

Diplomarbeit

Chemische und enzymkatalysierte Synthesen
von
2-Azido-2-desoxy-D-glucose
und
2-Azido-2-desoxy-cellobiose

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Verfasserin : Nermeen GABRA

Matrikel-Nummer : 9957259

Studienrichtung : 449 Pharmazie

Betreuerin/Betreuer : o.Uni. Prof. Mag. pharm. Dr. Helmut Viernstein

Wien, im April 2009

Danksagung

an dieser Stelle möchte ich mich beim Univ. Prof. Dr. Helmut Viernstein für die Bereitstellung des interessanten Themas und beim Prof. Dr. Frank Michael Unger für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung bei der Korrektur der Arbeit herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch meinen Kolleginnen und Kollegen insbesondere MMag. Borjana Lubura (meine Kollegin und meine Freundin), Mag. Dr. Sharareh Salar-Behzadi und Mag. Yasser Saber für die freundliche Unterstützung, durch die mir diese Arbeit erleichtert wurde.

Bei meinen lieben Kindern Maria, Peter und Veronika möchte ich mich für die liebevolle Unterstützung bedanken. Bei meinem Mann Maged bedanke ich mich ganz herzlich, für seinen Glauben an mich und vor allem dafür, dass er mir die Nostrifikation, trotz allem, ermöglicht hat.

Schließlich bedanke ich mich bei Gott, der immer zu mir steht, und bei meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung.....	6
1.1 Cellulose.....	6
1.1.1 Aminoanaloge der Cellulose.....	7
a) Chitin.....	7
b) Chitosan.....	8
1.2 Prebiotika.....	10
1.3 Glycosaminoglykan.....	11
1.4 Enzyme.....	12
1.4.1 Cellobiose Phosphorylase (CeP).....	13
2. Experimenteller Teil	14
2.1 Methoden.....	14
2.1.1 Dünnschichtchromatographie.....	14
2.1.2 Säulenchromatographie.....	16
2.1.3 Polarimetrie.....	16
2.1.4 NMR-Spektroskopie.....	18
a) ¹ H-NMR-Spektroskopie.....	18

b) ¹³ C-NMR-Spektroskopie.....	19
2.1.5 Trocknen der Lösungsmittel und Reagenzien.....	20
2.1.6 Schmelzpunktbestimmung.....	20
2.2 Materialien.....	21
2.3 Die chemischen Synthesen.....	23
2.3.1 Die chemische Synthese von 2-Azido-2-desoxy-D-glucose.....	23
Überblick 1.....	23
(1) Glucose	24
(2) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-β-D-glucopyranose.....	24
(3) 1-Bromo-1-desoxy-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranose.....	26
(4) 3,4,6-Tri-O-acetyl-D-glycal.....	27
(5) 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy-1-nitro-D-glucopyranose...	28
(6) 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-azido-2-desoxy-D-glucopyranose.....	30
(7) 2-Azido-2-desoxy-D-glucose.....	31

2.3.2 Die chemische Synthese von 2-Azido-2-desoxy-cellobiose.....32

Überblick 2.....32

(1*) Cellobiose.....33

(2*) Cellobiose-octa-acetat.....33

(3*) α -Cellobiosyl-bromid-hepta-acetat.....35

(4*) Hexa-acetyl-D-cellobial.....36

(5*) 2-Azido-2-desoxy-1-nitro-cellobiosyl-hexa-acetat.....39

(6*) 2-Azido-2-desoxy-cellobiosyl-hepta-acetat.....40

(7*) 2-Azido-2-desoxy-cellobiose.....42

2.4 Die enzymkatalysierte Synthese.....43

3. Zusammenfassung.....46

4. Summary.....47

5. Literatur.....48

6. Spektrenanhang.....50

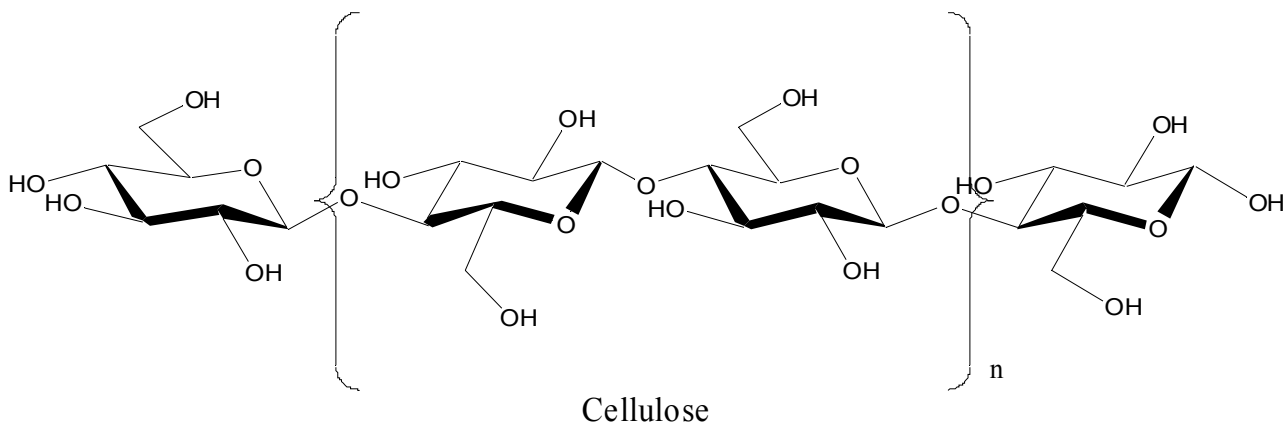
Abbildungsverzeichnis

Abbildung (1): Die enzymkatalysierten Synthesen von 2-Azido-
2-desoxy-D-glucose und 2-Azido-desoxy-cellobiose.....44

1 Einleitung

In der vorliegenden Diplomarbeit werden organische-chemische sowie enzymkatalytische Synthesen von Azido-desoxyderivaten von Mono-und Disacchariden beschrieben. Aus den beschriebenen Zwischenprodukten können Glucosamin-Derivate hergestellt werden, die für Anwendungen im Bereich der pharmazeutischen Hilfsstoffe, als Prebiotika sowie als Chondroprotektiva von Interesse sind. Im Bereich der pharmazeutischen Hilfsstoffe kommen Azidoderivate von Glucose und Cellobiose als Bausteine für neuartige Aminoanaloge der Cellulose in Betracht.

1.1 Cellulose : [1],[2],[5],[16],[20]



Cellulose ist eine 1,4-verknüpfte Poly- β -D-glucopyranose, die aus etwa 3000 Monomereinheiten aufgebaut ist und eine molare Masse von bis zu 500 000gm/mol hat. Die durch β -Bindungen erzeugten geraden Ketten sind optimal zur Bindungen von Fasern mit hoher Zugfestigkeit. Im Cellulosemolekül sind die Monomereinheiten

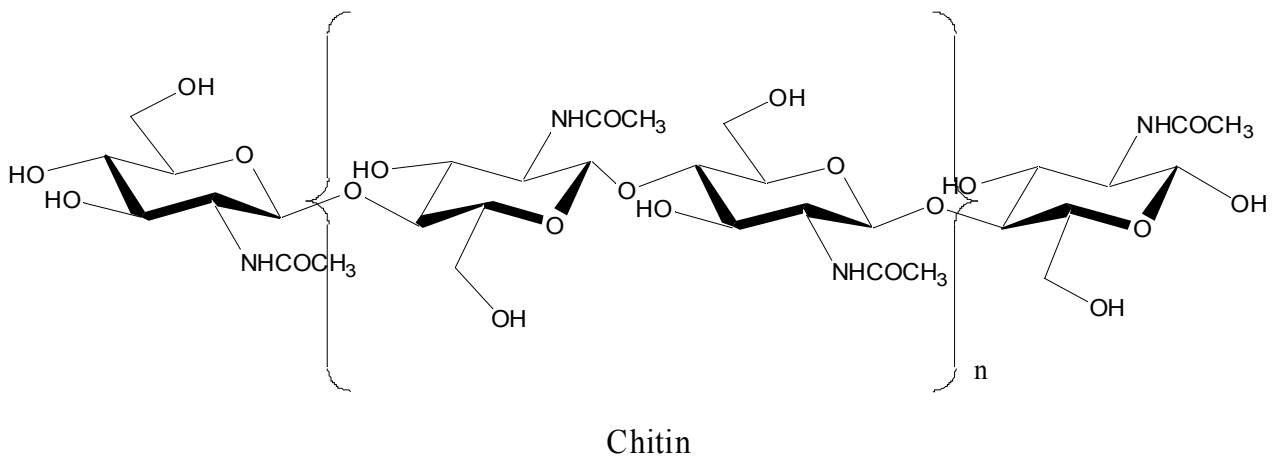
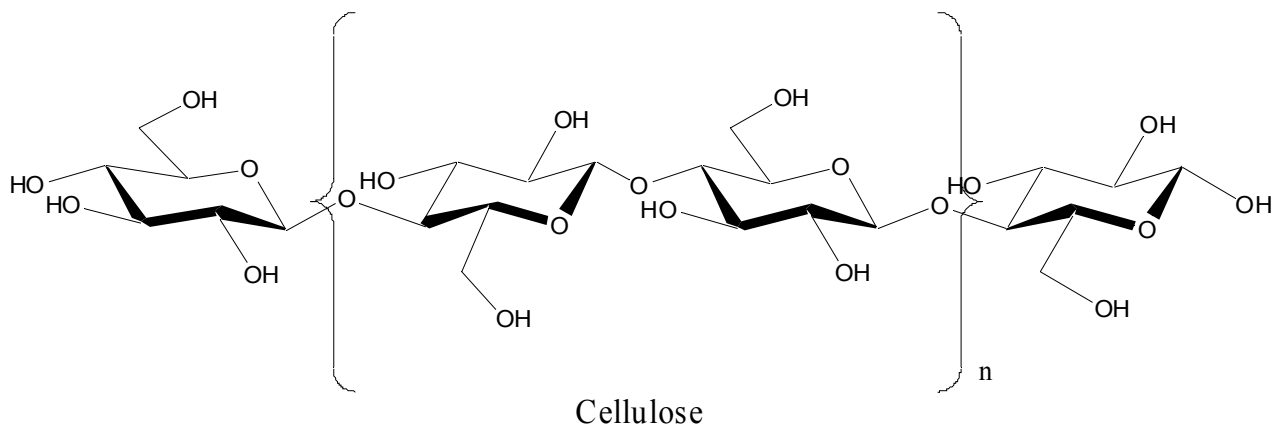
zum größten Teil linear und stereoregulär angeordnet. Wie Röntgenstrukturanalysen ergeben, besteht die Cellulosekette aus sich wiederholenden Einheiten von 1030 pm Länge und nicht 510 pm, was der Länge einer Glukoseeinheit entspräche. Dies ist dadurch zu erklären, dass jede zweite Glukoseeinheit um 180 ° gegenüber den vorigen gedreht ist. Cellulose lässt sich daher am besten als Polycellobiose beschreiben. Cellobiose kommt in der Natur nicht vor. Als Baustein der Cellulose und des Lichenins ist sie aber die häufigste biogene Substanz. Cellobiose als Reinstoff spielt in der Pharmazie, im Gegensatz zu Cellulose und ihren Derivaten, nur eine untergeordnete Rolle. Ihr ist weder im europäischen noch im amerikanischen Arzneibuch eine Monographie gewidmet. Als Hilfsstoff in Pulverinhalatoren hat Cellobiose laut einem Patent der Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc. (Ridgefield, CT) verglichen mit Lactose den Vorteil einer geringeren Sinterung unter feuchten Bedingungen.

1.1.1 Aminoanaloga der Cellulose:

Chitin [18]

Chitin ist ein Polysaccharid, das aus sich wiederholenden N-Acetyl-Glucosamin Einheiten, in β -1-4 glycosidischer Verknüpfung besteht. Daher lässt sich Chitin als 2-Desoxy-2-acetylaminocellulose bezeichnen. Chitin hat die selbe Funktion wie Cellulose, nämlich dem Organismus mechanische Festigkeit zu geben. (Chitos= Panzerhemd, Panzer der Arthropoden und Insekten).

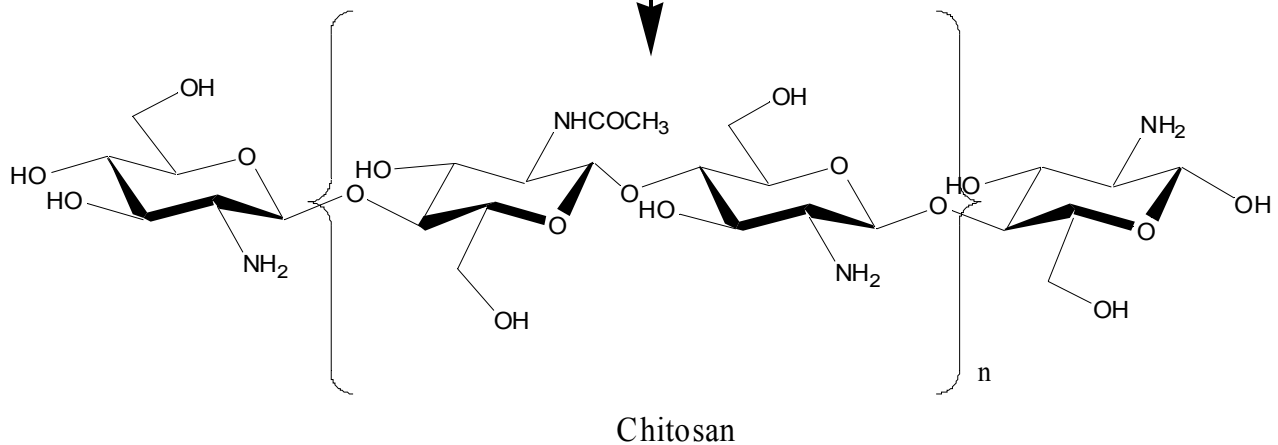
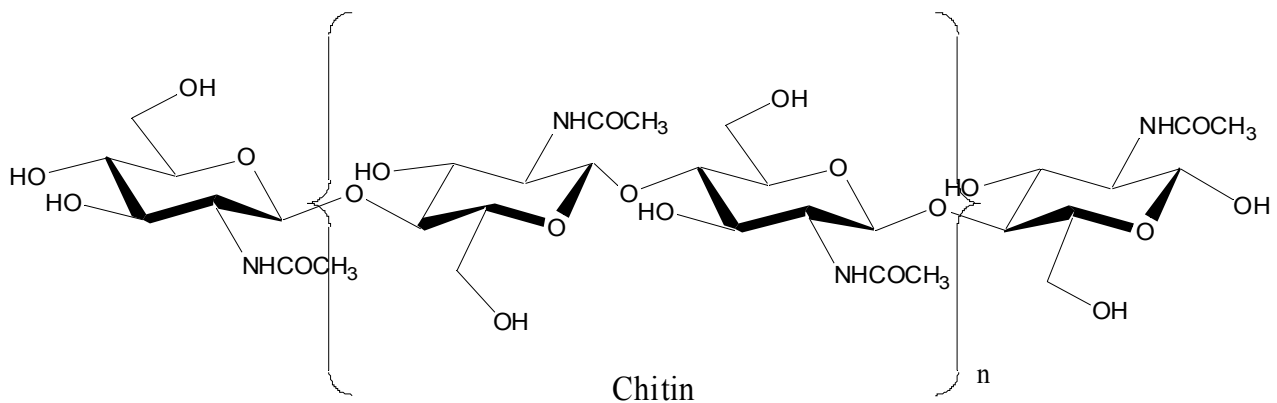
Chitin kommt wie Cellulose, Dextrin, Pektin, Alginsäure, Carrageen und Agar in der Natur vor und ist ein absolut wasserunlösliches Gerüstkohlenhydrat.



Chitin ist auch Bestandteil wichtiger Krankheitserreger, es wird in Zellwänden pathologischer Pilze, in Scheide und Pharynx von Filarien so wie in Eiern parasitischer Würmer gefunden. Säugetiere und Pflanzen haben als Abwehrmaßnahme chitinabbauende Enzyme entwickelt, die „Chitinasen“.

Chitosan [15],[19]

Im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden Polysacchariden wie Chitin, Agar, Pektin und Alginsäure, die neutral oder sauer reagieren, ist Chitosan, welches aus Chitin mittels Deacetylierung durch Alkali gewonnen wird, ein stark basisches Polysaccharid.



Chitosan ist ein lineares Polysaccharid, in dem eine D-Glucosamin-1,4-glucosamin Polysaccharidkette statistisch von ebenfalls β 1-4 glycosidisch verknüpftem N-Acetyl-D-glucosamin unterbrochen wird. Es gibt eine Reihe von Chitosan-Präparaten, die sich in Molekulargewicht (10 000- 2 000 000 Da), Deacetylierungsgrad (40%-98%) und ihrer Viskosität unterscheiden.

Nach Deacetylierung verbleiben reaktive Aminogruppen, die eine chemische Derivatisierung ermöglichen. Chitosan ist nicht toxisch oder allergen, daher die Zulassung als Lebensmittelzusatz. Chitosan weist eine Reihe von medizinisch

interessanten Eigenschaften auf, wie zum Beispiel anti-mikrobielle Aktivität, anti-tumor Aktivität, hämostatische Aktivität und Förderung der Wundheilung. Pharmazeutisch technologisch wird Chitosan vielfältig genutzt: als Füllstoff bei der Direkttablettierung, zur Herstellung von Tabletten mit modifizierter Freisetzung, zur Nassgranulierung, als Gelbildner und zur Wundversorgung.

1.2 Prebiotika: [22], [23]

Prebiotika sind definiert als:

Nicht verdaubare Lebensmittelbestandteile, die ihren Wirt günstig beeinflussen, indem sie das Wachstum und / oder die Aktivität einer oder mehrerer Bakterienarten im Dickdarm gezielt anregen und somit die Gesundheit des Wirts verbessern. (Gibson and Roberfroid, 1995).

Die Prebiotika sind Kohlenhydrate. Prebiotika gehören neben Probiotika zu den häufigsten Lebensmittelzusätzen. Prebiotika stellen eine selektive Nahrungsgrundlage für Darmbakterienarten dar, und können auf diese Weise gezielt die Zusammensetzung der Darmflora positiv beeinflussen. Die Prebiotika Inulin und Oligofructose werden industriell aus der Wurzelzichorie (Chicoree) hergestellt. Inulin und Oligofructose werden auch in der Tierfütterung verwendet.

1.3 Glycosaminoglykan: [1],[3]

Proteoglycane bestehen aus Proteinen, die an bestimmte Formen von Polysacchariden, die Glycosaminoglycane, gebunden sind. Früher hat man die Glycosaminoglycane als Mucopolysaccharide, bezeichnet.

Die Proteoglykane dienen als Gleitmittel in Gelenken und als Strukturbestandteile von Bindegewebe. In anderen Geweben vermitteln sie die Adhäsion von Zellen an die extra zelluläre Matrix und binden Faktoren, welche die Zellproliferation anregen. Zu den am besten charakterisierten Vertretern dieser vielfältigen Klasse gehören die Proteoglykane in der extra zellulären Knorpelmatrix. Das Proteoglykan (Aggrekan) und das Protein (Kollagen) sind wesentliche Bestandteile des Knorpels. Der proteolytische Abbau von Aggrekan und Kollagen kann zu Osteoarthritis führen. Das Glycosaminoglykan kann bis zu 95% des Gewichtes der Proteoglykane ausmachen, und bestimmt hauptsächlich die Eigenschaften von Proteoglykan. Viele Glycosaminoglykane bestehen aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten die ein sulfatiertes Derivat eines Aminozuckers enthalten. Somit gelten sie auch als anionische Polysaccharide, die aus repetitiven Disaccharideinheiten bestehen. Die wichtigsten Glycosaminoglykane bei Tieren sind Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Heparin, Dermatansulfat und Hyaluronan (Hyaluronsäure).

1.4 Enzyme: [1],[3]

Enzyme-die Katalysatoren biologischer Systeme sind bemerkenswerte molekulare Werkzeuge, welche die Muster chemischer Umsetzungen bestimmen.

Die hervorstechendsten Eigenschaften der Enzyme sind ihre katalytische Aktivität und Spezifität. Die Katalyse findet an einer bestimmten Stelle im Enzym statt, dem so genannten „aktiven Zentrum“. Enzyme sind meist Proteine obwohl Proteine jedoch kein absolutes Monopol für die Katalyse besitzen.

Die hohe Effizienz der Katalyse verschiedenster chemischer Reaktionen beruht auf ihrer Fähigkeit, spezifisch ein sehr breites Spektrum an Molekülen zu binden.

Sie bringen Substrate in optimale Orientierung zueinander und schaffen so die Voraussetzung für das Knüpfen und Lösen chemischer Bindungen.

Enzyme beschleunigen Reaktionen um das Millionenfache oder mehr. Ohne sie würden die meisten Reaktionen in biologischen Systemen nicht in wahrnehmbaren Umfang ablaufen.

Enzyme spielen eine zentrale Rolle im Stoffwechsel aller lebenden Organismen.

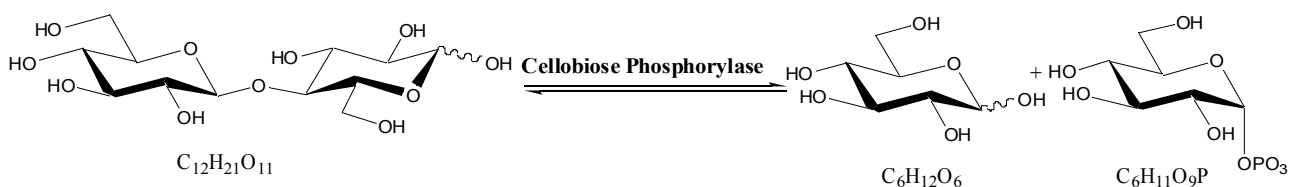
Nahezu alle biochemische Reaktionen werden von Enzymen kontrolliert, bekannte Beispiele sind Glycolyse, Zitratzyklus, Atmungskette, Photosynthese, Transkription und Translation sowie die DNA-Replikation. Enzyme wirken nicht nur als Katalysatoren, sie sind auch wichtige Regulation- und Kontrollpunkte im Stoffwechselgeschehen. Daher werden auch angeborene Stoffwechseldefekte durch

enzymatische Überprüfung diagnostiziert. Die Bedeutung von Enzymen beschränkt sich nicht nur auf den Stoffwechsel, sie sind auch bei der Reizaufnahme und Reizweitergabe wichtig. Enzyme vermitteln auch Signaltransduktion innerhalb der Zelle. Außerdem haben fast alle Rezeptoren enzymatische Funktion.

Der Abbau von Polysacchariden kann durch Endo- und Exoenzyme, sowohl durch ein Enzym als auch durch ein Enzymgemisch erfolgen. Exoenzyme spalten Monosaccharide vom nicht reduzierenden Ende einer Zuckerkette ab, während Endoenzyme Bindung im inneren der Zuckerkette spalten.

1.4.1 Cellobiose Phosphorylase (CeP): [21]

Cellobiose Phosphorylase ist ein Enzym aus der Familie Glycotransferasen. Es katalysiert die Hydrolyse von Cellobiose unter Bildung von α -D-Glukose-1-phosphat und D-Glukose. Cellobiose Phosphorylase kann auch in Umkehr der Hydrolysereaktion zur Synthese von Cellobiose bzw. Cellobiose-Derivaten verwendet werden.



Früher wurde es aus dem Bakterium *Colostridium thermocellum* gewonnen, in den letzten Jahren wird es öfter auch aus zwei anderen Bakterien, nämlich *Ruminococcus flavefaciens* und *Cellvibrio gilvus*, gewonnen.

2 Experimenteller Teil

2.1 Methoden

2.1.1 Dünnschichtchromatographie: [7],[8],[12]

Die Dünnschichtchromatographie (DC) dient zur Trennung sowie zur qualitativen und quantitativen Analyse von Substanzen. Als stationäre Phase dienen Feststoffe oder an Feststoffe adsorbierte Flüssigkeiten, als mobile Phase werden Flüssigkeiten verwendet. Die Trennung erfolgt je nach stationärer Phase durch Adsorption oder Verteilung. Die stationäre - Phase (Sorbens) wird als dünne Schicht auf einen Träger aufgebracht (Dünnschichtplatten, Standard 5x10 cm). Als Plattengrund (Träger) werden Glasplatten oder Folien angeboten. Als Schichtmaterial für die stationäre Phase bei der Dünnschichtchromatographie werden hauptsächlich Aluminiumoxid und Kieselgel verwendet. Die zu untersuchende Substanz wird als Lösung auf eine Zone am unterem Rand der Platte aufgetragen (Start, Startpunkt) und in einen Trog (Entwicklungskammer) gestellt, der die mobile Phase (das Fließmittel) enthält. Die DC-Platte wird im Allgemeinen nach dem aufsteigenden Verfahren entwickelt, das heißt die DC-Platte wird so in die Entwicklungskammer gestellt, dass das Lösungsmittel die DC-Platte unterhalb der Startlinie benetzt. Das Lösungsmittel steigt auf Grund von Kapillarkräften und transportiert das zu trennende Stoffgemisch.

Nach der Entwicklung wird die DC-Platte aus der Kammer genommen, getrocknet und die getrennten Substanzen nachgewiesen (detektiert). Zur Sichtbarmachung wird die DC-Platte mit einem modifizierten Anisaldehyd-Schwefelsäure-Sprühareagens (Anisaldehyd, 0.5 ml; Ethanol, 9 ml konz. H_2SO_4 , 0.5 ml; Eisessig, 0.1 ml) besprüht. **Ref. :** K.G. Krebs, D. Heusser, und H. Wimmer Sprühreagentien , 813-859. In: B.A. Lewis und F.Smith, Zucker und Derivate, in: Dünnschichtchromatographie, ein Laboratoriumshandbuch, Ed. E. Stahl, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New- York 1967; 769-798.

Das Sprühen sollte unter einem gut ziehenden Abzug zum Abführen der giftigen oder aggressiven Reagensnebel und Lösungsmitteldämpfe erfolgen. Nach dem Aufbringen des Sprühareagens wird das Chromatogramm auf einer Heizplatte erhitzt, um die Reaktion zu beschleunigen. Nach dem Sichtbarmachen ist es sinnvoll, die Flecken sofort zu kennzeichnen, denn sie können verblassen oder ihre Farbe verändern. Mit Hilfe des R_f -Wertes

$$R_f = \frac{\text{Abstand Startpunkt-Substanzfleck}}{\text{Abstand Startpunkt-Laufmittelfront}}$$

wird die DC ausgewertet.

Für die graphische DC-Darstellung wurden die besprühten Platten mit Hilfe eines Hewlett-Packard HP Psc 700 Serienscanners gescannt und unter Verwendung des Programms Adobe Photoshop 5.5 gedruckt.

2.1.2 Säulenchromatographie: [10],[11]

Bei der klassischen Säulenchromatographie fließt das Elutionsmittel aufgrund des hydrostatischen Druckes von oben nach unten durch die mit der stationären Phase gefüllte Trennsäule. Voraussetzung für die chromatographische Trennung ist eine ausreichende Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase, die durch die Schwerkraft zustande kommt. Die Trennleistung der Säule hängt stark von der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung der stationären Phase ab. Kleinere und gleichmäßig geformte Teilchen führen zu einer hohen Trennleistung. Das zu trennende Gemisch wird als Lösung auf das obere Ende der Säule aufgebracht und mit dem Elutionsmittel durch die Säule transportiert. Die Säule darf mit der Probenmengen nicht überladen werden, sonst erhält man unvollständige und nicht reproduzierbare Trennungen. Die Komponenten der aufgetragenen Probe werden durch kontinuierliches Nach waschen mit dem Eluens in der Säule getrennt. Wenn die aufgetrennten Verbindungen mit dem Lösungsmittel aus der Säule austreten, werden sie in kleine Fraktionen aufgeteilt, welche dann analysiert werden. Die Fraktionen einer bestimmten Verbindung werden dann wieder zusammen gegeben.

2.1.3 Polarimetrie: [8],[9]

Die Messung von optischen Drehwerten wurde mit Hilfe eines „Perkin Elmer 341“ Polarimeters ausgeführt. In der Polarimetrie wird die Drehung der Schwingungsebene des linear polarisierten Lichtes durch optische aktive Substanzen gemessen (optische

Drehung) und zur Analyse herangezogen. Licht, das nur in einer Ebene schwingt nennt man linear polarisiert; seine Erzeugung aus natürlichem Licht bezeichnet man als Polarisation. Optisch aktive Substanzen drehen die Schwingungsebene des linear polarisierten Lichtes entweder nach rechts (im Uhrzeigersinn, positiv, Symbol +) oder nach links (entgegen dem Uhrzeigersinn, negativ, Symbol -). Den Winkel α , um den die Schwingungsebene gedreht wird, bezeichnet man als Winkel der optischen Drehung bzw. Drehwinkel. Die optische Drehung wird konventionell in Grad (°) gemessen. Die Messung der Drehung fester Substanzen wird in Lösung vorgenommen. Charakteristische Größe ist die spezifische Drehung $[\alpha]$.

Die optische Drehung einer optisch aktiven Substanz ist von folgenden Faktoren abhängig:

1. Wellenlänge des polarisierten Lichtes
2. Temperatur
3. Lösungsmittel
4. Schicht dicke der durch strahlten Lösung Konzentration
5. Konzentration

Berechnung der spezifischen Drehung:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \alpha \cdot 1 / c \cdot I$$

α = gemessener Drehungswinkel [Grad]

c = Konzentration [g/ 100 ml]

I = Schicht dicke [dm]

2.1.4 NMR-Spektroskopie: [8]

NMR-Spektren wurden mit einem NMR-Spektrometer von Bruker durchgeführt.

Die Kalibrierung wurde an den internen Standards der Lösungsmittel

durchgeführt (^1H -NMR: CHCl_3 in CDCl_3 7.24 ppm, H_2O in D_2O 4.79 ppm;

^{13}C -NMR: CDCl_3 77.00 ppm). Die chemische Verschiebung (δ) wird in ppm

angegeben, die Kupplungskonstante J in Hertz (Hz).

a) ^1H -NMR-Spektroskopie:

In der Kernresonanzspektroskopie (englisch: nuclear magnetic resonance spectroscopy; Abkürzung: NMR-Spektroskopie) wird das Verhalten von Atomkernen in Magnetfeldern beobachtet. Untersucht man Wasserstoffkerne (Protonen), so spricht man von Protonenresonanzspektroskopie (^1H -Kernresonanzspektroskopie, ^1H -NMR-Spektroskopie). Für die Kerne der in einem Molekül gebundenen Wasserstoffatome gibt es im Magnetfeld zwei verschieden

Einstellungsmöglichkeiten: eine energiereichere und eine energieärmere. Durch Zufuhr von Energie können die in der energieärmeren Stellung befindlichen Atomkerne in die energiereichere Stellung übergehen und anschließend unter Abgabe dieser Energie wieder in die energieärmere Stellung zurückkehren. Die Energiezufuhr erfolgt durch Einwirkung elektromagnetischer Strahlung. Die Kerne nehmen diese Energie nur auf, wenn sie zur Überführung in den energiereicheren Zustand gerade ausreicht (Kernresonanz, Protonenresonanz). Die Energieaufnahme wird im Kernresonanzspektrum registriert.

Die Größe der zur Kernresonanz notwendigen Energie und damit die Lage des

Signale im Kernresonanzspektrum, die chemische Verschiebung, hängt von den Bindungsverhältnissen des betreffenden Atoms ab. Durch den Einfluss benachbarter Wasserstoffatome können Kernresonanzsignale in mehrere Teilsignale aufgespalten werden (Spin-Kopplung). Aus der Lage der Signale und ihrer Aufspaltung erhält man Informationen über Anordnung und Eigenschaften der Wasserstoffatome innerhalb organischer Moleküle.

b) ^{13}C -NMR-Spektroskopie:

Die NMR-Spektroskopie an Kohlenstoffkernen erfordert mehr apparativen Aufwand als die Protonresonanz-Spektroskopie. Das „normale“ Kohlenstoffisotop ^{12}C besitzt keinen resultierenden Kernspin (Drehung der Atomkerne um ihre eigene Achse) und ist daher der Kernresonanzmessung nicht zugänglich. Messbar ist dagegen das Kohlenstoffisotop ^{13}C . Wie die Wasserstoffkerne zeigt es ein Spinmoment von $I=1/2$. Damit gelten prinzipiell die gleichen Gesetzmäßigkeiten wie in der ^1H -NMR-Spektroskopie. Jedoch bestehen bei ^{13}C -NMR-Messung erhebliche Schwierigkeiten bezüglich der Empfindlichkeit:

- Die Konzentration der durch Kernresonanz erfassbaren ^{13}C -Atome ist mit 1.1% bezogen auf natürlichen Kohlenstoff sehr gering.
- Das magnetische Moment des ^{13}C -Kern beträgt nur ca. $1/4$ des Protons (die ^{13}C -Kernmagnete sind nur etwa „ein Viertel so stark“, wie die Protonen-Kernmagnete).

2.1.5 Trocknen der Lösungsmittel und Reagenzien

- Chloroform: Chloroform wird 4h unter Rückfluss Über di-Phosphopentoxid (P_2O_5) erhitzt und anschließend unter Ausschluss von Feuchtigkeit destilliert.
- Dichlormethan: Dichlormethan wird 4h unter Rückfluss über Kalziumhydrid erhitzt und anschließend unter Ausschluss von Feuchtigkeit destilliert.
- Pyridin: Pyridin wird 4h unter Rückfluss über Kalziumhydrid erhitzt und anschließend unter Ausschluss von Feuchtigkeit destilliert.
- Acetonitril: Acetonitril wird 4 h unter Rückfluss über Kalziumanhydrid erhitzt und anschließend unter Ausschluss von Feuchtigkeit destilliert.
- Methanol: Methanol wird 4 h unter Rückfluss über Magnesiummethyllat erhitzt und anschließend unter Ausschluss von Feuchtigkeit destilliert.

2.1.6 Schmelzpunktbestimmung:

Schmelzpunkte werden auf einer Kofler-Heizbank bestimmt und sind unkorrigiert.

2.2 Materialien

Glycon Biochemicals GmbH, Biotechnology-Luckenwalde:

β -D-Glucose

Cellobiose

Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim:

Ce-(IV) Ammonium nitrat

Bromwasserstoff (33% Lösung in Essigsäure)

Celite 545

Chloroform (normales und getrocknetes)

Acetonitril (getrocknetes)

Diethyl ether

Essigsäure-anhydrid

n-Hexan

Kupfer-(II)-sulfat

Magnesiumsulfat wasserfrei

Methanol

Natrium-azid

Natrium-bicarbonat

Natriummethylatlösung (getrocknetes Methanol + Natrium)

Pyridin (getrocknetes)

Toluol

Zn-Staub

Sigma-Aldrich-Laborchemikalien, Seelze , Deutschland:

Dichlormethan (normales und getrocknetes)

Essigsäure

Essigsäure 100% reinst

Natrium-acetat

Alfa Aesar GmbH&Co.KG:

Silica gel

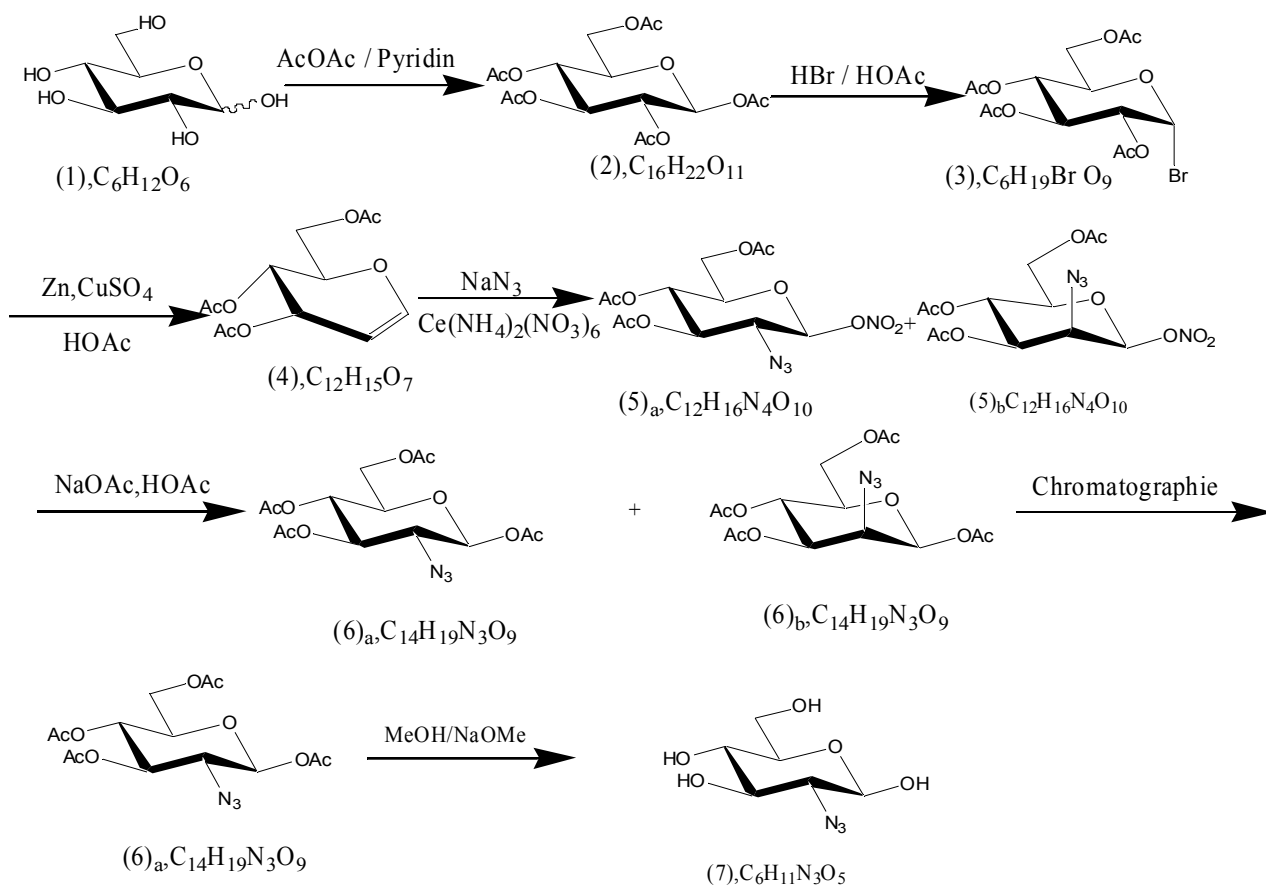
Fluka Chemie GmbH:

Natrium-chlorid

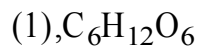
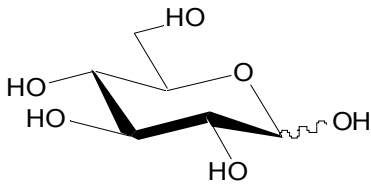
2.3 Die Chemischen Synthesen

2.3.1 Chemische Synthese von 2-Azido-2-desoxy-D-glucose:

Überblick 1



(1) β -D-Glucose:

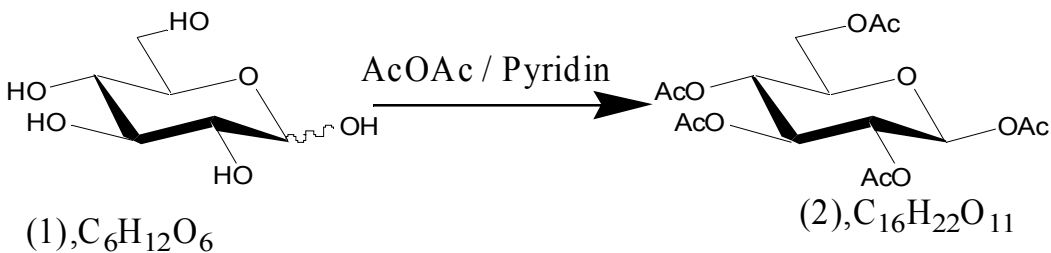


Bezogen von GLYCON Biochemicals GmbH, Biotechnology, Luckenwalde.

Charakterisierung:

Schmelzpunkt: 146-148 °C

(2) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- β -D-glukopyranose:



Komponente (1) (30 g, 0.1667 Mol) wird in getrocknetem Pyridin (150 ml) gelöst und Essigsäureanhydrid (150 ml) zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wird in einem mit einem Trockenrohr verschlossenen Rundkolben im Eiswasserbad gekühlt und über Nacht gerührt. Mittels Dünnschichtchromatographie (Essigsäureethylester/ Toluol; 3:2) wird das Ende der Reaktion festgestellt.

Danach wird das Gemisch auf Eiswasser gegossen und gerührt, bis das Eis vollständig geschmolzen ist, und sich Kristalle ausgebildet haben. Diese werden unter Vakuum abfiltriert, wobei mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen wird, bis der Geruch von Pyridin vollständig entfernt ist. Man trocknet das Produkt im Exsiccator unter Vakuum und erhält so 40.44g (81%) von Komponente (2) .

Charakterisierung:

DC (Essigsäureethylester/Toluol;3:2)

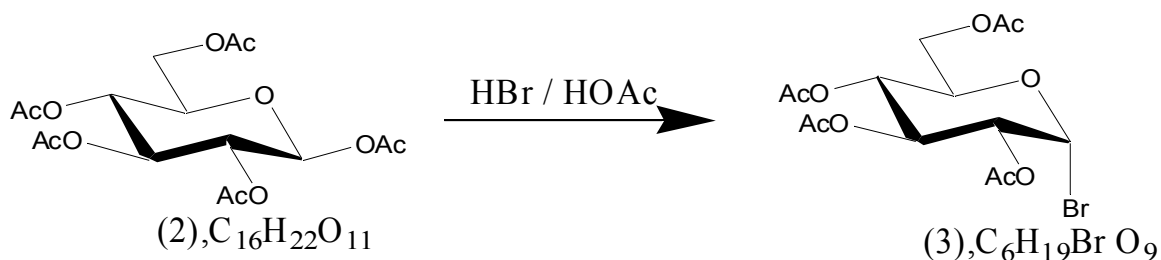
$R_f(1) = 0.01$

$R_f(2) = 0.67$

Schmelzpunkt: 86-87 °C

(2) spezifischer Drehwert $[\alpha]_D = + 30,5^\circ$ (CHCl_3 ; 0.41g / 100 ml)

(3) 1-Bromo-1-desoxy-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glukopyranose:



In einem Rundkolben werden (10.2 g, 0.026 Mol) von gut eingetrockneter Komponente (2) in getrocknetem Chloroform (100 ml) gelöst. Aus einem mit einem Trockenrohr verschlossenen Tropftrichter werden 16 ml HBr Lösung (33% in Essigsäure) langsam zu getropft (Tropfgeschwindigkeit: 100 ml/Stunde), während das Reaktionsgemisch in Eiswasserbad gekühlt und über Nacht gerührt wird. Das Ende der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie (Essigsäureethylester/ n-Hexan; 1:1) festgestellt.

Dann wird das Gemisch mit 100 ml Dichlormethan versetzt, mit 2x100ml Eiswasser und 2x100ml 10%-iger Natriumbicarbonatlösung gewaschen, und mit gesättigter Natriumbicarbonat Lösung neutralisiert. Die Dichloromethan Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, über ein Faltenfilter filtriert und am Rotavapor eingedampft. Man erhält 10.16g (100%) von Komponente (3).

Charakterisierung

DC (Essigsäureethylester/n-Hexan; 1:1)

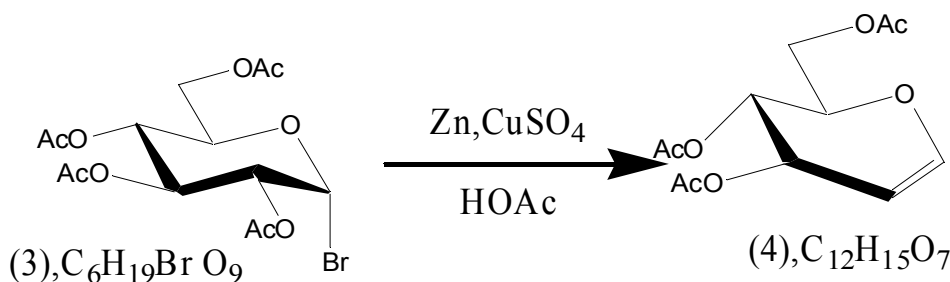
$R_f(2) = 0.83$

$R_f(3) = 0.90$

Schmelzpunkt: 89-91°C

(3) spezifischer Drehwert $[\alpha]_D = +194^\circ$ (CHCl_3 ; 1.00 gm/ 100 ml)

(4) 3,4,6-Tri-O-acetyl-D-glycal:



Von der Komponente (3) werden (10g, 24.33 Mol) in (160 ml) Essigsäure gelöst, und mit Kupfersulfat (1.8 g in 20 ml destilliertem Wasser) und (30 g) Zn-Staub versetzt. Man rührt das Reaktionsgemisch zunächst für 30 Minuten im Eiswasserbad und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Das Ende der Reaktion wird anhand einer Dünnschichtchromatographie (Essigsäureethylester/n-Hexan, 1:1) festgestellt (das Edukt ist innerhalb von 20 Stunden vollständig umgesetzt). Das Gemisch wird über Celite 545 unter Vakuum filtriert, und das Celite mit 3x100 ml destilliertem Wasser gewaschen. In einem Scheidetrichter wird das Produkt aus dem Filtrat mit 3x100 ml Chloroform extrahiert und, die Chloroformphase mit 1x100 ml destilliertem Wasser und mit gesättigter Natriumbicarbonat Lösung gewaschen. Die Chloroformphase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, über Faltenfilter filtriert und am Rotavapor eingedampft. Da das Produkt nicht rein war, wurde es mittels Säulenchromatographie (Fließmittel; Essigsäureethylester/Toluol; 3:2) gereinigt.

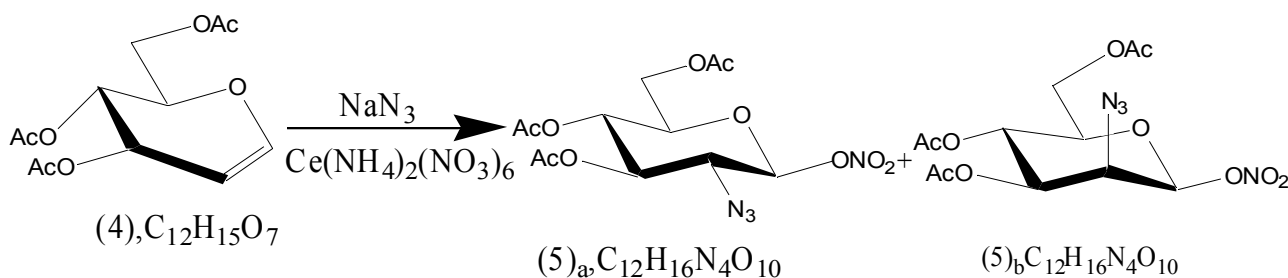
Charakterisierung

DC (Essigsäureethylester/Hexan; 1:1)

R_f(3) = 0.79

R_f(4) = 0.41

(5) 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy-1-nitro-D-glucopyranose:



In einem Rundkolben wird ein Gemisch von Natriumazid (1.45g, 21.77mmol), und Cer (IV) ammonium nitrat in einem Bad von Trockeneis / gesättigter Natriumbicarbonat gekühlt. Aus einem mit einem Trockenrohr verschlossenen Tropftrichter wird eine Lösung von Komponente (4) (3.95g, 14.5 mMol) in (100ml) CH_3CN zu dem Gemisch zu getropft, die Reaktionstemperatur sollte zwischen (-15°C und -20°C) sein. Der Verlauf der Reaktion wird anhand von Dünnschichtchromatographie (Essigsäureethylester/n-Hexan; 1:1) beobachtet. Um den Fleck des Produkts besser sichtbar zu machen, wird 1ml des Gemisches mit Diethylether extrahiert, mit destilliertem Wasser gewaschen und dann ein Tropfen der Etherphase auf die DC-Platte aufgetragen. Das Edukt ist innerhalb von 6 Stunden vollständig umgesetzt. Das Produkt wird mit (120 ml) kaltem destilliertem Wasser verdünnt, mit (120 ml) kaltem Diethylether extrahiert und über Celite 545 filtriert, wobei das Celite 545 mit 3 x 50 ml Diethylether gewaschen wird. Die Diethylether Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, durch ein Faltenfilter filtriert und am Rotavapor eingedampft. Man erhält 3.90g (100%) von Komponente (5).

Charakterisierung:

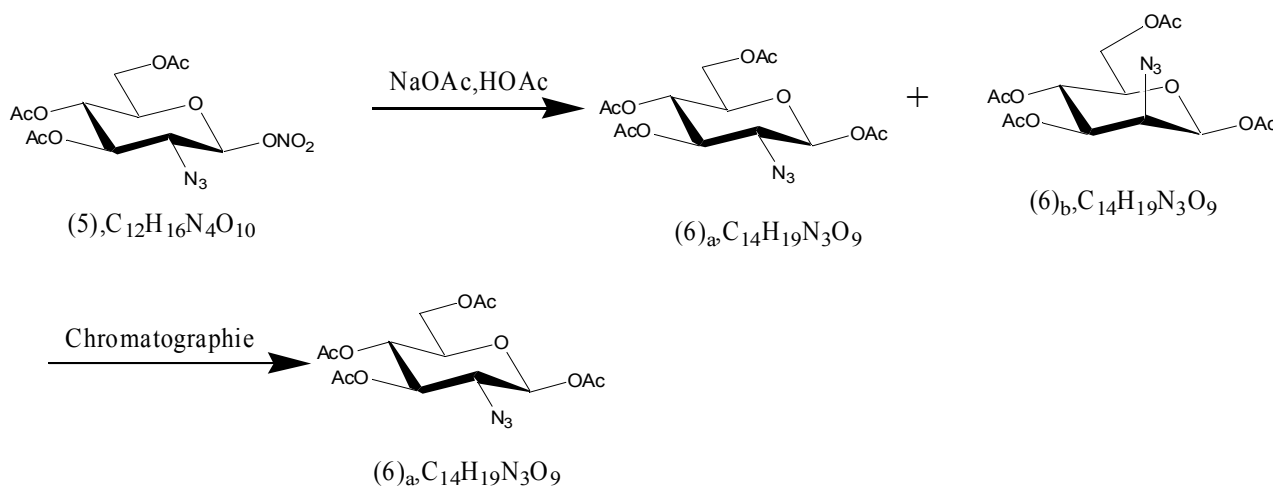
Das Produkt besteht aus dem Gluco- und Manno-Isomer, welche auf der Nitratstufe chromatographisch nicht trennbar sind. Die chromatographische Trennung gelingt erst nach Überführung des Nitratgemisches in das Gemisch der 1-O-Acetate.

DC (Nitrate, Essigsäureethylester/n-Hexan; 1:1)

$R_f(4) = 0.67$

$R_f(5) = 0.75$

(6) 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-azido-2-desoxy-D-glucopyranose:



In einem Rundkolben werden (3.90 g, 10.36 Mol) von Komponente (5) in (30 ml) Essigsäure (reinst 100%) gelöst und (2 g) Natriumacetat zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wird unter Rückfluss im Ölbad erhitzt (120 °C) und gerührt. Der Verlauf der Reaktion wird mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

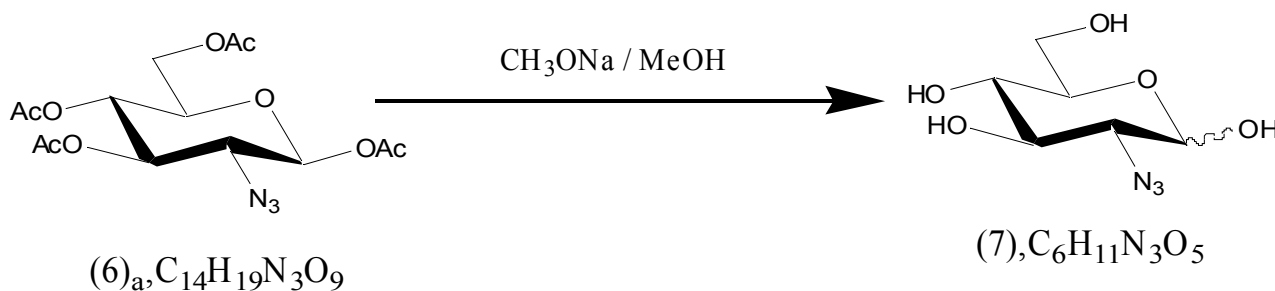
(Essigsäureethylester/n-Hexan; 3:2) verfolgt. Um den Produktfleck besser sichtbar zu machen, wird 1 ml des Gemisches mit Dichlormethan und destilliertem Wasser gewaschen und mit gesättigter Natriumbicarbonat neutralisiert; anschließend wird ein Tropfen davon auf die DC-Platte aufgetragen. Das Edukt ist innerhalb von 6 Stunden vollständig umgesetzt. Das Gemisch wird gekühlt. Das Produkt wird mit 2x100 ml Dichlormethan extrahiert, die Dichlormethanphase mit 2x100 ml destilliertem Wasser gewaschen und mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung neutralisiert. Die Dichlormethanphase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, durch ein Faltenfilter filtriert und am Rotavapor eingedampft. Man erhält 3g (75%) der Komponente (6). Das Produkt besteht aus drei Isomeren. Diese werden mittels Säulenchromatographie (Fließmittel; Essigsäureethylester/ n-Hexan; 1:1) von einander getrennt und gereinigt. Aufgrund der R_f -Werte und mittels Bestimmung der spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D$ sind die Gluco- und Mannoisomere von einander unterscheidbar. Man erhält 1.33g (44%) von (6)_a (Anomerengemisch der Gluco-Azidoacetate), und 1.36g (45%) von (6)_b (Manno-Azidoacetat).

Charakterisierung:

DC (Essigsäureethylester/n-Hexan; 3:2)	$R_f(5) = 0.65$
	$R_f(6)_a = 0.47$
	$R_f(6)_b = 0.58$

Schmelzpunkt: 178-180 °C

(7) 2-Azido-2-desoxy-D-glucose:



Komponente (6)_a (1.33 g) wird in (20 ml) getrocknetem Methanol ausgelöst. Die Lösung wird in einem mit einem Trockenrohr verschlossenen Rundkolben mit (5g) Natriummethylatlösung umgesetzt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur magnetisch gerührt. Mittels Dünnschichtchromatographie (Essigsäureethylester/Toluol; 1:1) wird das Ende der Reaktion festgestellt. Die optimale Reaktionszeit beträgt 1 Stunde.

Das Reaktionsgemisch wird mittels Dowex 50- H⁺-Ionenaustauscher neutralisiert. Danach wird die Lösung über Faltenfilter filtriert und am Rotavapor eingedampft. Das Produkt wird im Vakuumexsikkator getrocknet.

Charakterisierung:

DC (Essigsäureethylester/Toluol; 1:1) R_f(6) = 0.50

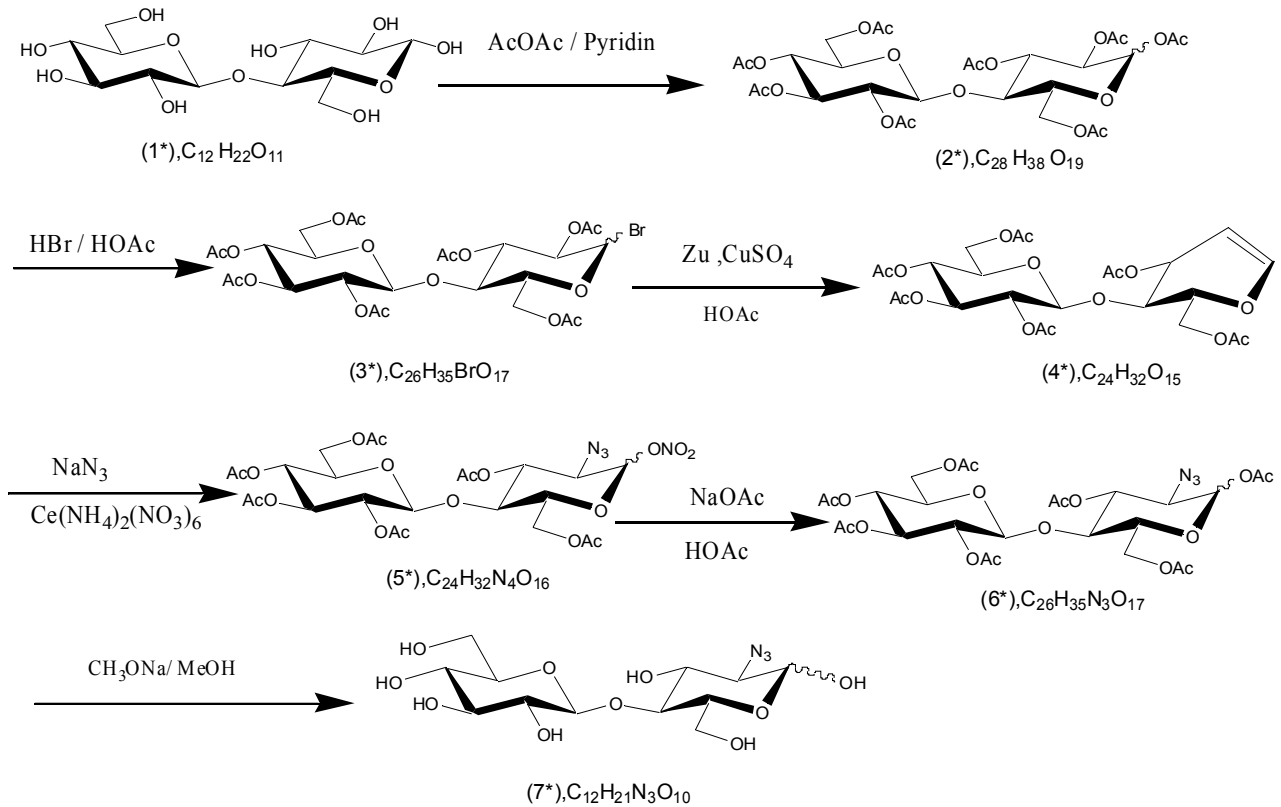
R_f(7) = 0.00

Schmelzpunkt: 188-190 °C

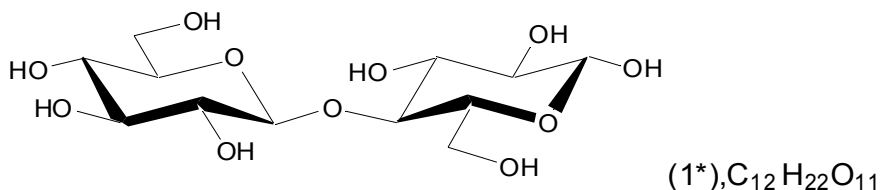
Danach muss Komponente (7) in Gegenwart von verdünnter Salzsäure hydriert werden. Man erhält dann Glucosaminhydrochlorid.

2.3.2 Chemische Synthese von 2-Azido-2-desoxy-cellobiose:

Überblick 2



(1*) Cellobiose:

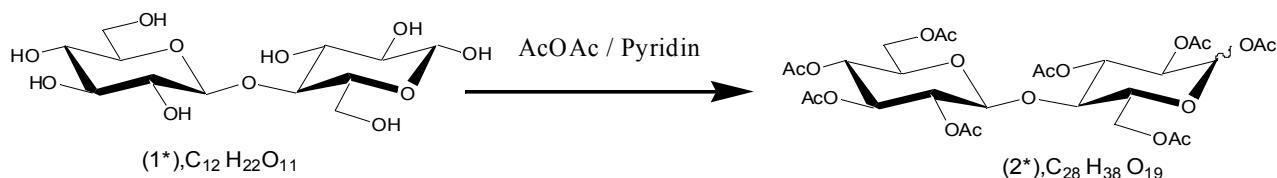


Bezogen von Glycon Biochemicals GmbH Biotechnology- Luckenwalde.

Charakterisierung:

Schmelzpunkt: 239-241 °C

(2*) Cellobiose-octa-acetat:



Komponente (1*) (50 g) wird in getrocknetem Pyridin (150 ml) gelöst und mit Essigsäureanhydrid (150 ml) umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wird in einem mit einem Trockenrohr verschlossenen Rundkolben im Eiswasserbad gekühlt und über Nacht gerührt. Mittels Dünnschichtchromatographie (Essigsäureethylester/ Toluol; 3:2) wird das Ende der Reaktion festgestellt.

Danach wird das Gemisch auf Eiswasser gegossen und gerührt, bis das Eis vollständig geschmolzen ist und sich Kristalle gebildet haben.

Diese werden unter Vakuum abfiltriert, wobei mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen wird. Um Pyridin vollständig zu entfernen, wird das Produkt in Chloroform gelöst und mit destilliertem Wasser (5x je 100 ml), Kaliumhydrogensulfatlösung, und gesättigter Natriumcarbonat Lösung (1 x 100 ml) extrahiert. Die Chloroformphase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, durch ein Faltenfilter filtriert und am Rotavapor eingedampft. Man trocknet das Produkt in einem Vakuumexsiccator. Man wiegt es alle drei Stunden bis zur Gewichtskonstanz und erhält so 27.04g (54%) der Komponente (2*). Die Mutter lauge wird portionsweise eingedampft. Das Produkt wird in Toluol (20ml) aufgenommen und wieder eingedampft, um den Rest von Wasser und Pyridin vollständig zu entfernen. Der Rückstand wird in einem Exsiccator getrocknet. Man erhält (21.72g) von unreaktiertem und teilweise reagiertem Material. Der Rückstand wird in (65 ml) getrocknetem Pyridin gelöst und mit (65 ml) Essigsäureanhydrid umgesetzt. Das Gemisch wird im Eiswasserbad gekühlt und über Nacht gerührt. Nach Kontrolle der vollständigen Umsetzung mittels Dünnschichtchromatographie wird das Gemisch auf Eiswasser gegossen und gerührt, die gebildeten Kristalle unter Vakuum abfiltriert und in einem Exsiccator getrocknet. Man erhält (22.53 g). Durch eine Dünnschichtchromatographische Kontrolle (Ethylessigsäure/ Toluol; 3:2) wird festgestellt, dass die beiden Produkte identisch sind. Insgesamt erhält man (27.04 + 22.53 = 49.57 g; 99.14%) von Komponente (2*).

-

Charakterisierung:

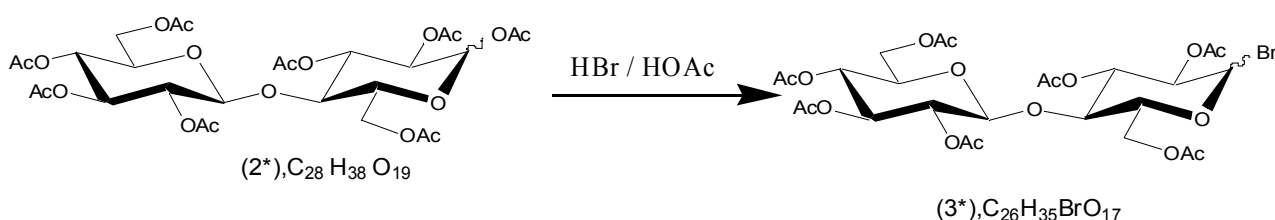
DC (Essigsäurethylester/ Toluol; 3:2)

$R_f(1^*) = 0.01$

$R_f(2^*) = 0.53$

Schmelzpunkt: 189-190 °C

(3*) α - Cellobiosyl-bromid- hepta-acetat :



In einem Rundkolben wird Komponente (2*) (49.57 g) in getrocknetem Chloroform (120 ml) gelöst. Aus einem mit einem Trockenrohr verschlossenen Tropftrichter werden (80 ml) Bromwasserstoff Lösung (33% in Essigsäure) langsam zu getropft (Tropfgeschwindigkeit; 100 ml / Stunde), während die Reaktionslösung im Eiswasserbad gekühlt und gerührt wird. Der Verlauf der Reaktion wird anhand einer Dünnschichtchromatographie (Essigsäureethylester / Toluol; 3:2) beobachtet. Das Edukt ist innerhalb von 4 Stunden vollständig umgesetzt. Das Produkt wird auf Eiswasser gegossen, mit Chloroform extrahiert und und die Chloroformlösung mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung gewaschen. Die Chloroform Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, durch ein Faltenfilter filtriert und und am Rotavapor eingedampft. Man erhält so 25.78 g (51%) von Komponente (3*).

Hinweise:

Komponente (3*) ist sehr instabil. Man sollte gleich den nächsten Schritt durchführen oder das Bromid im Kühlraum aufbewahren.

Charakterisierung:

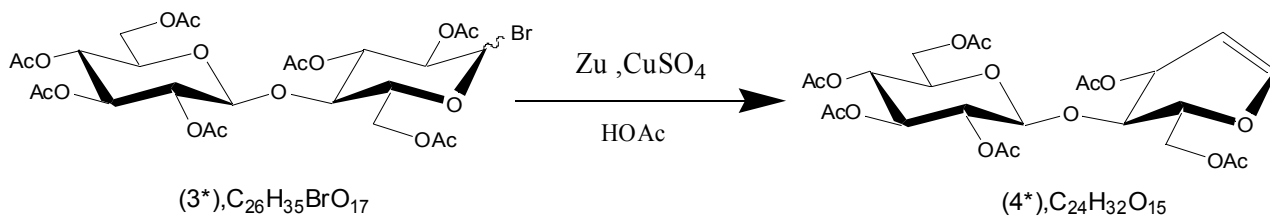
DC(Essigsäureethylester/Toluol; 3:2)

$R_f(2^*) = 0.52$

$R_f(3^*) = 0.60$

Schmelzpunkt: 190-191 °C

(4*) Hexa-acetyl-D-Cellobial:



Probeversuch

Komponente (3*) (0.5 g) wird in einem Rundkolben in (8 ml) Essigsäure gelöst, mit Kupfersulfat (0.09 g in 2 ml destilliertem Wasser) und (1.5g) Zn-Staub versetzt, und im Eiswasserbad (0°C) für 30 Minuten und dann bei Raumtemperatur magnetisch gerührt. Eine Dünnschichtchromatographie (Essigsäureethylester/Toluol; 3:2) zeigt das Ende der Reaktion an, die etwa 3 Stunden dauert.

Das Gemisch wird über das Celite 545 unter Vakuum abfiltriert. Das Celite-545 wird

drei Mal mit Chloroform gewaschen, um das gesamte Produkt aus dem Celite vollständig zu erhalten.

In einem Scheidetrichter wird die Substanz mit 3 x je 15 ml Chloroform extrahiert.

Die organische Phase wird gesammelt, mit destilliertem Wasser, 10% -iger

Natriumbicarbonatlösung und mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung gewaschen

Die Chloroformphase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, durch ein Faltenfilter filtriert und am Rotavapor eingedampft. Da das Produkt nicht rein war, wurde es mittels Säulenchromatographie (Fließmittel; Essigsäureethylester/ n-Hexan; 1:1) gereinigt.

Dann wurde eine NMR-spektroskopische Messung (Prof. Holzer, Department für pharmazeutische Chemie) durchgeführt, um das Vorhandsein der Doppelbindung festzustellen. Da das Vorhandsein der Doppelbindung aus dem NMR-Spektrum gesichert ist (siehe; Spektrenanhang), wurde der Ansatz mit der Hauptmenge durchgeführt.

Hauptmenge:

In einem Rundkolben werden 25g der Komponente (3*) in (400 ml) Essigsäure gelöst, mit Kupfersulfat (4.5 g gelöst in 50 ml destilliertem Wasser) und (75g)

Zn-Staub vergesetzt, und in Eiswasserbad (0°C) für 30 Minuten und anschließend bei Zimmertemperatur gerührt. Nach der Feststellung des Endes der Reaktion wird das

Gemisch über Celite 545 filtriert, mit Chloroform extrahiert, mit destilliertem

Wasser und 10 % -iger Natriumbicarbonatlösung gewaschen, und mit gesättigter

Natriumbicarbonatlösung neutralisiert. Die Chloroform Phase wird über

Magnesiumsulfat getrocknet, durch ein Faltenfilter abfiltriert, und am Rotavapor

eingedampft. Dann wurde eine Säulenchromatographie durchgeführt (Fließmittel; Essigsäureethylester/n-Hexan; 1:1). Man erhält 16.16g (65%) von Komponente (4*).

Charakterisierung:

DC (Ethylelessigsäure/Toluol; 3:2)

$R_f(3^*) = 0.69$

$R_f(4^*) = 0.54$

Schmelzpunkt: 95-100 °C

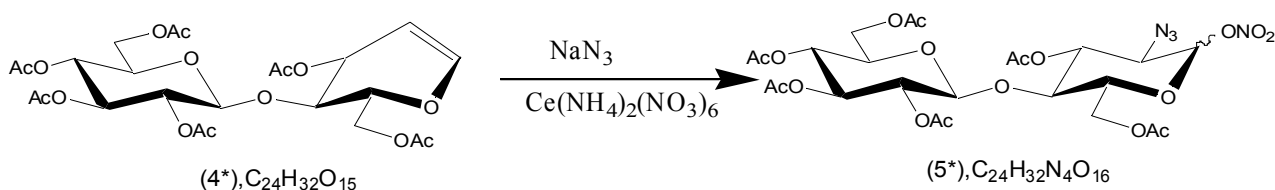
^1H -NMR-Spektroskopie: kalibriert auf CHCl_3 (CDCl_3), $\delta=7.26$ ppm

H	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'
ppm	6,39	4,8	5,4	3,97	3,13	4,43	4,67	4,96	5,17	5,07	3,67	4,05 4,29

^{13}C -NMR-Spektroskopie: kalibriert auf CDCl_3 , $\delta=77.0$ ppm

C	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
ppm	145,4	99	68,6	69,7	74,3	61,7	100,5	71,3	72,7	68	71,9	61,7

(5*) 2-Azido-2-desoxy-1- nitro -cellobiosyl-hexa-acetat:



Eine Lösung von Komponente (4*) (260 mg) in getrocknetem CH_3CN (5 ml) wird aus einem mit einem Trockenrohr verschlossenen Tropftrichter auf ein Gemisch von Natriumazid (250 mg) und Cer- IV-ammonium nitrat (750mg) langsam zu getropft (Tropfgeschwindigkeit; 100 ml/ Stunde). Das Reaktionsgemisch wird in einem Gemisch von Trockeneis und gesättigter Natriumchlorid Lösung gekühlt die Reaktionstemperatur sollte zwischen (-5°C und 0°C sein). Der Verlauf der Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Ethyllessigsäureester/ Toluol; 3:2) beobachtet. Um den Produktfleck besser sichtbar zu machen, wird die Dünnschichtprobe mit Diethylether und Wasser extrahiert und dann auf die DC-Platte aufgetragen. Die optimale Dauer der Reaktion ist 3 Stunden. Das Produkt wird mit (80ml) kaltem Diethylether und (80 ml) destilliertem Wasser verdünnt und über Celite 545 filtriert. In einem Scheidetrichter wird die Diethylether Phase gesammelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, durch ein Faltenfilter abfiltriert, und am Rotavapor eingedampft. Da das Produkt unrein war musste eine Säulenchromatographie (Fließmittel; Essigsäureethylester/ n-Hexan; 1:1) durchgeführt werden. Man erhält 90mg Kristalle (40.8%) der Komponente (5*) .

Charakterisierung:

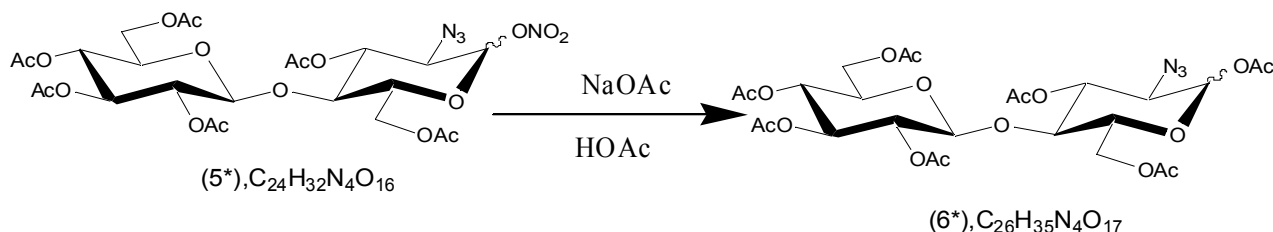
DC (Ethylessigsäureester/ Toluol; 3:2)

$R_f(4^*) = 0.58$

$R_f(5^*) = 0.41$

Schmelzpunkt: 99-100 °C

(6*) 2-Azido-2-desoxy-cellobiosyl- hepta-acetat:



In einem Rundkolben wird Komponente (5*) (1.2g) in (16 ml) Essigsäure (100%-reinst) gelöst und Natriumacetat (1 g) zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wird unter Rückfluss im Ölbad erhitzt (120°C) und magnetisch gerührt. Der Verlauf der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie (Essigsäureethylester / Toluol; 3:2) beobachtet. Um den Produktfleck besser sichtbar zu machen, wird 1 ml des Gemisches mit Dichlormethan verdünnt, und die Lösung mit destilliertem Wasser und gesättigter Natriumbicarbonatlösung gewaschen anschließend wird ein Tropfen auf die DC-Platte aufgetragen. Die Reaktion dauert ca. 4 Stunden.

Das Gemisch wird gekühlt und das Produkt wird mit 2x50 ml Dichlormethan extrahiert, die Dichlormethanphase wird mit 2x50 ml destilliertem Wasser gewaschen

und mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung neutralisiert, während das PH-Wert mittels pH-Papier kontrolliert wird.

Die Dichloromethan Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, durch ein Faltenfilter abfiltriert, und am Rotavapor eingedampft. Da das Produkt nicht rein war, wurde es mittels Säulenchromatographie (Fließmittel; Essigsäureethylester/Toluol; 1:1) gereinigt. Man erhält 680 mg (57%) von Komponente (6*).

Charakterisierung

DC (Ethyllessigsäureester/Toluol; 1:1) $R_f(5^*) = 0.48$

$R_f(6^*) = 0.31$

Schmelzpunkt: 218-221 °C

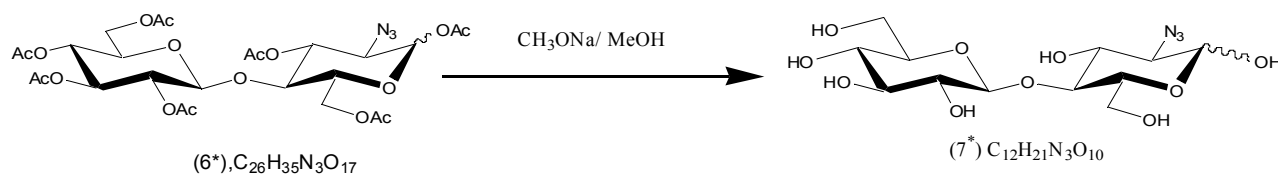
^1H -NMR-Spektroskopie: kalibriert auf CHCl_3 (CDCl_3), $\delta = 7.26$ ppm

H	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'
ppm	6,24	3,52	5,48	3,77	3,97	4,13	4,52	4,98	5,18	5,14	3,69	4,07 4,46

^{13}C -NMR-Spektroskopie: kalibriert auf CDCl_3 , $\delta = 77.0$ ppm

C	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
ppm	90	60,5	70	76,5	71	61,5	100,9	72	73	68	72,3	61,5

(7*) 2-azido-2-desoxy-cellobiose:



Komponente (6*) (360 mg) wird in (20 ml) getrocknetem Methanol ausgelöst. Die Lösung wird in einem mit einem Trockenrohr verschlossenen Rundkolben mit (25ml) Natriummethylatlösung umgesetzt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur magnetisch gerührt. Mittels Dünnschichtchromatographie (Essigsäureethylester/Toluol; 1:1) und (1-Propanol/Wasser; 17:3) wird das Ende der Reaktion festgestellt. Die optimale Reaktionszeit beträgt 1 Stunde .

Das Reaktionsgemisch wird mittels Dowex-50- H^+ -Ionenaustauscher neutralisiert. Danach wird die Lösung über Faltenfilter filtriert und am Rotavapor eingedampft. Das Produkt wird im Vakuumexsikkator getrocknet.

Charakterisierung:

DC (Essigsäureethylester/Toluol; 1:1) $R_f(6^*) = 0.36$

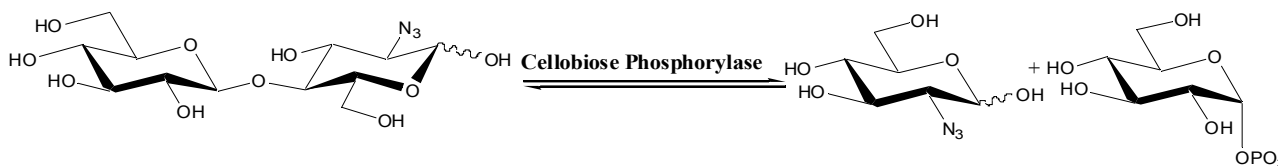
$R_f(7^*) = 0.00$

DC (1-Propanol/Wasser; 17:3) $R_f(6^*) = 0.8$

$R_f(7^*) = 0.64$

Danach muss Komponente (7*) in Gegenwart von verdünnter Salzsäure hydriert werden. Man erhält so denn das Hydrochlorid des Cellobiosamin.

2.4 Die enzymkatalysierte Synthese



Synthese von 2-Azido-2-deoxy-D-glucose:

(1.0 ml) von 2-Azido-2-desoxy-cellobiose Lösung in Methanol wurde zusammen mit (2 ml) Cellobiose Phosphorylase (CeP) und (0.8 ml) Phosphatpuffer pH 7.0 bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Synthese von 2-Azido-2-deoxy-cellobiose:

(1.0 ml) von 2-Azido-2-desoxy-D-glucose Lösung in Methanol wurde zusammen mit (2 ml) Cellobiose Phosphorylase (CeP), (0.6 ml) α -D-glucose-1-phosphat und (2 ml) Trispuffer bei pH 7.0 ebenfalls bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Zur Dünnschichtchromatographischen Verfolgung der beiden enzymkatalysierten Reaktionen wurde wie folgt vorgegangen. Auf einer breiten Dünnschichtchromatographieplatte die drei Standards 2-Azido-2-deoxy-D-glucose, 2-Azido-2-desoxy-cellobiose und α -D-Glucose-1-phosphat zusammen mit den Proben von beiden Reaktionen nach einer halben Stunde, einer Stunde, zwei, drei, sechzehn, achtzehn, zwanzig und zweiundzwanzig Stunden aufgetragen. Das Fließmittel für die Dünnschichtchromatographie war (1-Propanol/Wasser; 17:3).

Synthese von 2-Azido-2-desoxy-cellobiose

Synthese von 2-Azido-2-desoxy-D-Glucose

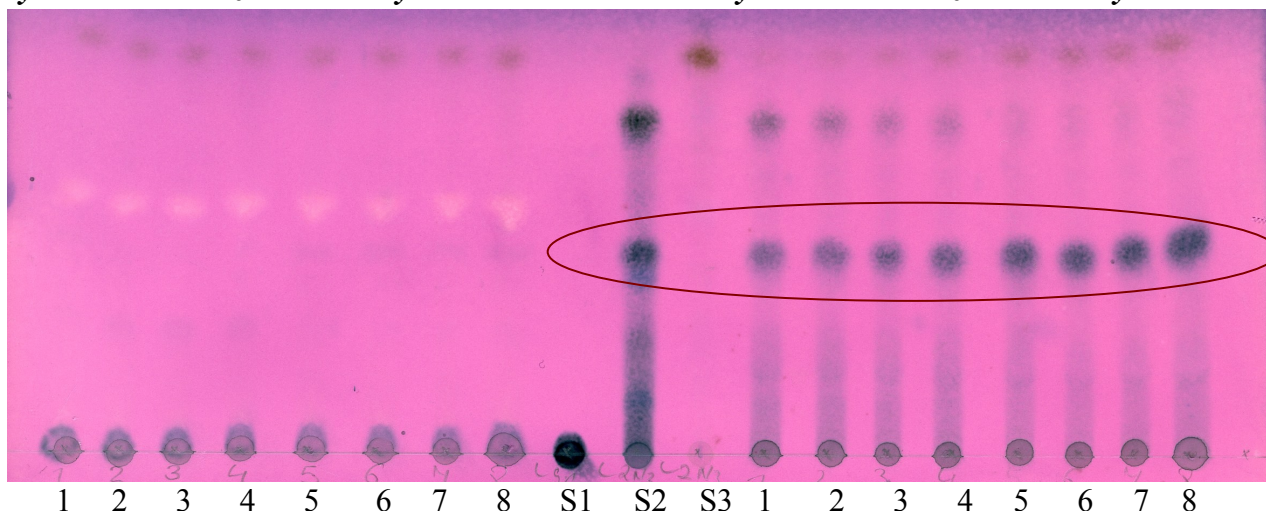


Abbildung 1: Die enzymkatalysierte Synthese von 2-Azido-2-desoxy-D-glucose und 2-Azido-2-desoxy-cellobiose

- 1.....Probe ziehen nach 30' Inkubationszeit
- 2.....Probe ziehen nach 1h Inkubationszeit
- 3.....Probe ziehen nach 2h Inkubationszeit
- 4.....Probe ziehen nach 3h Inkubationszeit
- 5.....Probe ziehen nach 16h Inkubationszeit
- 6.....Probe ziehen nach 18h Inkubationszeit
- 7.....Probe ziehen nach 20h Inkubationszeit
- 8.....Probe ziehen nach 22h Inkubationszeit
- S1....Standard α -D-Glucose-1-phosphat
- S2....Standard 2-Azido-2-desoxy-cellobiose
- S3....Standard 2-Azido-2-desoxy-D-glucose

Aus der Abbildung 1 erkennt man, dass die Synthese von 2-Azido-2-desoxy-D-glucose durch phosphorolytische Spaltung von 2-Azido-2-desoxycellobiose funktioniert hat und diese schon nach der ersten halben Stunde beginnt. Es ist deutlich zu beobachten, dass die Menge von 2-Azido-2-desoxy-D-glucose (S3) als auch von α -D-glucose-1-phosphat (S1) mit der Zeit zunimmt, während sich die Menge an 2-Azido-2-desoxy-cellobiose (S2) verringert.

Da die Probe von 2-Azido-2-desoxy-cellobiose nicht sauber war, erkennt man einen weiteren Fleck (rot markiert), der sich aber während der weiteren Inkubationszeit nicht geändert hat.

Aus der Abbildung 1 ist weiteres zu erkennen, dass die Synthese von 2-Azido-2-desoxy-cellobiose nicht funktioniert hat.

Der mögliche Grund, warum diese Synthese nicht stattgefunden hat, könnte eine nicht ausreichende Zugabe an Cellobiose Phosphorylase oder 2-Azido-2-desoxy-D-glucose sein. Die Bildung von 2-Azido-2-desoxy-D-glucose aus 2-Azido-2-desoxy-cellobiose beweist, dass unter geeigneten Umständen auch die Synthese von 2-Azido-2-desoxy-cellobiose stattfinden kann.

3 Zusammenfassung

in der vorliegenden Diplomarbeit werden organisch-chemische Synthese von Zwischenprodukten für die Herstellung glukosaminhaltiger Sacchariden beschreiben. Dabei handelt es sich um 2-Azido-2-desoxy-D-glucose und 2-Azido-2-desoxy-cellobiose, welche auf dem Wege der Azidonitratisierung von entsprechenden Glycal-Vorstufen erhalten wurden und enzymatisch mit Hilfe des Enzymes Cellobiose Phosphorylase. Die aus den hergestellten Zwischenstufen erhältlichen Glucosamin-Derivate sind für eine Reihe von Anwendung von Interesse. So können sie unter Katalyse durch Cellulasen aus Pilzen in künstliche Aminopolysaccharide eingebaut werden, welche als pharmazeutische Hilfsstoffe und als prebiotische Substrate für probiotische Bakterien von Interesse sind. Eine weitere potentielle Anwendung ergibt sich im Bereich der chondroprotektiven Nahrungsergänzungen mit gesteigerter biologischer Aktivität.

4 Summary

Organic chemical and enzyme-catalyzed syntheses are described of azido glucose intermediates for the preparation of glucosamin-containing saccharide derivatives.

Specifically, 2-azido-2-desoxy-D-glucose and 2-azido-2-desoxy-cellobiose have been prepared by way of azidonitratization of the corresponding glycal precursors.

The derivatives of glucosamine that may be prepared from such intermediates are of interest in several types of application.

First, they have the potential to serve as precursors of aminopolysaccharides in polymerization catalyzed by fungal cellulases. The resulting artificial polymers are of interest both as pharmaceutical excipients and as prebiotic substrates for probiotic bacteria. Another potential application of glucosamine-containing saccharides is as chondroprotective nutritional supplements with enhanced biological activity.

5 Literatur:

[1] Lehninger, A.L.; Nelson, D. L.;Cox, M. M. HERausgaber Teschesche H.;
Prinzipien der Biochemie (1984, 2. Auflage S.345 ff); Spektrum Akademischer
Verlag

[2] United States Patent 6,482,429
Inventors: Etzler; Frank M. (New Milford, CT)
Assignee: Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc. (Ridgfield, CT)
Appl. No.: 09/885,349 Filed June 20, 2001

[3] Carbohydrate Chemistry Volume 9 . Chemical Society 1977

[4] Stryer Biochemie 6. Auflage J. M. Berg , J. L. Tymoczko , L. Stryer

[5] K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, Organische Chemie, 3. Auflage Wiley-VCH,
Weinheim (2000)

[6] Per J. Garegg; Some aspects of regio-, stereo-, and chemoselective reactions
in carbohydrate chemistry pure und applied chemistry, Vol. 56,No.7 (1984)

[7] Karin Bauer, Leo Gros, Werner Sauer; Dünnschichtchromatographie – Eine
Einführung. 1989 bei Dr. Alfred Hüthig Verlag GmbH

[8] Gerhard Rücker, Michael Neugebauer, Günter G. Willems; Instrumentelle
pharmazeutische Anlytik, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart

[9] Andreas Dominik, Dieter Steinhilber; Instrumentalle Analytik für Pharmazeuten
Jungjohann Verlag

[10] Keith Wilson, Kenneth H Goulding; Methoden der Biochemie, 250,1991,
Georg Thieme Verlag

[11] Georg Schwedt; Chromatographische Trennmethode, 52,1994,Georg Thieme
Vorlag

[12] K.G.Krebs, D.Heusser, und H.Wimmer, Spühreagentien,813-859. In B.A. Lewis
und F.Smith, Zucker und Derivate, in: Dünnschichtchromotographie, ein
Laboraturiumshandbuch, Ed.E.Stahl, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
1967.

[13] D.C. Baker, D. Horton and C.G. Tindel; Preparation of Mono-and Disaccharides in Methods in Carbohydrate Chemistry Volume 7; Department of chemistry; Ohio State University

[14] S.Kobayashi, S. Shoda, J.Donelly and S.P.Church; Enzymatic Synthesis of cellulose; in Methods in Biotechnology, Volume 10: Carbohydrate Biotechnology Protocols; Hrsgb. C. Bucke (1999)

[15] Rabea, E. I. Radawy, M. E. T. ,Stevens, C. V., Smagghe, G. & Steutbaut W. Chitosan as antimicrobial agent; Applikation and mode of action. Biomacromolecules 4,(2003)

[16] Siro Saka ; Chemical Composition and distribution; in Wood and Cellulosic chemistry; Hrsgb. D. Hon; N. Shiraishi (1991)

[17] J.C. Arthur; Chemical Modification of Cellulose and its derivatives; in Comprehensive Polymer Science; Volume 6 (1989) Pergamon Press

[18] Majeti N.V. Ranvi Kumer; A review of chitin and chitosan application; in Reactive & Functional Polymers 46 (2000)

[19] Illum L.; Chitosan and its use as pharmaceutical excipient. Pharm. Res.(1998)15

[20] Handbook of Pharmaceutical Excipients. A joint publication of the American pharmaceutical Association and the pharmaceutical society of Great Britain

[21] ALEXANDER J.K. 1985 Studie on purified cellobiose phosphorylase. Bacteriol. Pro.,1958

[22] Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. J Nutr. 1995;125:1401-12

Weblinks:

[23] www.Food-info-net.com : Präbiotika-Übersicht-Wirkungen,Hintergrund

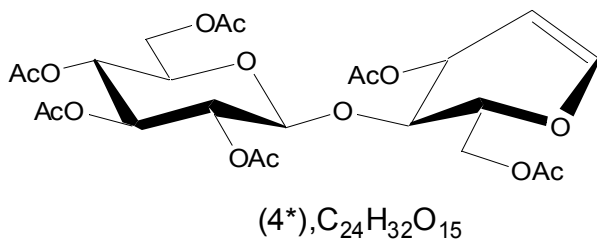
[24] www.wikipedia.com

[25] www.glycon.de/anindex.html

[26] www.oldenburg.de/verlag/zkristallogr/mn-ncsc0104.htm

6 Spektrenanhang:

Das NMR-Spektrum von Hexa-acetyl-D-cellobiosal (4*):



¹H kalibriert auf CHCl₃ (CDCl₃), δ= 7.26 ppm

¹³C kalibriert auf CDCl₃, δ= 77.0 ppm



Current Data Parameters
NAME FU1
EXPNO 5
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20081127
Time 23.42
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO BB-1H
PULPROG cosygpcqf
TD 4096
SOLVENT CDCL3
NS 4
DS 4
SWH 6127.451 Hz
FIDRES 1.495960 Hz
AQ 0.3343652 sec
RG 71.8
DW 81.600 usec
DE 280.00 usec
TE 293.7
D0 0.00000300 sec
D1 2.50000000 sec
d13 0.00000400 sec
D16 0.0002000 sec
INO 0.00016320 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRR 2.50000000 sec

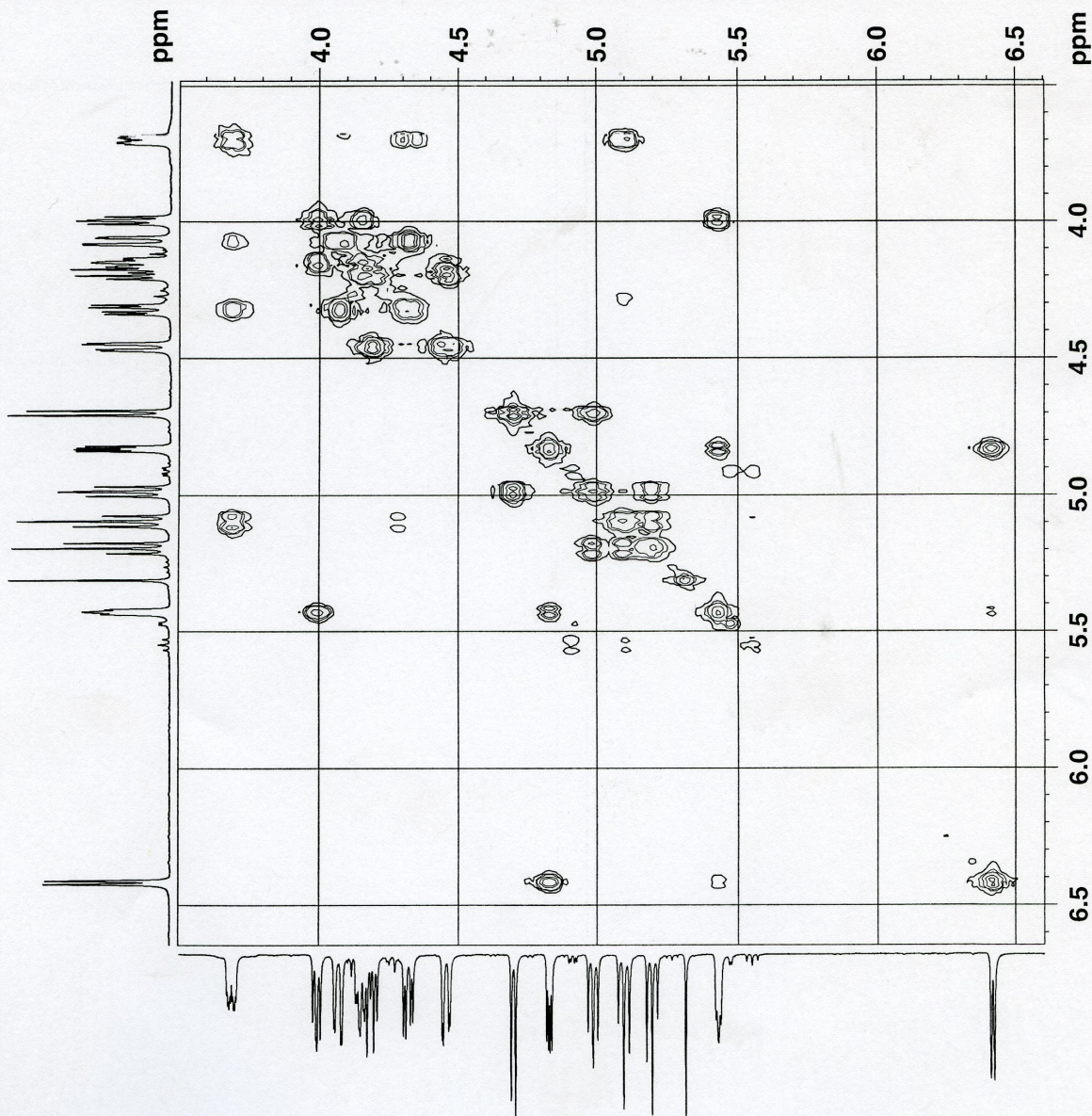
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P0 13.50 usec
P1 13.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 500.132737 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1 SINE.100
GPNAM2 SINE.100
GPX1 0.00 %
GPX2 0.00 %
GPY1 0.00 %
GPY2 0.00 %
GPZ1 20.00 %
GPZ2 20.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
ND0 1
TD 256
SFO1 500.132737 MHz
FIDRES 23.935356 Hz
SW 12.252 ppm
FhMODE QF

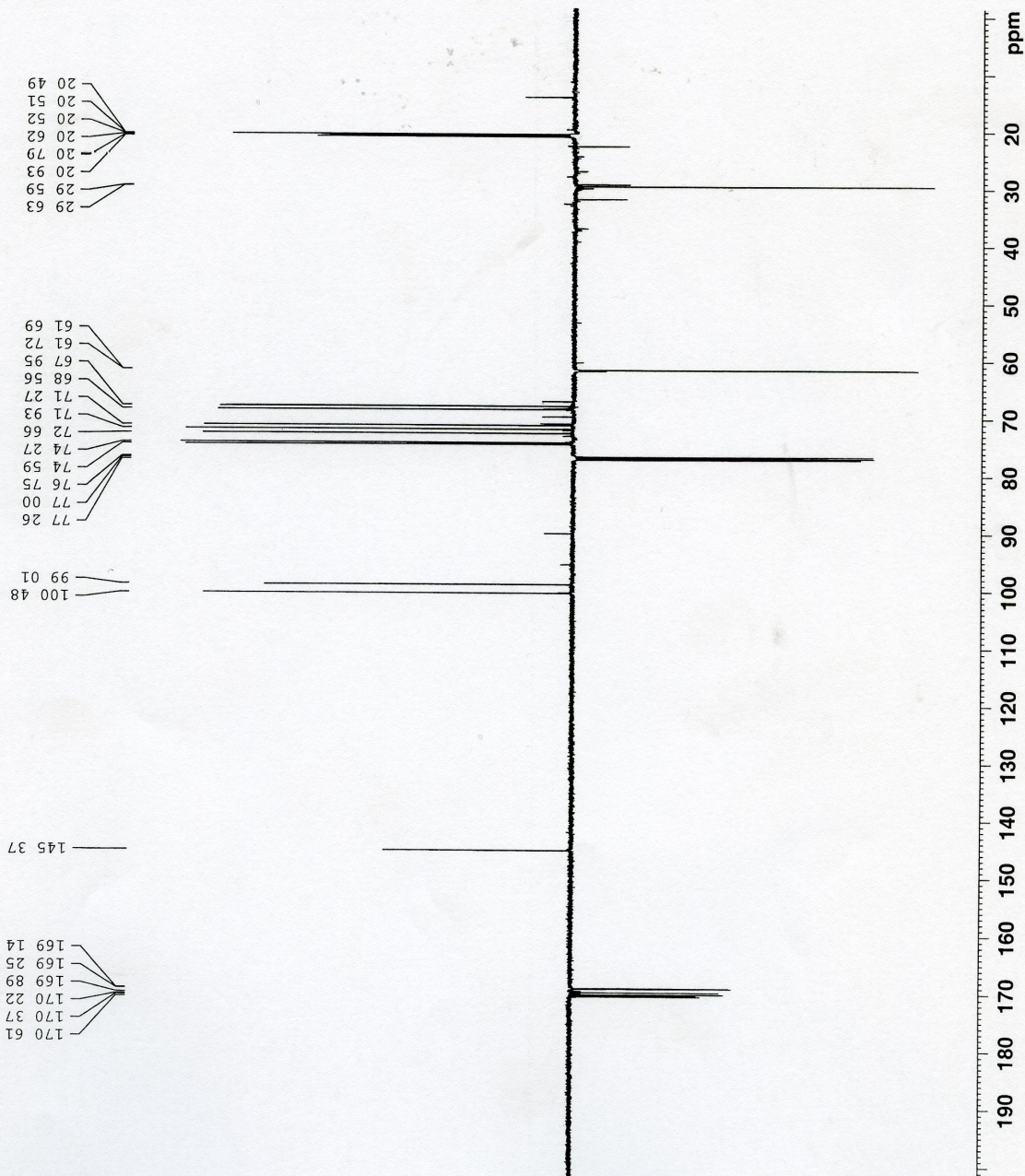
F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 500.1300000 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
FC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
SF 500.1300000 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0





FU1/CDC13/3C APT



Current Data Parameters
 NAME FU1
 EXPNO 2
 PROCNO 1

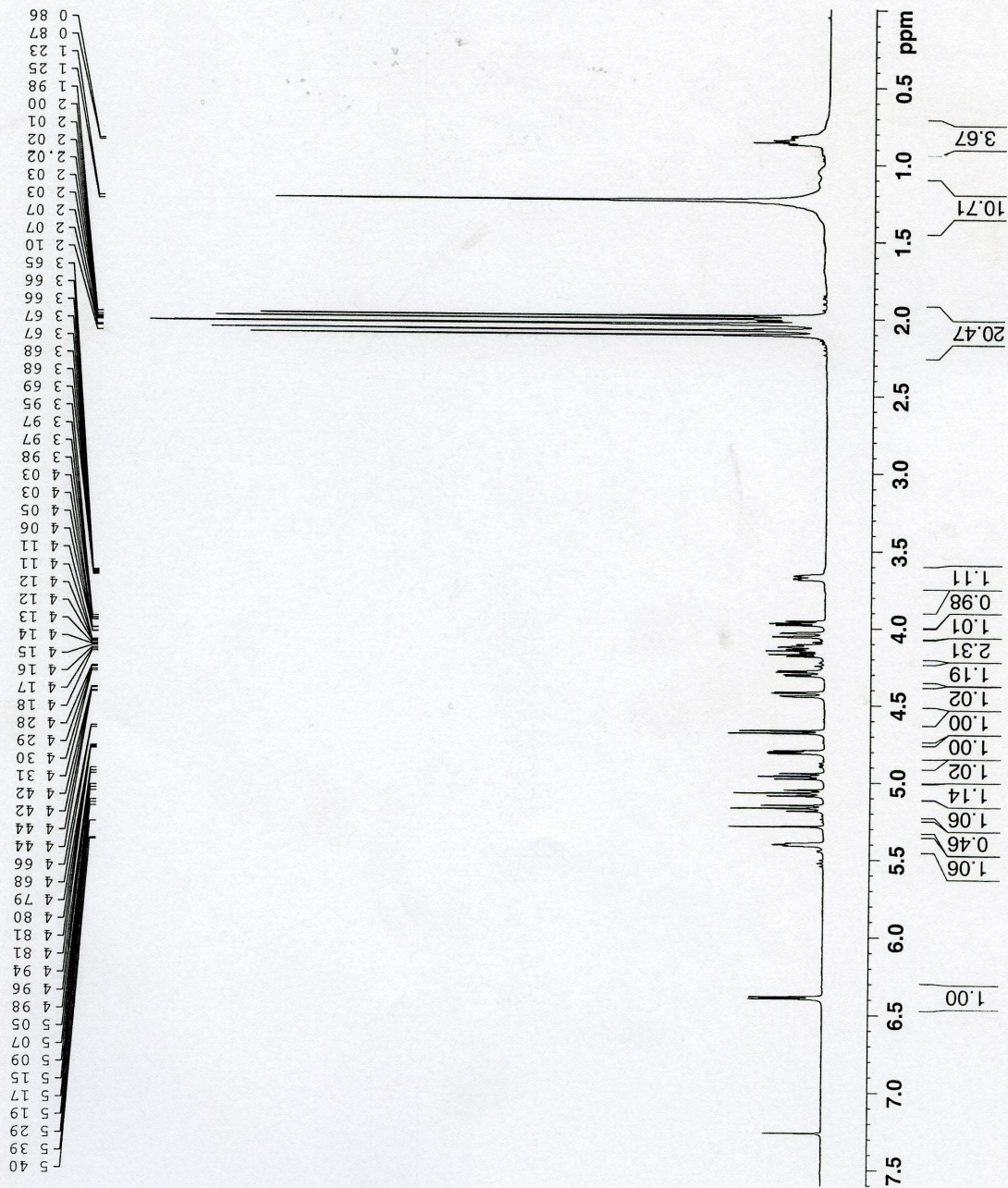
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20081127
 Time 18 51
 INSTRUM spect
 PROBD 5 mm BBO BB-1H
 PULPROG jmod
 TD 111106
 SOLVENT CDC13
 NS 2048
 DS 4
 SWH 27777.777 Hz
 FIDRES 0.250012 Hz
 AQ 1.9999760 sec
 RG 16384
 DW 18.000 usec
 DE 6.00 usec
 TE 294.8 K
 CNST2 145.000000
 CNST11 1.000000
 D1 2.5000000 sec
 d20 0.00889655 sec
 DELTA 0.00001210 sec
 MCREST 0.0000000 sec
 MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 9.50 usec
 P2 19.00 usec
 PL1 3.80 dB
 SFO1 125.7703643 MHz

===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 90.00 usec
 PL2 0.30 dB
 PL12 16.78 dB
 SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 131072
 SF 125.7577964 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

FU1 (Kolben) / CDC13



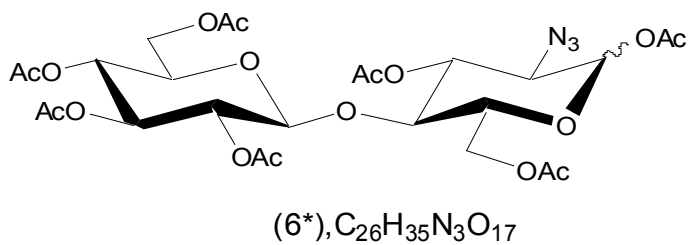
Current Data Parameters
NAME FU1
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20081127
Time 18 37
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO BB-1H
PULPROG zg30
TD 82642
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.096958 Hz
AQ 5.1569734 sec
RG 45 3
DW 62.400 usec
DE 6.00 usec
TE 293.6 K
D1 5.0000000 sec
MCREST 0.0000000 sec
MCWRK 0.0150000 sec

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 13.50 usec
PL1 0.30 dB
SFO1 500.1330885 MHz

F2 - Processing parameters
SI 131072
SF 500.1300130 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

Das NMR-Spektrum von 2-Azido-2-desoxy-cellobiosyl-hepta-acetat (6*)



¹H kalibriert auf CHCl₃ (CDCl₃), δ = 7.26 ppm

¹³C kalibriert auf CDCl₃, δ = 77.0 ppm

FU N6 COSY



Current Data Parameters
NAME FU_N6
EXPNO 5
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20090307
Time 22.14
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO BB-1H
PULPROG cosyzgpg
PC 100
SOLVENT CDCl3
NS 4
DS 4
SWH 5000.000 Hz
FIDRES 1.220703 Hz
AQ 0.409750 sec
RG 100.000 usec
DE 6.00 usec
TE 293.6 K
d0 0.00000300 sec
d1 2.00000000 sec
d13 0.00000400 sec
d16 0.00000100 sec
d17 0.00119995 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 2.00000000 sec

===== CHANNEL f1 =====

NUC1 1H
P0 13.50 usec
PL 0.30 dB
PR 1.00
SF01 500.1325006 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====

GPNAM1 SINE.100
GPNAM2 SINE.100
GPX1 0.00 %
GPX2 0.00 %
GPX3 0.00 %
GPX4 0.00 %
GPZ1 20.00 %
GPZ2 20.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition Parameters

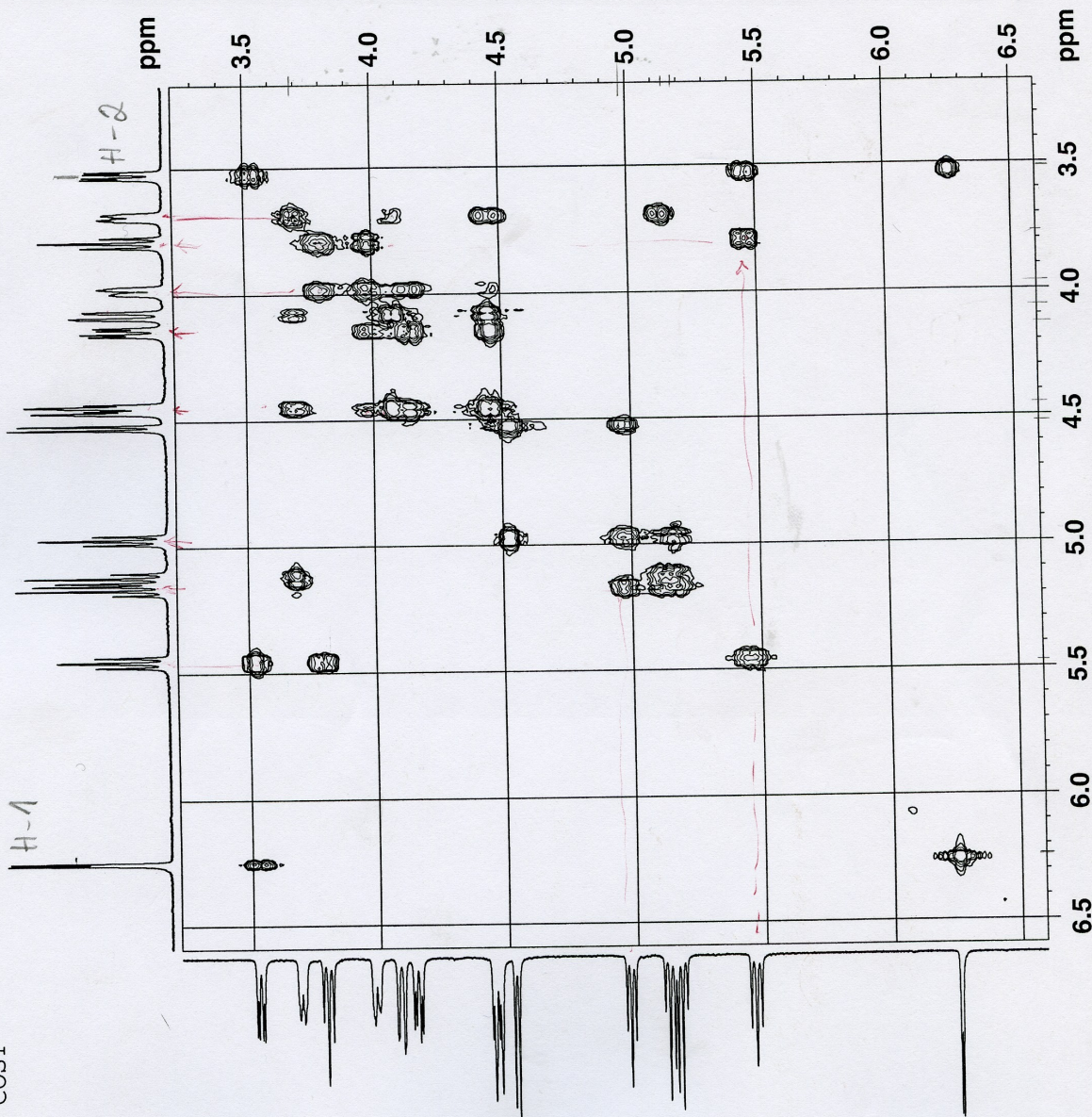
NUC1 1H
P0 256
PL 0.30 dB
PR 1.00
SF01 500.1325 MHz
FIDRES 19.536135 Hz
SW 10.000 ppm
F0MODE QF

F2 - Processing Parameters

SI 1024
SF 500.1300000 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.40

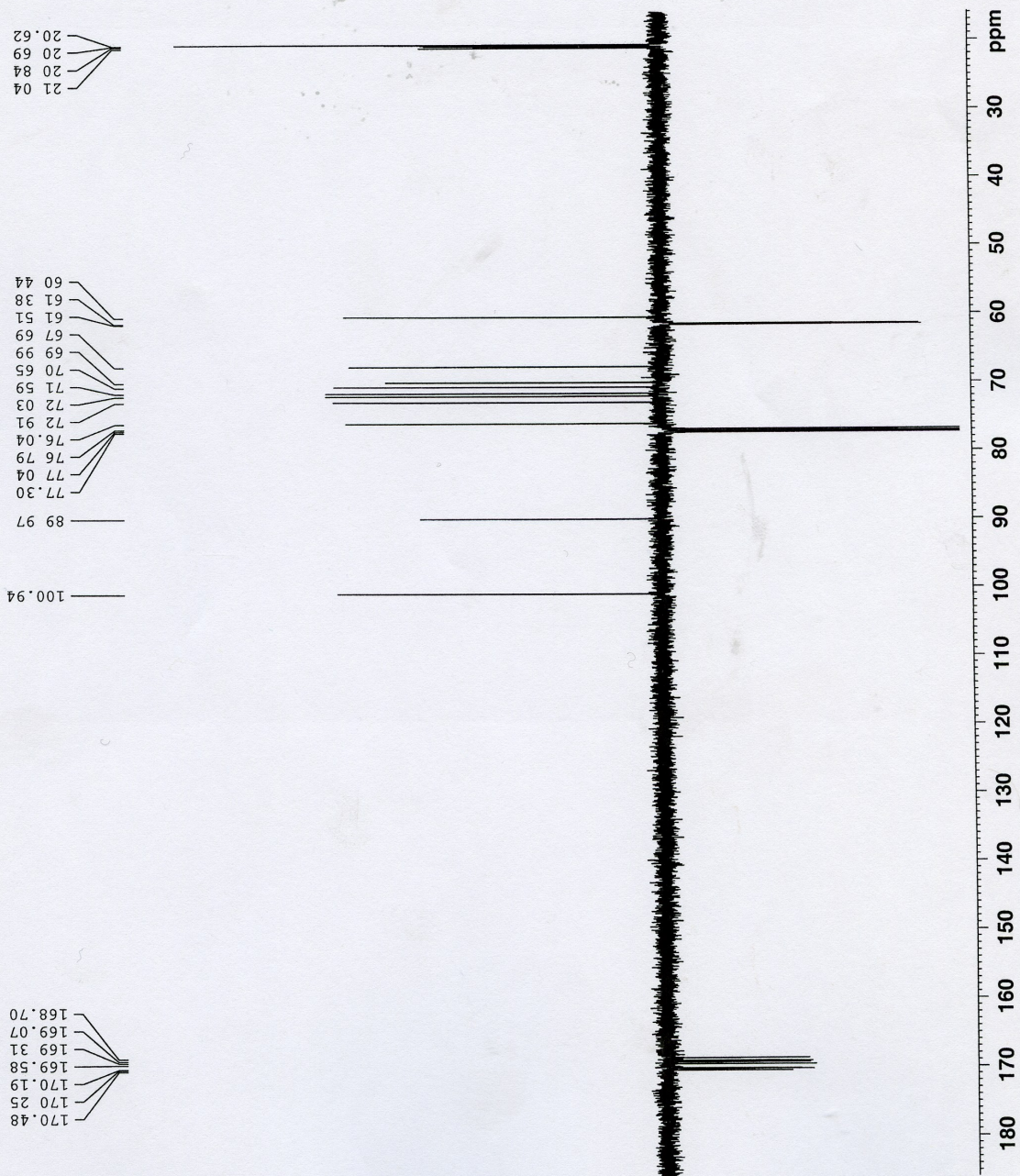
F1 - Processing Parameters

SI 1024
MC2 QF
SF 500.1300000 MHz
WDW SINE
SSB 0.00 Hz
LB 0
GB 0





FU N6



```

Current Data Parameters
NAME      FU_N6
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20090307
Time      18 35
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBO BB-1H
PULPROG   jmod
TD         111106
SOLVENT    CDC13
NS         512
DS         4
SWH        27777.777 Hz
FIDRES     0.250012 Hz
AQ         1.9399760 sec
RG         11585.2
DE         18.000 usec
TE         294.6 K
CNST2      145.0000000
CNST11     1.0000000
D1          2.0000000 sec
d20         0.0089855 sec
DELTA       0.00001210 sec
MCREST      0.0000000 sec
MCWRK      0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1        13C
P1          9.50 usec
PL1         19.00 usec
PL1         3.80 dB
SFO1        125.7703643 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2     waltz16
NUC2         1H
PCPD2       90.00 usec
PL2         0.30 dB
PL12        16.78 dB
SFO2        500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI          131072
SF          125.7577890 MHz
WDW         EM
SSB         0
LB          1.00 Hz
GB          0
PC          1.40
  
```

Lebenslauf

1. Persönliche Daten

Name : Nermeen GABRA
Geboren am : 23.08.1975 in Kairo Ägypten
Staatsbürgerschaft : Österreicherin seit 14.12.2002
Ehegatte : Maged GABRA
Kinder : Maria, Peter und Veronika GABRA
Ankunft in Österreich : 25.10.1999

2. Ausbildung

1980- 1986 : Volksschule in Kairo
1986- 1989 : Mittelschule in Kairo
1989- 1992 : Hochschule in Kairo
1992- 1997 : Pharmazie Studium an der Universität Kairo

WS 2002 : Absolvieren vom Deutschkurse an der Universität Wien; Abschluss: mit Auszeichnung „Sehr gut“

SS 2003 : Antragstellung für die Anrechnung meines Bachelordiploms an der Universität Wien

WS 2005 : Antragstellung für die Nostrifikation
WS 2006 : Beginn mit der Nostrifikation

3. Arbeitserfahrung

1997- 1999 : bei der Krankenkasse in Kairo