Enzym-katalysierte Reaktionen, 14^[1]

Stereoselektive Darstellung von Thiozuckern aus achiralen Vorstufen mittels Enzymen

Franz Effenberger*, Alexander Straub [2a] und Volker Null [2b]

Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 55, W-7000 Stuttgart 80, Germany

Eingegangen am 30. Juli 1992

Key Words: 5-Thiopentulofuranose / 6-Thiohexulopyranose / Rabbit muscle aldolase (RAMA) / Yeast transketolase / Carbohydrates / Enzymes / Transketolase / Aldolase

Enzyme-Catalyzed Reactions, 14^[1]. - Stereoselective Synthesis of Thiosugars from Achiral Starting Compounds by Enzymes

A novel synthesis for thiosugars starting from achiral compounds by using enzymes as catalysts is described. 5-Thio-D-threo-2-pentulofuranose (4), for example, is prepared either by the RAMA (rabbit muscle aldolase)-catalyzed reaction of mercaptoacetaldehyde (1b) with dihydroxyacetonephosphate (2)

or by the yeast transketolase-catalyzed reaction of 2-hydroxy-3-mercaptopropanal (R/S)-6 with lithium 3-hydroxypyruvate (9). 6-Thio-D-arabino-2-hexulopyranose (8 a) and 6-thio-L-xylo-2-hexulopyranose (8 b) are obtained by the RAMA-catalyzed reaction of racemic (R/S)-6 with 2.

Über Eigenschaften und Synthesen von Thiozuckern ist im Vergleich zu den entsprechenden Stickstoffanaloga, die als Glycosidase-Inhibitoren^[3] große Bedeutung erlangt haben, wenig bekannt^[4].

Thiozucker, über deren biologische Wirkung berichtet wurde, sind z.B. 5-Thio-D-xylo-pyranose, die β -D-xylosidasen und x-D-xylo-pyranose, die ein α -Fucosidase-Inhibitor ist α -Thio-D-glucal, das Glycosidasen inhibiert α - 5-Thio-D-glucopyranose hemmt die Insulinfreisetzung, den zellulären Transportmechanismus für Glucose, die Spermatogenese und führt – kombiniert mit Hyperthermie – zur Tumorregression α - 5-Thio-D-mannopyranose war der erste aus Naturprodukten isolierte Thiozucker.

Bei der Synthese von Thiozuckern geht man in der Regel von natürlich vorkommenden Zuckern aus, die über eine Reihe chemischer Schritte in die gewünschten Thiozucker übergeführt werden^[4]. So wurde z.B. 6-Thio-D-*arabino*-2-hexulopyranose ausgehend von D-Fructose in sechs Synthesestufen hergestellt^[10].

Im Rahmen unserer Untersuchungen zur Anwendung von Enzymen in der organischen Synthese haben wir u.a. über enantioselektive C-C-Knüpfungsreaktionen zum Aufbau von Kohlenhydraten mittels Kaninchenmuskel-Aldolase (RAMA) und Hefe-Transketolase (Hefe-TK) berichtet [11,12]. In der vorliegenden Publikation beschreiben wir die Darstellung einiger 5- und 6-Thiozucker, die wir durch die Anwendung der Enzyme RAMA bzw. Hefe-TK als Katalysatoren einfach und in guter Ausbeute erhalten konnten.

Synthesen von Thiozuckern mit Kaninchenmuskel-Aldolase (RAMA) (EC 4.1.2.13)

Bei der durch RAMA katalysierten C-C-Verknüpfung haben ausführliche Untersuchungen gezeigt^[13], daß dieses

Enzym bezüglich des Dihydroxyacetonphosphats, als einem der beiden Edukte dieser Reaktion, sehr substratspezifisch ist, jedoch bezüglich des zweiten Reaktionspartners, einem Aldehyd, eine große Variationsbreite möglich ist^[11a,13]. Über RAMA-katalysierte Umsetzungen von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) mit Mercaptoaldehyden sollten deshalb auch Thiozucker einfach zugänglich sein.

Für die Darstellung der 5-Thio-D-threo-2-pentulofuranose (4) (Schema 1) haben wir 1,4-Dithian-2,5-diol (1a), das in wäßriger Lösung mit seinem Monomer, 2-Mercaptoacetaldehyd (1b), im Gleichgewicht vorliegt [14], mit Dihydroxyacetonphosphat (2) unter Zugabe von RAMA umgesetzt. 1b ist zwar Substrat für die Aldolase, führt aber selbst in starker Verdünnung zu einer Enzym-Desaktivierung, so daß eine Nachdosierung an Enzym erforderlich ist.

-OH

3a: X = 2H

b: X = Ba

HO

α-4 (17%)

Das gebildete Thiofuranose-1-phosphat 3a wird mit Bariumchlorid aus ethanolischer Lösung als Bariumsalz 3b ausgefällt und durch Hydrolyse mit Phosphatase (EC 3.1.3.2) in die gewünschte 5-Thiofuranose 4 übergeführt.

Die durch RAMA katalysierten C-C-Verknüpfungen verlaufen stereochemisch eindeutig, und zwar unter Ausbildung der S-Konfiguration an C-3 und der R-Konfiguration an C-4 in den gebildeten 2-Ketosen^[11,13]. Bei den Thiozukkern wird aufgrund der höheren Priorität des Schwefels gegenüber dem Sauerstoff die R-Konfiguration an C-4 zur S-Konfiguration. Die *trans*-Stellung der Hydroxy-Gruppen an C-3 und C-4 in der 5-Thio-furanose 4 wird u.a. durch die Kopplungskonstanten von 9.3 Hz zwischen 3- und 4-H bestätigt^[15].

Schema 2

Die Konfiguration an C-2 ist naturgemäß nicht festgelegt. Nach unseren 1 H-NMR-Untersuchungen liegt das Anomeren-Gleichgewicht für die Thiofuranose 4 in wäßriger Lösung bevorzugt auf der Seite des β-Anomeren: 4 liegt zu 83% als β- und zu 17% als α-Anomer vor (Schema 1). Dies stimmt mit Ergebnissen überein, nach denen im dominierenden Anomer von Furanosen die Hydroxymethyl-Gruppe an C-2 überwiegend *trans* zu der Hydroxy-Gruppe an C-3 angeordnet ist $^{[16]}$.

Die für Mercaptoacetaldehyd (1b) beschriebene, Enzymkatalysierte Darstellung einer Thiofuranose ließ sich auch auf andere Mercaptoaldehyde übertragen. So konnte racemischer 3-Thioglycerinaldehyd [(R/S)-6] mit DHAP (2) unter RAMA-Katalyse zu den stereoisomeren 6-Thiopyranosen 8a und 8b umgesetzt werden (Schema 2).

3-Thioglycerinaldehyd [(R/S)-6] wird in situ aus 3-Thioglycerinaldehyd-diethylacetal (5) durch Säure-katalysierte Hydrolyse erhalten und ohne Isolierung direkt mit DHAP (2) unter Aldolase-Katalyse weiter umgesetzt. Da auch bei dieser Reaktion die Aldolase desaktiviert wird, ist eine Nachdosierung an Enzym während der Reaktion notwendig.

Die gebildeten Zuckerphosphate werden mit Bariumchlorid aus ethanolischer Lösung als Bariumsalze 7a/7b ausgefällt und durch Hydrolyse mit Phosphatase (EC 3.1.3.2) in die freien 6-Thiopyranosen 8a und 8b übergeführt. Die beiden Thiozucker 8a und 8b wurden nach Chromatographie an Dowex 1X8 (Formiat) in einer Gesamtausbeute von 48% bezogen auf eingesetztes 5 im Verhältnis ca. 1:1 (¹H-NMR-spektroskopisch ermittelt) erhalten und konnten anschließend durch Chromatographie an Dowex 50WX8 Ca²+ mit Wasser getrennt werden (s. Exp. Teil).

Auch in den 6-Thiopyranosen 8 ist die Konfiguration an C-3 und C-4 durch die RAMA-katalysierte C—C-Knüpfung festgelegt^[11,13]. Wenn beide Enantiomere des eingesetzten racemischen 3-Thioglycerinaldehyds [(R/S)-6] reagieren, müßten zwei Diastereomere entstehen, was auch der Fall ist. Man erhält die beiden Thiopyranosen 8a und 8b mit S-bzw. R-Konfiguration an C-5. Im ¹H-NMR-Spektrum von 8b erscheint das 4-H-Signal als ein Triplett mit einer Kopplungskonstanten von 9.1 Hz. Somit sind 3- und 5-H transdiaxial zu 4-H angeordnet, was mit der L-xylo-Form in Einklang steht.

Die Konfiguration am anomeren Zentrum C-2 ist wiederum nicht fixiert. 6-Thio-D-arabino-2-hexulopyranose (8a) liegt nach ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen in wäßriger Lösung zu 15% als α-Anomer in einer ⁵C₂-Konformation und zu 85% als β-Anomer in einer ²C₅-Konformation vor^[15]. Das Anomeren-Verhältnis konnte durch eigene NMR-Untersuchungen bestätigt werden (Schema 2). Für 6-Thio-L-xylo-2-hexulopyranose (8b) haben wir im Gegensatz zu 8a nur die Signale eines Anomeren ¹H-NMR-spektroskopisch nachweisen können. 8b liegt demnach in wäßriger Lösung, im Rahmen der NMR-Nachweisgrenze, als β-Anomer vor.

Untersuchungen zur Erweiterung des Substratspektrums für RAMA-katalysierte Reaktionen mit Mercaptoaldehyden haben ergeben, daß 2-Thioglycerinaldehyd auf diese Weise nicht mit DHAP (2) zur gewünschten 5-Thio-D-hexulofuranose umgesetzt werden kann.

Darstellung von 5-Thio-D-threo-2-pentulofuranose (4) mittels Hefe-Transketolase (EC 2.2.1.1)

Oben wurde die Darstellung der 5-Thiopentulofuranose 4 aus Dihydroxyacetonphosphat (2) und Mercaptoacetaldehyd (1b) in Gegenwart von RAMA beschrieben. Analog zur Darstellung der stickstoffhaltigen 5- bzw. 6-Ring-Zucker^[11b] sollten Thiopentulosen auch aus 3-Thioglycerinaldehyd und Lithium-3-hydroxypyruvat (9) in Gegenwart von Hefe-Transketolase zu erhalten sein.

Über die durch Hefe-Transketolase katalysierte Umsetzung einer Reihe von 2-Hydroxyaldehyden mit 9 haben wir kürzlich berichtet [12]. Neben einer vielseitig variierbaren Darstellung von 2-Ketosen kann diese Reaktion auch zur kinetischen Racemat-Trennung von 2-Hydroxyaldehyden dienen, da nur die D-Form der Hydroxyaldehyde für die C-C-Knüpfung mit 9 akzeptiert wird und dadurch die L-2-Hydroxyaldehyde in hoher optischer Reinheit im Reaktionsgemisch zurückbleiben [12].

So haben wir unter anderem auch 3-Thioglycerinaldehyd [(R/S)-6] mit 9 in Gegenwart von Hefe-Transketolase umgesetzt und neben 5-Thio-D-threo-2-pentulofuranose (4) in 80proz. Ausbeute den L-Hydroxyaldehyd (R)-6 erhalten ^[12]. Im Gegensatz zu den anderen hergestellten L-2-Hydroxyaldehyden ist es in diesem Fall nicht gelungen, den Mercaptohydroxyaldehyd (R)-6 in reiner Form aus dem wäßrigen Reaktionsmedium zu isolieren ^[12]. Wir haben deshalb die Möglichkeit untersucht, den im Reaktionsgemisch vorliegenden Aldehyd (R)-6 über eine Folgereaktion zu erfassen und diese Reaktion gleichzeitig für die Darstellung eines Thiozuckers zu nutzen.

Nach beendeter Hefe-TK-katalysierter Reaktion von (R/S)-6 mit 9 wurde das angefallene Reaktionsgemisch mit DHAP unter Zugabe von RAMA umgesetzt, wobei (R)-6 unter C-C-Knüpfung zum Thiozucker-Derivat 7 reagiert. Nach vollständigem Umsatz konnten die Zuckerphosphate mit Bariumchlorid aus ethanolischer Lösung als Bariumsalze 7a und 7b ausgefällt werden, während die Furanose 4 aus dem Überstand nach Chromatographie in 70proz. Ausbeute isoliert werden konnte. Die Barium-Zuckerphosphate 7 wurden mit Phosphatase zu den freien 6-Thiozuckern 8a, 8b hydrolysiert, die nach Chromatographie in 49proz. Gesamtausbeute bezogen auf 5 erhalten wurden.

Schema 3

Die Voreinstellung des pH-Wertes der DHAP-Lösung auf pH 6.5 bei dieser Reaktion ist wichtig, da sonst bei der Zugabe eine Racemisierung des Aldehyds (R)-6 erfolgt. Trotz Desaktivierung der Aldolase während der Reaktion wurde das Enzym nicht nachdosiert.

Nach den ¹H-NMR-Spektren beträgt das Isomeren-Verhältnis 8a:8b = 7:93. Daraus kann nun auch auf die Ef-

fizienz der kinetischen Racemat-Trennung bei der durch Hefe-TK katalysierten Umsetzung von 3-Thioglycerinaldehyd [(R/S)-6] mit 9 geschlossen werden^[12]. Es besteht weitgehende Übereinstimmung der beschriebenen optischen Reinheit von (R)-6^[12] und dem Verhältnis der beiden über die Folgereaktion gebildeten Stereoisomere 8b bzw. 8a.

Mit dem zuletzt angeführten Beispiel wird die aus präparativer Sicht interessante Möglichkeit aufgezeigt, in einer Eintopfreaktion mittels Hefe-Transketolase 3-Thioglycerinaldehyd [(R/S)-6] unter Bildung der Thiofuranose 4 umzusetzen und anschließend das angereicherte (R)-6 unter RAMA-Katalyse fast vollständig in das entsprechende Lxylo-Ketose-Derivat 8b zu überführen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

¹H-NMR: Bruker WP 80, AC 250 F sowie CXP 300, TMS als interner Standard. — Drehwerte: Perkin-Elmer Polarimeter 241 LC, verbunden mit thermostatisierbarer Glasküvette (*l* = 10 cm) mit Anschluß für Durchflußmessungen. — EI-MS: Varian Mat 711. — Präparative Säulenchromatographie: Glassäulen verschiedener Größe, gepackt mit Dowex 1X8 sowie Dowex 50WX8, Korngröße jeweils 0.037−0.075 mm (Serva). — Hefe-Transketolase: (EC 2.2.1.1), 20 U/mg (Sigma). — Kaninchenmuskel-Aldolase (RAMA): (EC 4.1.2.13), 15 U/mg (Sigma). — Phosphatase: (EC 3.1.3.2), 2 U/mg (Boehringer, Mannheim).

5-Thio-D-threo-2-pentulofuranose-1-phosphat (3b): Unter N₂ löst man unter Erwärmen 0.70 g (4.6 mmol) 1a in 500 ml Wasser, gibt 7 mmol $2^{[11a,b]}$ dazu, stellt mit 2 N NaOH auf pH 6 ein, füllt mit Wasser auf 700 ml auf und inkubiert nach Zugabe von 1800 Units RAMA bei 39 °C. Nach 3.5 h werden nochmals 1700 Units RAMA zugegeben, und 48 h wird inkubiert. Anschließend gibt man 2.7 g (11.1 mmol) BaCl₂ · 2 H₂O, gelöst in wenig Wasser, zu, kühlt 5 h bei 0 °C und zentrifugiert. Der Überstand wird auf ca. 300 ml eingeengt, mit 700 ml Ethanol versetzt, 16 h bei 0 °C gekühlt und zentrifugiert. Der Rückstand wird i.Hochvak. getrocknet; Rohausb. 2.05 g (77%). — ¹H-NMR (D₂O): δ = 2.65 und 3.07 (2 dd, $J_{5,5}$ = -10.4, $J_{4,5}$ = 7.2, $J_{4,5}$ = 9.1 Hz, 2H, 5-H), 3.85 (d, $J_{3,4}$ = 9.3 Hz, 1H, 3-H), 3.93 und 3.97 (AB-System, J = -10.8, J_{POCH} = 5.7 Hz, 2H, 1-H), 4.33 (ddd, 1 H, 4-H).

5-Thio-D-threo-2-pentulofuranose (4): 2.0 g (5.24 mmol) 3b werden unter Zugabe von Dowex 50WX8 H $^+$ in Wasser gelöst. Der Ionenaustauscher wird abfiltriert und das Filtrat mit 2 n NaOH auf pH 4.5 eingestellt (50 ml Gesamtvolumen). Man gibt 5 mg Natriumazid zu und inkubiert nach Zugabe von 50 Units saurer Phosphatase (EC 3.1.3.2) 60 h bei 37°C. Anschließend wird die Reaktionslösung i. Vak. eingeengt, zentrifugiert und der Überstand an Dowex 1X8 (Formiat) (Säule 3 cm \times 40 cm) mit Wasser chromatographiert. Die drehwertaktiven Fraktionen werden gesammelt; Ausb. 0.68 g (78%), Schmp. 84–86°C, $[\alpha]_D^{20} = -103.8$ (c = 3.23, D_2O).

β-4: ¹H-NMR (D₂O): $\delta = 2.63$ und 3.08 (2 dd, $J_{5,5} = -10.4$, $J_{4,5} = 7.1$, $J_{4,5} = 9.1$ Hz, 2H, 5-H), 3.66 (nicht aufgelöstes AB, $J_{1,1} = -19.2$ Hz, 2H, 1-H), 3.79 (d, $J_{3,4} = 9.3$ Hz, 1H, 3-H), 4.34 (ddd, 1H, 4-H).

α-4: 1 H-NMR (D₂O): $\delta = 3.00$ (dd, $J_{5,5} = -11.2$, $J_{4,5} = 6.2$ Hz, 1 H, 5-H), 3.78 (d, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, 1 H, 3-H). Die übrigen Signale sind von β-4-Signalen überlagert.

C₅H₁₀O₄S Ber. 166.0299 Gef. 166.0299 (MS)

3-Thioglycerinaldehyd-diethylacetal (5): In die Lösung von 3.83 g (68.4 mmol) Kaliumhydroxid in 15 ml Methanol leitet man bei 0°C 1 h H₂S ein. Dann tropft man eine Lösung von 5.0 g (34.2 mmol) 2-(Diethoxymethyl)oxiran [17] in 10 ml Methanol innerhalb 0.5 h unter H₂S-Einleiten zu, läßt unter Rühren auf Raumtemp, erwärmen und noch 1 h nachrühren und gießt das Reaktionsgemisch auf 150 ml Eiswasser. Unter Eiskühlung wird mit 5 N H₂SO₄ auf pH 2 eingestellt und fünfmal mit jeweils 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Extrakte wäscht man mit jeweils 20 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknet mit Natriumsulfat und engt ein; Ausb. 5.8 g (95%). - ¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 1.25$ (t, 6H, CH₃), 1.65 (t, 1H, SH), 2.45 - 3.00 (m, 3H, CH₂CH), 3.45 - 3.90(m, 5H, 2 CH₂, OH), 4.50 [d, 1H, $CH(OC_2H_5)_2$].

> C₇H₁₆O₃S (180.3) Ber. C 46.64 H 8.95 S 17.79 Gef. C 46.87 H 8.75 S 17.70

6-Thio-D-arabino-2-hexulopyranose (8a) und 6-Thio-L-xylo-2-hexulopyranose (8b): Zur Lösung von (R/S)-6 [in situ hergestellt aus 1 g (5.54 mmol) 5 und 0.8 g Dowex 50WX8 H+ in 32 ml Wasser; nach 24stdg. Rühren bei Raumtemp. wird der Ionenaustauscher abfiltriert] gibt man 5.4 mmol 2, stellt mit 2 N NaOH auf pH 6 ein, füllt mit Wasser auf 500 ml auf und inkubiert nach Zugabe von 450 Units RAMA bei 25°C. Nach 2 h werden nochmals 1000 Units RAMA zugegeben, und es wird 21 h inkubiert. Dann engt man das Reaktionsgemisch auf 100 ml ein, gibt 3.0 g (12.3 mmol) BaCl₂ 2 H₂O, gelöst in wenig Wasser, zu, kühlt 2 h bei 0°C und zentrifugiert. Der Überstand wird mit 400 ml Ethanol versetzt, 10 h bei 0°C gekühlt und zentrifugiert. Der Rückstand (7a, 7b) wird getrocknet, unter Zugabe von Dowex 50WX8 H+ in Wasser gelöst und mit 2 N NaOH auf pH 4.5 eingestellt (100 ml Gesamtvolumen). Man gibt 5 mg Natriumazid und 50 Units Phosphatase zu, inkubiert 40 h bei 40°C, stellt mit Barytwasser auf pH 7 ein und zentrifugiert. Der Überstand wird eingeengt und an Dowex 1X8 (Formiat) mit Wasser chromatographiert (polarimetrische Detektion bei 365 nm); Gesamtausb. 0.50 g (48%) 8a und 8b im Verhältnis 1:1 (¹H-NMR-spektroskopisch durch Integration des 6-H-Signals ermittelt). Das Gemisch wird eingeengt und 0.25 g an Dowex 50WX8 Ca²⁺ mit Wasser chromatographiert (polarimetrische Detektion bei 436 nm).

1. Fraktion: Ausb. 72 mg (29%) **8b**, Schmp. 160-161 °C, $[\alpha]_D^{20} =$ -103.7 (c = 0.8, H₂O). - ¹H-NMR (D₂O): δ = 2.68 (dd, $J_{6,6}$ = -13.0, $J_{5,6} = 4.4$ Hz, 1 H, 6-H), 2.89 (dd, $J_{5,6} = 11.0$ Hz, 1 H, 6-H), 3.61 (dd, $J_{4,5} = 9.1$ Hz, 1 H, 4-H), 3.69 (d, $J_{1,1} = -11.0$ Hz, 1 H, 1-H), 3.74 (d, $J_{3,4} = 9.1$ Hz, 1H, 3-H), 3.74 (ddd, 1H, 5-H), 3.82 (d, 1H, 1-H).

> C₆H₁₂O₅S (196.2) Ber. C 36.73 H 6.16 S 16.34 Gef. C 36.54 H 6.11 S 16.16

2. Fraktion: Ausb. 86 mg (34%) 8a, Schmp. 59°C (Lit. [18] 63-64°C), $[\alpha]_D^{20} = -192$ (c = 0.6, D_2 O) [Lit.^[18] -194 (c = 1.0, H_2O)]. – ¹H-NMR-Spektren von β -8a und α -8a identisch mit C₆H₁₂O₅S Ber. 196.0405 Gef. 196.0405 (MS)

Kombinierte Darstellung von 4, 8a und 8b: Die Lösung von (R/ S)-6 [wie oben beschrieben in situ hergestellt aus 0.20 mmol 5], 25.6 mg (0.23 mmol) 9^[19], 2.4 mg (20 μmol) Magnesiumsulfat und 9.9 mg (20 µmol) Thiaminpyrophosphat in 20 ml Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl-Puffer (5 mm, pH 7.8) wird auf 30°C erwärmt, und nach pH-Kontrolle wird die Reaktion durch Zugabe von 9 Units Hefe-Transketolase gestartet. Nach 71 h (keine Drehwertänderung mehr beobachtbar) gibt man die auf pH 6.5 gepufferte Lösung von 0.15 mmol 2 zu, stellt auf pH 7 ein, erwärmt auf 25°C und startet die Reaktion mit 225 Units RAMA. Nach 18 h setzt man 0.12 g (0.5 mmol) BaCl₂ · 2 H₂O, gelöst in wenig Wasser, zu,

kühlt 4 h bei 0°C und zentrifugiert. Man engt den Überstand auf 10 ml ein, gibt 40 ml Ethanol zu, kühlt 16 h bei 4°C und zentrifugiert. Der Überstand wird eingeengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Dowex 50WX8 H+ und Dowex 1X8 HCO₃ entsalzt. Man engt ein und chromatographiert an Dowex 50WX8 Ca²⁺ (Säule 3 cm × 85 cm) mit Wasser (polarimetrische Detektion bei 365 nm); Ausb. 11.7 mg (70%) 4, $[\alpha]_D^{20} = -95.5$ (c = 0.6, H₂O). - ¹H-NMR-Daten s. oben. Der Rückstand (7) wird in Wasser unter Zugabe von Dowex 50WX8 H⁺ gelöst, der Ionenaustauscher abfiltriert und das Filtrat mit 2 N NaOH auf pH 4.5 eingestellt (50 ml Gesamtvolumen). Man setzt 1 mg Natriumazid und 5 Units Phosphatase zu, inkubiert 48 h bei 40°C, stellt dann mit Barytwasser auf pH 7 ein und zentrifugiert. Der Überstand wird eingeengt und an Dowex 1X8 (Formiat) (Säule 3 cm × 30 cm) mit Wasser chromatographiert (polarimetrische Detektion bei 365 nm); Ausb. 9.5 mg (49%) 8a und 8b im Verhältnis 7:93 (1H-NMR-spektroskopisch ermittelt). - Daten s. oben.

[1] 13. Mitteilung: F. Effenberger, V. Null, Liebigs Ann. Chem. 1992,

im Druck.

[2] [2a] A. Straub, Teil der Dissertation, Univ. Stuttgart, 1989. — [2b] V. Null, Teil der Dissertation, Univ. Stuttgart, 1992.

[3] [3a] E. Truscheit, W. Frommer, B. Junge, L. Müller, D. D.

Schmidt, W. Wingender, Angew. Chem. 1981, 93, 738-753. — [3b] A. M. Scofield, L. E. Fellows, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, Life Sci. 1986, 39, 645-650. — [3e] L. E. Fellows, Chem. Br. 1987, 23, 842-844. — [3d] A. Karpas, G. W. J. Fleet, R. A. Dwek, S. Detwerd, S. M. Morgan, N. G. Beneder, S. Karpas, G. W. J. Fleet, R. A. Dwek, S. Detwerd, S. M. Morgan, N. G. Beneder, S. Karpas, S. W. Morgan, N. G. Beneder, G. S. Lest, T. Petursson, S. K. Namgoong, N. G. Ramsden, G. S. Jacob, T. W. Rademacher, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 9229 - 9233.

[4] [4a] R. L. Whistler, T. Van Es, J. Org. Chem. 1963, 28, 2303 – 2304. - [4b] H. Paulsen, Angew. Chem. 1966, 78, 501 – 516; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1966, 5, 495 – 510. – [4c] H. Paulsen, K. Todt, Adv. Carbohyld. Chem. 1968, 23, 115 – 232. – [4d] D. Hor. ton, J. D. Wander in The Carbohydrates, Bd. IB (Hrsg.: W. Pigman, D. Horton), Academic Press, New York, 1980, S. 799-842. - [4e] H. Hashimoto, M. Kawanishi, H. Yuasa, Tetrahedron Lett. 1991, 32, 7087 - 7090. - [4f] H. Yuasa, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 5891 - 5892

M. Claeyssens, C. K. de Bruyne, Naturwissenschaften 1965, 52,

[6] H. Hashimoto, T. Fujimori, H. Yuasa, J. Carbohydr. Chem. **1990**, *9*, 683 – 694.

W. Korytnyk, N. Angelino, O. Dodson-Simmons, M. Hanchak, M. Madson, S. Valentekovic-Horvath, Carbohydr. Res. 1983,

113, 166-171.
[8] [8a] D. J. Hoffman, R. L. Whistler, Biochemistry 1968, 7, ^[8b] B. Hellman, A. Lernmark, J. Sehlin, I. B. Taljedal, R. L. Whistler, Biochem. Pharmacol. 1973, 22, 29-35.

[Sc] J. R. Zysk, A. A. Bushway, R. L. Whistler, W. W. Carlton, J. Reprod. Fertil. **1975**, 45, 69—72.

[9] R. J. Capon, J. K. MacLeod, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1987**, 1200 – 1201.

[10] M. S. Feather, R. L. Whistler, J. Org. Chem. 1963, 28, 567 - 1569.

[11] [11a] F. Effenberger, A. Straub, Tetrahedron Lett. 1987, 28, 1641–1644. — [11b] T. Ziegler, A. Straub, F. Effenberger, Angew. Chem. 1988, 100, 737-738; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1988, 27, 716-717. — [11e] A. Straub, F. Effenberger, P. Fischer, J. Org. Chem. 1990, 55, 3926-3932.

[12] F. Effenberger, V. Null, T. Ziegler, Tetrahedron Lett. 1992, 33,

5157-5160.

131 132 C.-H. Wong, G. M. Whitesides, J. Org. Chem. 1983, 48, 3199-3205. — [13b] G. M. Whitesides, C.-H. Wong, Angew. Chem. 1985, 97, 617-638; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1985, 24, 617-638. — [136] R. L. Pedersen, M.-J. Kim, C.-H. Wong, Tetrahedron Lett. 1988, 29, 4645-4648.

^[14] G. Hesse, I. Jörder, Chem. Ber. 1952, 85, 924-932.

[15] M. Chmielewski, R. L. Whistler, Carbohydr. Res. 1979, 69, 259 - 263.

[16] [16a] L. Que, G. R. Gray, Biochemistry 1974, 13, 146-153. [16b] G. R. Gray, Acc. Chem. Res. 1976, 9, 418-424. - [16c] T. A. W. Koerner, R. J. Voll, L. W. Cary, E. S. Younathan, Biochemistry 1980, 19, 2795-2801.

[17] G. B. Payne, P. H. Deming, P. H. Williams, J. Org. Chem. 1961,

26, 659 – 663.
[18] M. Chmierewski, M.-S. Chen, R. L. Whistler, *Carbohydr. Res.* **1976**, 49, 479 – 481.

[19] F. Dickens, H. Williamson, *Biochem. J.* **1958**, 68, 74–81.

[156/92]

CAS-Registry-Nummern

1a: 40018-26-6 / 1b: 4124-63-4 / 2: 57-04-5 / 3a: 143858-31-5 / 3b: 143858-36-0 / 4 (α-Anomer): 143858-32-6 / 4 (β-Anomer): 143858-37-1 / 5: 143858-33-7 / (R/S)-6: 143858-34-8 / (R)-6: 143954-95-4 / 7a: 143858-35-9 / 7b: 143858-38-2 / 8a (α-Anomer): 69685-31-0 / 8a (β-Anomer): 56578-20-2 / 8b: 143858-39-3 / 9: 3369-79-7 / RAMA: 9024-52-6 / 2-(Diethoxymethyl)oxiran: 13269-77-7 / Hefe-Transketolase: 9014-48-6 / Phosphatase: 9013-05-2