepta-acetat in Cellobial (1)

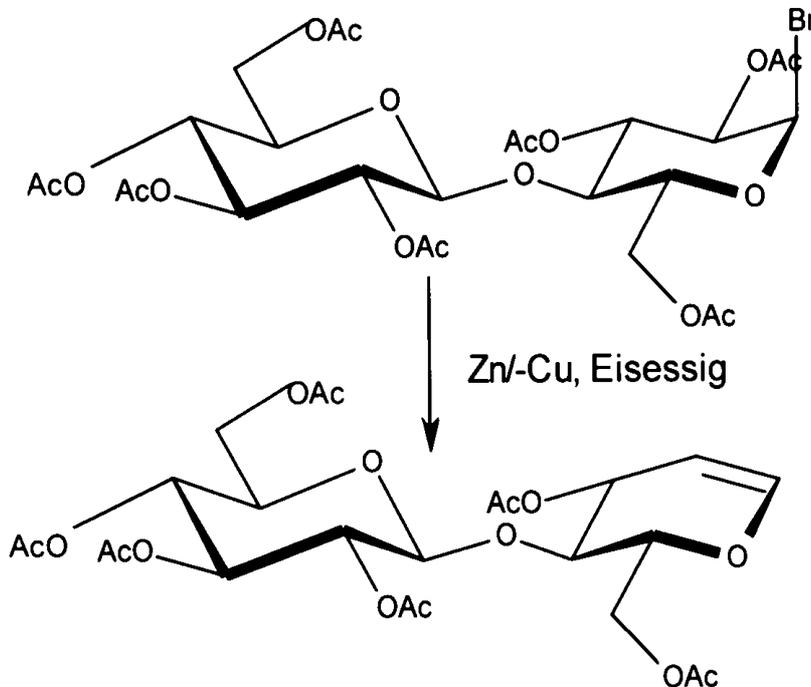


Abbildung 7: Die Reaktionen von Cellobiosyl-bromid-hepta-acetat in Cellobial

Zunächst wurde Kupfersulfat (0.9g) in Wasser (20ml) gelöst und mit Zink-Staub (15g) zu einer Paste verrührt. Als nächster Schritt musste diese Mischung nun der in Essigsäure (80ml) gelösten Ausgangssubstanz(1) (5g) unter Rühren und Eiswasserkühlung beigemischt. Durch die regelmäßige Entnahme von DC Proben wurde der Reaktionsverlauf verfolgt.

Nach vollständiger Umsetzung des Ausgangsmaterials folgte das Abnutschen der essigsauren Reaktionsmischung über Celite 545. Aus dem Filtrat wurde anschließend mit Chloroform das Produkt extrahiert. Die Chloroform-Phase wird mit Wasser, Natriumhydrogencarbonat-Lösung und nochmals Wasser gewaschen. Die über Magnesiumsulfat getrocknete organische Phase wurde nach dem Filtrieren eingedampft.

2.3.2. Azidonitrierung von hexa-acetyl-D-Cellobial (**1**) nach Leumieux und Ratcliffe

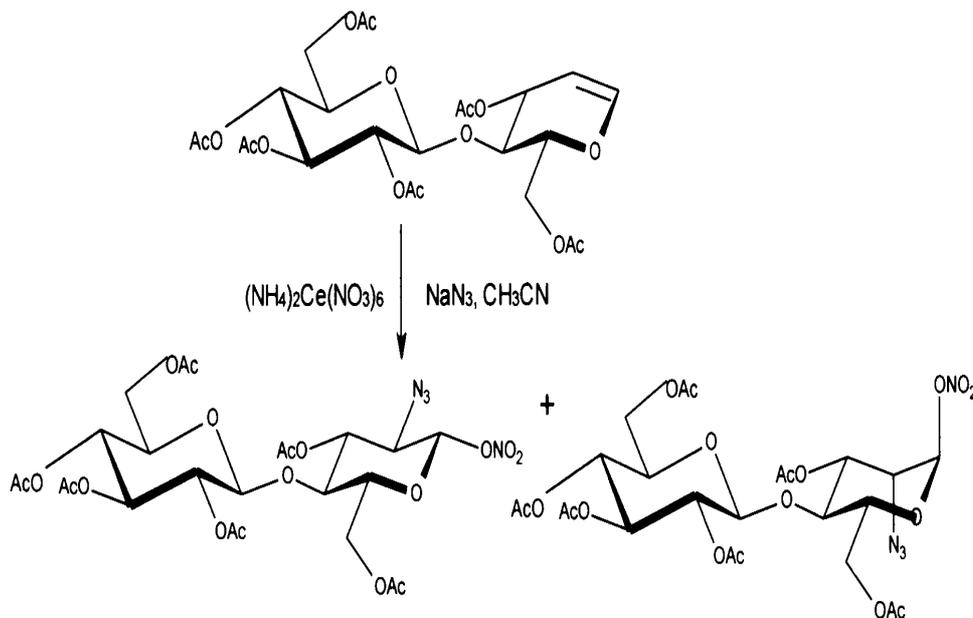


Abbildung 8: Die Reaktion von Cellobial mit Natriumazid und Cer(IV)ammoniumnitrat liefert **5**, eventuell **6**, unterschiedliche und zum Teil nur schwer trennbare Produkte.

Die Ausgangssubstanz(**1**) (5.73g) wurde in getrocknetem Acetonitril (ca. 120ml) gelöst und auf eine im Reaktionsgefäß vorgelegte Verreibung von Natriumazid (6.15g) und Cerium(IV)Ammoniumnitrat(18.35g) bei einer Temperatur von -5° bis 0°C unter ständigem Rühren mittels Magnetrührer über einen Tropftrichter aufgebracht. Die ideale Tropfgeschwindigkeit der Lösung von Hexa-acetyl-D-cellobial hierbei war ein Tropfen alle zwei Sekunden. Der Tropftrichter wurde zum Schutz des Reaktionsgemisches vor eindringender Luftfeuchtigkeit mit einem Trockenrohr (befüllt mit DRIERITE) verschlossen.

Der Reaktionsverlauf wurde über Dünnschichtchromatographie verfolgt.

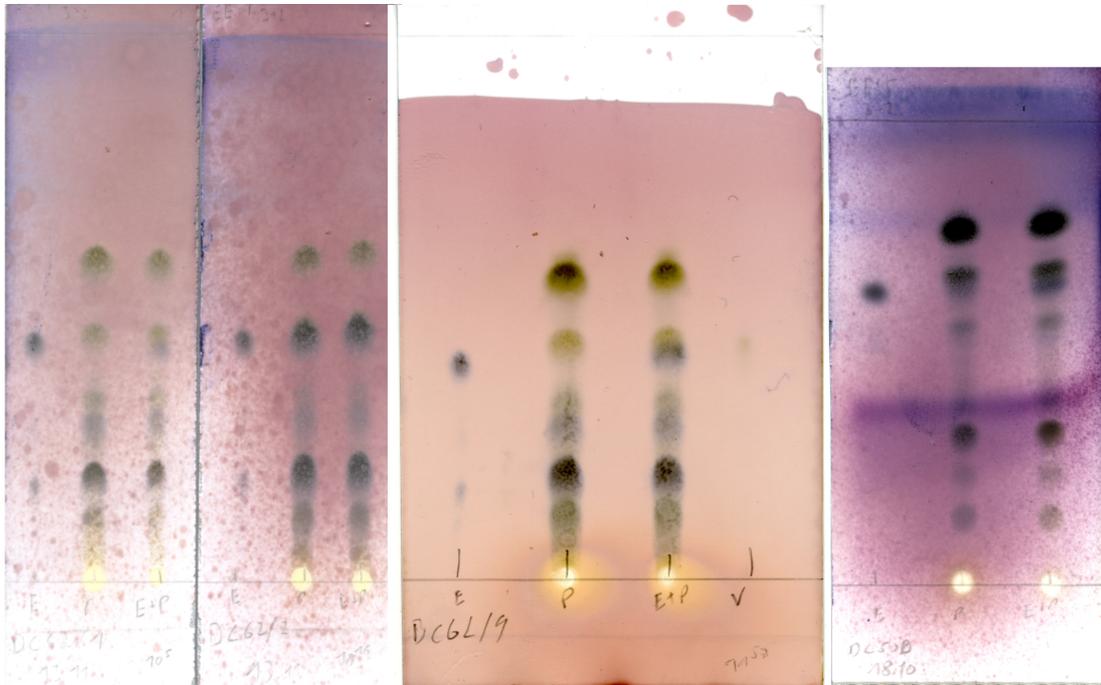


Abbildung 9: Verschiedene Stadien der Umsetzung von Cellobial (1) mit Natriumazid und Cer(IV)ammoniumnitrat in der DC-Kontrolle

(Laufmittel: Ethylacetat:Toluol 3+2 , Platte: Kieselgel 60 auf Aluminiumfolie, Detektionsmittel : Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz)

Dabei zeigte sich im Laufe der Reaktion zunächst der grünliche Fleck des 2-azido-2-desoxy-1- β -D-gluco-1-O-nitro-Derivats(2) und seines 2-azido-2-desoxy-1- α -D-manno-1-O-nitro Isomers (3) bei Rf ca. 0,62-0,68 (Abb. 9 linkes Chromatogramm). Im Zuge der abnehmenden Intensität des violett-blauen Edukt-Flecks bei Rf ca. 0,50-0,54 wurde der leicht darüber liegende grün farbene Fleck (Rf ca. 0,53-0,57) von 2-azido-2-desoxy-1- α -D-gluco-1-O-nitro-cellobiosyl-hexa-acetat sichtbar. Kurze Zeit nach dem Reaktionsbeginn sind die ebenfalls mittels DC detektierbaren Fraktionen III und IV mit den Substanzen (7) und (8) sichtbar geworden. Als die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials erfolgt war, wurde die Reaktion durch Zugabe von gekühltem Diethylether und destilliertem Wasser gestoppt.

Es empfahl sich, den Reaktionsverlauf gegen Ende der Umsetzung in immer kürzeren Abständen mittels DC zu kontrollieren, da die Bildung von Nebenprodukten durch rechtzeitiges Stoppen der Reaktion geringer gehalten werden konnte. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches erfolgte zunächst durch Abnutschen über Celite 545.

Das zweiphasige Filtrat wurde in einem Schütteltrichter getrennt, die wässrige Phase nochmals mit Diethylether ausgeschüttelt und die gesammelten organischen Phasen durch nochmaliges Ausschütteln mit destilliertem Wasser gereinigt.

Der Diethylether wurde nun mit Magnesiumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren desselben wurde am Rotavapor bei 40°C Badtemperatur eingedampft.

Der Rückstand enthielt die Substanzen (2), (3), (4), (7) und (8).

Um die Substanzen zu trennen wurde der Rückstand in getrocknetem Chloroform gelöst und auf eine vorbereitete Säule zur Normaldruck-Chromatographie aufgetragen. (Stationäre Phase: Kieselgel 60, Mobile Phase: Ethylacetat :Toluol,3+2)

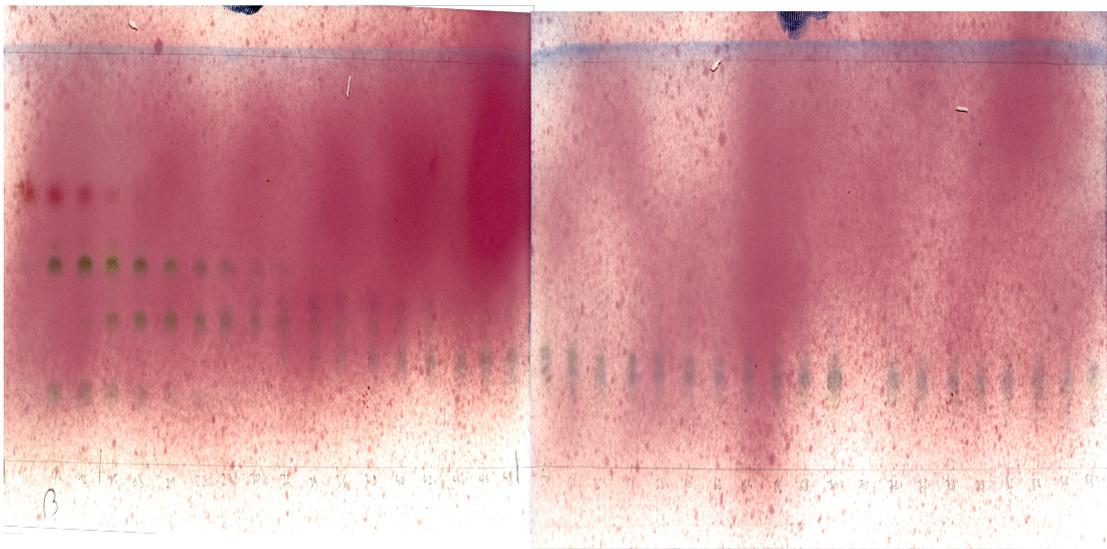


Abbildung 10: DC der mittels Säulenchromatographie getrennten Produkte der Cello-
biumumsetzung

Nach etwa 220ml Laufmittel konnte eine Mischung der Substanzen (2) und (3)
(Fraktion I) aus der Säule gewonnen werden.

Zum Teil mit dieser überlappend, gelang es als Nächstes Substanz (4) (Fraktion II) und
mit deutlicher Verzögerung die Substanzen (7) und (8) (Fraktionen III und IV) zu
isolieren.

Die jeweiligen Fraktionen wurden am Rotavapor bei 40°C eingedampft und zur
endgültigen Trocknung über Nacht unter Kühlung im Exsiccator gelagert.

2.3.3. Fraktion I (2) (3) und Tetrabutylammoniumnitrat

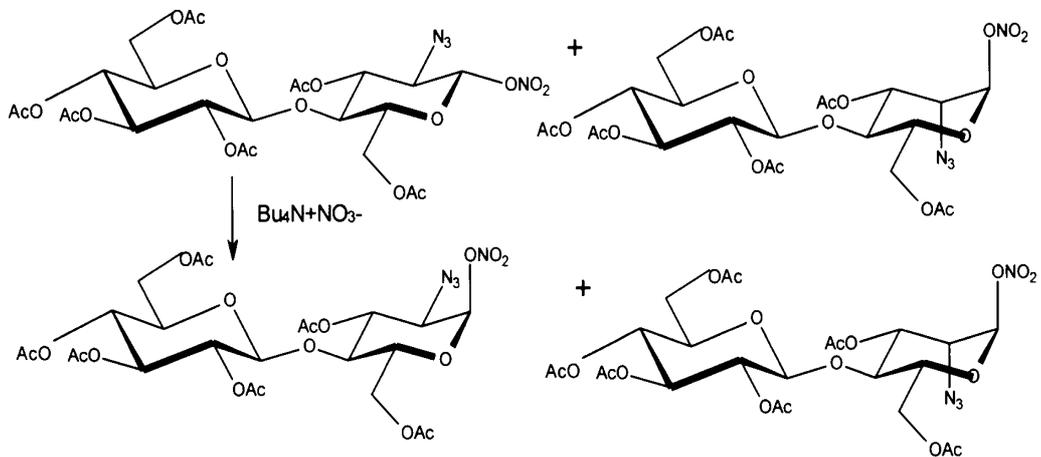


Abbildung 11: Die Behandlung von Fraktion I mit Tetrabutylammoniumnitrat bewirkt die Umlagerung der weniger stabilen Beta-Form in die durch den anomeren Effekt stabileren Alpha-Form

Zunächst wurde nur eine Teilmenge von Fraktion I (44 mg) aus den Komponenten (2) und (3) in getrocknetem Acetonitril (5 ml) gelöst und zunächst mit einer kleinen Menge Tetrabutylammoniumnitrat (58 mg) versetzt.

Bei 40°C wurde das Reaktionsgemisch am Ölbad unter ständigem Rühren und unter Verlaufskontrolle mittels DC für 70 Stunden stehen gelassen. Während dieser Zeit wurde mehrmals täglich weiteres Tetrabutylammoniumnitrat zugesetzt (8 Uhr, 12 Uhr je ca. 30mg; 18 Uhr ca. 50mg).

Als über die DC Kontrolle festgestellt werden konnte, dass sich ein stabiles neues Reaktionsgleichgewicht eingestellt hatte wurde die Reaktion beendet.

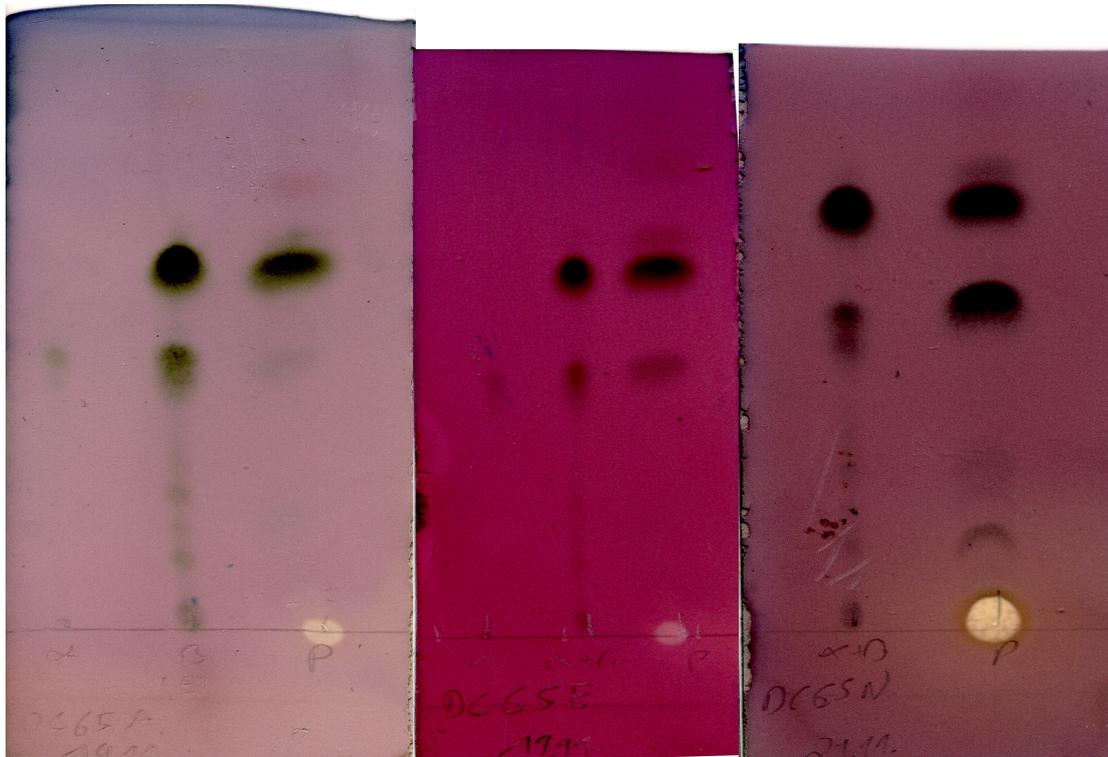


Abbildung 12: Die stärker werdende Intensität des unteren Flecks in der rechten Spalte zeigt die Zunahme der Alpha-Form bei der Behandlung von Fraktion I mit Tetrabutylammoniumnitrat

Nach diesem Feststellen der Durchführbarkeit der Reaktion wurde eine größere Teilmenge von Fraktion I (975mg) nach dem lösen in Acetonitril (10 ml) zunächst mit 500 mg Tetrabutylammoniumnitrat versetzt. Im Laufe der Reaktion wurde im Abstand von etwa 12 Stunden jeweils weitere 500 mg Tetrabutylammoniumnitrat bis zu einer Gesamtmenge von 2500 mg zugesetzt. Die Umsetzung wurde per DC verfolgt.

Nach 65 Stunden bei 40° C und unter Rühren wurde die Reaktion durch Verdünnen mit kaltem Diethylether (50ml) und destilliertem Wasser (50ml) gestoppt.

In einem Scheidetrichter wurde der Diethylether abgetrennt und nochmals mit destilliertem Wasser gewaschen.

Die organische Phase wurde am Rotavapor bei 40°C eingedampft.

Der Rückstand enthielt nun die Substanzen (3) und (4).

Zur Trennung dieser wurde eine Säulenchromatographie (Stationäre Phase: Kieselgel 60, Mobile Phase: Ethylacetat:Toluol, 3+2) durchgeführt.

2.3.4. 2-Azido-2-desoxy- α -D-manno-1-O-nitro-cellobiosyl-hexa-acetat (3) und Natriumacetat

Substanz (3) wurde in konzentrierter Essigsäure mit Natrium-Acetat umgesetzt.

Bei 100° C am Ölbad wurde das Reaktionsgemisch gerührt bis über die DC das Ende der Reaktion festgestellt werden konnte. Der Reaktionsmischung wurde Dichlormethan zugesetzt um das Produkt zu extrahieren. Im Schütteltrichter wurde als Nächstes die organische Phase abgetrennt. In weiterer Folge wurde diese mit kaltem destillierten Wasser, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abermals mit destillierten Wasser, bis dieses neutral war, geschüttelt. Zur Trocknung wurde der Dichlormethan-Phase Magnesiumsulfat beigegeben. Anschließend wurde filtriert und das Filtrat am Rotavapor bei 40° C eingedampft. Der Eindampfrückstand enthielt vermutlich Verbindung (10).

2.3.5. Fraktion I (2) (3) und Natriumacetat

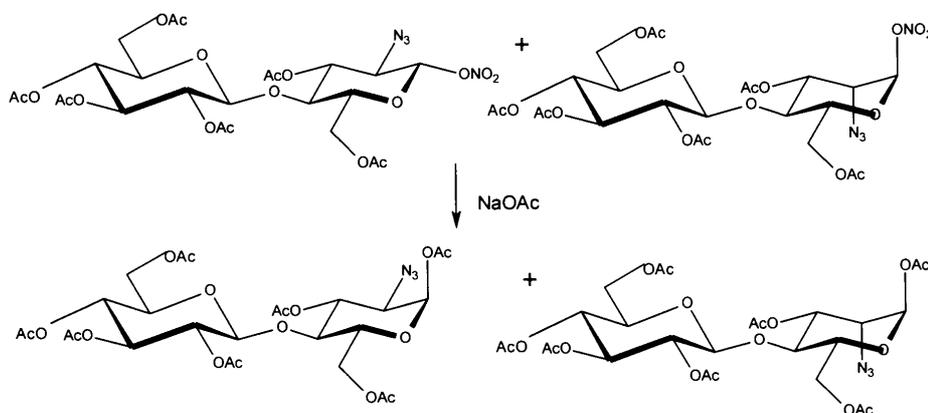


Abbildung 13: Das β -Gluconitrat und das α -Mannonitrat lassen sich durch Behandlung mit Natriumacetat vollständig in die α -Acetate überführen; das α -Mannonitrat behält dabei seine α -Anomerenkonfiguration bei.

Fraktion I, bestehend aus den Substanzen (2) und (3), wurde in konzentrierter Essigsäure gelöst und mit Natriumacetat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in ein Ölbad bei 100° C übergeführt und unter Rühren und Rückflusskühlung reagieren gelassen. Mittels DC wurde der Verlauf der Umsetzung verfolgt.

Danach wurde Dichlormethan der Reaktionslösung beigegeben. Dieses wurde nach gründlichem Schütteln im Scheidetrichter wieder abgetrennt und mit kaltem destilliertem Wasser und weitere zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Letztlich wurde wiederholt mit destilliertem Wasser, bis dieses neutral war, gewaschen. Die organische Phase wurde nun unter häufigem Schwenken mit Magnesiumsulfat versetzt und zur Entfernung von Wasserresten einige Zeit stehen gelassen und filtriert. Das Dichlormethan wurde anschließend am Rotavapor bei einer Badtemperatur von 40° C eingedampft. Im Rückstand fanden sich die entstandenen Acetate (9) und (10).

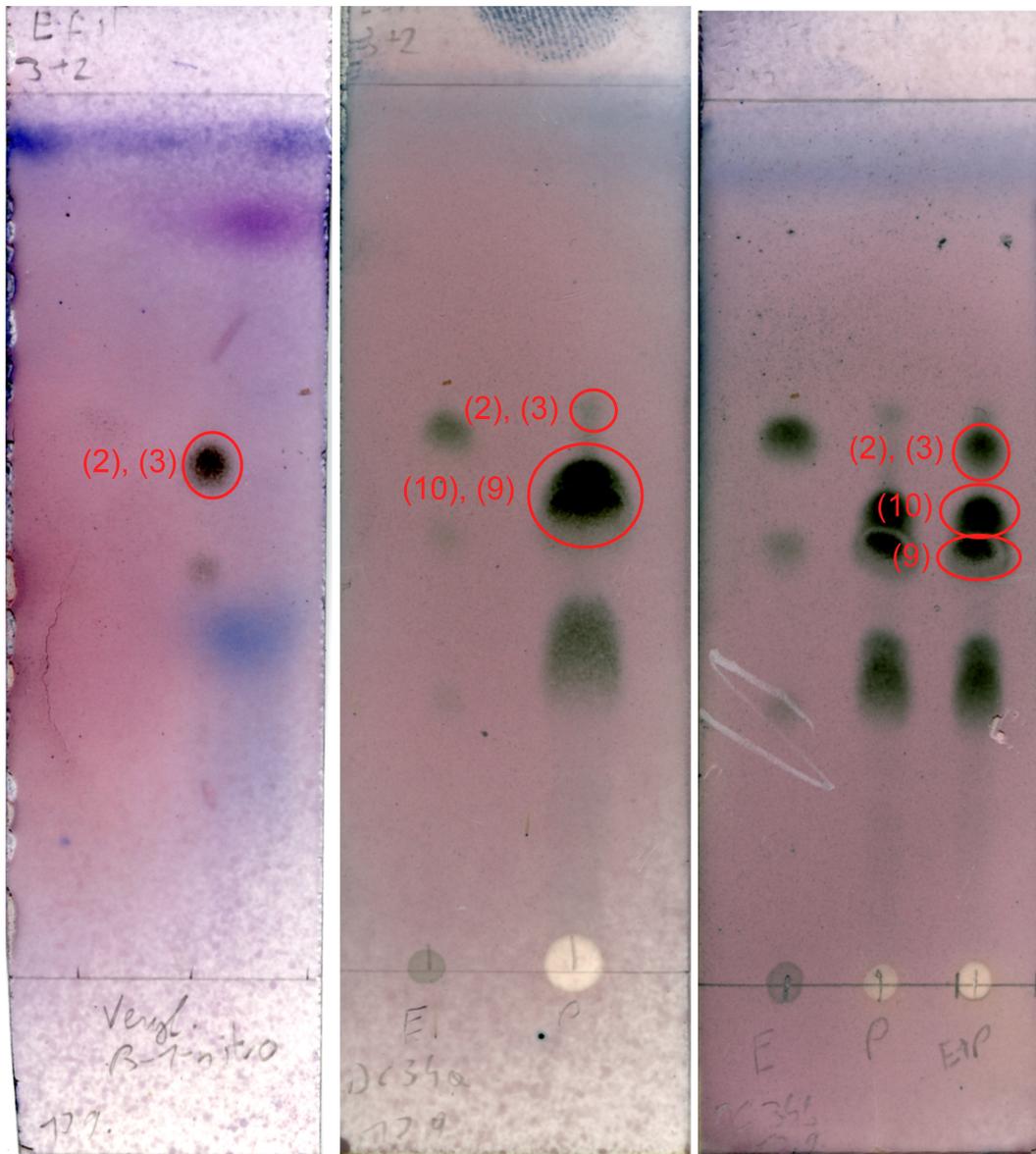


Abbildung 14: Der Verlauf der Umsetzung von Fraktion I mit Natriumacetat und die dabei entstehenden Verbindungen wurde über die entstehenden Farbflecken und deren respektive Farbintensität nachvollziehbar.

Die erste Dünnschichtchromatographie(links) zeigt die noch unveränderte Fraktion I mit den Substanzen (2) und (3). Auf den folgenden Platten(mitte u. rechts) sind ihre beiden Acetate (9) und (10) zu erkennen. Durch die Acetylierung konnte eine Erste, wenn auch nur ungenügende, Trennung erreicht werden.

2.3.6. Fraktion II (4) und Tetrabutylammoniumnitrat

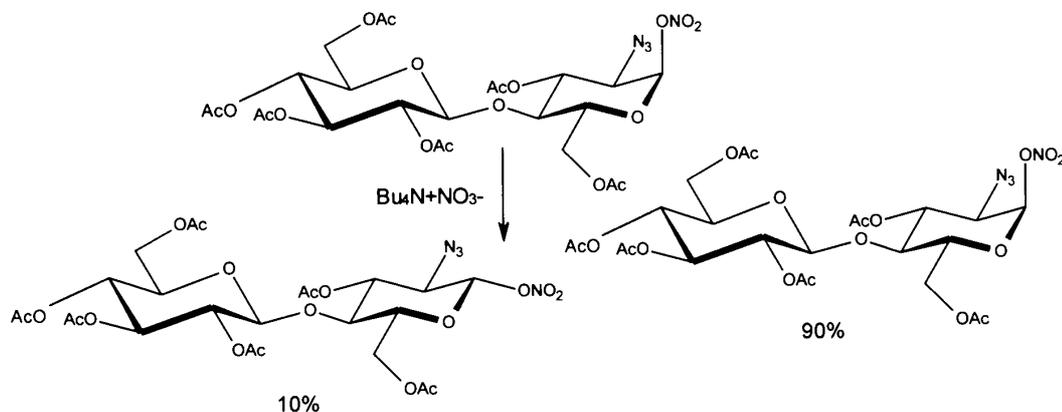


Abbildung 15: Das stabilere 2-azido-desoxy- α -D-gluco-1-O-nitro Derivat lässt sich nur mit großen Mengen Reagenz und nur in kleinen Mengen in das 2-azido-desoxy- β -D-gluco-1-O-nitro Derivat überführen

Um festzustellen ob die Umsetzung von 2-Azido-2-desoxy- α -D-gluco-1-O-nitrocellobiosyl-hexa-acetat (4) in 2-Azido-2-desoxy- β -D-gluco-1-O-nitrocellobiosyl -hexa-acetat (2) mit Tetrabutylammoniumnitrat durchführbar ist wurden zunächst 13mg der Substanz (4) in 3ml getrocknetem Acetonitril gelöst und mit 150mg Tetrabutylammoniumnitrat versetzt.

Die Umsetzung ist bei 40° C am Ölbad durchgeführt worden und mittels DC konnte die Bildung der Reaktionsprodukte verfolgt werden.



Abbildung 16: Die DC-Platten zeigen anhand der entstanden Produktflecken die Gleichgewichtseinstellung zwischen der α - und der β -Form von 2-azido-2-desoxy-D-glucopyranosyl nitrat unter dem Einfluss von Tetrabutylammoniumnitrat.

Nach 24 Stunden Reaktionszeit war sichergestellt, dass eine Umsetzung erfolgte und es wurde ein zweiter, größerer Reaktionsansatz erstellt. Hierzu wurden 180mg von Verbindung (4) in 10ml getrocknetem Acetonitril 540 mg Tetrabutylammoniumnitrat zugesetzt und das Gemisch gerührt. Nach 24 Stunden und weiters nach 44 Stunden wurden jeweils weitere 270mg Tetrabutylammoniumnitrat zugesetzt. Als nach 68 Stunden trotz der Zugabe weiterer 100mg Tetrabutylammoniumnitrates keine Veränderungen mehr anhand der DC feststellbar waren wurde die Reaktion durch Verdünnen mit kaltem Diethylether und destilliertem Wasser gestoppt. Die organische Phase wurde am Scheidetrichter abgetrennt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Durch die Zugabe von Magnesiumsulfat wurde der Diethylether getrocknet und dieser anschließend abfiltriert. Nach dem Eindampfen des Filtrates am Rotavapor (40° C Badtemperatur) fanden sich im Rückstand die Substanzen (2) und (4) im Verhältnis 1:9.

2.3.7. Fraktion II (4) und Natriumacetat

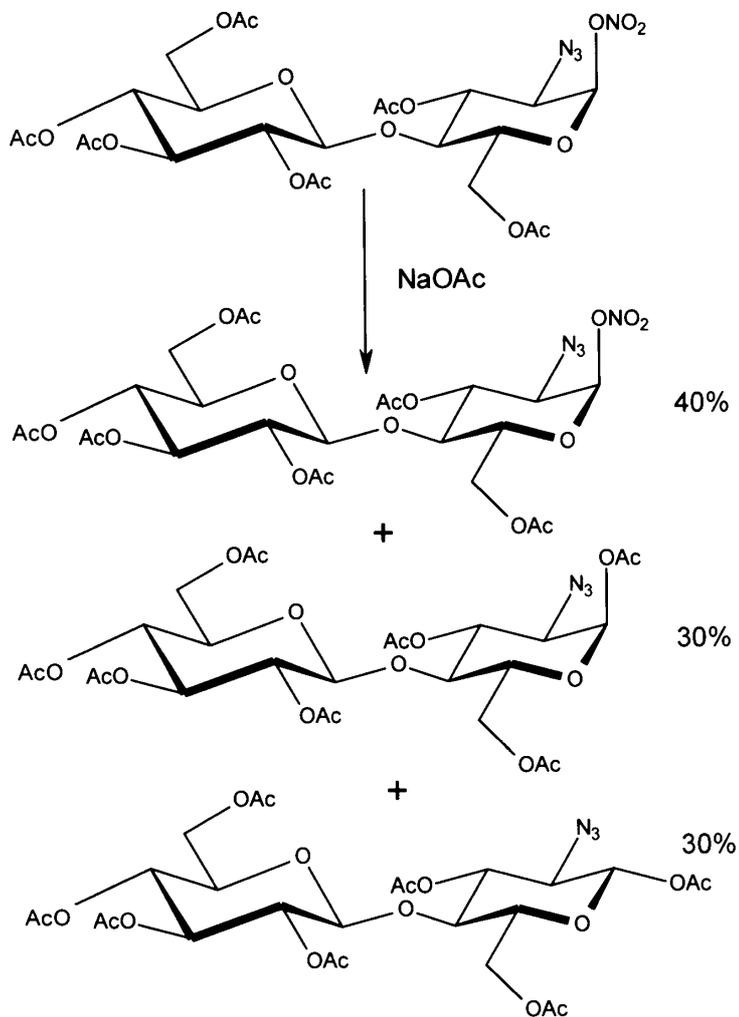


Abbildung 17: Die Zugabe von Natriumacetat zur Fraktion II zeigt die Stabilität der α -Form an, da diese kaum von der Umsetzung betroffen ist.

100mg von Verbindung (4) wurden in 5ml konzentrierter Essigsäure gelöst und mit 44 mg Natriumacetat versetzt. Die Mischung wurde am Ölbad unter Rühren auf 100°C erhitzt und der Verlauf der Reaktion durch regelmäßig durchgeführte Dünnschichtchromatographien verfolgt.

Nach 75 Minuten war das Ende der Umsetzung mangels Veränderungen an der DC Kontrolle erkennbar. Es wurde mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase im Schütteltrichter abgetrennt.

Als Nächstes wurde die organische Phase nacheinander mit kaltem, destilliertem Wasser, zwei mal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und letztlich wieder mit destilliertem Wasser geschüttelt. Nach Trocknen des Dichlormethans und anschließendem Filtrieren wurde die organische Phase am Rotavapor bei 40° C Badtemperatur eingedampft. Im Rückstand fanden sich die beiden Acetate (9) (30%) und (11) (30%) so wie die Ausgangssubstanz (4) (40%).

2.3.8. Umsetzung von Cellobial (1) mit Natriumazid und Cer(IV)ammoniumnitrat mit DOWEX-Ionenaustauscher:

Zunächst wurden die Chloridreste am DOWEX-Ionenaustauscher durch Perkolieren mit Natronlauge gegen Hydroxidgruppen ausgetauscht und dieser über Nacht getrocknet. Der so vorbereitete Ionenaustauscher wurde mit einer Verreibung von 48 mg Natriumazid und 144mg Cerium(IV)Ammoniumnitrat in einem Kolben vorgelegt. Der Kolben wurde auf ein Temperaturband von -5°C bis 0°C abgekühlt. Darauf wurde unter Rühren eine Lösung von 50mg Substanz (1) in 2ml getrocknetem Acetonitril aus einem mit einem Trockenrohr verschlossenem Tropftrichter langsam aufgebracht. Nach ein und zwei Stunden wurden jeweils weiter 50mg DOWEX zugesetzt. Die Reaktion wurde mittels DC verfolgt. Nach 3 Stunden wurde mit kaltem Diethylether verdünnt und dieser am Schütteltrichter abgetrennt. Anschließend wurde die organische Phase mit destilliertem Wasser gewaschen, durch Zusatz von Magnesiumsulfat getrocknet und nach dem Abfiltrieren des Trocknungsmittels am Rotavapor bei 40° C Badtemperatur eingedampft.

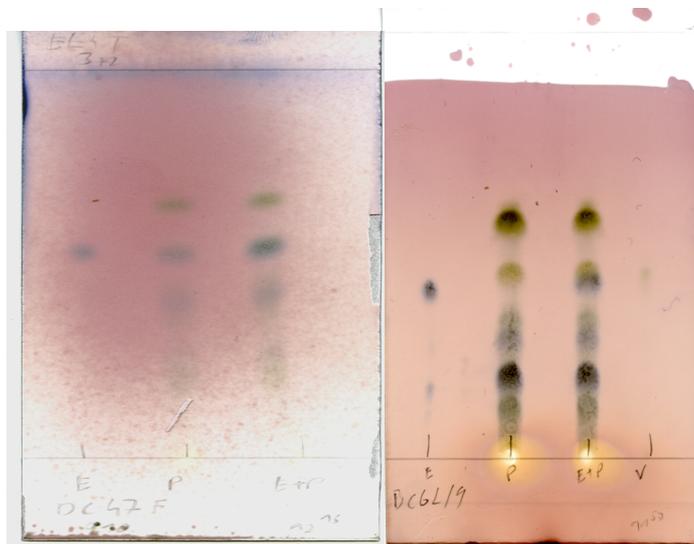


Abbildung 18: Die DC der Umsetzung mit Ionenaustauscher (links) zeigte keine Veränderungen gegenüber der Umsetzung ohne diesem (rechts).

3.Diskussion

Die Acetylierung der Fraktionen I (2) (3) und II (4) der Azidonitratisierung von Cellobial ist seit langem von Interesse. Neu ist deren Behandlung mit Tetrabutylammoniumnitrat die neue Möglichkeiten bei der Auftrennung bietet. Wie diese Reaktionen ablaufen, die Rolle die der Anomere Effekte dabei spielt und wie sie optimiert werden könnten wird im Folgenden erläutert.

Die Azidonitratisierung von per-O-acetylcellobial [2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-Glucopyranosyl(1-4)-3,6-di-O-acetyl-1,5-anhydro-1,2-eno-D-Glucitol](1) unter den 1976 von R. U. Lemieux und R. M. Ratcliffe beschriebenen Reaktionsbedingungen führt zur Bildung von vier chromatographisch auftrennbaren Produktfraktionen. Fraktion I (ca. 32%) besteht aus dem 2-azido-desoxy- β -D-gluco-1-O-nitro Derivat (2) und seinem 2-azido-desoxy- α -D-manno-1-O-nitro(3) Isomer im Verhältnis 15 bis 20:1. Fraktion II besteht aus dem reinen 2-azido-desoxy- α -D-gluco-1-O-nitro Derivat (4).

Die Fraktionen III und IV (ca. 9%) beinhalten die 2-azido-1,2-didesoxy- α und β -D-gluco-1-acetamido Derivate (7) (8). Die Komponenten (2) und (3) aus Fraktion I sind mit normalen säulenchromatographischen Methoden nicht auftrennbar.

Durch Umsetzung von Fraktion I mit Tetrabutylammoniumnitrat kann der Großteil von (2) in sein α -Anomer (4) umgewandelt werden.

Im Gegensatz dazu zeigt sich (3) von dieser Reaktion fast zur Gänze unverändert.

Bei Behandlung von Fraktion II (4) mit Tetrabutylammoniumnitrat werden nur etwa 10% zum 2-azido-desoxy- β -D-gluco-1-O-nitro Derivat (2) umgewandelt während die restlichen 90% von (4) unverändert bleiben.

Wenn Fraktion I in Eisessig mit Natriumacetat versetzt wird entstehen hauptsächlich das α -D-Glucoacetat (9) und das α -D-Mannoacetat (10).

Wird jedoch 2-azido-desoxy- α -D-gluco-1-O-nitro Derivat (4) aus Fraktion II in gleicher Weise mit Eisessig und Natriumacetat behandelt, so entstehen je ca. 30% der α - und β -Acetate (9) und (11) während etwa 40% von (4) unverändert bleiben.

Der festgestellte Unterschied in der Reaktivität des β -Nitrat (2) und die relativ hohe Stabilität der α -Nitrate (3) und (4) gegenüber Tetrabutylammoniumnitrat und Natriumacetat bestätigt das Auftreten des anomeren Effekts bei diesen Reaktionsbedingungen, welcher dazu führt, dass das axiale Anomer eines Paares von Glycosyl Derivaten mit elektronegativen Substituenten stabiler als das äquatoriale Anomer ist.

Angeichts des Anomeren Effekts lässt sich die mäßige Ausbeute von 2-azido-1,2-didesoxycellobiose bei der Azidonitrierung von per-O-Acetylcellobial mit folgender Theorie erklären:

Die zunächst bei der Reaktion gebildeten 1,2-trans-Verbindungen (2) und (3) finden sich in Fraktion I. Während (3) unter den Reaktionsbedingungen stabil ist, reagiert das thermodynamisch instabile β -D-Glucosyl Derivat (2) mit dem beim Zerfall des Cerium(IV)ammonnitrat-Komplexes entstehenden Nitrat und Ammoniak zu α -D-Gluconitrat (4) und α -Glycosylamin (5). Verbindung (5) reagiert mit in dem Reaktionsgemisch befindlichen acetylierten Verbindungen weiter zu Acetamid (7) und teilweise entschützten, nun polaren Verbindungen welche wahrscheinlich nun der chromatographischen Auftrennung entgehen und so einen Teil zur verringerten Ausbeute beitragen. Verbindung (4) reagiert ebenfalls mit Ammoniak und bildet das β -Glycosylamin (6) und das acetamido Derivat (8). Momentan wird daran gearbeitet das instabile Zwischenprodukt (2) während der Azidonitrierung in eine stabilere Form überzuführen, um so die Bildung von (4), (7) und (8) zu verhindern und damit die Gesamtausbeute von 2-azido-desoxy-cellobiose zu erhöhen.

4. Zusammenfassung

4.1. Deutsch

Die Azidonitrierung von per-O-acetylcellobial (1) unter den 1976 von Lemieux und Ratcliffe beschriebenen Reaktionsbedingungen führte zur Bildung von vier chromatographisch trennbaren Fraktionen. Besonders die Hauptkomponenten der ersten und zweiten Fraktion, das 2-azido-desoxy- β -D-gluco-1-O-nitro Derivat und das 2-azido-desoxy- α -D-gluco-1-O-nitro Derivat sind von besonderem Interesse. Durch die Behandlung von 2-Azido-2-desoxy-1-nitro-Disacchariden mit in Position 1 angreifenden Reagenzien konnten Informationen über die bevorzugt eingenommene Konfiguration und damit gleichzeitig über deren unterschiedliche Stabilität gewonnen werden. Es zeigte sich, dass das Anomer von 2-azido-desoxy-D-gluco-1-O-nitro mit einer α -ständigen Nitrogruppe sowohl bei der Acetylierung mit Natriumacetat als auch bei der „Umnitrierung“ mit Tetrabutylammoniumnitrat sehr stark dazu neigt seine ursprüngliche Konfiguration beizubehalten. In letzterem Fall gelang es nur durch Zugabe größerer Mengen Reagenz eine kleine Menge der reinen β -Form zu gewinnen. Im krassen Gegensatz dazu steht das Verhalten des β -ständigen Anomeres, welches bei beiden zuvor genannten Reaktionen seine ursprüngliche Konfiguration zu Gunsten der α -Konfiguration fast vollständig aufgibt.

Die Erklärung dieses Verhaltens liegt im anomeren Effekt begründet. Beim α -Anomer kann es, anders als bei der β -Form, zur Überlappung von e^- -Orbitalen kommen. Die so mögliche stärkere Delokalisation der Elektronen führt bedingt durch ein niedrigeres Energieniveau zu höherer Stabilität. Die so gewonnenen neuen Erkenntnisse auf diesem Gebiet der Zuckerchemie bilden zwar nur einen kleinen Beitrag für das Verständnis einer komplexen Synthesefolge, können aber in weiterer Zukunft als Ausgangspunkt für neue und tiefer gehende Forschungsarbeiten dienen. Diese werden es hoffentlich nach weiteren Anstrengungen ermöglichen, zu wirtschaftlichen Bedingungen und in ausreichendem Maße beliebige Zucker und deren Derivate zu

synthetisieren und letztlich zu beliebigen Ketten zusammenzufügen. Damit wäre ein Schritt hin zu über ihre Zuckerketten gesteuerten Arzneimitteln sowie neuen Hemmstoffen der Glykosidasen getan.

4.2. Englisch

After the azidonitration of per-O-acetylcellobial (1) there are essentially four chromatographically separable Fractions of products. Particularly interesting are the first and the second fraction and their main components, the α -(4) and β -(2)-anomers of the 2-azido-desoxy-D-gluco-1-O-nitroderivat.

The treatment of the 2-Azido-2-desoxy-1-nitro-Disaccharids with agents affecting the nitro group in position 1 has brought an interesting effect regarding the stability of the two different anomeric forms to our attention. The α -anomer of 2-azido-desoxy-D-gluco-1-O-nitro seems to be the by far more stable form.

Neither acetylation with sodiumacetat nor „renitration“ with Tetrabutylammoniumnitrat was able to change its configuration to a greater extent. Whereas the treatment of the β -anomer with the above mentioned compounds quickly led to changing its configuration to the α -form and so strengthening the previously made assumption about the stability of the α -anomer. The cause for this behaviour is the anomeric effect. It states the possibility of overlapping e⁻-orbitals thus creating a lower overall energy level for the electrons which leads to a more stable molecule.

5. Literatur

1. Dr. B. Brahn, Dr. F. Schiff; Über die komplexe Natur der Blutgruppensubstanz A des Menschen; Klinische Wochenschrift, 6. August 1926, Volume 5, Issue 32:1455-1456
2. H. Dold, R. Rosenberg; Nachweis von Isopräcipitinen im Menschlichen Blut. Nachweis der Vier Menschlichen Blutgruppen durch Isopräcipitation; Klinische Wochenschrift, 1928, Volume 7, Issue 9: 394-395
3. H.K. King , W.T.J. Morgan; Proceedings of the Biochemical Society X; Biochem. J., 1944, Volume 38, Part 1,
4. R.A. Kekwick; The Electrophoretic Analysis of Normal Human Serum, Biochem. J., 1939 vol:33 Issue:7:1122-9
5. R. U. Lemieux , D. R. Bundle , D. A. Baker; Properties of a synthetic antigen related to the human blood-group Lewis a; J. Am. Chem. Soc., 1975, 97 (14); 4076–4083
6. T. Desmet, M. Claeysens, K. Piens, W. Nerinckx; Synthesis and Evaluation of 2-Deoxy-2-amino- β -cellobiosides as Cellulase Inhibitors; J. Carbohydr. Chem., 29: 164-180, 2010;
7. R. U. Lemieux , H. Driguez; Chemical synthesis of 2-O-(α -L-fucopyranosyl)-3-O-(α -D-galactopyranosyl)-D-galactose. Terminal structure of the blood-group B antigenic determinant; J. Am. Chem. Soc., 1975, 97 (14); 4069–4075
8. R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe; The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal; Can.J.Chem. 1979, 57(10): 1244-1251, 10.1139/v79-203;

9. K.G. Krebs; D. Heusser, H. Wimmer; Sprühreagentien, 813-859

10. W. L. F. Armarego, D. D. Perrin; Purification of Laboratory Chemicals, 4th Edition,

Lebenslauf

Peter Christoph BURDIS

Persönliche Daten

Staatsangehörigkeit Österreich
Geburtsdatum 16.05.1985
Geburtsort Wien
Eltern: Mag. Pharm. Johannes Burdis
Mag^a. Andrea Burdis

Ausbildung

1992-1996 Volksschule Leopoldsdorf, Niederösterreich
1996-2004 AHS Laaerbergstraße, Wien
2004 Abschluss mit Matura
2004-laufend Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Beruflich

2004-laufend Mitarbeit in der elterlichen Apotheke

Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache)
Englisch