

Peter Lutz, Werner Lochinger und Gisela Taigel

Zur Konformation der *N*-Acetyl-neuraminsäure

Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg
(Eingegangen am 8. Juli 1967)

Die NMR-Spektren von *N*-Acetyl-neuraminsäurederivaten, insbesondere von *O*-peracetylierten und *O*-permethylierten anomeren Ketosiden zeigen, daß stets die ¹C-Konformation vorliegt. Die absolute Konfiguration am C-Atom 2 ist für den *N*-Acetyl-neuraminsäure-methylester aus einer Fernkopplung zu bestimmen; das Ergebnis wird auf die anomeren Reihen der Ketoside übertragen.

Die Schreibweise von Neuraminsäurederivaten mit 3 äquatorialen Substituenten an den C-Atomen 4, 5 und 6 gründet sich bisher auf Überlegungen am Molekülmodell für Pyranosen.

Dabei muß der Einfluß am C-Atom 2 ketosidisch gebundener großer Reste unberücksichtigt bleiben, da deren Orientierung am Ring und damit auch die der Carboxylgruppe vorläufig nicht feststehen. Zwar sind zwei nach Darstellungsart, enzymatischer Spaltbarkeit, Schmelzpunkt (von Derivaten), Drehwert und IR-Spektrum unterscheidbare anomere Reihen von Ketosiden beschrieben worden¹⁻³⁾, ihre Bezeichnung als α - bzw. β -Ketoside gibt aber nur – im Sinne von *E. Fischer* und *Hudson* – das Ausmaß der Linksdrehung wieder und stellt keinen Anschluß an die tatsächliche Raumorientierung etwa der Hexosen dar.

An Hand hoch aufgelöster NMR-Spektren geeigneter Derivate sollte man eindeutig zwischen C1- und ¹C-Konformation entscheiden können. Die anomeren Methyl-^{1,2)} und Benzylketoside^{1,3)} gestatten auch in Form der *O*-Acetyl-Derivate keine eindeutigen Protonenzuordnungen; es lag nahe, auf deren *O*-Methyl-Derivate auszuweichen. Permethylierte Neuraminsäurederivate sind bisher nicht beschrieben worden, auch nicht im Zuge der Aufklärung neuraminsäurehaltiger Oligosaccharide^{4,5)}. Wir methylierten mit $\text{CH}_3\text{J}/\text{BaO}/\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ in DMF⁶⁾ und setzten die Benzylketoside *O*-peracetyliert mit freier Carboxylgruppe oder nach Veresterung mit Diazomethan ein. Das β -Ketosid erhielten wir aus Ansätzen nach *Faillard* und *Mitarbb.*³⁾ mit kleinen Modifikationen der Darstellung wie Acetylgruppenabspaltung mit Methylat nach *Zemplén* und anderer Dimensionierung der Linterspulversäule; aus 2.0 g *N*-Acetyl-neuraminsäure entstanden z. B. 1.03 g (40%) β -Ketosid nebst 0.1 g

¹⁾ *P. Meindl* und *H. Tuppy*, Mh. Chem. **96**, 802 (1965).

²⁾ *R. Kuhn*, *P. Lutz* und *D. L. McDonald*, Chem. Ber. **99**, 611 (1966).

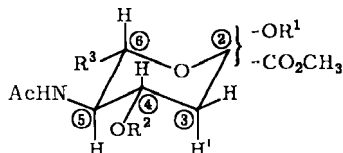
³⁾ *H. Faillard*, *G. Kirchner* und *M. Blohm*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **347**, 87 (1966).

⁴⁾ *R. Kuhn* und *H. Egge*, Chem. Ber. **96**, 3388 (1963).

⁵⁾ *E. Klenk* und *W. Gielen*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **330**, 218 (1963).

⁶⁾ *R. Kuhn* und *H. H. Baer* (unter Mitarbeit von *A. Seeliger*), Liebigs Ann. Chem. **611**, 236 (1958).

(4%) α -Ketosid und 0.38 g (15%) Anomerengemisch. Durch Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin, die erst bei Wiederholung alle OH-Gruppen erfaßte, und Diazomethanbehandlung kommt man zum kristallinen β -2-*O*-Benzyl-4.7.8.9-tetra-*O*-acetyl-*N*-acetyl-neuraminsäure-methylester (β -3). Ohne Nachmethylierung fielen kristalline Produkte mit berechnetem Methoxylwert an (Bestimmung unter *N*-Methyl-Bedingungen wegen Sekundärreaktionen des abgespaltenen CH_3I mit der NH-Gruppe⁷⁾); die NH-Acetylgruppierung ist zumindest in den kristallinen Fraktionen erhalten. Auf Dünnschichtchromatogrammen sieht man weitere, rascher laufende und nicht kristallisierende Fraktionen.



	R ¹	R ²	R ³
1	H	H	-[CHOH] ₂ -CH ₂ OH
α - 2 ; β - 2	CH ₃	Ac	-[CHOAc] ₂ -CH ₂ OAc
α - 3 ; β - 3	CH ₂ -C ₆ H ₅	Ac	-[CHOAc] ₂ -CH ₂ OAc
α - 4 ; β - 4	CH ₂ -C ₆ H ₅	CH ₃	-[CH(OCH ₃) ₂]-CH ₂ OCH ₃

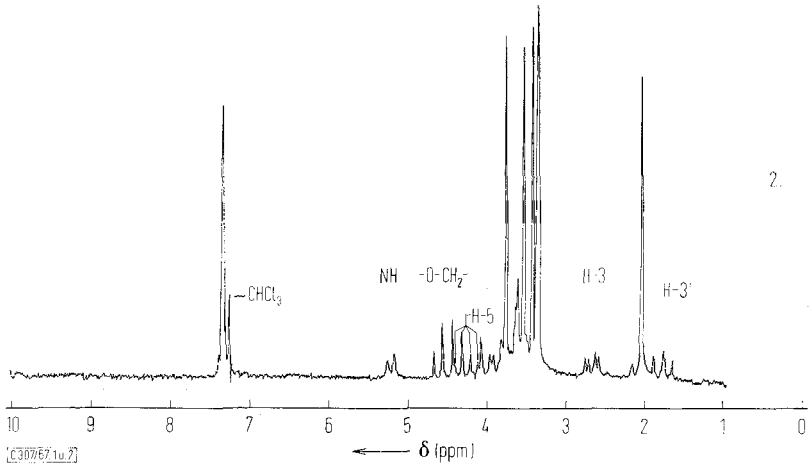
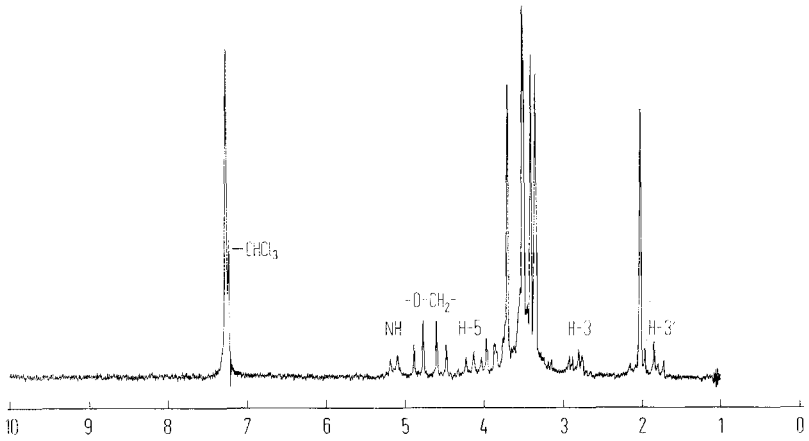
In den NMR-Spektren des *N*-Acetyl-neuraminsäure-methylesters (**1**), der Methylester der anomeren *O*-peracetylierten Methyl- (α -**2**; β -**2**) und Benzylketoside (α -**3**; β -**3**) sowie der anomeren *O*-permethylierten Benzylketoside (α -**4**; β -**4**) wurden die Kopplungskonstanten der ringständigen Protonen bestimmt (Tab. 1) und die chemischen Verschiebungen der ketosidischen Gruppen in verschiedenen deuterierten Lösungsmitteln verglichen. Man erkennt (vgl. Abbild. 1 und 2), daß die Spektren der Derivate anomerer Ketoside deutliche Unterschiede aufweisen und die oben aufgezählten Kriterien für das Vorliegen zweier Reihen ergänzen. Die beiden Protonen an C-3 ergeben stets ein AMX-Spektrum: z. B. zeigt H-3 in **1** δ = 2.08 ppm, H-3' 1.75 ppm gegen Tetramethylsilan in Hexadeutero-dimethylsulfoxid. Zuordnungen wurden getroffen durch Spinentkopplung ausgehend vom NH-Proton. Die Kopplungskonstanten zeigen, daß H-4 und H-5 sowie H-5 und H-6 jeweils diaxial zu einander stehen, was jeweils äquatorialer Stellung der OH-Gruppe, der NHAc-Gruppe und des Trihydroxypropylrestes an den C-Atomen 4 bzw. 5 und 6 entspricht. Die ¹C-Konformation geht aus den Diederwinkeln $\varphi_{\text{H-3',H-4}} \sim 180^\circ$, $\varphi_{\text{H-3,H-4}} \sim 45^\circ$ hervor, da diese in der C1-Konformation beide etwa 60° betragen müßten. Zugleich folgt unabhängig von den auf *N*-Acetyl-neuraminsäure angewandten klassischen Methoden der Stereochemie, daß die OH-Gruppe am C-Atom 4 in der Fischer-Projektion nach rechts^{8,9)} und die NHAc-Gruppe nach links¹⁰⁾ zu schreiben ist.

⁷⁾ Pregl-Roth, Quantitative organische Mikroanalyse, 7. Aufl., S. 253, Springer-Verlag, Wien 1958.

⁸⁾ R. Kuhn und G. Baschang, Chem. Ber. **95**, 2384 (1962).

⁹⁾ R. Kuhn und R. Brossner, Angew. Chem. **74**, 252 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. **1**, 218 (1962).

¹⁰⁾ S. Roseman und D. G. Comb, J. Amer. chem. Soc. **80**, 3166 (1958).

Abbild. 1. NMR-Spektrum von α -4 in CDCl_3 Abbild. 2. NMR-Spektrum von β -4 in CDCl_3 Tab. 1. Kopplungskonstanten und Diederwinkel (nach *Karplus*) der ringständigen Protonen in α -4 und β -4

Protonen	Kopplungskonstante J		Diederwinkel
	in α -4	in β -4	
H-3, H-3'	12.4	12.9	$\sim 180^\circ$
H-3', H-4	12.4	11.5	$\sim 180^\circ$
H-3, H-4	4.4	4.6	$\sim 45^\circ$
H-4, H-5	10.2	~ 10.0	$\sim 180^\circ$
H-5, H-6	10.2	~ 10.0	$\sim 180^\circ$

Tab. 2. Kopplungskonstanten des Triacetoxypropylrestes in α -3

Protonen	Kopplungskonstante J
H-6, H-7	1.8
H-7, H-8	7.8
H-9, H-9'	10.0

Am protonenfreien C-Atom 2 besteht keine Möglichkeit, aus direkten H,H-Kopplungen die Konfiguration der ketosidisch gebundenen Reste abzulesen; auch die Änderung der chemischen Verschiebung der aliphatischen Methyl- und Benzylprotonen beim Wechsel von CHCl_3 zu Benzol als Lösungsmittel ist zu gering (um -0.3 ppm) für eine eindeutige Zuordnung axial/äquatorial. Kürzlich wurden aber an einer Reihe von Pyranosen Fernkopplungen zwischen OH-Gruppe und Proton am benachbarten C-Atom gefunden¹¹⁾; sie traten ohne Ausnahme nur bei diaxialer Anordnung von OH-Gruppe und Proton auf. Auch bei **1** findet man eine derartige Fernkopplung, und zwar zwischen OH am C-Atom 2 und H-3' (2.1 Hz, in deuteriertem DMSO + deuteriertem Benzol 8:3). Daraus folgt die axiale Anordnung der OH-Gruppe in **1**.

Eine Mutarotation von **1** war weder im NMR-Spektrum der DMSO-Lösung noch an Hand der spätestens 2 Min. nach Herstellung einer Methanol-Lösung laufend registrierten Drehwerte festzustellen.

Den Übergang zu den früher²⁾ beschriebenen Ketosiden ermöglicht der Vergleich der optischen Drehungen: **1** hat ein $[\alpha]_D^{20}$ von -27° ($c = 1$, Methanol), die Acetohalogenverbindung von **1** dreht -63° ($c = 1$, Chloroform), die zur enzymatisch nicht spaltbaren Reihe gehörende β -2-O-Methyl-Verbindung von **1**: -46° ($c = 1$, Methanol), während die entsprechende α -2-O-Methyl-Verbindung -6.3° ($c = 1$, Methanol) dreht. Da nun eine OH-Gruppe am Anomeriezentrum von Zuckern denselben Drehsinn, aber einen kleineren Drehwert als eine OR-Gruppierung hat, ordnet sich das stärker linksdrehende, zur enzymatisch nicht spaltbaren Reihe gehörende Methylketosid bzw. sein Methylester in eine Reihe ein mit **1** und dessen Acetochlorverbindung, die nach¹²⁾ ein axiales Chloratom hat; seine O-Methylgruppe steht also auch axial.

Eine weitere Betrachtung führt zum gleichen Ergebnis: bei der Glykosidsynthese nach *Koenigs/Knorr* tritt stets Konfigurationsumkehrung am anomeren C-Atom ein, wenn in Gegenwart von Silberionen und bei Raumtemperatur gearbeitet wird: die ketosidische Methoxylgruppe des enzymatisch spaltbaren, weniger stark linksdrehenden Methylketosids bzw. seines Methylesters stünde dann äquatorial.

Herrn Professor Dr. *Richard Kuhn* danken wir für sein Interesse und seine Unterstützung, Herrn Dr. *J. C. Jochims* für die Diskussion der NMR-Spektren.

¹¹⁾ *J. C. Jochims, G. Taigel, A. Seeliger, P. Lutz und H. E. Driesen*, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 4363.

¹²⁾ *D. Horton und W. N. Turner*, J. org. Chemistry **30**, 3387 (1965), und spätere Mitteilungen.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden im Apparat nach Tottoli der Firma Büchi, die Drehungen am Polarimeter Modell 141 der Firma Perkin-Elmer (dm-Rohr, 2.5 mm Blendenweite) und am registrierenden Spektralpholarimeter REPM 12 der Firma Zeiss bestimmt, die NMR-Spektren am HA-100-Gerät der Firma Varian aufgenommen (TMS als innerer Standard). Dünnschichtchromatogramme (DC) wurden in den Fließmitteln Benzol/Methanol 7:3 (A) und Butanol/Eisessig/Wasser 5:2:2 (B) auf Kieselgel G (*Merck*) entwickelt, die Substanzen mit H₂SO₄ und Ehrlich-Reagenz sichtbar gemacht; Entfernung von Lösungsmitteln stets im Rotationsverdampfer bei maximal 40° Badtemperatur.

β-2-*O*-Benzyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-*N*-acetyl-neuraminsäure-methylester (*β*-3): 0.100 g *β*-2-*O*-Benzyl-*N*-acetyl-neuraminsäure werden in 5 ccm *Pyridin* + 1.5 ccm *Acetanhydrid*, anfangs bei 0°, 18 Stdn. lang aufbewahrt. Der Ansatz wird in Eiswasser gegeben, zum Sirup eingengt und in 5 ccm Methanol über eine mit einigen ccm IR-120-H[®] (mit Methanol gewaschen) beschickte Säule gegeben. Aus Percolat und Waschflüssigkeit 0.135 g (95%) Sirup. Dieser wird in 1 ccm Methanol gelöst, mit 30 ccm Äther versetzt und mit überschüss. *Diazomethan* 15 Min. stehengelassen. Nach Abziehen des Lösungsmittels bleiben 0.133 g (93%) sirupöses Produkt zurück. Das DC in A zeigt ein Gemisch von teilacetylierten Substanzen. Wiederholung der oben beschriebenen Acetylierung liefert 0.123 g (85%) durchkristallisierendes, im DC nahezu einheitliches Produkt (*R_F* 0.65). Nach zweimaligem Umfällen aus Essigester/wenig Methanol/Hexan erhält man Nadeln in Drusen vom Schmp. 135.5–138.5°. $[\alpha]_D^{20}$: -1.3° (*c* = 1, Methanol). Zur Analyse wird 12 Stdn. bei 70°/10⁻³ Torr getrocknet.

C ₂₇ H ₃₅ NO ₁₃	(581.6)	Ber. C 55.75	H 6.06	N 2.41	1 OCH ₃ 5.33
C ₂₇ H ₃₅ NO ₁₃ · 1 H ₂ O	(599.6)	Ber. C 54.08	H 6.22	N 2.33	1 OCH ₃ 5.17
		Gef. C 54.16, 53.49	H 5.85, 5.91	N 2.24, 2.41	OCH ₃ 5.57

Im IR (KBr-Preßling) neben NH-Bande und Acetyloberschwingung Bande bei 3625/cm, die in CHCl₃ ebenfalls an für Wasser und nicht für OH-Valenzschwingung charakteristischer Stelle (3670/cm) auftritt.

α-2-*O*-Benzyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-*N*-acetyl-neuraminsäure-methylester (*α*-3): 0.5 g *α*-2-*O*-Benzyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-*N*-acetyl-neuraminsäure¹⁾ werden in Methanol/Äther (1:10) mit überschüss. *Diazomethan* 15–30 Min. stehengelassen; nach Vertreiben der Lösungsmittel verbleiben 0.5 g sirupöses Produkt; aus Essigester/etwas Methanol fällt nach Zugabe von Hexan zunächst stets ein Sirup aus, der im Laufe von Tagen durchkristallisiert. Schmp. 83.5 bis 89°. $[\alpha]_D^{20}$: -3.1° (*c* = 1, Methanol). Zur Analyse wird 12 Stdn. bei 70°/10⁻³ Torr getrocknet.

C ₂₇ H ₃₅ NO ₁₃	(581.6)	Ber. C 55.75	H 6.06	N 2.41	1 OCH ₃ 5.33
		Gef. C 54.95	H 5.98	N 2.51	OCH ₃ 5.28

α-2-*O*-Benzyl-4,7,8,9-tetra-*O*-methyl-*N*-acetyl-neuraminsäure-methylester (*α*-4): 1.0 g *α*-3 werden in 12 ccm DMF mit 3 g BaO + 1.5 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O + 3 ccm CH₃J 10 Stdn. bei 40° und 30 Stdn. bei Raumtemperatur unter Rückflußkühlung gerührt, nach 6 Stdn. nochmals 2 ccm CH₃J zugegeben (in anderen Ansätzen wurde die Reaktionszeit ohne Ausbeuteminderung auf 20 Stdn. verkürzt). Der Ansatz wird mit 150 ccm CHCl₃ verdünnt und filtriert, der Rückstand mit CHCl₃ nachgewaschen; Filtrat und Waschflüssigkeit werden vereinigt, nacheinander mit Wasser, Thiosulfatlösung (bis zum Verschwinden der Braunfärbung) und nochmals mit Wasser geschüttelt und mit Na₂SO₄ getrocknet. Nach Vertreiben des CHCl₃ wird noch verbliebenes DMF durch mehrfaches Nachdampfen mit Toluol (p. a.) entfernt. Das zunächst sirupös anfallende Produkt (ca. 0.8 g) kristallisiert durch. Nach 2maligem Umkristallisieren aus Essigester/Hexan erhält man 0.45 g (55%, in anderen Ansätzen 41–50%) in feinen Nadeln

vom Schmp. 180–183.5°. $[\alpha]_D^{20}$: $\pm 18.4^\circ$ ($c = 2.2$, Methanol). Zur Analyse wird bei $70^\circ/10^{-3}$ Torr über Nacht getrocknet.

$C_{23}H_{35}NO_9$ (469.6) Ber. C 58.83 H 7.51 N 2.98 5OCH₃ 33.05

Gef. C 58.42 H 7.34 N 3.08 OCH₃ 32.47*)

*) Unter *N*-Methyl-Bedingungen; unter *O*-Methyl-Bedingungen 29.87%. Das NMR-Spektrum (Integrator) beweist ebenfalls *O*-permethylierte Substanz auf Grund des Verhältnisses Acetyl- zu Methoxylprotonen.

β -2-*O*-Benzyl-4,7,8,9-tetra-*O*-methyl-*N*-acetyl-neuraminsäure-methylester (β -4): 0.6 g 2-*O*-Benzyl-*N*-acetyl-neuraminsäure werden wie oben beschrieben acetyliert und mit Diazomethan verestert. Das nicht umkristallisierte Rohprodukt β -3 (0.845 g, 93%) wird in 15 ccm DMF zusammen mit 4 g BaO + 2 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O + 4 ccm CH₃J 30 Stdn. lang gerührt, zuletzt einige Stunden bei 40° unter Rückfluß. Man arbeitet auf wie bei der Darstellung von α -4. Ausb. 0.44 g (75%, bez. auf die eingesetzte 2-*O*-Benzyl-*N*-acetyl-neuraminsäure). Das in A und B entwickelte DC zeigt im wesentlichen 2 Komponenten mit R_F 0.65 (in A; auf Grund der Flecken geschätzt: 10–20%) und 0.60 (80–70%). Umkristallisieren aus Essigester/wenig Methanol/Hexan ergibt 0.041 bzw. 0.065 g in 2 Fällungen. Große solitäre Prismen, Schmp. (nach 2maligem Umkristallisieren) 154.5–157°. $[\alpha]_D^{20}$: -12.4° ($c = 1$, Methanol). Der Vergleich der von Acetyl- und Methoxylprotonen im NMR-Spektrum gegebenen Integratorstufe zeigt unabhängig ein *O*-permethyliertes Ketosid. Misch-Schmp. α -4/ β -4: Beginn bei 140°, durchgeschmolzen bei 156°. Zur Analyse wird bei $70^\circ/10^{-3}$ Torr über Nacht getrocknet.

$C_{23}H_{35}NO_9$ (469.6) Ber. C 58.83 H 7.51 N 2.98 5OCH₃ 33.05

Gef. C 58.20 H 7.48 N 2.95 OCH₃ 32.94*)

*) Unter *O*-Methyl-Bedingungen: 31.45%.

[307/67]