

RICHARD KUHN und HEINZ EGGE

Über Ergebnisse der Permethylierung der Ganglioside G_I und G_{II}Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie,
Heidelberg

(Eingegangen am 11. Juli 1963)

Die Ganglioside G_I und G_{II} aus Rindergehirn sowie das durch Partialhydrolyse aus G_I erhaltene Des-LS-gangliosid wurden permethyliert. Die nach Methanololyse gebildeten Methylglykoside der Hexosen und des Galaktosamins wurden an den freien OH- und NH₂-Gruppen acetyliert und durch Gaschromatographie deren Mengenverhältnisse quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse sichern die Strukturformeln für die Ganglioside G_I und G_{II}. — Für 20 verschiedene Methyl- bzw. Methyl-acetyl-Derivate der Galaktose und Glucose werden die Retentionszeiten und Retentionsindices angegeben.

Die Konstitution des Gangliosids G_I, insbesondere die Verknüpfung der Kohlenhydratbausteine, hat sich ohne Heranziehung des klassischen Verfahrens der Permethylierung eindeutig klären lassen¹⁾. Dasselbe gelang für die Ganglioside G_{II} und G_{III}²⁾. Hier soll über die parallel dazu gewonnenen Ergebnisse aus Permethylierungsversuchen berichtet werden.

Aus einem „ox brain mucolipid“ (vermutlich ein Gemisch der Ganglioside G_I bis G_V enthaltend) wurden nach Permethylierung erhalten³⁾: 2.6-Dimethyl-, 2.4.6-Trimethyl- und 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose sowie 2.4.6-Trimethyl-glucose (nicht sicher identifiziert). Ein Gangliosid-Gemisch lieferte⁴⁾: 2.6-Dimethyl-, 2.4.6-Trimethyl- und 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose (wie oben), 2.3.6-Trimethyl-glucose (nicht 2.4.6-Trimethyl-glucose) sowie 4.6-Dimethyl- und 3.4.6-Trimethyl-galaktosamin·HCl. E. KLENK und W. GIELEN⁵⁾ erhielten aus ihrem Gangliosid B_I mit einem Sialinsäurerest (das unserem G_I entspricht) 2.6-Dimethyl- und 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose, 2.3.6-Trimethyl-glucose und 4.6-Dimethyl-galaktosamin·HCl; aus ihrem Gangliosid B_I mit 2 Sialinsäureresten (das dem von uns⁶⁾ als G_{II} bezeichneten Gangliosid entspricht) erhielten sie dieselben Spaltstücke, jedoch 2.4.6-Trimethyl- an Stelle von 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose; die durch Abspaltung von Sialinsäure erhaltene Substanz, die als Des-LS-gangliosid beschrieben wurde¹⁾, ergab⁵⁾: 2.4.6-Trimethyl- (nicht sicher identifiziert) und 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose, 2.3.6-Trimethyl-glucose und 4.6-Dimethyl-galaktosamin·HCl.

Über die von uns zur Isolierung der Ganglioside angewandte Methode wurde bereits an anderer Stelle¹⁾ berichtet; Methode C wurde bevorzugt verwendet. Das

1) R. KUHN und H. WIEGANDT, Chem. Ber. 96, 866 [1963].

2) R. KUHN und H. WIEGANDT, Z. Naturforsch. 18b, 541 [1963].

3) E. CHARGAFF und A. ROSENBERG, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 42, 357 [1960].

4) E. KLENK und W. GIELEN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 326, 144 [1961].

5) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 330, 218 [1963].

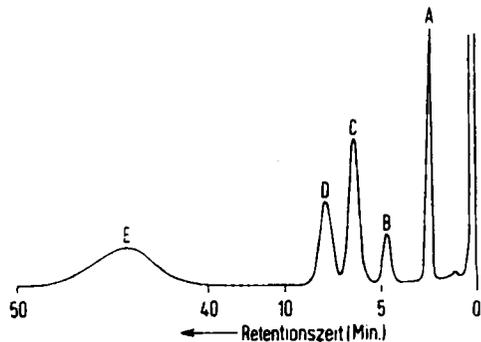
6) R. KUHN, H. WIEGANDT und H. EGGE, Angew. Chem. 73, 580 [1961].

Des-LS-gangliosid stellten wir durch Partialhydrolyse von G_I mit $n/100$ HCl, Dialyse und anschließende Chromatographie an Kieselgel- und Al₂O₃-Säulen rein dar. Hierbei erhielten wir in geringen Mengen noch drei weitere Glykolipide, die durch weitergehenden Abbau von G_I entstanden waren und den von L. SVENNERHOLM⁷⁾ beschriebenen entsprachen: ein Glucocerebrosid, Schmp. 173–175°, dessen IR-Spektrum mit den von S. BOGOCH⁸⁾ erhaltenen übereinstimmte; ein Ceramid-disaccharid⁷⁾ (Lactocerebrosid), Schmp. 231–232°, und in sehr geringer Menge ein Ceramid-trisaccharid, Schmp. 228–230°, das Glucose, Galaktose und Galaktosamin enthielt.

Wie schon beschrieben^{9,10)}, bereitet die Permethylierung lactaminsäurehaltiger Naturstoffe Schwierigkeiten, da Abbaureaktionen nebenherlaufen können. Je nach Art der Methylierung erhielten wir z. B. einen Teil der Fettsäure als Methylester und einen Teil der Lactaminsäure als Pyrrol- α -carbonsäure bzw. deren Methylester. Auch die endständige Galaktose wurde in einigen Fällen teilweise abgespalten. Unter mehreren von uns vergleichend untersuchten Methoden¹⁰⁾ erwies sich die Permethylierung mit Ag₂O und CH₃I in Dimethylformamid¹¹⁾ als die günstigste. Auch hier konnte jedoch, wie die Dünnschichtchromatographie (Kieselgel G, Merck, Benzol/absol. Äthanol (8 : 2)) zeigte, ein Abbau nicht vollständig vermieden werden. Deshalb haben wir die Methylierungsprodukte an Kieselgel-Säulen gereinigt, um Abbauprodukte und nicht vollständig methyliertes Gangliosid abzutrennen. Wir konnten so die Permethylverbindungen von G_I, G_{II} und von Des-LS-gangliosid in Ausbeuten von 40 bis 60% d. Th. erhalten. Sie wurden mit 6-proz. methanol. Salzsäure methanolysiert, um die Methylglykoside der Zucker zu erhalten, die anschließend an den freigewordenen OH- und NH₂-Gruppen acetyliert wurden. Nach Abtrennen der aus Fettsäure, Lactaminsäure und Sphingosin entstandenen Methylierungsprodukte wurden die Methylzucker gaschromatographisch analysiert (vgl. S. 3343) und die erhaltenen Peaks quantitativ ausgewertet.

Abbild. 1. Gaschromatogramm der Methylhexoside aus Lacto-*N*-tetraose. 1-m-Polyestersäule, 200°, 215 ccm He/Min.

- A: Pentamethyl-galaktose
 B: β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetylglucosid
 C: β -Methyl-2.4.6-trimethyl-3-acetyl-galaktosid und α -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetylglucosid
 D: α -Methyl-2.4.6-trimethyl-3-acetyl-galaktosid
 E: α -Methyl-4.6-dimethyl-*N*-acetyl-3-O-acetyl-glucosaminid (doppelte Empfindlichkeit)



7) Biochem. biophysic. Res. Commun. **9**, 436 [1962].

8) J. Amer. chem. Soc. **79**, 3287 [1957].

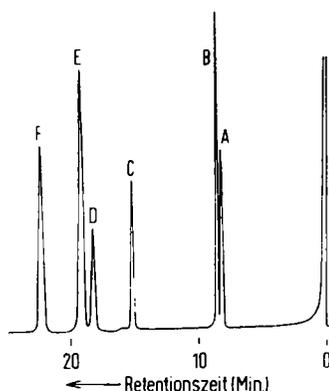
9) H. EGGE, Bull. Soc. Chim. biol. **42**, 95 [1960].

10) K. WALLENFELS, G. BECHTLER, R. KUHN, H. TRISCHMANN und H. EGGE, Angew. Chem., Internat. Edition **2**, 515 [1963].

11) R. KUHN, H. TRISCHMANN und I. LÖW, Angew. Chem. **67**, 32 [1955].

Um die Methode zu testen, wählten wir das in seiner Struktur bekannte Tetrasaccharid Lacto-*N*-tetraose¹²⁾. Die Methylierung¹¹⁾ lieferte in 75-proz. Ausb. die kristallisierende Permethylverbindung, β -Methyl-dodecamethyl-glykosid, Schmp. 177–178° (Bräunung). Nach Methanolyse und Acetylierung wurden durch Gaschromatographie (Abbild. 1 und 2) folgende Methylglykoside gefunden und quantitativ bestimmt:

	Ber.	Gef. *)
α - und β -Methyl-2.3.4.6-tetramethyl-galaktosid	1.00	1.00
α - und β -Methyl-2.4.6-trimethyl-3-acetyl-galaktosid	1.00	1.1
α - und β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid	1.00	1.03
α -Methyl-4.6-dimethyl- <i>N</i> -acetyl-3- <i>O</i> -acetyl-glucosaminid	1.00	0.80



Abbild. 2. Gaschromatogramm der Methylhexoside aus Lacto-*N*-tetraose. 50-m-Kapillarsäule R (Perkin Elmer), 200°, 1.36 ccm He/Min.

- A: β -Methyl-2.3.4.6-tetramethyl-galaktosid
 B: α -Methyl-2.3.4.6-tetramethyl-galaktosid
 C: β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid
 D: β -Methyl-2.4.6-trimethyl-3-acetyl-galaktosid
 E: α -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid
 F: α -Methyl-2.4.6-trimethyl-3-acetyl-galaktosid

Nach mehrmaligem Methylieren von Des-LS-gangliosid und Abtrennen der Abbauprodukte durch Chromatographie an Silicagel erhielten wir eine Permethylverbindung (OCH₃ ber. 28.1, gef. 27.3). Das IR-Spektrum (in CCl₄) zeigte keine OH-Bande mehr. Weiteres Methylieren führte nur zu noch stärkerem Abbau und zu *N*-Methylierung (IR-Spektrum). Gaschromatographisch konnten nach Methanolyse und Acetylierung folgende Methylzucker identifiziert und quantitativ bestimmt werden:

	Ber.	Gef. **)
α - und β -Methyl-2.3.4.6-tetramethyl-galaktosid	1.0	0.75
α - und β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-galaktosid	1.0	1.00
α - und β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid	1.0	1.05
α -Methyl-4.6-dimethyl- <i>N</i> -acetyl-3- <i>O</i> -acetyl-galaktosaminid	1.0	0.70

Das Galaktosaminid wurde gaschromatographisch präparativ gewonnen.

Ein Teil der 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose (aus der endständigen Galaktose) wurde offensichtlich während der Aufarbeitung der Methylierungsansätze verloren. Sie konnte neben Stearinsäure-methylester gaschromatographisch, ohne vorhergehende Methanolyse, unter den Abbauprodukten nachgewiesen werden.

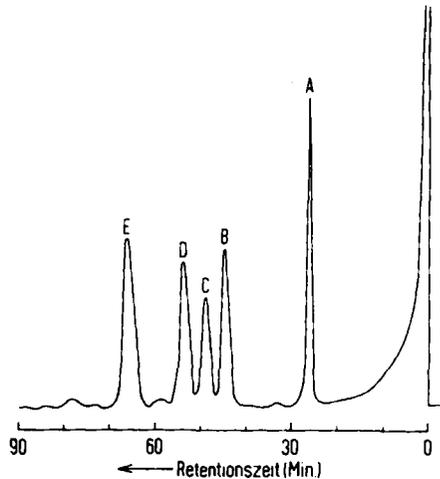
*) Relative Werte, bez. auf die gef. Summe von α - und β -Methyl-2.3.4.6-tetramethyl-galaktosid.

**) Relative Werte, bez. auf die Summe von α - und β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-galaktosid.

¹²⁾ R. KUHN und H. H. BAER, Chem. Ber. **89**, 504 [1956]. Für Überlassung der Substanz danken wir Fräulein Dr. A. GAUHE.

Abbild. 3. Gaschromatogramm der Methylhexoside aus Des-LS-gangliosid. 2-m-Polyestersäule, 218°, 75 ccm He/Min.

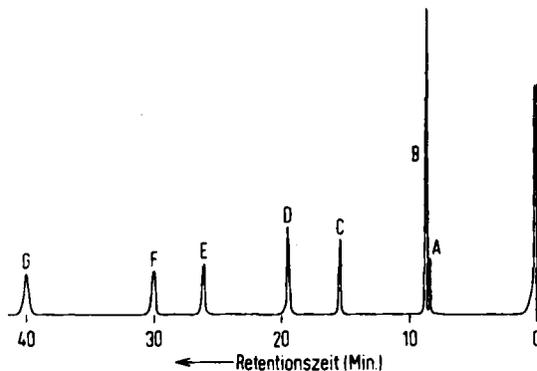
- A: Pentamethyl-galaktose
 B: β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-galaktosid
 C: β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid
 D: α -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-galaktosid
 E: α -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid



Nach Permethylierung von Gangliosid G_I und Reinigung über eine Silicagelsäule erhielten wir ein auf der Dünnschichtplatte einheitlich wanderndes Produkt (OCH₃ ber. 29.5; gef. 28.6, 28.3).

Die gaschromatographische Analyse des Methanolsates ergab:

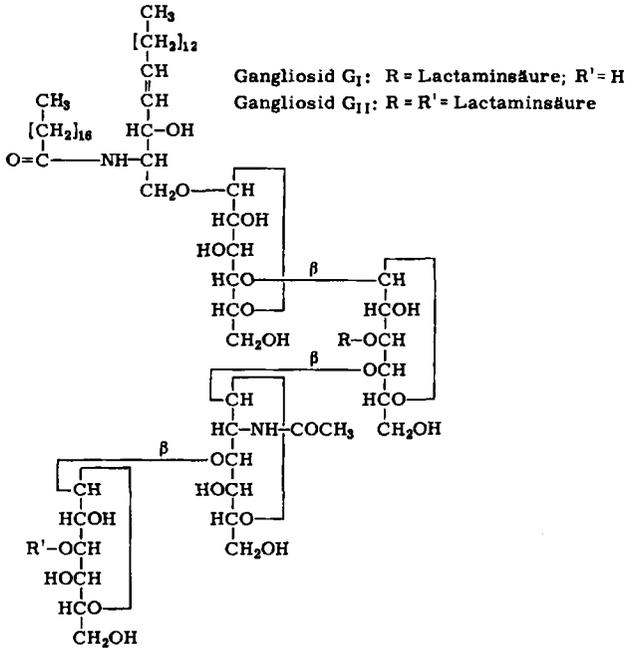
	Ber.	Gef. *)
α - und β -Methyl-2.3.4.6-tetramethyl-galaktosid	1.00	0.95
α - und β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid	1.00	1.00
α - und β -Methyl-2.6-dimethyl-3.4-diacetyl-galaktosid und Methyl-2.6-dimethyl-3.5-diacetyl-galaktofuranosid	1.00	1.08
α -Methyl-4.6-dimethyl-N-acetyl-3-O-acetyl-galaktosaminid	1.00	0.80



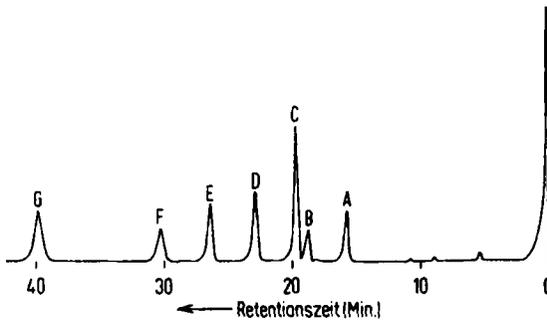
Abbild. 4. Gaschromatogramm der Methylhexoside aus Gangliosid G_I. 50-m-Kapillarsäule, 200°, 1.36 ccm He/Min.

- A: β -Methyl-2.3.4.6-tetramethyl-galaktosid
 B: α -Methyl-2.3.4.6-tetramethyl-galaktosid
 C: β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid
 D: α -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid
 E: Methyl-2.6-dimethyl-3.5-diacetyl-galaktofuranosid
 F: β -Methyl-2.6-dimethyl-3.4-diacetyl-galaktosid
 G: α -Methyl-2.6-dimethyl-3.4-diacetyl-galaktosid

*) Relative Werte, bez. auf α - und β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid.



Die Permethylierung von *Gangliosid* G_{II} lieferte als Hauptkomponente den Dimethylester von Permethyl-G_{II}, der jedoch bei der Säulenchromatographie auf Kieselgel hydrolytisch weitgehend zum Monomethylester gespalten wurde.



Abbild. 5. Gaschromatogramm der Methylhexoside aus permethyliertem *Gangliosid* G_{II}.
50-m-Kapillarsäule, 200°, 1.36 ccm He/Min.

- A: β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid
- B: β -Methyl-2.4.6-trimethyl-3-acetyl-galaktosid
- C: α -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid
- D: α -Methyl-2.4.6-trimethyl-3-acetyl-galaktosid
- E: Methyl-2.6-dimethyl-3.5-diacetyl-galaktofuranosid
- F: β -Methyl-2.6-dimethyl-3.4-diacetyl-galaktosid
- G: α -Methyl-2.6-dimethyl-3.4-diacetyl-galaktosid

Nach Methanolyse und Acetylierung wurden erhalten:

	Ber.	Gef. *)
α - und β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid	1.00	1.00
α - und β -Methyl-2.4.6-trimethyl-3-acetyl-galaktosid	1.00	0.93
α - und β -Methyl-2.6-dimethyl-3.4-diacetyl-galaktosid und Methyl-2.6-dimethyl-3.5-diacetyl-galaktofuranosid	1.00	0.95
α -Methyl-4.6-dimethyl- <i>N</i> -acetyl-3- <i>O</i> -acetyl-galaktosaminid	1.00	0.75

Die vorliegenden Identifizierungen und quantitativen Bestimmungen der Spaltstücke sichern die auf S. 3342 angegebenen Formeln der Ganglioside G_I und G_{II} hinsichtlich des Kohlenhydratbereichs.

Aus Permethyl-G_I wurden nach Hydrolyse mit n H₂SO₄ kristallisiert erhalten: 2.6-Dimethyl-galaktose und 2.3.6-Trimethyl-glucose; als Öl 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose. Die im Gaschromatogramm von Permethyl-G_{II} neu erscheinende 2.4.6-Trimethyl-galaktose wurde ebenfalls kristallisiert erhalten.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

(Mitarbeitet von WERNER LOCHINGER)

Abkürzungen: DMF = Dimethylformamid, DMSO = Dimethylsulfoxid, FID = Flammenionisationsdetektor, WLD = Wärmeleitfähigkeitsdetektor. Zur Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel G (E. Merck) verwendet.

Gaschromatographie

Für die gaschromatographische Trennung flüchtiger Zucker-Derivate sind eine Reihe von Säulenfüllungen bekannt¹³⁾, die jedoch nicht alle gute Trennleistung, hohe Temperaturbeständigkeit, lange Lebensdauer, hohe Belastbarkeit und kurze Analysenzeit gewährleisten. Unter mehreren von uns erprobten Säulen erwiesen sich die von C. T. BISHOP und F. P. COOPER¹⁴⁾ beschriebenen als am günstigsten. Für die Analytik verwendeten wir gepackte 1- bzw. 2-m-Säulen mit 10 bzw. 20% Butandiol-(1.4)-succinat-polyester¹⁴⁾ (BDS) auf Kieselgur (Merck, 0.125–0.175 mm \varnothing) und 50- bzw. 25-m-Kapillarsäulen (Perkin Elmer-R-Säulen, Polypropylenglykol und BDS + OS 138-Polyester) in einem Perkin Elmer-116 E-Gerät.

Für die Analyse der Gemische von Hexosiden und Hexosaminiden erwies sich eine Kombination von gepackter 1-m-Säule (10% BDS) mit 50-m-Golay-Säule als vorteilhaft. Die Substanz wurde über einen Strömungsteiler im Verhältnis 1 : 160 bis 1 : 200, je nach den Arbeitsbedingungen, auf die Kapillarsäule mit FID und Füllkörper-Säule mit WLD verteilt. Während auf der 1-m-Säule unter den von der Kapillarsäule bestimmten Arbeitsbedingungen wie Trägergasdruck und Ofentemperatur, die Tetramethyl- und Trimethylhexoside unvollständig, Trimethyl- und Dimethyl-*N*-acetyl-hexosaminide aber sauber getrennt werden, können die ersteren auf der Kapillarsäule einwandfrei getrennt und identifiziert werden (vgl. Abbild. 1 und 2).

Für präparative Trennungen¹⁵⁾ benutzten wir 3-m-Säulen von 21 mm \varnothing mit 20% BDS auf Kieselgur (E. Merck, für Gaschromatographie, 0.2–0.3 mm \varnothing), die Substanzmengen bis zu 1 g auftrennten. Hier verwendeten wir ein Gerät von Rubarth.

*) Relative Werte, bez. auf α - und β -Methyl-2.3.6-trimethyl-4-acetyl-glucosid.

13) C. T. BISHOP, *Methods biochem. Analysis*, ed. D. GLICK, X, 1 [1962].

14) *Canad. J. Chem.* 38, 388 [1960].

15) E. BAYER und R. WIDDER, *Angew. Chem.* 73, 766 [1961].

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte entweder planimetrisch oder durch Ausschneiden und Auswägen der Peakflächen.

Tab. 1. Relative Retentionszeiten¹⁶⁾ von methylierten Hexosiden, bez. auf β -Methyl-2.3.4.6-tetramethyl-galaktosid = 1.00 [t_{rGal}] und Retentionsindices¹⁷⁾ [Ri]

Substanz	50-m-R-Golay-Säule, 200°, 1.36 ccm He/Min.				2-m-BDS-Säule, 220°, 83 ccm He/Min.				50-m-BDS + OS 138- Polyester-Golay-Säule, 201°, 6.5 ccm He/Min.			
	1		2		1		2		1		2	
	t_{rGal}	Ri	t_{rGal}	Ri	t_{rGal}	Ri	t_{rGal}	Ri	t_{rGal}	Ri	t_{rGal}	Ri
<i>-methyl-galaktosid</i>												
2.3.4.6-Tetramethyl-	1.00	1675	1.05	1685	1.00	2272	1.03	2280	1.00	2280	1.07	2295
2.3.5.6-Tetramethyl-	0.91	1653			0.81	2210			0.80	2220		
2.3.6-Trimethyl-4-acetyl-	1.75	1797	1.96	1825	1.69	2450	2.03	2510	1.77	2423	2.29	2490
2.3.6-Trimethyl-5-acetyl-	1.80	1805	2.00	1833					2.03	2460	2.23	2480
2.4.6-Trimethyl-3-acetyl-	2.21	1855	2.72	1900	2.29	2560	2.94	2640	2.39	2495	3.27	2580
2.3.4-Trimethyl-6-acetyl-	2.53	1882	2.69	1897	2.69	2600	2.85	2618	3.09	2560	3.43	2588
3.4.6-Trimethyl-2-acetyl-	2.25	1860	3.21	1937	2.25	2540	4.11	2735	2.38	2495	4.56	2660
2.3-Dimethyl-4.6-diacetyl-	3.60	1960	4.02	1985	4.35	2755	4.75	2780	5.18	2692	5.97	2730
2.3-Dimethyl-5.6-diacetyl-	3.62	1962			3.95	2720			4.68	2667		
2.6-Dimethyl-3.4-diacetyl-	3.57	1958	4.75	2022	4.35	2755	5.65	2840	5.18	2692	6.83	2760
2.6-Dimethyl-3.5-diacetyl-	3.12	1929			3.20	2655			3.79	2610		
β -1.6-Anhydro-2.3.4-tri- methyl-galaktose	1.10	1695			1.27	2358			1.27	2340		
β -Methyl-2.3.4-trimethyl- fucosid	0.43	1488			0.45	2010			0.40	2045		
<i>-methyl-glucosid</i>												
2.3.4.6-Tetramethyl-	0.75	1610	0.94	1662	0.62	2127	0.83	2212	0.56	2130	0.81	2212
2.3.6-Trimethyl-4-acetyl-	1.85	1812	2.34	1865	1.85	2480	2.45	2580	1.99	2450	2.82	2538
2.4.6-Trimethyl-3-acetyl-	2.24	1855	3.15	1933	2.42	2565	3.60	2695	2.69	2533	4.16	2635
2.3.4-Trimethyl-6-acetyl-	1.79	1805	2.44	1875	1.68	2448	2.38	2560	1.77	2422	2.61	2522
3.4.6-Trimethyl-2-acetyl-	1.79	1805	2.31	1862	1.53	2420	2.33	2553	1.58	2400	2.58	2520
2.3-Dimethyl-4.6-diacetyl-	4.00	1985	5.10	2040	4.50	2765	6.10	2865	6.00	2730	7.46	2785
2.6-Dimethyl-3.4-diacetyl-	3.34	1945	4.55	2012	3.75	2705	5.40	2825	4.44	2655	6.83	2762
Methyl-2.3.4-trimethyl- glucuronsäure-methylester	1.58	1777	1.74	1798					1.97	2450	2.28	2485
2.3.4.5.6-Pentamethyl- glucuronsäure-methylester	1.51	1767							1.42	2365		

Anhang zu Tab. 1: Auf eine Angabe der theoret. Bodenzahlen der Säulen wird verzichtet, da sie keine Aussage über die eigentliche Trennleistung (resolving power) der Säule für das spezielle Problem erlaubt. So trennt z. B. die 50-m-Kapillarsäule mit einer um eine Zehnerpotenz höheren Bodenzahl als die 2-m-Polyestersäule das Gemisch der Methyl-2.3-dimethyl-diacetyl-galaktopyranoside und -galaktofuranoside nur in zwei Peaks auf, während auf der 2-m-Polyestersäule noch drei Peaks sauber getrennt erscheinen.

Vor kurzem veröffentlichte G. O. ASPINALL¹⁸⁾ eine ähnliche Tab. Ein Vergleich der angegebenen Retentionswerte zeigt, daß die Acetylierung, die bei den Aminozuckern wegen der NH_2 -Gruppe eine *conditio sine qua non* darstellt, auch bei den Hexosen gewisse Vorteile erbringt. Die Analysenzeiten werden kürzer, die Auftrennung der Trimethylhexosen ist z. Teil besser, vermutlich, weil die Unterschiede in der Stellung der nicht verätherten OH-Gruppen durch die Acetylgruppe noch betont werden. Und außerdem können die Dimethyl-

16) Angegeben sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen. Maximale Abweichung $\pm 2\%$. Unterschiede von $\Delta t_{rGal} = 0.05$ bzw. $\Delta Ri = 10$ für die Golay-Säule und $\Delta t_{rGal} = 0.15$ bzw. $\Delta Ri = 18$ für die gepackte 2-m-Säule ergeben noch vollständige Trennung der Peaks.

17) Nach A. WEHLI und E. KOVATS, Helv. chim. Acta 24, 2709 [1959].

18) J. chem. Soc. [London] 1963, 1676.

hexoside, die ohne Acetylierung von dem Butandiolsuccinatpolyester zum größten Teil irreversibel zurückgehalten werden, bei relativ kurzen Retentionszeiten auch noch getrennt und quantitativ erfaßt werden.

Über die Analyse methylierter Methyl-*N*-acetyl-hexosaminide wird an anderer Stelle¹⁰⁾ berichtet.

Vergleichssubstanzen: Ausgehend von *Glucose* und *Galaktose* stellten wir die α - und β -Methylglykoside der Tetramethyl-, der Trimethyl-mono-*O*-acetyl- und einiger Dimethyl-diacetyl-Verbindungen, soweit sie nicht vorhanden waren¹⁹⁾, nach in der Literatur beschriebenen Verfahren dar.

2.6-Dimethyl-galaktose: 2.3 g α -Methyl-*D*-galaktosid wurden in 50 ccm absol. *Aceton* mit 6 g wasserfreiem CuSO_4 einen Tag bei 20° gerührt. Nach Abfiltrieren und Abdampfen erhielten wir 2.6 g eines hellen Sirups (Gemisch von α -Methyl-3.4-isopropyliden- und α -Methyl-4.6-isopropyliden-galaktosid). Die Methylierung des Gemisches erfolgte in 20 ccm DMF mit 4 g BaO + 2 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ und 14 ccm CH_3J . Nach 24stdg. Rühren bei 20° wurde aufgearbeitet; Ausb. 2.5 g.

Abspaltung der Isopropylidengruppen und gleichzeitige Anomerisierung erreichten wir durch 1stdg. Kochen mit 3-proz. *methanol.* HCl. Nach *Acetylierung* erhielten wir 2.7 g eines farblosen Sirups. Die gaschromatographische Analyse des Gemisches ergab 14% Methyl-2.6-dimethyl-3.5-diacetyl-galaktofuranosid und 39% α -Methyl-2.6-dimethyl-3.4-diacetyl-galaktopyranosid. Die beiden Substanzen wurden gaschromatographisch präparativ abgetrennt und lieferten nach Hydrolyse mit 1*n* H_2SO_4 (5 Stdn. bei 100°) kristallisierte 2.6-Dimethyl-galaktose $\cdot \text{H}_2\text{O}$. Schmp. 109°, $[\alpha]_D^{20}$: +46 \rightarrow +88° ($c = 1.1$, in Wasser) (Lit.: Schmp. 106 bis 108°, $[\alpha]_D^{20}$: +45 \rightarrow +88° (in Wasser)).

Auf eine Gewinnung der 2.3-Dimethyl-galaktose wurde verzichtet, da diese auf anderem Wege leicht zugänglich ist.

Lacto-N-tetraose

Methylierung: 320 mg *Lacto-N-tetraose*, gelöst in 5 ccm DMF + 5 ccm DMSO, wurden bei 0° mit 1.7 g BaO + 1.7 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ und 5.5 ccm *Dimethylsulfat* versetzt und nach Auftauen des Eises 48 Stdn. bei 20° gerührt. Danach versetzten wir mit 100 ccm Chlf., zentriugierten den Niederschlag ab, wuschen diesen mit 30 ccm Chlf. und schüttelten die klaren Überstände mit 30 ccm 2*n* Ammoniak und 3 mal mit je 20 ccm Wasser aus, wobei dem 2. Waschwasser einige Tropfen 2*n* Essigsäure zugesetzt wurden. Trocknen der Chlf.-Lösung über Na_2SO_4 und Abdampfen ergab 280 mg (75%) eines hellgelben Sirups. (Zur Entfernung von Resten DMF und DMSO mußte noch mehrmals i. Vak. mit je 10 ccm Toluol abgedampft werden.) Aus Essigester/Benzin (60–70°) kristallisierten 140 mg β -Methyl-dodecamethyl-lacto-*N*-tetraosid, Schmp. 177–178° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: +13° ($c = 1.0$, in CHCl_3). Auf Grund der Drehung von *Lacto-N-tetraose*, $[\alpha]_D^{20}$: +38 bis +25°, ist anzunehmen, daß das β -Methylglykosid der Dodecamethyl-lacto-*N*-tetraose vorliegt.

$\text{C}_{39}\text{H}_{71}\text{NO}_{21}$ (889.9) Ber. C 52.63 H 8.04 OCH_3 45.33 Gef. C 52.37 H 7.65 OCH_3 45.87

Methanolyse: 35 mg krist. *Permethyl-lacto-N-tetraosid* wurden mit 1 ccm 5-proz. *methanol.* HCl (wasserfrei) 16 Stdn. gekocht. Dann wurde mehrmals mit Benzol i. Vak. bei 0–5° abgedampft und der Rückstand acetyliert (0.5 ccm Pyridin + 0.5 ccm *Acetanhydrid*, 20 Stdn. bei 20°). Überschüss. Pyridin und *Acetanhydrid* wurden durch mehrmaliges Abdampfen mit Toluol i. Vak. vertrieben. Den Rückstand (37 mg) destillierten wir aus einem Kugelrohr bei 80–120°/10⁻³ Torr. Gaschromatographische Analyse s. Abbild. 1 und 2.

¹⁹⁾ Fräulein Dr. A. GAUHE und Herrn H. TRISCHMANN danken wir für die Überlassung verschiedener Trimethylhexosen.

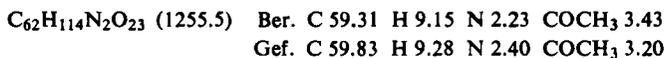
Des-LS-gangliosid

Darstellung: 1 g *Gangliosid G_I* (freie Säure) wurde in 100 ccm *n*/100 HCl gelöst, 40 Min. bei 80° gehalten (Dampfbad) und nach Abkühlen bei 4° erschöpfend gegen Wasser dialysiert. Der Schlauchinhalt wurde gefriergetrocknet (800 mg). In gleicher Weise kann man Gemische der *Ganglioside G_I–G_{IV}* der Partialhydrolyse unterwerfen. 2.7 g des gefriergetrockneten Produktes gaben wir auf eine Säule (3.5 cm \varnothing und 35 cm Füllhöhe) von Al₂O₃ (Wölm, neutral, Akt.-Stufe V) und eluierten mit Propanol/Wasser (4 : 1). Wir erhielten: a) 0.5 g eines *Cerebrosid*-Gemisches, b) 1.2 g *Des-LS-gangliosid* und c) 0.9 g *Gangliosid G_I*.

Das *Cerebrosid*gemisch a) wurde zur weiteren Trennung auf Kieselgel (0.05–0.2 mm \varnothing)-Säulen mit Propanol/Wasser (4 : 1) als Laufmittel gegeben. Neben einigen Mischfraktionen erhielten wir damit chromatographisch einheitlich

	<i>R_{G_I}</i> *)	Schmp.
40 mg <i>Glucocerebrosid</i>	1.88	173–175°
150 mg <i>Ceramid-disaccharid</i>	1.70	231–232°
20 mg <i>Ceramid-trisaccharid</i>	1.45	228–230°
1200 mg <i>Des-LS-gangliosid</i>	1.18	210–212°

Das *Des-LS-gangliosid*, das noch 2–3% Asche enthielt, gaben wir in Propanol/Wasser (1 : 1) über eine Säule von Amberlite IR 120 (H⁺-Form). Das Eluat wurde bei 30° i. Vak. zur Trockne gebracht und aus Äthanol kristallisiert. Zur Analyse wurde 3 Stdn. über P₂O₅ bei 110°/10⁻³ Torr getrocknet.



Das nicht umgesetzte *Gangliosid G_I* wurde vom Al₂O₃ erst nach Zusatz von 0.5 *n* Essigsäure zum Elutionsgemisch vollständig heruntergewaschen. Mitgelöste Al-Salze wurden über Amberlite IR 120 (H⁺-Form) entfernt, das gefriergetrocknete Eluat wurde erneut der Partialhydrolyse unterworfen. Die Ausb. an *Des-LS-gangliosid* konnte so auf ca. 70% gesteigert werden.

Methylierung von Des-LS-gangliosid: 500 mg *Gangliosid* in 5 ccm DMF + 5 ccm DMSO versetzten wir bei 0° mit 1.7 g BaO + 1.7 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O (fein gepulvert) und 5 ccm *Dimethylsulfat*. Nach 24stdg. Rühren bei 20° gaben wir noch 2 g BaO und 3 ccm *Dimethylsulfat* zu. Nach insgesamt 2 Tagen wurde aufgearbeitet, wie bei der *Lacto-N-tetraose* beschrieben. Ausb. 450 mg (gef. OCH₃ 20.7), die wir zur Nachmethylierung in 15 ccm *Methyljodid* lösten. Wir kochten 2 Tage auf einem Magnetrührer unter Rückfluß bei 3maliger Zugabe von je 1 g Ag₂O und erhielten nach Aufarbeiten 270 mg eines hellgelben Sirups (gef. OCH₃ 26.6). Die Dünnschichtchromatographie (Benzol/absol. Äthanol (8 : 2)) zeigte neben einer Hauptkomponente mit *R_F* 0.55 noch ca. 6 andere Banden. Wie wir bei verschiedenen Ansätzen feststellten, führte nochmaliges Nachmethylieren nicht zu höheren Methoxylwerten, sondern zu stärkerem Abbau.

Weitere Reinigung: Kieselgel 0.05–0.2 und < 0.08 mm \varnothing wurden 1 : 1 gemischt und mit Benzol/absol. Äthanol (9 : 1) luftblasenfrei in eine 30-cm-Säule mit 2.5 cm \varnothing geschlämmt. 220 mg Methylierungsprodukt gaben wir gelöst in 2 ccm des Elutionsgemisches auf die vorher sorgfältig gewaschene Säule und erhielten 180 mg chromatographisch einheitliches *Permethyl-des-LS-gangliosid*, *R_F* 0.55. OCH₃ ber. 28.1, gef. 27.3.

*) Dünnschichtplatte mit Kieselgel G, Propanol/Wasser (3 : 1).

Methanolyse und Acetylierung erfolgten wie bei der Lacto-*N*-tetraose. Das acetylierte Produkt wurde in 20 ccm Wasser aufgenommen und die Fettsäure sowie das Sphingosin über eine 5-mm-Schicht von Kieselgur abfiltriert. Das Filtrat verdampften wir i. Vak. und destillierten im Kugelrohr bei $120^\circ/10^{-3}$ Torr. Gaschromatographische Analyse s. Abbild. 3.

a-Methyl-4.6-dimethyl-N-acetyl-3-O-acetyl-galaktosaminid: Das, wie oben beschrieben, aus Des-LS-gangliosid gewonnene Gemisch der Methylzucker lösten wir in 100 cmm Methanol und trennten gaschromatographisch präparativ das Galaktosaminid von den Methylhexosiden ab (220° , 1-m-Säule mit 6 mm \varnothing , Trägergas H_2 , 80 ccm/Min.). Eingespritzt wurden je 20 cmm der Lösung. Nach Beendigung der Trennung wurde die Substanz mit Chlf. aus der Falle gespült und in einem Kugelrohr nach Verdampfen des Lösungsmittels bei $120^\circ/10^{-3}$ Torr sublimiert. Wir erhielten 15 mg feine farblose Kristalle, Schmp. $111-112^\circ$, Misch-Schmp. mit einem synthet. Produkt²⁰⁾ $111-112^\circ$.

Ganglioside G_I und G_{II}

Die zur Methylierung dienenden Präparate wurden analysiert.

Gangliosid G_I :

$C_{73}H_{131}N_3O_{31}$ (1546.8)	Ber. C 56.68	H 8.54	N 2.72	COCH ₃ 5.57
	Gef. C 56.33, 56.73	H 8.45, 8.44	N 2.73, 2.85	COCH ₃ 5.31, 5.51

Gangliosid G_{II} :

$C_{84}H_{148}N_4O_{39}$ (1838.2)	Ber. C 54.88	H 8.12	N 3.05	COCH ₃ 7.03
	Gef. C 55.47, 54.27	H 8.77, 7.93	N 2.88, 2.96	COCH ₃ 7.49, 7.91

Da *Methylierungen* mit Dimethylsulfat schlechte Ausb. und zu geringe Methoxylwerte lieferten, verwendeten wir die unter l. c.²¹⁾ beschriebene Vorschrift.

500 mg *Gangliosid* G_I , gelöst in 10 ccm DMF, wurden bei $0-4^\circ$ mit 5 ccm CH_3J und 3 g Ag_2O gerührt. Nach 4 Tagen wurde vom Niederschlag abfiltriert, 2mal mit 5 ccm DMF gewaschen, das Filtrat nochmals mit 3 g Ag_2O und 5 ccm CH_3J versetzt und 24 Stdn. bei 20° gerührt. Nach Aufarbeiten und Trennen über eine Kieselgelsäule erhielten wir 400 mg dünn-schichtchromatographisch einheitliches *Permethyl-G_I*, R_F 0.27 (Benzol/absol. Äthanol (8 : 2)). OCH₃ ber. 29.5, gef. 28.6, 28.3.

500 mg *Gangliosid* G_{II} wurden ebenso methyliert; Ausb. 550 mg. Nachmethylierung²²⁾ ergab 500 mg. Dünnschichtchromatographie zeigte neben mehreren schwachen Banden eine Hauptkomponente mit R_F 0.18. Über eine Kieselgelsäule erhielten wir jedoch nur 60 mg der Komponente mit R_F 0.18, aber 320 mg mit R_F 0.13. Nach der Intensität der Ester-CO-Bande des IR-Spektrums dieser Substanz (in CCl_4) und der Analyse dürfte es sich hier um den Monomethylester von *Permethyl-G_{II}* gehandelt haben. Vermutlich wurde die eine der beiden Estergruppen von *Permethyl-G_{II}* während der Säulenchromatographie hydrolytisch gespalten.

Dimethylester von *Permethyl-G_{II}*: Ber. OCH₃ 30.5

Monomethylester von *Permethyl-G_{II}*: Ber. OCH₃ 29.8 Gef. OCH₃ 29.2

Methanolyse und Acetylierung erfolgten wie oben. Gaschromatographische Analyse s. Abbild. 4 und 5.

Methylhexosen aus Permethyl-G_I: Für *Methyl-2.6-dimethyl-diacetyl-galaktosid* erhielten wir im Gaschromatogramm 3 Peaks (E—G in Abbild. 4). Diese wurden bei präparativer Gaschromatographie gemeinsam in einer Falle kondensiert (18 mg). Hydrolyse mit *n* H_2SO_4

²⁰⁾ P. J. STOFFYN und R. W. JEANLOZ, J. Amer. chem. Soc. 76, 561 [1954].

²¹⁾ R. KUHN, I. LÖW und H. TRISCHMANN, Chem. Ber. 90, 203 [1957].

²²⁾ Nach TH. PURDIE und J. G. IRVINE, J. chem. Soc. [London] 83, 1021 [1903].

(5 Stdn. bei 100°) lieferte kristallisierte *2.6-Dimethyl-galaktose* (Monohydrat), Schmp. 108 bis 109°, Misch-Schmp. 108–109°. Bei Peak E handelt es sich um das furanoside Derivat der *2.6-Dimethyl-galaktose*. Wegen der Neigung der Galaktose zur Bildung furanosider Derivate ist mit deren Auftreten immer zu rechnen, wenn Stellung 4 nicht methyliert ist. So erhielten wir auch für die *2.3-Dimethyl-galaktose* 3 Peaks und für die *2.3.6-Trimethyl-galaktose* 4 Peaks.

Die durch Synthese gewonnene *2.6-Dimethyl-galaktose* gab nach Glykosidierung mit 1-proz. methanol. HCl und Acetylierung dieselben Peaks E–G. Auf der Dünnschichtplatte (Benzol/Äthanol (9 : 1)) wurden ebenfalls 3 Banden erhalten. Permethylierung eines solchen Gemisches E–G führte unter Abspaltung der Acetylgruppen zu einer Mischung von Methyl-*2.3.4.6-tetramethyl-* und Methyl-*2.3.5.6-tetramethyl-galaktosid*. Die direkte Methylierung¹¹⁾ von *D-Galaktose* führt zu einem ähnlichen Gemisch.

Methyl-*2.3.5.6-tetramethyl-galaktosid* wurde nach HAWORTH²³⁾ dargestellt. Wir erhielten aus 10 g *D-Galaktose* 9.5 g eines Produktes, das gaschromatographisch 65% der gewünschten Substanz enthielt. Fraktionierte Destillation über eine kleine Kolonne (10 cm lang, mit Glas-kugeln von 2 mm \varnothing) ergab eine Hauptfraktion (Sdp._{0.001} 60°) mit 80% furanosidem Anteil. Die weitere Reinigung erfolgte durch präparative Gaschromatographie (200°, 3-m-Polyester-säule, 21 mm \varnothing , 350 ccm H₂/Min.) bzw. durch Chromatographie an Kieselgel mit Benzol + 2% Äthanol. $[\alpha]_D^{20}$: -93.5° ($c = 2.08$, in Wasser) (Lit.: $[\alpha]_D^{20}$: -45.2° ($c = 1.42$, in Wasser)). Auf Grund der von HAWORTH²³⁾ angegebenen Drehung ist anzunehmen, daß seine Substanz noch pyranoside Permethylgalaktose enthielt.

β -Methyl-*2.3.4.6-tetramethyl-galaktosid*: $[\alpha]_D$: +19.6°, in Wasser

α -Methyl-*2.3.4.6-tetramethyl-galaktosid*: $[\alpha]_D$: +188.5°, in Wasser

Aus permethyliertem Gangliosid G_I isolierten wir ferner: *2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose* als farbloses Öl, $[\alpha]_D^{20}$: +61 \rightarrow +63.2° ($c = 1.85$, in Wasser) (Lit.: $[\alpha]_D$: +58 \rightarrow +63.3° (in Wasser)), und *2.3.6-Trimethyl-glucose*, Schmp. 120–122°, Misch-Schmp. 120–123°. α -Methyl-*4.6-dimethyl-N-acetyl-3-O-acetyl-galaktosaminid* wurde nur gaschromatographisch identifiziert.

Methylhexosen aus permethyliertem Gangliosid G_{II}: Wie Abbild. 5 zeigt, erhielten wir, ausgehend von Gangliosid G_{II}, anstelle des Tetramethylgalaktosids aus G_I *2.4.6-Trimethyl-galaktosid*. Da die dichte Lage der Peaks von Trimethylglucosid und -galaktosid eine gaschromatographisch präparative Trennung wenig lohnend erscheinen ließ, wurde nach Hydrolyse mit n H₂SO₄ auf einer Celite-535-Säule mit Butanol (wassergesätt.) als Laufmittel getrennt. Wir erhielten neben *Dimethylgalaktose* und *2.3.6-Trimethyl-glucose* 15 mg kristallisierte *2.4.6-Trimethyl-galaktose*, Schmp. 104–106°, Misch-Schmp. 104–105°.

Quantitative Bestimmung der Stearinsäure: Eingewogene Mengen der Ganglioside G_I und G_{II} (10–15 mg) wurden 18 Stdn. mit 1 ccm 7-proz. methanol. HCl unter Rückfluß hydrolysiert und quantitativ in ein Kugelrohr übergeführt. Die methanol. HCl wurde bei 1 Torr (0–5°) abgedampft, der *Stearinsäure-methylester* bei 100°/10⁻³ Torr überdestilliert und mit einer gewogenen Menge Benzol in die abgeschmolzene Spitze des Rohres gespült; aliquote Teile davon wurden in den Gaschromatographen eingespritzt. Als Eichlösung diente eine 1-proz. Lösung von Stearinsäure-methylester in Benzol. Arbeitsbedingungen: 203°, 100 ccm He/Min., 2-m-Polyestersäule mit WLD. Wir fanden, auf freie Stearinsäure bez.:

Gangliosid G_I: Ber. 18.39 Gef. 19.2, 19.6

Gangliosid G_{II}: Ber. 15.47 Gef. 15.5, 15.8

²³⁾ W. N. HAWORTH, D. A. RUELL und G. C. WESTGARTH, J. chem. Soc. [London] **125**, 2468 [1924].