

ZUM MECHANISMUS DER TRANSGLYKOSIDIERUNG
VON GLYKOSYLAMINEN UND UNTERSUCHUNGEN
ZUR MUTAROTATION

H. SIMON UND G. PHILIPP

Chemisches Institut der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau Weihenstephan, Technische Hochschule München (Deutschland)*

(Eingegangen den 7. März, 1968)

ABSTRACT

Under different conditions, the rates of transglucosylation of *N-p*-tolyl-D-glucopyranosylamine (**1a**) and *N-p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranosylamine (**1b**) were measured with labelled *p*-toluidine and labelled *p*-nitroaniline, respectively. Some possible mechanisms can be excluded. Depending on the acid concentration, the reaction shows a distinct rate maximum which is different for **1a** and **1b**. The acid catalysis is specific. Under most conditions, the mutarotation is faster. General acid catalysis has little influence. In contrast to the transglucosylation, the mutarotation is catalyzed by bases. The Schiff's bases **12** and **13** exchange the amines much faster than do glucosylamines; the rate for 4,6-*O*-benzylidene-*N-p*-tolyl-D-glucosylamine (**11**) is intermediate.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Geschwindigkeit der Transglucosidierung von *N-p*-Tolyl-D-glucopyranosylamin (**1a**) wurde mit radioaktiv markiertem *p*-Toluidin und die von *N-p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosylamin (**1b**) mit markiertem *p*-Nitranilin unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Es werden einige mögliche Mechanismen ausgeschlossen. Die Reaktion ist spezifisch säurekatalysiert und zeigt in Abhängigkeit von der Säurekonzentration ein ausgeprägtes Geschwindigkeits-Maximum, das für **1a** und **1b** verschieden ist. Die ebenfalls unter Transglucosidierungsbedingungen gemessene Mutarotation ist meist wesentlich rascher, die allgemeine Säurekatalyse spielt nur eine geringe Rolle. Sie ist im Gegensatz zur Transglucosidierung auch alkalisch katalysierbar. Die Schiffschen Basen **12** und **13** zeigen einen viel rascheren Amin-austausch als obige Glucosylamine. 4,6-*O*-Benzyliden-*N-p*-tolyl-D-glucosylamin (**11**) nimmt eine Mittelstellung ein.

EINLEITUNG

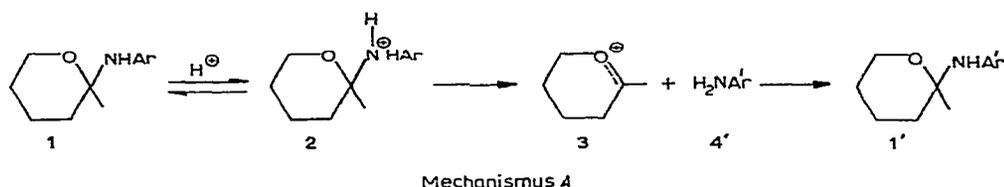
In der Literatur wurde die Übertragung des Glykosidrestes eines Glykosylamins auf ein freies Amin (Gleichung 1) unter präparativen¹⁻⁴, mechanistischen⁴ und

*Postanschrift : D 8050 Freising-Weihenstephan.

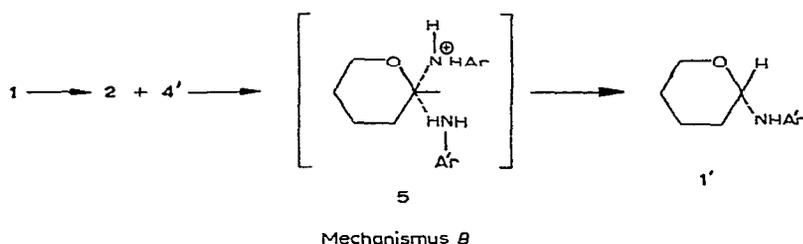
biochemischen⁵ Gesichtspunkten beschrieben. Von Bognár und Nánási⁴ wurden darüber hinaus die durch Gleichung (2) und (3) wiedergegebenen Reaktionstypen beschrieben (G = Glykosylrest, H_2NAr = aromatisches Amin). Kinetische Daten



sind unseres Wissens nicht bekannt und über den Mechanismus wurden bisher nur von Bognár und Nánási⁴ Angaben gemacht. Danach soll sich aus dem Glykosylamin **1** ein Glykosylaminkation **2** und daraus ein Carboniumion **3** bilden, das dann mit dem freien Amin reagiert (Mechanismus *A*).

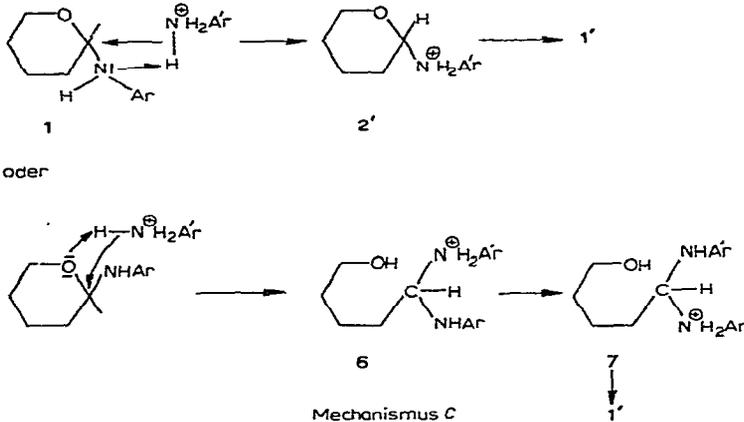


Bei den Reaktionstypen (2) und (3) sollen protonisierte Spezies über intermediär gebildete mesomere Carboniumionen Aminmoleküle miteinander austauschen⁴. Nach unseren Untersuchungen zur Hydrolyse von Glykosylaminen⁶ interessierten wir uns aus mechanistischen und präparativen Gründen für die Transglykosidierung des Typs (1) und (2). Neben dem Reaktionsablauf nach Bognár und Nánási⁴ sind noch folgende Mechanismen denkbar. Das am Stickstoff protonisierte Glykosylamin **2** wird in einer S_N2 -Reaktion von freiem Amin mit Übergangszustand **5** verdrängt (Mechanismus *B*).

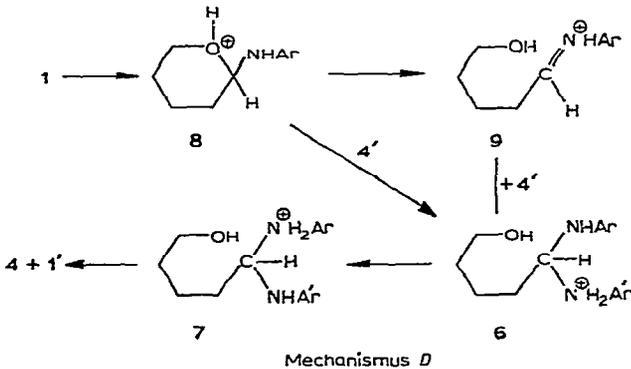


Ein cyclischer Elektronenübergang könnte direkt über **2'** zu **1'** führen. Weiterhin könnte in einer Art S_{Ni} -Reaktion **1** ein protonisiertes Amin unter Ringöffnung zu einem Bis-*N*-acetal **6** addieren, das sodann nach Umprotonierung zu **7** unter Amin und Protonabspaltung zu **1'** cyclisiert. (Mechanismus *C*).

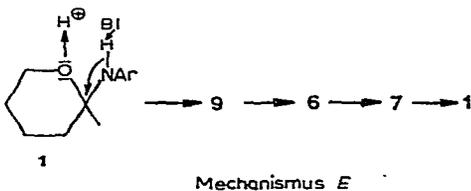
In Analogie zur Hydrolyse von Glykosylaminen könnte zunächst der Ringsauerstoff zu **8** protoniert werden. Anschließende Ringöffnung ergibt die Schiffsche



Base 9, die das freie Amin unter Bildung von 6 addiert, das wie oben angegeben über 7 in 1' übergeht. Auch ein direkter Übergang 8 → 6 wäre möglich (Mechanismus D).



Schließlich könnte eine Säure-Base-Katalyse eine Rolle spielen. Dabei würde in einem intermolekularen Schritt der Ring unter Bildung einer Schiffischen Base geöffnet, die dann wie unter Mechanismus D weiter reagieren kann (Mechanismus E).



Es sollte möglich sein, einige dieser Mechanismen auszuschließen, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit (RG) der Transglykosidierung in Abhängigkeit von der Säurekonzentration, bei konstantem pH in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration, sowie im Vergleich mit der Mutarotation kinetisch untersucht würde. Weiterhin wäre von Interesse, die Austauschgeschwindigkeit von Schiffischen Basen im Vergleich

zu Glykosylaminen zu kennen. Sollten erstere langsamer reagieren als letztere, könnten die Mechanismen *D* und *E* ausgeschlossen werden.

ZUR METHODIK

Eine relativ einfache Versuchsanordnung ergibt sich durch Austauschreaktionen, bei denen das gebundene und freie Amin chemisch gleich sind, jedoch aufgrund von Isotopenmarkierung unterschieden werden können. Daher wurde *N-p*-Tolyl- β -D-glucopyranosylamin (**1a**) mit Tritium-markiertem *p*-Toluidin (**4a**) und *N-p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosylamin (**1b**) mit Tritium-markiertem *p*-Nitranilin (**4b**) umgesetzt. Bei der Untersuchung von **1a** wurde **4a** in Form des Hydrochlorids isoliert und analysiert. Im Falle von **1b** wurde entweder **1b** (Zunahme der Radioaktivität von Null bis zur Gleichverteilung) oder **4b** (Verminderung der ursprünglichen Radioaktivität bis zur Gleichverteilung) wieder isoliert.

Die RG-Konstanten wurden rechnerisch oder graphisch bestimmt. Zur rechnerischen Ermittlung wurde die Gleichung

$$-\ln\left(1 - \frac{X_t}{X_\infty}\right) = 2akt$$

verwendet. Dabei bedeuten: X_t = die molare Radioaktivität des Glucosylamins zur Zeit t , falls zur Zeit Null nur das freie Amin markiert war; X_∞ = die molare Radioaktivität des Glucosylamins bzw. Amins nach der Gleichverteilung; a = die Konzentration des Amins bzw. Glucosylamins; und k = RG-Konstante.

Da im vorliegenden Fall stets mit äquimolaren Lösungen gearbeitet wurde, ist $X_\infty = A_0/2$, wenn A_0 die molare Ausgangsaktivität des Amins darstellt. Für den Zusammenhang zwischen RG-Konstante und Halbwertszeit gilt: $t_{0,5} = (1n2/2ak)$. Bei den Experimenten, bei denen das eingesetzte markierte Amin nach der Reaktionszeit t isoliert worden war, wurde aus dessen Radioaktivität die molare Radioaktivität des Glucosylamins errechnet. Zur graphischen Ermittlung der Halbwertszeit wurde $\log(100 - \% \text{ Austausch})$ gegen die Zeit aufgetragen. Aus den sich ergebenden Geraden (vgl. Abb. 1) wurde die Halbwertszeit bestimmt. Für den prozentualen Austausch gilt für den Fall, daß das freie Amin markiert ist und das Amin isoliert wird: $\% \text{ Austausch} = 100 (A_0 - A_t)/A_\infty$. Dabei bedeuten A_0 , A_t und A_∞ die spezifischen Radioaktivitäten des Amins zur Zeit 0, zur Zeit t und nach Gleichverteilung. Falls das freie Amin markiert ist und das Glucosylamin isoliert wird, gilt: $\% \text{ Austausch} = 100 X_t/(A_0 - X_\infty)$. (Bedeutung der Symbole siehe oben.)

Eine besondere Schwierigkeit ergab sich daraus, daß nicht in Wasser oder wasserhaltigen Medien gearbeitet werden konnte, da die Hydrolyse z.T. von vergleichbarer Geschwindigkeit wie die Transglykosidierung verläuft und außerdem die RG in 95proz. und wasserfreiem Äthanol bei gleicher Säurekonzentration stark unterschiedlich ist. Die Alkoholyse von **1a** und **1b** war vernachlässigbar. Wie sich herausstellte, ist die Mutarotation von **1a** nur bei schwach saurem pH und bei einer höheren Konzentration von **1a** und **4a**, wie üblicher Weise verwendet, langsamer als

die Transglucosidierung. Daher wurde, von einer Ausnahme abgesehen, nur die β -Form der D-Glykosylamine eingesetzt. Über Kontrollversuche, Aufarbeitungsbedingungen etc. siehe Beschreibung der Versuche.

ERGEBNISSE

Abhängigkeit der RG von der Konzentration. — In Abb. 1 ist die Abhängigkeit der Austauschgeschwindigkeit von **1b** bei äquimolaren Konzentrationen von **1b** und **4b** dargestellt und in Abb. 2 die Abhängigkeit der Halbwertszeit von der reziproken Konzentration. Es zeigt sich ein linearer Verlauf, d.h. die Reaktion ist erster Ordnung in bezug auf Glucosid und Amin.

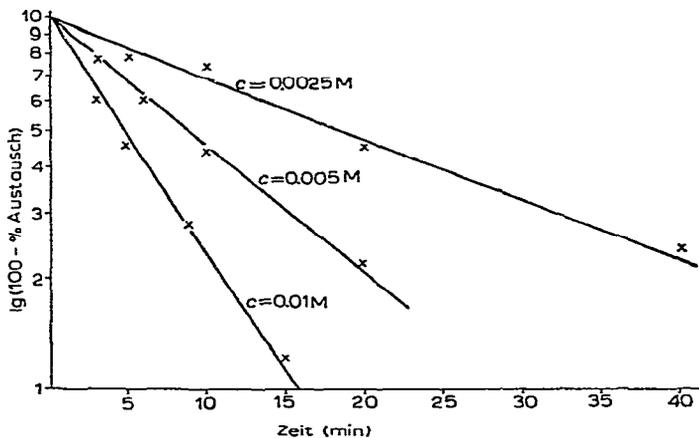


Abb. 1. Austauschgeschwindigkeit von *N-p*-Nitrophenyl-D-glucopyranosylamin mit Nitranilin-*r* bei verschiedenen äquimolaren Konzentrationen der Reaktionspartner in 0.1N äthanolischer Salzsäure bei 0.2°.

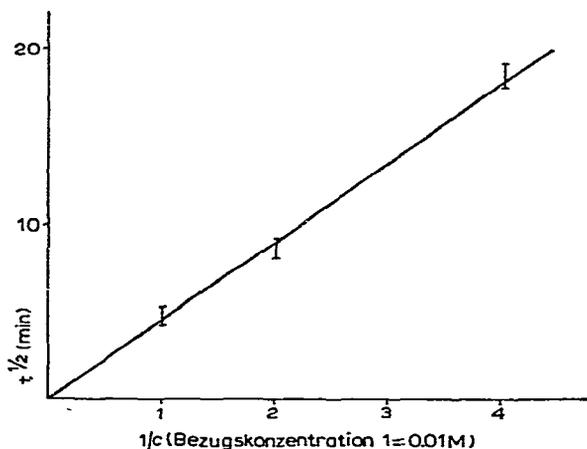


Abb. 2. Abhängigkeit der Halbwertszeit des Austauschs zwischen *N-p*-Nitrophenyl-D-glucopyranosylamin und Nitranilin-*r* von der reziproken Konzentration. Bedingungen wie bei Abb. 1 angegeben.

Abhängigkeit der RG von der Säurekonzentration. — In Abb. 3 ist der Logarithmus der RG-Konstanten der Transglucosidierung (2. Ordnung) von **1a** und **1b** in Abhängigkeit vom negativen Logarithmus der Chlorwasserstoffkonzentration in absolutem Äthanol dargestellt. Für **1a** liegt das RG-Maximum nach dieser Art der Wiedergabe bei *ca.* 0.005N HCl und für **1b** zwischen 0 und 1. Das scharfe Maximum von **1a** kommt daher, daß durch das *p*-Toluidin die freie HCl-Konzentration unter 0.01M wesentlich geringer ist, als angegeben. Berechnet man die Konzentration des freien Chlorwasserstoffs, wie er bei den Verhältnissen in Wasser vorliegen würde und trägt diese Werte auf die Abszisse auf, so ergibt sich die mit ⊗ gekennzeichnete Kurve, d.h. das Maximum liegt bei einer Säurekonzentration von 10^{-4} bis 10^{-5} . In den Tab. I und II sind die Halbwertszeiten der Transglucosidierung unter dem

TABELLE I

ABHÄNGIGKEIT DER RG DER TRANSGLYKOSIDIERUNG VON *N-p*-TOLYL- β -D-GLUCOPYRANOSYLAMIN (**1a**) VON VERSCHIEDENEN SÄUREN UND KONZENTRATIONEN IN ABSOLUTEM ÄTHANOL. KONZENTRATION VON **1a** UND **4a** JE 0.01M TEMP. $0.2 \pm 0.1^\circ$.

Katalysator	Konzentration (N)	Halbwertszeit (Min)
HCl	2	708 \pm 65
HCl	1	624 \pm 60
HCl	0.1	504 \pm 50
HCl	0.01	29.7 \pm 3
HCl	0.005	8.5 \pm 0.9
HCl	0.004	10.0 \pm 1.0
HCl	0.001	43 \pm 4
HCl	0.0001	720 \pm 60
Benzoessäure	0.01	228 \pm 18
<i>m</i> -Chlorbenzoessäure	0.01	100 \pm 10
<i>m</i> -Nitrobenzoessäure	0.01	38.5 \pm 3
<i>p</i> -Nitrobenzoessäure	0.01	38.5 \pm 3

TABELLE II

ABHÄNGIGKEIT DER RG DER TRANSGLYKOSIDIERUNG VON *N-p*-NITROPHENYL- β -D-GLUCOPYRANOSYLAMIN (**1b**) BEI VERSCHIEDENEN ÄQUIMOLAREN KONZENTRATIONEN VON **1b** UND **4b** UND VERSCHIEDENEN SÄUREN UND KONZENTRATIONEN IN ABSOLUTEM ÄTHANOL. TEMP. $0.2 \pm 0.1^\circ$

Molare Konzentration der Reaktionspartner	Katalysator Konzentration (N)	Halbwertszeit (Min)
0.005	2 HCl	10.8 \pm 1
0.005	1 HCl	9.2 \pm 0.9
0.01	0.1 HCl	4.7 \pm 0.5
0.005	0.1 HCl	8.3 \pm 0.8
0.0025	0.1 HCl	18.5 \pm 1.6
0.005	0.01 HCl	47.5 \pm 4
0.005	0.001 HCl	960 \pm 80
0.005	kein	kein Austausch nach 7 Stdn.
0.005	0.1 Essigsäure	kein Austausch nach 5 Stdn.
0.005	1 Essigsäure	kein Austausch nach 50 Stdn.

Einfluß einiger anderer Säuren im Vergleich mit Chlorwasserstoff bei verschiedenen Konzentrationen und bei **1b** auch in Abhängigkeit von der Eigenkonzentration wiedergegeben.

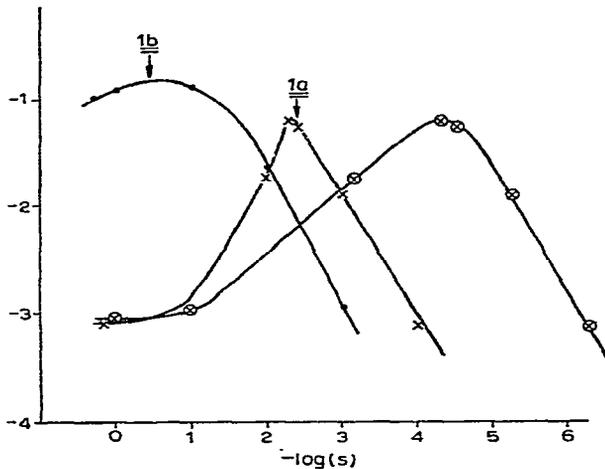


Abb. 3. Logarithmus der RG-Konstanten (2. Ordnung) der Transglucosidierung von **1a** und **1b** in Gegenwart äquimolarer Konzentration von **4a** bzw. **4b** in Abhängigkeit vom negativen Logarithmus der Chlorwasserstoffkonzentration in absolutem Äthanol bei 0.2°. Die mit \otimes gezeichnete Kurve ergibt sich für **1a** unter Berücksichtigung der freien HCl-Konzentration (vgl. Text).

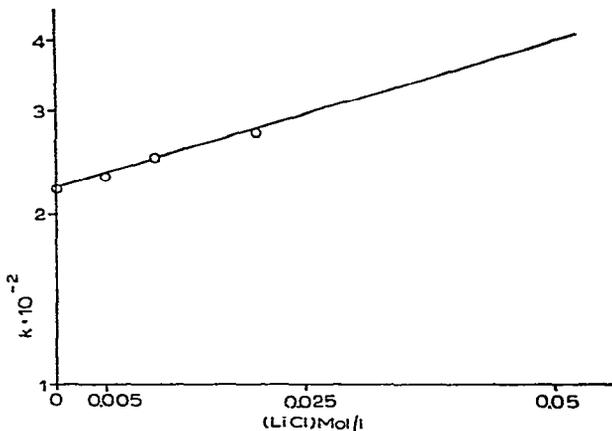


Abb. 4. Abhängigkeit der RG der Transglucosidierung von steigenden Mengen Lithiumchlorid bei konstanter Pufferkonzentration (Essigsäure 0.1M, Natriumacetat 0.05M) in Äthanol. Die Extrapolation bis 0.05M Lithiumchlorid zeigt, welche Wirkung dem Puffer aufgrund seiner Ionenstärke zukommt.

Art der Säurekatalyse und Temperaturabhängigkeit der Transglykosidierung. — Wie Abb. 4 zeigt, ist die Ionenstärke auf die RG von Einfluß. Die Pufferkonzentration konnte aber nur über einen kleinen Bereich variiert werden, da in absolutem

Äthanol nur wenig Lithiumchlorid löslich ist. Tab. III zeigt, daß bei konstanter Ionenstärke die RG bei verschiedenen Pufferkonzentrationen konstant ist. Diese Befunde, zusammen mit der Tatsache, daß der α -Wert der logarithmischen Bronsted-Gleichung sehr nahe 1 ist, zeigt, daß es sich bei der Reaktion um spezifische Säurekatalyse handelt.

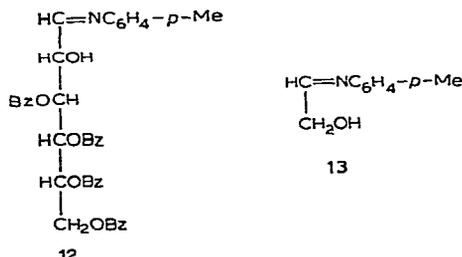
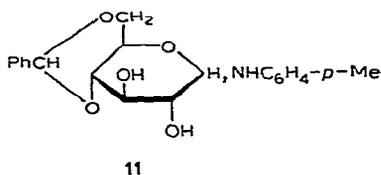
TABELLE III

RG DER TRANSGLYKOSIDIERUNG VON **1a** IN WASSERFREIEM ÄTHANOL IN 0.01M LÖSUNG BEI 20.0° BEI VERSCHIEDENEN PUFFERKONZENTRATIONEN UND KONSTANTER IONENSTÄRKE

Essigsäure	Natriumacetat	Lithiumchlorid	Ionenstärke	$k \cdot 10^2$ sec
0.08	0.040	0.010	0.050	1.86
0.06	0.030	0.020	0.050	1.98
0.04	0.020	0.030	0.050	1.86

Die Messungen bei 0; 11.4; 15.0 und 20.0° in einem Puffer Essigsäure 0.1M und Natriumacetat 0.05M ergaben RG-Konstanten von 4.81; 13.4; 18.6 und 22.8×10^{-3} Konz. $^{-1}$ sec $^{-1}$. Daraus berechnet sich eine Aktivierungsenergie von 12.8 \pm 1.3 kcal/Mol. Die Aktivierungsentropie beträgt $-5.3 \pm \frac{9.7}{4.4}$ (cal/Grad.Mol).

Vergleich der Austauschgeschwindigkeit von Glykosylaminen und entsprechenden Schiffischen Basen. — Die Halbwertszeiten des Austauschs für **1a**, 4,6-*O*-Benzyliden-*N*-*p*-tolyl-D-glucosylamin (**11**), und die Schiffischen Basen **12** und **13** in *p*-Dioxan-



Äthanol (1:1, v/v) sind in Tab. IV wiedergegeben. Es ist anzunehmen, daß der Anteil der Schiffischen Base an **11** bereits wesentlich höher ist als bei **1a**. Entsprechende

TABELLE IV

HALBWERTSZEITEN DES AMINAUSTAUSCHS IN *p*-DIOXAN-ÄTHANOL (1:1, v/v). SALZSÄUREKONZENTRATION 0.1M, KONZENTRATION DER REAKTIONSPARTNER 0.05M. TEMP. 0.2°

Verbindung	Halbwertszeit (Min)
<i>N</i> - <i>p</i> -Tolyl- β -D-glucopyranosylamin (1a)	108
4,6- <i>O</i> -Benzyliden- <i>N</i> - <i>p</i> -tolyl-D-glucosylamin (11)	4
Schiff'sche Base 12	\sim 0.5
Schiff'sche Base 13	sehr rasch

Kontrollversuche zeigten, daß **12** und insbesondere **13** bereits unter den alkalischen Aufarbeitungsbedingungen Austausch zeigen.

Zur Gleichgewichtslage bei Transglykosidierungen. — Da bei der Transglykosidierung das glykosidisch gebundene und freie Amin im allgemeinen chemisch verschieden sind, erhebt sich die Frage nach der Gleichgewichtslage. Wir untersuchten daher die Reaktion $1a + 4b \rightleftharpoons 1b + 4a$ in 0.01M Lösung der Reaktionspartner in 0.1N und 1.0N äthanolischer Salzsäure von beiden Seiten. In 0.01N HCl ergab sich sowohl ausgehend von **1a** wie ausgehend von **1b** eine Gleichgewichtskonstante von 81 und in nHCl eine Konstante von 2,400. Das *N*-Glucosyl-Derivat mit der schwächeren Base ist unter diesen Bedingungen stabiler.

Das Gleichgewicht stellte sich in 0.01N HCl bei 0.2° in 1–2 Stdn. ein und in n HCl in ca. 6 Stdn.

Versuche, aus **1a** und *N*-Methyl-*p*-nitranilin durch Transglykosidierung *N*-Methyl-*p*-nitrophenyl-glucopyranosylamin darzustellen, waren unter den im Versuchsteil angegebenen Bedingungen nicht erfolgreich. Die Methode ist offensichtlich nicht universell.

Zur Frage der Transglykosidierung des Typs 2. — Die Transglykosidierung vom Typ 2 mit **1b** (0.01M) und markierter D-Glucose (0.01M) in wasserfreiem Äthanol ergab, daß die Reaktion bei 0° und 0.01N HCl nach 49 Stdn. nicht oder weniger als zu 0.02% abgelaufen war. Wir halten es für zweifelhaft, ob die Reaktion überhaupt abläuft. Unter den von Bognár und Nánási⁴ angegebenen Bedingungen (Siedehitze und Verwendung von Glycosylaminen, die rasch Amadori-Umlagerung ergeben, und dann unter Wasserabspaltung weiter reagieren) kann selbst bei ursprünglich wasserfreiem Arbeiten genügend Wasser für eine Hydrolyse entstehen. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß sich Glykosylamine von sekundären schwachen Aminen sehr schwer bilden. So ist es uns nach den üblichen Darstellungsmethoden für **1a** oder **1b** und wesentlich drastischeren Bedingungen (vgl. Beschreibung der Versuche) nicht gelungen, die *N*-Glucosyl-Derivate von *N*-Methyl-*p*-nitranilin oder *N*-Methyl-*p*-toluidin darzustellen. Da zur Transglykosidierung nach Typ 2 ebenfalls ein sekundäres Amin von einem freien Zucker angegriffen werden müßte, spricht auch diese Erfahrung mit den *N*-Methylderivaten von *p*-Toluidin und *p*-Nitranilin gegen diese Reaktion.

Bestimmung der Mutarotationsgeschwindigkeit, Art der Säurekatalyse unter Transglucosidierungsbedingungen und Vergleich mit der Geschwindigkeit der Transglucosidierung. — Da Messungen der Mutarotation von **1a** unter den Bedingungen der Transglucosidierung nicht bekannt sind, bestimmten wir die RG unter verschiedenen Bedingungen. Die Ergebnisse sind in Tab. V wiedergegeben.

Auch für die Mutarotation untersuchten wir die Art der Säurekatalyse. Die Ergebnisse mit einer Reihe von Phenol- und Benzoesäurederivaten sind in Tab. VI zusammengestellt. Das Bronsted-Diagramm (Abb. 5), in dem der log der RG gegen die log der K_a -Werte der Säuren aufgetragen ist, ergibt eine Steigung α von 0.98 \pm 0.02, was zeigt, daß die allgemeine Säurekatalyse nur eine untergeordnete Rolle spielt.

TABELLE V

HALBWEITZZEIT DER MUTAROTATION VON *N-p*-TOLYL-D-GLUCOPYRANOSYLAMIN (0.0371M) UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN (VERSUCHE NR. 1-15 MIT α -FORM, VERSUCHE 16-18 MIT β -FORM)

Vers. Nr.	Lösungsmittel	Temp. (°)	Katalysator und Bedingungen	Halbwertszeit (Min) und Bemerkungen
1	Methanol	25.0	—	keine Veränderung nach 3 Stdn.
2	Methanol-Wasser (1:1)	25.0	—	99
3	Methanol-Wasser (1:1)	25.0	Wasser wurde von gelbstem CO ₂ befreit	160
4	Methanol	25.0	CH ₃ COOH/CH ₃ COONa = 1:1, 0.04M	14
5	Methanol-Wasser (1:1)	0.2	CH ₃ COOH/CH ₃ COONa = 1:1, 0.04M	~1
6	Methanol	-10.0	HCl 0.005N	<0.2
7	Methanol	-20.0	HCl 0.005N	<0.2
8	Methanol	20.0	HCl 0.0005N	92
9	Methanol	-20.0	HCl 0.5N	sehr schnell
10	Methanol	-20.0	HCl 8N	sehr schnell
11	Methanol	25.0	CH ₃ COONa 0.08M	1930
12	Methanol	23.5	CH ₃ COOH/CH ₃ COONa = 1:1, 0.04M	11.2 ^a
13	Methanol	23.5	CH ₃ COOH/CH ₃ COONa = 1:1, 0.04M und <i>p</i> -Toluidin ^b	10.5 ^a
14	Methanol	23.5	CH ₃ COOH/CH ₃ COONa 1:1, 0.08M	6.8
15	Methanol	23.5	CH ₃ COOH/CH ₃ COONa = 1:1, 0.08M und <i>p</i> -Toluidin ^b	6.5
16	Methanol	20.0	NaOH 0.01N	2400
17	Methanol	20.0	NaOH 0.1N	200
18	Methanol	20.0	NaOH 1N	20

^aUnter diesen Bedingungen ist die Halbwertszeit der Transglucosidierung für die α -Verbindung 5.9 \pm 0.4 Min. und für die β -Verbindung 13.3 \pm 1.8 Min.
^b0.0371M.

TABELLE VI

MUTAROTATION VON *N-p*-TOLYL- β -D-GLUCOPYRANOSYLAMIN IN WASSERFREIEM METHANOL BEI 20.0° UNTER DEM EINFLUSS VERSCHIEDENER SÄUREN. KONZENTRATION=1.00%

Katalysator	Konzentration (M)	Halbwertszeit (Min)
Benzoessäure	5.0×10^{-4}	9.75; 9.90; 9.60
Benzoessäure	5.0×10^{-3}	0.91; 0.92
<i>p</i> -Chlorbenzoessäure	5.0×10^{-4}	3.75; 3.87; 3.81
<i>m</i> -Nitrobenzoessäure	5.0×10^{-4}	1.0; 1.0; 1.0
<i>p</i> -Nitrobenzoessäure	5.0×10^{-4}	0.87; 0.85; 0.86
Phenol	5.0×10^{-2}	1020
<i>m</i> -Nitrophenol	5.0×10^{-2}	44
<i>m</i> -Nitrophenol	5.0×10^{-3}	500
<i>p</i> -Nitrophenol	5.0×10^{-3}	77.2; 68.0
2,4-Dinitrophenol	5.0×10^{-4}	0.325; 0.325

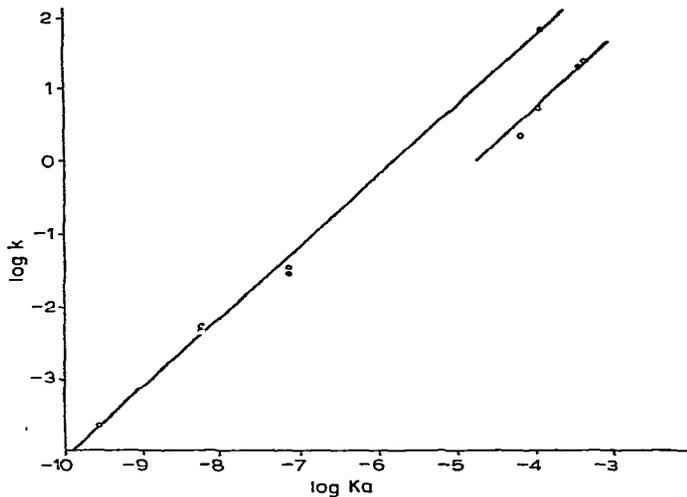


Abb. 5. Abhängigkeit des Logarithmus der RG der Mutarotation von *N-p*-Tolyl- β -D-glucopyranosylamin in 1-prozentiger methanolischer Lösung bei 20° von den Logarithmen der Dissoziationskonstanten verschiedener Phenole und Benzoessäuren. Obere Gerade von links unten nach rechts oben: Phenol, *m*-Nitrophenol, *p*-Nitrophenol, 2,4-Dinitrophenol. Untere (kurze) Gerade von links unten nach rechts oben: Benzoessäure, *p*-Chlorbenzoessäure, *m*-Nitrobenzoessäure, *p*-Nitrobenzoessäure.

DISKUSSION

Die von Bognár und Nánási⁴ angegebene Reaktionsfolge entspricht einem S_N1-Mechanismus. Die Austauschgeschwindigkeit sollte daher nullter Ordnung in bezug auf freies Amin sein. Wie die Abb. 1 und 2 bzw. die Tab. II zeigen, ist die Transglucosidierung erster Ordnung in bezug auf das Glucosylamin und das freie Amin. Unabhängig davon wären bei einem Carboniumion als Zwischenstufe u.a. Solvolysprodukte zu erwarten, da nicht anzunehmen ist, daß das Carboniumion besonders selektiv ist. Das Äthanol weist eine ca. 1700fach höhere Konzentration auf.

Wie wir fanden, tritt bei **1a** unter Bedingungen, bei denen die Transglucosidierung eine Halbwertszeit zwischen 5 und 10 Min. hat, innerhalb von 3 bzw. 4 Stdn. keine meßbare (d.h. <2%) Solvolyse auf. Diese Befunde schließen den Mechanismus *A* aus.

Für eine S_N2-Reaktion (Mechanismus *B*) spricht die Konzentrationsabhängigkeit der Transglucosidierung. Auch die ausgeprägte Abhängigkeit der RG von der Säurekonzentration läßt sich erklären.

Für den S_N2-Mechanismus sollte für die RG gelten:

$$RG = k[\text{GNH}_2^+\text{Ar}] [\text{H}_2\text{NAr}]$$

Da jedoch die glucosidisch gebundenen Anilinderivate um *ca.* 4 p_K-Einheiten schwächere Basen sind, als die entsprechenden freien Anilinderivate⁷, durchläuft die RG in Abhängigkeit von der Säurekonzentration ein Maximum, das bei einem p_H-Wert zwischen dem p_K-Wert des freien Amins und des Glucosylamins liegen sollte. Dies wäre, falls man die für Wasser gültigen p_K-Werte heranzieht, für **1a** bei einer Säurekonzentration von 10⁻³ und für **1b** von 10¹ zu erwarten. Die beobachteten Werte liegen bei Konzentrationen, die 1–2 Größenordnungen tiefer liegen. Da diese Messungen in Äthanol durchgeführt wurden, wurde eine quantitative Beziehung nicht aufgestellt.

Sollte der S_N2-Mechanismus gültig sein, so sollte die Reaktion mit einer Konfigurationsumkehr an C-1 verbunden sein, d.h. daß die Mutarotation z.B. von **1a** in Gegenwart von freiem *p*-Toluidin erhöht ist. Eine entsprechende Untersuchung ist jedoch nur unter Bedingungen möglich, bei denen die RG der Mutarotation geringer oder vergleichbar mit der der Transglucosidierung ist. Ein Vergleich der Versuche 12 und 13 bzw. 14 und 15 in Tab. V zeigt, daß die RG der Mutarotation von **1a** in der α-Form durch freies Amin nicht signifikant erhöht wird, wie es zu erwarten wäre, wenn die Transglucosidierung, die unter diesen Bedingungen eine Halbwertszeit von 5.9 ± 0.4 Min. hat, unter Konfigurationsumkehr erfolgen würde. Man muß aus diesen Versuchen weiter folgern, daß bei der Transglucosidierung von α-**1a** ausschließlich oder stark bevorzugt wieder α-D-Glycosylamin entsteht. Sonst müßte, wegen der unter diesen Verhältnissen rascheren Transglucosidierung, die Mutarotation doch scheinbar rascher gehen. Die Halbwertszeit ist für die β-Form von **1a** unter diesen Bedingungen *ca.* 3mal länger als für die α-Form.

Der von **1** über **2'** zu **1'** führende Weg des Mechanismus *C* ist mit den Ergebnissen der Mutarotation der α-Form von **1a** mit und ohne *p*-Toluidinzusatz gut verständlich. Der Austausch würde unter Konfigurationserhalt erfolgen. Auch die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Säurekonzentration steht damit in Einklang. Das Maximum der RG sollte bei einer Säurekonzentration liegen, bei der das freie Amin vollkommen protonisiert ist, ohne daß Protonisierung am Glycosylamin erfolgt wäre. Bei einem p_H-Wert, der absolut um eine Einheit kleiner ist als der p_K-Wert, ist das freie Amin fast völlig protonisiert und das Glycosylamin jedoch erst in Spuren⁷. Allerdings wäre für diesen Mechanismus für die stark eingegengte Bewegungsfreiheit zwischen den Reaktionspartnern im Übergangszustand eine höhere negative Aktivierungsentropie als –5 bis –10 (cal/Mol. Grad) zu erwarten.

Der über 6 und 7 verlaufende Weg könnte unter Bedingungen eine Rolle spielen bei denen die Mutarotation rascher verläuft als die Transglykosidierung (vgl. hierzu auch das zum Mechanismus *D* Gesagte).

Mechanismus *E* kann aufgrund der gefundenen spezifischen Säurekatalyse für die Transglucosidierung keine wesentliche Rolle spielen. Es wurde im System Methanol Essigsäure-Natriumacetat keine Abhängigkeit der RG von der Pufferkonzentration gefunden. Für die Mutarotation ist dieser Mechanismus jedoch wahrscheinlich, da die Mutarotation auch alkalisch zu katalysieren ist (Tab. V, Vers. 16–18) und die Halbwertszeit bei Verdoppelung der Pufferkonzentration fast halbiert wird (Tab. V, Vers. 12 und 14).

Recht wahrscheinlich ist Mechanismus *D* für die p_H -Bereiche, in denen die Mutarotation sehr viel rascher erfolgt als die Transglucosidierung. Hier dürften die Übergänge $8 \rightarrow 9 \rightarrow 6$ oder $8 \rightarrow 6$ stattfinden. Die Schiffsche Base reagiert dann rasch nach einem Additions-Eliminierungsmechanismus. Die stark zunehmende Austauschgeschwindigkeit in der Reihe 1a, 11, 12 bzw. 13 zeigt, daß dieser letzte Schritt sehr rasch verläuft.

Die Substanz 11 reagiert deshalb rascher als 1a, da die ringoffene Form im Gleichgewicht gegenüber der Ringform relativ zu 1a bevorzugt sein dürfte. Bei 12 und 13 ist nur die Schiffsche Base möglich. Die p_H -Abhängigkeit ist wie folgt zu erklären. Die Mutarotation steigt mit zunehmender Säurekonzentration rasch an (Vers. 1–9, Tab. V) und nimmt auch bei hohen Konzentrationen nicht wieder ab (Vers. 10, Tab. V). D.h., daß der Übergang $8 \rightarrow 9$ mit zunehmender Säurekonzentration rascher wird. In dem Maße, wie das freie Amin protonisiert wird, ist jedoch eine Addition an die Schiffsche Base nicht mehr möglich. Damit nimmt zwar die Mutarotation mit zunehmender Säurekonzentration zu, die RG der Transglucosidierung wird jedoch nach Erreichen eines Maximums wieder geringer.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *Allgemeines.* — Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Zur Radioaktivitätsanalyse wurde *p*-Nitranilin oder sein Glucosid in Schöniger-Kolben⁸ verbrannt und die Lösungen in einem Flüssigkeits-Szintillations-Zähler Marke TRI CARB vermessen. Dazu wurden 5 ml der anfallenden 10 ml Absorptionslösung (4proz. Äthanolamin in Methanol) mit 15 ml einer Lösung von 4.0 g "Omni-fluor" der Firma New England Nuclear Chicago pro l Toluol vermischt. Das *p*-Toluidin wurde als Hydrochlorid in Mengen von 6–7 mg der obigen Mischung gelöst und gemessen. Häufig wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Mutarotationen wurden mit dem Polarimeter 141 der Firma Perkin-Elmer in thermostatisierten Küvetten vermessen und auf einem Schreiber aufgezeichnet. Bei Drehwerten $< 2^\circ$ war die Anzeige besser als $\pm 0.002^\circ$.

2. *Lösungsmittel.* — Käufliches wasserfreies, benzolvergälltes Äthanol wurde über Calciumhydrid unter Rückfluß gekocht und destilliert. Vor- und Nachlauf wurden verworfen. Methanol wurde über eine 1.5-m Kolonne destilliert, über

Magnesiumspänen unter Rückfluß erhitzt und sodann erneut destilliert. Die Reinigung von Dioxan erfolgte nach lit. cit.⁹. Die alkoholischen Salzsäuren wurden unter peinlichem Feuchtigkeitsausschluß durch Einleiten von HCl-Gas aus einer Stahlflasche in die wasserfreien Alkohole dargestellt.

3. *Darstellung der Verbindungen.* — *N-p*-Tolyl- β -D-glucopyranosylamin (**1a**) wurde nach Weygand¹⁰ und die α -Verbindung nach Ellis und Honeyman¹¹ gewonnen. Ersteres zeigte nach zweimaligem Umkristallisieren aus 96proz. Äthanol einen Schmp. von 133–134°; $[\alpha]_D^{20} -107.3^\circ$ (*c* 1, abs. Methanol). Bei der Darstellung der α -Verbindung wurde auf strikten Feuchtigkeitsausschluß geachtet. Im Gegensatz zu Befunden in lit. cit.¹¹ gelang es, die Verbindung aus wasserfreiem Äthanol umzukristallisieren. Schmp. 140°, $[\alpha]_D^{20} +210^\circ$ (*c* 1, abs. Methanol).

N-p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosylamin (**1b**) wurde nach Weygand und Mitarbb.¹² gewonnen. Nach Umkristallisieren aus Methanol und Trocknen bei 110° im Vakuum über P₂O₅. Schmp. 185–188°, $[\alpha]_D^{25} -164^\circ$ (*c* 1, abs. Methanol).

p-Nitranilin-*t* und *p*-Toluidin-*t* wurden nach lit. cit.⁶ erhalten und mit nicht-markiertem Material auf eine Radioaktivität von ca. 1000–2000 ipm*/mg verdünnt.

4,6-*O*-Benzyliden-*N-p*-tolyl-D-glucopyranosylamin wurde aus 4,6-*O*-Benzyliden-D-glucose, die nach L. Zervas¹³ dargestellt worden war, und *p*-Toluidin nach Micheel und Frowein¹⁴ gewonnen.

Die Schiffsche Base **12** wurde aus 3,4,5,6-Tetra-*O*-benzoyl-D-glucose nach Brigl¹⁵ mit *p*-Toluidin nach Micheel und Dijong¹⁶ dargestellt.

Die Schiffsche Base **13**: 600 mg Glykolaldehyd (10 mmole) wurden in 100 ml Äthanol unter Erwärmen gelöst und noch warm mit 1071 mg (10 mmole) *p*-Toluidin versetzt. Nach kurzem Aufkochen kristallisierten nach 24stündigem Stehen im Kühlschrank 1010 mg (67%) aus, Schmp. 144°

C₉H₁₁NO (149.02) Gef.: C, 72.6; H, 7.66; N, 9.42.

Ber.: C, 72.5; H, 7.40; N, 9.40.

4. *Allgemeine Arbeitsmethodik für die Austauschreaktionen.* — Das Glucosylamin wurde gelöst und die Lösung in einem Thermostaten auf Reaktionstemperatur ($\pm 0.1^\circ$) gebracht. Im gleichen Thermostaten wurde eine dem Glucosylamin entsprechende äquimolare Lösung des Amins im gleichen Lösungsmittel zusammen mit dem Katalysator temperiert. Durch Vereinigen der beiden Lösungen wurde die Reaktion gestartet. Nach passenden Zeiten wurden 50 ml Proben gezogen und unter Kühlung durch Einfließenlassen in wäßrige Natronlauge auf p_H 9–10 gebracht. Bei Untersuchungen von **1a** wurde daraus nach Zugabe von weiteren 50 ml Wasser bei ca. 50° Badtemperatur und 20 Torr das wasserdampflichtige Toluidin in 15 ml alkoholische 2N Salzsäure überdestilliert. Das Destillat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht, 20 ml Äthanol zum Rückstand gegeben und erneut abdestilliert. Das hinterbleibende *p*-Toluidin-hydrochlorid wurde über KOH und P₂O₅ getrocknet und sodann analysiert.

Bei Untersuchungen von **1b** wurde nach dem Stoppen der Reaktion die Lösung

*imp = Impulse pro Minute.

am Rotationsverdampfer unter Vakuum fast bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 30 ml Wasser aufgenommen, wobei sich das Glucosylamin löste und der größte Teil des *p*-Nitranilins ungelöst blieb. Falls das Amin analysiert werden sollte, wurde dieses abgesaugt und durch Umkristallisation aus Wasser-Methanol gereinigt. Zur Isolierung des Glucosylamins wurde die wäßrige Lösung zweimal mit 20 ml Äther ausgeschüttelt, die wäßrige Phase bis zur Trockene schonend eingengt, der Rückstand in 10 ml heißen Methanol aufgenommen, filtriert und das umkristallisierte **1b** abgesaugt. Nach Waschen mit Methanol-Äther und Trocknen war es analysenrein.

Kontrollversuche zeigten, daß unter diesen Aufarbeitungsbedingungen sowohl die RG der Transglucosidierung und der Hydrolyse vernachlässigbar sind. Eine Ausnahme machte die Schiffsche Base **13**. Die Tritium-Markierung der Amine war unter diesen Bedingungen völlig stabil.

5. *Beispiel einer Austauschkinetik.* — Ein Reaktionsansatz von 300 ml wasserfreiem Äthanol (HCl = 0.01N) enthielt **1b** und **4b** in einer Konzentration von 0.005M bei +0.2°. Nach 30, 60, 90, 120 und 180 Min. wurden Proben entnommen. Die Radioaktivität des eingesetzten *p*-Nitranilins betrug 134.9 ipm/ μ Mol und das nach den angegebenen Zeiten isolierte **1b** 23.4; 38.7; 51.0; 55.2 und 60.9 ipm/ μ Mol. Dies entspricht einem Austausch von 34.7; 57.4; 75.7; 81.9 und 90.4%. Die graphisch ermittelte Halbwertszeit betrug 47.5 Min.

6. *Versuche zur Ermittlung des Gleichgewichts $1a + 4b \rightleftharpoons 1b + 4a$.* — Konzentration der Reaktionspartner (**1a + 4b**) 0.01M in 0.1N äthanolischer HCl. Nach 5; 10; 60 und 780 Min. wurden Proben entnommen und das in Freiheit gesetzte **4a** durch Verdünnungsanalyse bestimmt. Nach den angegebenen Zeiten hatten sich 37.5; 62.5; 86.0 und 90.0% **1b** gebildet. Bei dem entsprechenden Gegenversuch (**1b + 4a**) wurden nach 80; 240 und 1320 Min. Proben genommen. Nach diesen Zeiten hatten sich 6.5; 10.5 und 11.0% **1a** gebildet.

In N äthanolischer HCl wurde entsprechend verfahren.

7. *Bestimmung der Mutarotation.* — Die Lösung des Glucosylamins und die des Katalysators wurden getrennt auf die Reaktionstemperatur gebracht und je 5 ml vereinigt (Zeit = 0). Das Gemisch wurde sodann rasch in die thermostatisierte Küvette gefüllt und vermessen. Der Gleichgewichtszustand wurde für **1a** bei $[\alpha]_D^{20} -45.5^\circ$ gefunden, was mit lit. cit.¹¹ übereinstimmt. In N NaOH wurde allerdings $[\alpha]_D^{20} -51.2^\circ$ für den Gleichgewichtszustand und -119° für den Ausgangsdrehwert bestimmt. Die RG-Konstanten wurden aus der Beziehung $\ln(A - A_\infty)/(A_t - A_\infty) = kt$ berechnet.

8. *Versuche zur Darstellung von N-Glucosyl-Derivate des N-Methyl-p-toluidins und N-Methyl-p-nitranilins.* — Die Methoden nach Weygand¹⁰, Ellis und Honeyman¹¹ sowie Weygand und Mitarbb.¹² führten auch bei wesentlich längeren Versuchszeiten und erhöhten Temperaturen nicht zum Ziel.

Auch die Umsetzung von Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosylbromid mit **4a** bzw. **4b** in Pyridin oder Nitromethan in Gegenwart von Barium-carbonat führte nicht zum Erfolg.

Die Transglucosidierung von *N-p*-Tolyl- β -D-glucoopyranosylamin (1a) und *N*-Methyl-*p*-nitranilin führte auch nach 12 Tagen in 0.1N äthanolischer Salzsäure bei 0° nicht zum Ziel. Von dem sekundären Amin hatten sich weniger als 4% umgesetzt. Bei Raumtemperatur wurden die Reaktionsansätze schnell stark dunkelbraun.

DANK

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung. Die Radioaktivitätsmessungen wurden an einem vom Ministerium für Wissenschaftliche Forschung zur Verfügung gestellten Gerät vorgenommen. Fräulein E. Wolf und H. Pflaumer führten zahlreiche Tritiumanalysen sehr gewissenhaft aus.

LITERATUR

- 1 R. KUHN UND A. DANSI, *Ber.*, 69 (1936) 1745.
- 2 Y. INOUE UND K. ONODERA, *J. Agr. Chem. Soc. (Japan)*, 22 (1948) 119.
- 3 R. BOGNÁR UND P. NÁNÁSI, *Nature*, 171 (1953) 475; *J. Chem. Soc.*, (1955) 189; R. BOGNÁR, P. NÁNÁSI UND E. NEMES-NÁNÁSI, *J. Chem. Soc.*, (1955) 193.
- 4 R. BOGNÁR UND P. NÁNÁSI, *Tetrahedron*, 14 (1961) 175.
- 5 H. M. KALCKAR, W. S. MACNUTT UND E. HOFF-JØRGENSEN, *Biochem. J.*, 50 (1952) 397.
- 6 H. SIMON UND D. PALM, *Ber.*, 98 (1965) 433.
- 7 R. SMITH, S. HOLTON UND O. RUNDQUIST, *J. Org. Chem.*, 28 (1963) 2881.
- 8 F. KALBERER UND J. RUTSCHMANN, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 1956.
- 9 W. BUNGE in: *Methoden der Organischen Chemie*, 1/2S. 816, Herausgeber E. MÜLLER, Gg. Thieme Verlag, Stuttgart, 1959.
- 10 F. WEYGAND, *Ber.*, 72 (1939) 1663.
- 11 G. P. ELLIS UND J. HONEYMAN, *J. Chem. Soc.*, (1952) 1490.
- 12 F. WEYGAND, W. PERKOW UND P. KUHNER, *Ber.*, 84 (1951) 594.
- 13 L. ZERVAS, *Ber.*, 64 (1931) 2289.
- 14 F. MICHEEL UND A. FROWEIN, *Ber.*, 90 (1957) 1599.
- 15 P. BRIGL, H. MÜHLSCHLEGEL UND R. SCHINLE, *Ber.*, 64 (1931) 2921, s.d. frühere Literatur.
- 16 F. MICHEEL UND J. DIJONG, *Ann.*, 658 (1962) 120.

Carbohyd. Res., 8 (1968) 424-439