

6 nach Methode A: Unter N₂-Atmosphäre werden 3.3 g (10 mmol) **5** und 14 mg (0.1 mmol) CuBr in 15 mL Ethylacetat gelöst und 9.5 mL (11 mmol) einer 10proz. Lösung von Me₃Al in Toluol zugegeben; die Lösung wird 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt, danach mit 1 mL Wasser hydrolysiert, der Feststoff abgesaugt und gewaschen. Beim zusätzlichen Eindampfen der Lösung werden 3.45 g Produkt erhalten. Kristallisation aus Aceton bei -10 °C ergibt 3.1 g **6** (90% Ausb.). Schmp. 181 °C; $[\alpha]_D^{20} = +17$ ($c = 1$ in CHCl₃); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C, TMS) $\delta = 0.83$ (s, 3H; 19-CH₃), 0.88 (d, 3H, ²J = 7 Hz; 1x-CH₃), 1.12 (s, 3H; 18-CH₃), 0.9–2.7 (m, 22H), 4.6 (q, 1H, H-17).

Eingegangen am 24. April 1993 [Z 6031]

- [1] Übersichten: a) G. H. Posner, *An Introduction to Synthesis Using Organocopper Reagents*, Wiley, New York, 1980; b) Y. Yamamoto, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 945–957; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 947–959; c) E. Nakamura, *Synlett* **1991**, 539–547; d) B. H. Lipshutz, *ibid.* **1990**, 119–128; e) B. H. Lipshutz, *Synthesis* **1987**, 325–341; g) G. H. Posner, *Org. React.* **1972**, 19, 1–113.
- [2] P. Perlmutter, *Conjugate Addition Reactions in Organic Synthesis*, Pergamon, Oxford, 1992.
- [3] a) H. Laurent, R. Wiechert in *Organic Reactions in Steroid Chemistry*, Vol. 2 (Hrsg.: J. Fried, J. A. Edwards), Van Nostrand Reinhold, New York, **1972**, S. 53–126; b) R. Philippson, E. Kaspar (Schering AG), DE-A 2046640, **1972**; c) Addition an ein 3-Keto- $\Delta^{1,5}$ -Steroid: M. Tanabe, D. F. Crowe, *Can. J. Chem.* **1967**, 45, 475–479; R. Wiechert, U. Kerb (Schering AG), DE-A 1223837, **1966**.
- [4] Beschleunigung der Reaktionen von Organocupraten mit polaren Zusätzen und Lewis-Säuren wie Me₃SiCl: a) C. R. Johnson, T. J. Marren, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 27–30; b) E. Nakamura, S. Matsuzawa, Y. Horiguchi, I. Kuwajima, *ibid.* **1986**, 27, 4029–4032; c) C. Chuit, J. P. Foulon, J. F. Normant, *Tetrahedron* **1980**, 36, 2305–2310; *ibid.* **1981**, 37, 1385–1389; d) E. J. Corey, N. W. Boaz, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 6015–1618; *ibid.* **1985**, 26, 1619–1622; e) A. Alexakis, J. Berlan, Y. Besace, *ibid.* **1986**, 27, 1047–1050.
- [5] Übersichten zu Organoaluminiumverbindungen: a) K. Maruoka, H. Yamamoto, *Tetrahedron* **1988**, 44, 5001–5032; b) T. Mole, E. A. Jeffery, *Organoaluminium Compounds*, Elsevier, Amsterdam, **1972**.
- [6] Ohne Katalysator ergibt **1** mit Me₃Al in THF weniger als 1% des Produkts der 1,2-Addition (THF, 5 h, 22 °C), in Gegenwart von Sauerstoff war keine Umsetzung zu **2** feststellbar.
- [7] G. W. Kabalka, R. F. Daley, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 4428–4429.
- [8] a) H. Kunz, K. Rück, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 712–715; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 694–696; b) K. Rück, H. Kunz, *Synlett* **1992**, 343–344; c) H. Kunz, K. J. Pees, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, 1168–1169.
- [9] a) K. T. Takai, K. Oshima, H. Nozaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, 54, 1281–1282; b) F. Sato, H. Kodama, Y. Tomuro, M. Sato, *Chem. Lett.* **1979**, 623–626.
- [10] a) E. A. Jeffery, A. Meisters, T. Mole, *J. Organomet. Chem.* **1974**, 74, 365–371; b) E. C. Ashby, G. Heinsohn, *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 3297–3299; c) L. Bagnell, E. A. Jeffery, A. Meisters, T. Mole, *Aust. J. Chem.* **1975**, 28, 801–815.
- [11] a) P. Wipf, H. Smitrovich, C.-W. Moon, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3178–3186; b) B. H. Lipshutz, S. H. Dimock, *ibid.* **1991**, 56, 5761–5763; c) G. Zweifel, J. A. Miller, *Org. React.* **1984**, 32, 375–513.
- [12] a) J. Schwartz, D. B. Carr, R. T. Hansen, F. M. Dayrit, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 3053–3061; b) R. T. Hansen, D. B. Carr, J. Schwartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 2244–2245.
- [13] a) CuCN · 2LiCl: P. Knochel, M. P. C. Yeh, S. C. Berk, J. Talbert, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 2390–2392; b) CuI · 2LiCl: M. Arai, E. Nakamura, B. H. Lipshutz, *ibid.* **1991**, 56, 5489–5491.

Oligosaccharidstrukturanalyse – Sequenzinformation in wenigen Minuten**

Von Harald Schröder und Ernst Haslinger*

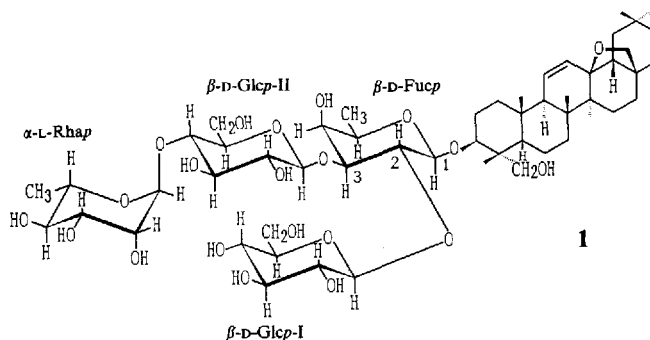
Polysaccharide oder Verbindungen mit Oligosaccharidteilstrukturen sind in der Natur weit verbreitet und oftmals biologisch hochwirksam. Zur Bestimmung der Konstitution muß man nicht nur die Monosaccharidbausteine kennen, sondern auch ihre anomere Konfiguration, die Sequenz und die Verknüpfungsstellen der Zuckereinheiten untereinander.

[*] Prof. Dr. E. Haslinger, Dipl.-Chem. H. Schröder
Abteilung für Organische Chemie I der Universität
Albert-Einstein-Allee 11, D-89069 Ulm
Telefax: Int. + 731/502-2803

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

In zunehmenden Maße hat sich die NMR-Spektroskopie als hervorragende Methode zur Bestimmung der beiden letztgenannten Strukturmerkmale erwiesen^[1–3]. In den vergangenen Jahren hat die Anwendung von 3D-NMR-Techniken zur Strukturuntersuchung von Oligosacchariden an Bedeutung gewonnen^[4–6]. Durch ein 3D-TOCSY-ROESY-Experiment erhält man beispielsweise alle gewünschten Strukturparameter^[7]. Allerdings sind die niedrige digitale Auflösung, die geringe Empfindlichkeit und damit der hohe Zeitbedarf die größten Hindernisse für eine routinemäßige Anwendung von 3D-NMR-Techniken.

Ersetzt man in einem solchen 3D-TOCSY-ROESY-Experiment den ersten Puls durch einen selektiven Gauß-Puls^[8], der nur eine bestimmte Protonenart anregt, so erhält man die Signale in Form eines 2D-Spektrums. Wir haben selektive TOCSY-ROESY-Experimente an Verbascosaponin **1** durchgeführt. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 1



und 2 abgebildet. Jedes Spektrum ermöglicht es, von einem Monosaccharid den oder die folgenden Zuckerbausteine und ihre Anknüpfungsstellen zu bestimmen. Der entscheidende Vorteil dieser Meßtechnik ist ihre hohe Empfindlichkeit und damit der außerordentliche Zeitgewinn.

Das Prinzip sei kurz erläutert: Ein nicht überlappendes Resonanzsignal eines Protons von einem Monosaccharidbaustein (in der Regel das anomere H-Atom) wird durch einen Gauß-Puls selektiv angeregt. Die dadurch erzeugte Magnetisierung wird durch einen anschließenden TOCSY-Schritt auf weitere Protonen desselben Zuckerbausteins verteilt. Nach dieser Vorbereitung wird das ROESY-Experiment durchgeführt, und man überträgt die Magnetisierung durch die dipolare Kopplung über den Raum auf jene Protonen der benachbarten Zuckerbausteine, die an der Verknüpfungsstelle gebunden sind. Dies führt zu interglycosidischen Korrelationssignalen zwischen den Protonen an der Verknüpfungsstelle.

Wir zeigen am Beispiel von Verbascosaponin **1** die Anwendung von selektiven 3D-TOCSY-ROESY-Messungen. Zur vollständigen Sequenzierung von **1** reichten zwei Experimente aus. Abbildung 1 zeigt das Spektrum, das erhalten wird, wenn das anomere Proton der Fucoseeinheit selektiv angeregt wird. Man findet drei interglycosidische Korrelationssignale a, b und c. Signal a belegt die Verknüpfung zwischen dem C1-Atom der Glucose-I-Einheit und dem C2-Atom des Fucosebausteins. An Position C3 der Fucose ist die Glucose-II-Einheit gebunden (Signal b); Fucose ist daher der Ausgangspunkt für eine Verzweigung der Zuckerkette. Sie ist über das anomere C-Atom an H3 des Aglycons (Signal c) gebunden. Die noch ausstehende Information über die Konstitution der Zuckerkette kann aus Abbildung 2 entnommen werden. Es wurde hier das anomere Proton der Glucose-II-Einheit selektiv angeregt und die Magnetisierung auf alle weiteren Protonen dieses Zuckers verteilt. Das Korrelationssignal a belegt, daß der Rhamnosebaustein an Position 4 der Glucose-II-Einheit gebunden ist. Signal b führt vom anomere-

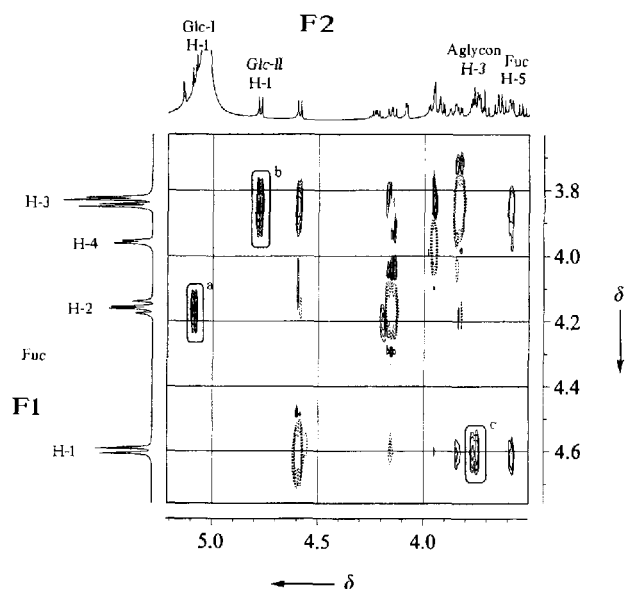


Abb. 1. 2D-TOCSY-ROESY-Spektrum, selektive Anregung des H1-Atoms der Fucoseeinheit. Das anomere Proton des Fucosebausteins wird selektiv angeregt und die Magnetisierung auf die Protonen H2, H3 und H4 dieses Bausteins übertragen. Nach dieser Vorbereitung wird das ROESY-Experiment durchgeführt. Im Spektrum sind ausgehend von Signalen der Fucose in F1 Diagonalsignale zum gleichen Proton (negativ, gestrichelte Darstellung), schwache COSY-artige Signale (erscheinen in Antiphase), ROESY-Cross-Peaks (positiv, durchgezogene Linie) innerhalb des Zuckerbausteins und zu Protonen an den Verknüpfungsstellen benachbarter Zuckereinheiten zu erkennen. Drei interglycosidische Signale (eingekreist, a: Fuc-H2/Glc-I-H1, b: Fuc-H3/Glc-II-H1, c: Fuc-H1/Aglycon-H3) belegen die Partialsequenz Glc-II-(1 → 3)-[Glc-I-(1 → 2)-]Fuc-(1 → 3)-Aglycon. Weiterhin sind ROE-Korrelationen innerhalb der Fucoseeinheit zu sehen: H1/H3, H1/H5 und H3/H5. In der F1-Dimension ist ein selektives TOCSY der Fucoseeinheit, in der F2-Dimension des ^1H -NMR-Spektrum von **1** als Referenzspektrum abgebildet. 512 W-Datenpunkte, 40 Experimente, TOCSY-Mischzeit 70 ms, Meßzeit 4 min.

ren Proton der Glucose-II-Einheit wieder zurück zum H3-Proton der Fucose.

Die Verwendung einer TOCSY-ROESY statt einer TOCSY-NOESY-Pulsfolge^[9] ist für Moleküle mittlerer Größe wie Verbascosaponin notwendig, da hier die Kern-Overhauser-Effekte (NOE) klein oder nicht vorhanden sind^[10]. Voraussetzung für eine Sequenzierung der Zuckerkette ist die Zuordnung der Protonensignale, z.B. durch ein COSY-Spektrum. Das selektive TOCSY-ROESY-Experiment ermöglicht auch bei starken Signalüberlagerungen eine eindeutige Sequenzierung. Liegen allerdings Signale der selektiv angeregten Zuckereinheit genau übereinander, kann auch diese Methode keine Ergebnisse liefern. Die beschriebene Meßtechnik kombiniert ausschließlich die Vorteile der selektiven Anregung (Frequenzselektivität, geringerer Zeit- und Speicherbedarf) mit denen der 3D-Spektroskopie (Dispersion in eine zusätzliche Frequenzdimension und dadurch Erzeugung von Teilspektren). Die vollständige Sequenzanalyse von **1** gelang uns innerhalb von 10 Minuten durch Aufnahme der beiden Spektren in Abbildung 1 und 2. Die Strukturbestimmung von Oligosacchariden ist mit dieser Methode wesentlich vereinfacht.

Experimentelles

Die NMR-Spektren wurden mit einem Bruker AMX-500-Spektrometer (^1H -NMR-Frequenz: 500.13 MHz) aufgenommen und an einem Aspect-X32-Rechner mit dem UXNMR-Programm bearbeitet. 5 mm inverser Probenkopf,

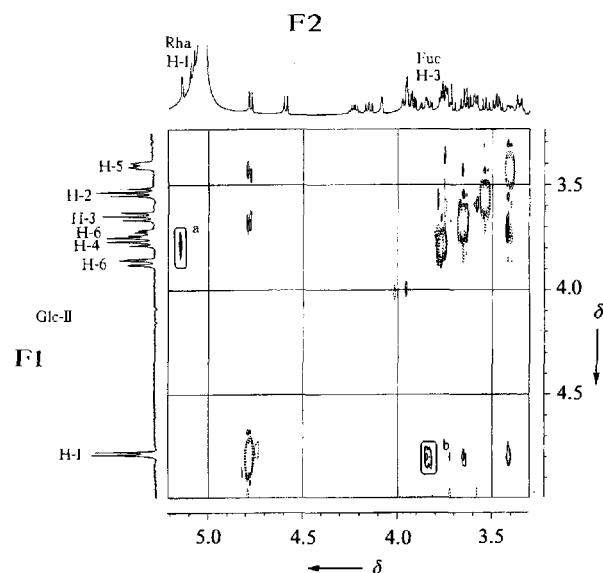


Abb. 2. 2D-TOCSY-ROESY-Spektrum, selektive Anregung des H1-Atoms der Glucose-II-Einheit. Das anomere Proton der Glucose-II-Einheit wird selektiv angeregt, die Magnetisierung auf alle anderen Protonen des Glucosebausteins übertragen und anschließend das ROESY-Experiment durchgeführt. Zwei interglycosidische ROE-Kreuzsignale (eingekreist, a: Glc-II-4/Rha-1, b: Glc-II-1/Fuc-3) belegen die Partialsequenz Rha-(1 → 4)-Fuc. Mit diesem und dem Experiment in Abbildung 1 sind somit Sequenz und Verknüpfungsstellen von **1** vollständig bestimmt. Folgende intraglycosidische ROE-Signale der Glucose-II-Einheit sind zu sehen: H1/H3, H1/H5 und H3/H5. In der F1-Dimension ist ein selektives TOCSY der Glucose-II-Einheit, in der F2-Dimension das ^1H -NMR-Spektrum von **1** als Referenzspektrum abgebildet. 512 W-Datenpunkte, 40 Experimente, TOCSY-Mischzeit 70 ms, Meßzeit 4 min.

Lösungsmittel: 0.2 mL $[\text{D}_4]\text{Methanol}/[\text{D}_5]\text{Pyridin}$ (3:2), Probenmenge 3×10^{-5} mol, Temperatur: 310 K. Das CD_3OD -Signal wurde als interne Referenz benutzt (^1H -NMR: $\delta = 3.3$).

Pulssequenz für das selektive 3D-TOCSY-ROESY-Experiment: 90° -soft-d1-[MLEV-17]- t_1 -[Spin-Lock]FID (t_2); 90° -Softpulslänge P1: 70 ms (64 dB, truncation level 1%), TOCSY Mischzeit: 70 ms (60 MLEV-17-Cyclen mit jeweils zwei Trim-Pulsen von 2.5 ms Länge), ROESY-Spin-Lock-CW-Puls: 250 ms, $d1 = 1/J\text{-P1}/2$, $^3J_{\text{H1,H2}} = 7.8$ Hz (Fucose und Glucose) Aquisitionszeit + Relaxationsdelay: 300 ms, 8 Scans, 512-W-Datenpunkte, 40 Inkremente (t_1), Meßzeit 4 min. Ein Gauß-Puls ist sehr selektiv und bietet Vorteile gegenüber Dante- oder Halbgauß-Pulsen. Ein selektiver Anregungspuls von 70 ms wurde gewählt, um die gewünschte Selektivität zu erreichen. Der darauf folgende TOCSY-Transfer erfordert Inphase-Magnetisierung. Da der dafür erforderliche Delay (Wartezeit) ($d1 = 1/J\text{-P1}/2 = 95$ ms) einen Empfindlichkeitsverlust durch Relaxation mit sich bringt, wurde der Delay möglichst klein gewählt (5 μs). Der Empfindlichkeitsverlust durch den Anteil an Antiphase-Magnetisierung wurde in Kauf genommen. Dies bietet den weiteren Vorteil, daß d1 nicht für verschiedene Kopplungskonstanten justiert werden muß.

Eingegangen am 16. April 1993 [Z 6014]

- [1] J. Dabrowski in *Two-dimensional NMR Spectroscopy* (Hrsg.: W. R. Coasman, R. M. K. Carlson), VCH, Weinheim, 1987, S. 366–370.
- [2] L. Poppe, J. Dabrowski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 159, 618–623.
- [3] E. Haslinger, S. Korhammer, M. Schubert-Zsilavecz, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 713–714.
- [4] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1987**, 73, 574–579.
- [5] G. W. Vuister, P. de Waard, R. Boelens, J. F. G. Vliegthart, R. Kaptein, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 772–774.
- [6] L. Poppe, H. van Halbeek, *J. Magn. Reson.* **1992**, 96, 185–190.
- [7] H. Schröder, E. Haslinger, *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, im Druck.
- [8] H. Kessler, S. Mronga, G. Gemmecker, *Magn. Reson. Chem.* **1991**, 29, 527–557.
- [9] V. Sklenar, J. Feigon, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5644–5645.
- [10] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, 63, 207–213.