

RUDOLF LAMBERT und FRIEDRICH ZILLIKEN

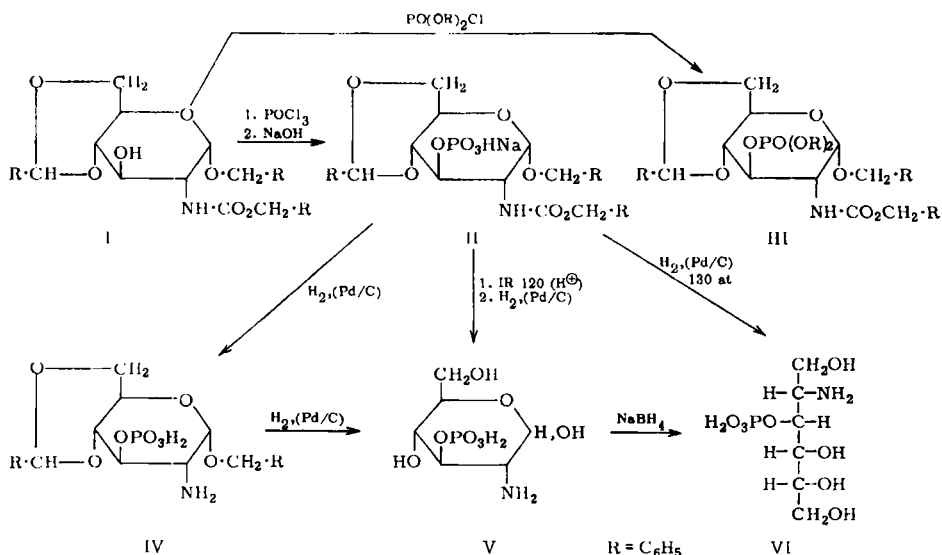
Synthese des D-Glucosamin-3-phosphates

Aus dem Biochemischen Laboratorium der R. K. Universität Nijmegen, Niederlande

(Eingegangen am 27. März 1963)

N-Carbobenzoxy-4.6-benzyliden-benzyl- α -D-glucosaminid (I) wird mit Phosphoroxychlorid in II übergeführt und daraus durch Entbenzylierung und katalytische Hydrierung das D-Glucosamin-3-phosphat (V) gewonnen.

Lactobacillus bifidus var. *pennsylvanicus*¹⁾ besitzt eine sehr aktive und spezifische Kinase, die *N*-Acetyl-D-glucosamin in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} vornehmlich in *N*-Acetyl-D-glucosamin-6-phosphat überführt^{2,3)}. Beim eingehenderen Studium dieser Reaktion beobachteten wir das Auftreten einer zweiten Substanz, die ebenfalls saure Eigenschaften aufwies und einen positiven Morgan-Elson-Test⁴⁾ für Acetylaminozucker gab. Bei der Elektrophorese bei pH 6.5 wandert sie deutlich schneller als *N*-Acetyl-D-glucosamin-6-phosphat, und auch papierchromatographisch unterscheiden sich die Substanzen. Im Rahmen der Konstitutionsaufklärung dieser zweiten



Substanz entschlossen wir uns zur Synthese des D-Glucosamin-3-phosphates. 3-O-Substituierte Derivate des *N*-Acetyl-D-glucosamins sind von allgemeinerer Bedeutung

1) P. GYÖRGY, R. F. NORRIS und C. S. ROSE, Arch. Biochem. Biophysics **48**, 193 [1954].

2) P. J. O'BRIEN, M. C. GLICK und F. ZILLIKEN, Federat. Proc. **19**, 85 [1960].

3) M. C. GLICK, I-WEN CHEN und F. ZILLIKEN, J. biol. Chemistry **237**, 981 [1962].

4) W. T. J. MORGAN und L. A. ELSON, Biochem. J. **28**, 988 [1934]; J. L. REISSIG, J. L. STROMINGER und L. F. LELOIR, J. biol. Chemistry **217**, 959 [1955]; M. R. SALTON, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **34**, 308 [1959].

für Biosynthesewege dieser Mutante. So besitzt dieser Mikroorganismus eine sehr aktive 3-O- β -D-Galaktotransferase³⁾. Die β -Glykoside des *N*-Acetyl-D-glucosamins werden in hoher Ausbeute direkt als *N*-Acetyl-muraminsäure (*N*-Acetyl-3-O-[α -carboxy-äthyl]-D-glucosamin)⁵⁾ in die Zellwand eingebaut⁶⁾ und zeigen Wuchsstoffaktivität, während andererseits das *N*-Acetyl-3-O-äthyl-D-glucosamin und die *N*-Acetyl-muraminsäure sowie deren β -Äthylglykoside keine Wuchsstoffaktivität aufweisen.

Ausgehend vom *N*-Carbobenzoxymethyl- α -D-glucosaminid⁷⁾ bereiteten wir zunächst die Benzylidenverbindung I durch Kondensation mit Benzaldehyd bei Gegenwart von trockenem Zinkchlorid. Mit Phosphoroxychlorid in Pyridin ließ sich I in 3-Stellung phosphorylieren und anschließend in das schön kristallisierende Mononatriumsalz II überführen. Der entsprechende Ester III konnte aus I mit Diphenylchlorophosphat synthetisiert werden. Es gelang uns jedoch nicht, auf einfache Weise alle Schutzgruppen dieser Verbindung zu entfernen.

II wurde zusammen mit einem Kationenaustauscher (H⁺-Form) in Wasser suspendiert und rasch mit Wasserdampf destilliert. Das entstandene *N*-Carbobenzoxymethyl- α -D-glucosaminid-3-phosphat konnte als solches isoliert werden. Zur Bereitung von D-Glucosamin-3-phosphat (V) genügte es jedoch, die Lösung nach Entfernen des Ionenaustauschers auf pH 6 zu bringen und mit Palladium auf Kohle (10% Pd) zu hydrieren. Nach Reinigung über eine Anionenaustauschersäule konnte V in guter Ausbeute kristallisiert gewonnen werden.

Zum Konstitutionsbeweis dieser Verbindung bedienten wir uns der Elson-Morgan-Reaktion⁸⁾. Bekanntlich geben hierbei 2-Amino-2-desoxy-hexosen nach alkalischer Behandlung mit Acetylaceton und anschließendem Erhitzen mit einer sauren Lösung von *p*-Dimethylaminobenzaldehyd einen roten Farbstoff. Bei der Modifikation nach N. F. BOAS⁹⁾ liegt das Absorptionsmaximum für die freien Aminozucker bei 530 m μ , während 3-O-substituierte Aminozucker ein Maximum bei 510 m μ aufweisen¹⁰⁾.

Die Abbildung zeigt die Spektren verschiedener 3-O-substituierter Glucosaminderivate sowie des D-Glucosamins unter den Bedingungen der Elson-Morgan-Reaktion nach Boas. Die Lage der Absorptionsmaxima von V sowie der von uns früher synthetisierten Verbindungen 3-O-[α -Carboxy-äthyl]-D-glucosamin (Muraminsäure) und 3-O-Äthyl-D-glucosamin⁵⁾ bei 510 m μ läßt den Schluß zu, daß es sich bei V tatsächlich um ein 3-substituiertes Glucosaminderivat handelt. Der Befund, daß glykosidische¹⁰⁾ und Ätherbindungen in der 3-Position des Glucosamins die Farbreaktion in diesem Sinne beeinflussen, kann nun auch auf Phosphorsäureester ausgedehnt werden.

Hydriert man II kurzzeitig bei pH 6 bis zur Beendigung der CO₂-Entwicklung, so entsteht 4.6-Benzyliden-benzyl- α -D-glucosaminid-3-O-phosphat (IV), das ebenfalls kristallin isoliert werden konnte. Durch längere Hydrierung konnte IV in V übergeführt werden, jedoch erwies sich die Abspaltung der Benzylidengruppe auf diesem

5) R. LAMBERT und F. ZILLIKEN, Chem. Ber. **93**, 2915 [1960].

6) P. J. O'BRIEN, M. C. GLICK und F. ZILLIKEN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **37**, 357 [1960].

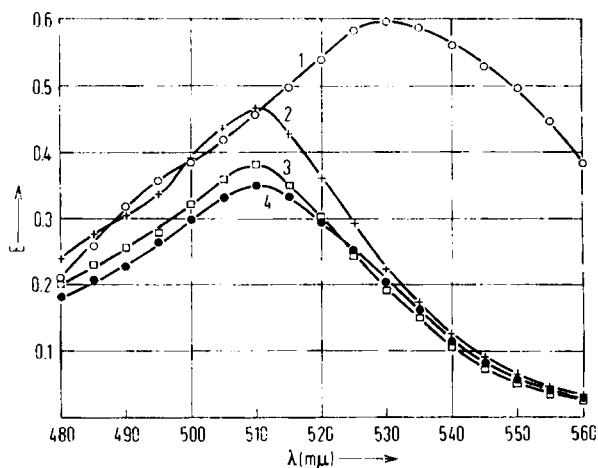
7) K. HEYNS und H. PAULSEN, Chem. Ber. **88**, 188 [1955].

8) L. A. ELSON und W. T. J. MORGAN, Biochem. J. **27**, 1824 [1933].

9) J. biol. Chemistry **204**, 553 [1953].

10) J. A. CIFONELLI und A. DORFMAN, J. biol. Chemistry **231**, 11 [1958].

Wege als schwieriger. Bei der Hydrierung von II unter Druck bei 100–130 at erhielten wir in guter Ausbeute kristallisiertes 2-Amino-2-desoxy-D-glucit-3-phosphat (VI),



Spektren verschiedener D-Glucosaminderivate nach der Elson-Morgan-Farbreaktion in der Modifikation von BOAS⁹⁾

- 1: D-Glucosamin-HCl (44.8 μg); 2: Muraminsäure (40.1 μg);
3: D-Glucosamin-3-phosphat (V) (40.1 μg); 4: 3-O-Äthyl-D-glucosamin (39.2 μg)

das wir auch durch Reduktion von V mit Natriumborhydrid gewinnen konnten. O. WESTPHAL und R. STADLER¹¹⁾ haben kürzlich unabhängig von uns V auf ähnlichem Wege synthetisiert.

Vorliegende Arbeit wurde durch Unterstützung des NATIONAL INSTITUTS OF HEALTH in Form eines USPHS AI 03987-02 Grants ermöglicht.

Herrn Professor Dr. H. RUDY, Firma J. A. BENCKISER GmbH, Ludwigshafen/Rh., danken wir sehr für großzügige Spenden von D-Glucosamin-HCl, den Herren G. GROENEWOUD und Diplomchemiker G. SCHMETS für präparative Mithilfe und Fräulein M. JANSEN für analytische Bestimmungen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Papierchromatographie wurde absteigend ausgeführt. Lösungsmittel I: Äthylacetat/Pyridin/Essigsäure/Wasser (5:5:1:3). Die Schmelzpunkte wurden mit dem Leitz Mikroskopeheitzisch 350 bestimmt. Sie sind unkorrigiert.

N-Carbobenzoxy-4,6-benzyliden-benzyl-α-D-glucosaminid (I): Eine fein pulverisierte Mischung von 20.0 g (49.6 mMol) *N*-Carbobenzoxy-benzyl-α-D-glucosaminid⁷⁾, Schmp. 174°, und 20 g trockenem Zinkchlorid wird mit 50 ccm frisch destilliertem, auf etwa 60° erwärmtem Benzaldehyd versetzt. Unter kräftigem Schütteln bei Feuchtigkeitsausschluß geht nach wenigen Minuten alles organische Material und das meiste Zinkchlorid in Lösung. Schließlich verfestigt sich der zähflüssige Sirup zu einem Gel. Nach 16 stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch unter mechanischem Rühren in 400 ccm Wasser eingetragen. Das

¹¹⁾ Angew. Chem. **75**, 452 [1963].

Rühren wird 15 Min. fortgesetzt; darauf wird das Wasser von der flockigen Suspension dekantiert, erneuert und der Vorgang wiederholt. Der Rückstand wird sodann zweimal kurze Zeit mit Petroläther (40–60°) auf dieselbe Weise behandelt. Das getrocknete Rohprodukt wird aus Toluol umkristallisiert. Ausb. 19.5 g (80% d. Th.) farbloser Nadeln vom Schmp. 230°. $[\alpha]_D^{25}$: +98.6° (in CHCl_3 , $c = 0.5$).

$\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{NO}_7$ (491.5) Ber. C 68.42 H 5.94 N 2.85 Gef. C 68.62 H 5.97 N 2.77

Die Kristalle sind löslich in Tetrahydrofuran, Dimethylformamid, Aceton, Chloroform, warmem Methanol, Äthanol und Äthylacetat.

N-Carbobenzoxy-4.6-benzyliden-benzyl- α -D-glucosaminid-3-O-mononatrium-phosphat (II): In einem verschlossenen Gefäß werden 7.8 g (15.9 mMol) *I* unter vorsichtigem Erwärmen in 35 ccm trockenem Pyridin gelöst. Die Lösung wird auf –30° abgekühlt. Man bereitet nun eine Lösung von 1.76 ccm (19.3 mMol) *Phosphoroxychlorid* durch dessen langsames Eintropfen in 5 ccm auf –30° vorgekühltes Pyridin. Die beiden Lösungen werden unter Schütteln vereinigt und in einem Aceton/Trockeneis-Bad weiter abgekühlt, bis das Pyridin eben auszukristallisieren beginnt. Man läßt das Lösungsgemisch 16 Std. bei +4° unter Feuchtigkeitsausschluß stehen, wobei Pyridin-hydrochlorid in langen Nadeln auskristallisiert. Nach Dekantieren und zweimaligem Waschen der Kristalle mit wenig Pyridin werden die vereinigten Lösungen langsam unter Rühren und Eiskühlung in eine Lösung von 3.9 g Natriumhydroxyd in 200 ccm Wasser eingetropt. Gegen Ende entsteht eine klare Lösung, ein Hinweis, daß die Phosphorylierungsreaktion sowie die Verseifung der zwei restlichen Chloratome vollständig sind. Sodann bringt man die Lösung mit konz. Salzsäure unter Rühren und Eiskühlung auf pH 1. Der voluminöse Niederschlag wird rasch abgesaugt, mit wenig Eiswasser gewaschen und in 125 ccm kaltem Methanol gelöst. Die Lösung wird sofort mit 0.1 *n* methanolischer Natronlauge auf pH 7 gebracht. Hierbei setzt Kristallisation ein. Nach wenigen Std. erhält man 2.7 g Kristalle. Diese Rohausbeute wird durch Einengen der Mutterlauge i. Vak. und Zufügen von Äther auf 7.9 g (84% d. Th.) erhöht. Nach einmaligem Umkristallisieren aus 96-proz. Äthanol lange, prismatische Nadeln vom Schmp. 265°. Ausb. 6.2 g (66% d. Th.). $[\alpha]_D^{25}$: +106.0° (in CH_3OH , $c = 0.5$).

$\text{NaC}_{28}\text{H}_{29}\text{NO}_{10}\text{P}$ (593.5) Ber. C 56.66 H 4.92 N 2.36 P 5.23

Gef. C 56.20 H 4.88 N 2.46 P 4.97

Die Substanz ist in Dimethylformamid, Methanol, heißem Äthanol und heißem Wasser gut, in Tetrahydrofuran, Aceton, Äther, Chloroform und Äthylacetat nicht löslich.

N-Carbobenzoxy-4.6-benzyliden-benzyl- α -D-glucosaminid-3-O-diphenylphosphat (III): Zur Lösung von 10.0 g (20.4 mMol) *I* in 75 ccm trockenem Pyridin gibt man langsam unter Eiskühlung 6.6 g (25.6 mMol) *Diphenylchlorophosphat*¹²⁾. Nach eintägigem Stehenlassen bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluß erwärmt man 30 Min. auf 50°. Nach einem weiteren Tag gießt man die Lösung in einen Scheidetrichter, der gleiche Teile Chloroform und 2 *n* HCl enthält, schüttelt aus und extrahiert die Chloroformlösung noch dreimal mit 2 *n* HCl. Die Chloroformlösung wird über Natriumsulfat getrocknet, eingedampft und das Reaktionsprodukt mit Äther zur Kristallisation gebracht. Ausb. 10.6 g. Durch gleiche Behandlung der Mutterlauge werden weitere 2.0 g gewonnen. Rohausb. 12.6 g (86% d. Th.).

Zur Umkristallisation werden 10.0 g in 15 ccm Chloroform gelöst und langsam unter gelindem Erwärmen mit Petroläther (60–80°) versetzt. Beim Erscheinen der ersten Trübung läßt man langsam abkühlen, bis sich Drusen zu formen beginnen. Nun wird rasch abfiltriert, das Filtrat bis zur Klärung erwärmt und nochmals Petroläther bis zum Einsetzen der Kristalli-

¹²⁾ P. BRIGL und H. MÜLLER, Ber. dtsh. chem. Ges. 72, 2121 [1939].

sation hinzugefügt. Ausb. 6.5 g farblose, lange, seidige Nadeln vom Schmp. 103°. $[\alpha]_D^{21}$: +55.0° (in CHCl_3 , $c = 1$).

$\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{NO}_{10}\text{P}$ (723.7) Ber. C 66.38 H 5.27 N 1.94 P 4.29

Gef. C 66.83 H 5.49 N 2.10 P 4.17

Löslich in Chloroform, Methanol, Äthanol, wenig in Äther, unlöslich in Petroläther.

D-Glucosamin-3-O-phosphat (V): 3.00 g (5.05 mMol) *II* werden in einem kleinen Rundkolben in 25 ccm Wasser suspendiert, mit 2 g Kationenaustauscher IR 120 (H^+) (Feuchtgewicht) versetzt und mit Wasserdampf destilliert. Nach 5–10 Min. ist die Benzylidenverbindung gespalten und der freigewordene Benzaldehyd abdestilliert. Man filtriert den Ionenaustauscher ab, bringt mit 2 *n* NaOH auf pH 6, fügt 5 g Palladium auf Kohle (10 % Pd) zu und hydriert mit strömendem Wasserstoff.

Bei Beendigung der CO_2 -Entwicklung erreicht die Lösung einen pH-Wert von etwa 7. Man setzt die Hydrierung weitere 16 Stdn. oder, falls im geschlossenen Gefäß weiterhydriert wird, bis zum Ende der Wasserstoffaufnahme fort. Nach Abfiltrieren des Katalysators konzentriert man die Lösung i. Vak. und filtriert über eine kleine IR 120 (H^+)-Säule. Das saure Eluat wird wiederum i. Vak. eingengt und auf eine Dowex 1 X-8 (Formiat)-Säule (2.0×20 cm) gegeben. Man eluiert mit Wasser und sammelt 8-ccm-Fractionen. Ninhydrin- und phosphatpositive Fractionen (4–14) werden vereinigt und gefriergetrocknet. Rohausb. 885 mg (68 % d. Th.) farbloses, amorphes Pulver. Zur Kristallisation wird in sehr wenig Wasser aufgenommen, vorsichtig mit 50-proz. Methanol versetzt und unter leichtem Erwärmen absol. Methanol zugefügt. Ausb. 800 mg (61 % d. Th.) vom Schmp. 157–158° (Zers.). Nach zweimaligem Umkristallisieren bleibt die spezifische Drehung konstant. $[\alpha]_D^{20}$: +79.0° (in H_2O , $c = 0.25$). Mutarotation wurde nicht beobachtet. Farblose Nadeln vom Schmp. 164–166°.

$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{NO}_8\text{P}$ (259.2) Ber. C 27.80 H 5.45 N 5.41 P 11.95

Gef. C 27.89 H 5.34 N 5.48 P 11.51

Löslich in Wasser und Formamid; unlöslich in Dimethylformamid, Dioxan, Tetrahydrofuran und den meisten organischen Lösungsmitteln.

Die Substanz war chromatographisch einheitlich im Lösungsmittel I, $R_{\text{Glucosamin}}$ 0.38, und ninhydrin-, anilinoxalat- und phosphatpositiv.

4,6-Benzyliden-benzyl- α -D-glucosaminid-3-O-phosphat (IV): 1.00 g (1.69 mMol) *II* werden in 50-proz. Methanol gelöst und in Gegenwart von 0.5 g Palladium auf Kohle (10 % Pd) mit strömendem Wasserstoff hydriert. Der pH-Wert darf 7.5 nicht überschreiten und ist gegebenenfalls mit Ameisensäure zu korrigieren. Nach Beendigung der CO_2 -Entwicklung und Abfiltrieren des Katalysators wird auf ungefähr 5 ccm i. Vak. eingengt, wobei schon Kristallisation auftritt.

Die Suspension wird mit 2 *n* Essigsäure angesäuert und nach mehrstündigem Aufbewahren im Kühlschrank filtriert. Rohausb. 628 mg (85 % d. Th.) Stäbchen. Schmp. 212–213°. Nach Umkristallisieren aus Wasser und aus Dimethylformamid/Wasser wurde eine konstante Drehung erreicht. $[\alpha]_D^{20}$: +40.0° (in Dimethylformamid, $c = 0.25$), Schmp. 243°.

$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_8\text{P}$ (437.4) Ber. C 54.92 H 5.53 N 3.21 P 7.00

Gef. C 54.51 H 5.61 N 3.15 P 6.74

Löslich in Dimethylformamid, Tetrahydrofuran, Chloroform und Methanol, unlöslich in Wasser, Äther, Aceton und Äthylacetat.

2-Amino-2-desoxy-D-glucit-3-O-phosphat (VI): a) 2.00 g (3.37 mMol) *II* werden in 75 ccm Wasser suspendiert, 4 g Palladium auf Kohle (10 % Pd) hinzugefügt und 24 Stdn. bei Raumtemperatur und 130 at im Autoklaven hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert und das

Filtrat i. Vak. eingengt. Die Substanz ist ninhydrin- und phosphatpositiv, anilinoxalatnegativ und chromatographisch einheitlich. Die Lösung wird zum Entfernen der Kationen über eine kleine Säule mit IR 120 (H^{\oplus}) filtriert. Das saure Eluat wird wiederum i. Vak. eingedampft, auf eine Säule von 2 cm \varnothing und 20 cm Länge gebracht und mit Wasser eluiert. Fraktionen von 8 ccm werden aufgefangen, die ninhydrin- und phosphatpositiven Fraktionen (10–36) vereinigt und i. Vak. eingedampft, die letzten 10 ccm gefriergetrocknet. Rohausb. 711 mg (81 % d. Th.).

Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Wasser/Dimethylformamid sind Drehung und Schmelzpunkt konstant. $[\alpha]_D^{25}$: -20.5° (in H_2O , $c = 0.25$). Feine Nadeln vom Schmp. 193 bis 195° .

$C_6H_{16}NO_8P$ (261.2) Ber. C 27.59 H 6.18 N 5.37 P 11.86

Gef. C 27.84 H 5.90 N 5.34 P 11.68

Die Substanz ist löslich in Wasser und Formamid, unlöslich in Dioxan, Dimethylformamid, Tetrahydrofuran und den meisten organischen Lösungsmitteln. Sie besitzt keine reduzierenden Eigenschaften. $R_{\text{Glucosamin}}$ im Lösungsmittel I: 0.30.

b) 100 mg *V* werden in 10 ccm Wasser gelöst und tropfenweise innerhalb von 30 Min. unter Rühren und Eiskühlung mit einer Lösung von 100 mg *Natriumborhydrid* in 5 ccm Wasser versetzt. Nach 2stdg. Aufbewahren bei Raumtemperatur wird das überschüssige Natriumborhydrid durch Ansäuern mit wenig konz. Salzsäure zersetzt. Zum Entfernen der Na^{\oplus} -Ionen gibt man die Lösung durch eine kleine IR 120 (H^{\oplus})-Säule. Nach dem Einengen auf 2–5 ccm i. Vak. filtriert man von sich ausscheidender Borsäure ab und fraktioniert die Lösung über eine Dowex-Säule, wie unter a) beschrieben. Ninhydrin- und phosphatpositive Fraktionen werden vereinigt und gefriergetrocknet. Man erhält so 195 mg eines noch stark borsäurehaltigen Materials. Es wird in wenig warmem Wasser gelöst, die Lösung abgekühlt und von auskristallisierter Borsäure abfiltriert. Das Filtrat wird mit der zweifachen Menge Dimethylformamid versetzt, worauf sich Kristalle abscheiden, die nochmals auf dieselbe Weise umkristallisiert werden. Ausb. 26 mg Nadeln, die sich durch Vergleich der Schmelzpunkte, der Infrarotspektren, der optischen Drehung und nach ihrem chromatographischen Verhalten als identisch mit *VI* erwiesen. Aus den Mutterlaugen konnte weiteres Material erhalten werden.