

# Über synthetische Ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure, 1. Mitt.:

Darstellung einer Reihe durch Neuraminidase spaltbarer  
Ketoside

Von

P. Meindl und H. Tuppy

Aus dem chemischen Laboratorium der Arzneimittelforschung Ges. m. b. H.  
und dem Institut für Biochemie der Universität Wien

(Eingegangen am 27. Januar 1965)

N-Acetyl-D-neuraminsäure wurde mit Acetanhydrid acetyliert, die erhaltene 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure mit trockenem Chlorwasserstoff in die 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-2-chlor-2-deoxy-D-neuraminsäure übergeführt und diese mit verschiedenen aliphatischen, araliphatischen und hydroaromatischen Alkoholen in Gegenwart säurebindender Mittel umgesetzt; schließlich wurden die O-Acetylgruppen mit verdünntem Alkali entfernt. Auf diese Weise wurde eine Anzahl verschiedener Ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure gewonnen, von denen nur eines, das m-Nitrobenzyl-glykosid, kristallisierte, alle jedoch gut kristallisierende Tetra-O-acetyl-Derivate gaben.

Den in dieser Arbeit beschriebenen synthetischen Ketosiden, aus denen der glykosidisch gebundene Alkohol durch *Vibrio-cholerae*-Neuraminidase enzymatisch abgespalten werden kann, wird die  $\alpha$ -Konfiguration zugeschrieben.

N-Acetyl-D-neuraminic acid was acetylated with acetic anhydride and the resulting 2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminic acid treated with dry hydrogen chloride to give 4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl-2-chloro-2-deoxy-D-neuraminic acid. The latter was reacted with various aliphatic, araliphatic and hydroaromatic alcohols, in the presence of acid-binding agents, and finally the O-acetyl groups were removed with the help of dilute alkali. Thereby a number of different ketosides of N-acetyl-D-neuraminic acid were obtained. Only one of them, viz. the m-nitrobenzyl glycoside, crystallized as such. The others, however, gave well crystallizing tetra-O-acetyl derivatives. The synthetic ketosides of neuraminic acid described in this paper,

all of which are cleaved by the receptor-destroying enzyme of *Vibrio cholerae* with release of the glycosidically bound alcohol, are considered to be the  $\alpha$ -anomers.

N-Acetyl- und N-Glykolylnneuraminsäure sind weit verbreitete Bestandteile zahlreicher Oligo- und Polysaccharide, Glykolipide und Glykoproteine<sup>1</sup>. Für die von diesen Verbindungen ausgeübten biologischen Wirkungen haben sich die Acylneuraminsäure-Reste in vielen Fällen als mitverantwortlich erwiesen. So sind beispielsweise die hormonelle Wirksamkeit einiger Glykoprotein-Hormone<sup>2</sup>, die Befähigung von Gangliosiden zur Bindung von Tetanustoxin<sup>3</sup>, die Blutgruppen-M- und -N-Aktivität von Bestandteilen der Erythrocytenoberfläche<sup>4</sup>, die Myxovirus-Rezeptoreigenschaft von Substanzen in der Membran der roten Blutkörperchen und anderer Zellen<sup>5</sup> und die kompetitive Hemmwirkung verschiedener Mucopolysaccharide gegenüber der durch Viren hervorgerufenen Hämagglutination<sup>6</sup> von der Anwesenheit geeignet gebundener N-Acylneuraminsäure-Reste abhängig.

In den Glykolipid-, Glykoprotein- und Saccharid-Molekülen, die N-Acylneuraminsäure-Reste enthalten, sind diese meist in terminaler Stellung, über ihre glykosidische Hydroxylgruppe ketosidisch mit Galak-

<sup>1</sup> G. Blix, A. Gottschalk und E. Klenk, Nature [London] **179**, 1088 (1957); A. Gottschalk, "Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances", Cambridge University Press, Cambridge 1960.

<sup>2</sup> W. K. Whitten, Austr. J. Sci. Res., Ser. B, **1**, 388 (1948); R. Brossmer und K. Walter, Klin. Wschr. **36**, 925 (1958); A. Gottschalk, W. K. Whitten und E. R. B. Graham, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **38**, 183 (1960); M. E. Rafelson, H. Clauser und J. Legault-Démare, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **47**, 406 (1961); R. Got und R. Bourrillon, Nature [London] **189**, 234 (1961); P. H. Lowy, G. Keighley und H. Borsook, Nature [London] **185**, 102 (1959).

<sup>3</sup> W. E. van Heyningen und P. A. Miller, J. Gen. Microbiol. **24**, 107 (1961).

<sup>4</sup> G. F. Springer und N. J. Ansell, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **44**, 182 (1958); E. Romanowska, Naturwiss. **47**, 66 (1960); E. Klenk und G. Uhlenbruck, Z. physiol. Chem. **319**, 151 (1960).

<sup>5</sup> F. M. Burnet, J. F. McCrea und J. D. Stone, Brit. J. Exper. Pathol. **27**, 228 (1946); R. H. Kathan und R. J. Winzler, J. Biol. Chem. **238**, 21 (1963); E. Klenk und H. Lemprid, Z. physiol. Chem. **307**, 278 (1957); C. Howe, H. M. Rose und L. Schneider, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **96**, 88 (1957).

<sup>6</sup> S. G. Anderson, F. M. Burnet, S. Fazekas de St. Groth, J. F. McCrea und J. D. Stone, Austr. J. Exper. Biol. Med. Sci. **26**, 347, 355, 371, 381, 389, 403 (1948); A. Gottschalk und P. E. Lind, Brit. J. Exper. Pathol. **30**, 85 (1949); I. Tamm und F. L. Horsfall, J. Exper. Med. **95**, 71 (1952); A. Rosenberg, C. Howe und E. Chargaff, Nature [London] **177**, 234 (1956); A. Gottschalk und S. Fazekas de St. Groth, J. Gen. Microbiol. **22**, 690 (1960); A. Pusztai und W. T. J. Morgan, Biochem. J. **78**, 135 (1961); C. Howe, L. T. Lee und H. M. Rose, Arch. Biochem. Biophys. **95**, 512 (1961); H. Faillard, W. Pribilla und H.-E. Posth, Z. physiol. Chem. **327**, 100 (1962).

tose- oder N-Acetyl-galaktosamin-Resten verknüpft, angetroffen worden. Diese ketosidische Bindung ist verhältnismäßig säurelabil und wird enzymatisch durch „Neuraminidasen“ gespalten<sup>7</sup>. Zu den Enzymen, die ketosidisch gebundene N-Acetylneuraminsäure in Freiheit setzen und die biologische Aktivität ihrer Substrate, soweit diese auf den gebundenen Neuraminsäure-Resten beruht, zerstören, gehört das „receptor destroying enzyme“ (RDE) der Cholera vibrionen und anderer Bakterien<sup>8</sup>; Neuraminidasen stellen ferner charakteristische Komponenten von Influenza- und anderen Myxoviren dar<sup>9</sup>; in geringer Menge wurden sie auch in Geweben und Körperflüssigkeiten von Vertebraten angetroffen<sup>10</sup>.

Unter den bisher bekannten, N-Acetyl-D-neuraminsäure enthaltenden und durch Neuraminidase spaltbaren Substanzen hatte das Trisaccharid Acetylneuraminyl-lactose, das *Trucco* und *Caputto*<sup>11</sup> sowie *Heyworth* und *Bacon*<sup>11</sup> aus der Brustdrüse der Ratte und *Kuhn* und *Brossmer*<sup>12</sup> aus Frauenmilch isolierten, das niedrigste Molekulargewicht und den einfachsten Bau. An noch einfacheren und synthetisch darstellbaren Glykosiden der Neuraminsäure waren bislang nur zwei beschrieben: das 1941 von *Klenk*<sup>13</sup> gewonnene und gut kristallisierende Methylketosid der D-Neuraminsäure („Methoxy-neuraminsäure“), das bei der sauren Methanolyse von Gangliosiden und Mucinen anfällt, sowie das nicht kristallisierende N-Acetyl-D-neuraminsäure-methylketosid („Methoxy-sialinsäure“), das von *Blix et al.*<sup>14</sup> durch Erwärmen von N-Acetyl-D-neuraminsäure mit trockenem Methanol in Gegenwart von Dowex 50 und durch nachfolgende milde Verseifung des zunächst entstandenen Methylketosides des N-Acetyl-D-neuraminsäure-methylesters dargestellt worden ist. Beide Verbindungen werden jedoch von Neuraminidase nicht gespalten<sup>15, 16</sup>.

<sup>7</sup> A. Gottschalk, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **23**, 645 (1957); Adv. Enzymol. **20**, 135 (1958).

<sup>8</sup> F. M. Burnet und J. D. Stone, Austr. J. Exper. Biol. Med. Sci. **25**, 227 (1947); E. A. Popenoe und R. M. Drew, J. Biol. Chem. **228**, 673 (1957); E. Mohr und G. Schramm, Z. Naturforsch. **15 B**, 568 (1960); G. L. Ada, E. L. French und P. E. Lind, J. Gen. Microbiol. **24**, 409 (1961).

<sup>9</sup> G. K. Hirst, J. Exper. Med. **75**, 195 (1942); L. W. Mayron, B. Robert, R. J. Winzler und M. E. Rafelson, Arch. Biochem. Biophys. **92**, 475 (1960).

<sup>10</sup> L. Warren und C. W. Spearing, Biochem. Biophys. Res. Comm. **3**, 489 (1960); G. L. Ada und P. E. Lind, Nature [London] **190**, 1169 (1961); B. Cook und G. L. Ada, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **73**, 454 (1963).

<sup>11</sup> R. E. Trucco und R. Caputto, J. Biol. Chem. **206**, 901 (1954); R. Heyworth und J. S. D. Bacon, Biochem. J. [London] **66**, 41 (1957).

<sup>12</sup> R. Kuhn und R. Brossmer, Angew. Chem. **68**, 211 (1956); Chem. Ber. **92**, 1667 (1959).

<sup>13</sup> E. Klenk, Z. physiol. Chem. **268**, 50 (1941).

<sup>14</sup> G. Blix, E. Lindberg, L. Odin und I. Werner, Acta Soc. Med. Upsal. **61**, 1 (1956).

<sup>15</sup> D. Aminoff, Biochem. J. **81**, 384 (1961).

<sup>16</sup> J. D. Karkas und E. Chargaff, J. Biol. Chem. **239**, 949 (1964).

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die Synthese mehrerer durch Neuraminidase spaltbarer N-Acetyl-D-neuraminsäure-Ketoside beschrieben. Zu ihrer Darstellung bedienten wir uns des 1901 von *Koenigs* und *Knorr*<sup>17</sup> eingeführten und seither vielfach modifizierten und verbesserten allgemeinen Verfahrens zur Glykosidsynthese, bei dem Acetohalozucker mit Alkoholen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels umgesetzt und die Acetylgruppen von den dabei gebildeten acetylierten Glykosiden sodann durch milde Verseifung entfernt werden.

N-Acetyl-D-neuraminsäure ließ sich mit Hilfe von Acetanhydrid in Gegenwart von Pyridin oder auch eines sauren Katalysators (z. B.  $ZnCl_2$ ) ohne Schwierigkeit peracetylieren. Die in der Literatur noch nicht beschriebene 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure konnte nicht kristallisiert, sondern nur als amorphes Pulver, jedoch in reiner und chromatographisch einheitlicher Form gewonnen werden.

Wenn diese Substanz in einem Gemisch von Eisessig und Essigsäureanhydrid gelöst und trockener Chlorwasserstoff unter Kühlung eingeleitet wurde, bildete sich 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-2-chlor-2-deoxy-D-neuraminsäure (Acetochlorneuraminsäure), die nach Entfernung des Lösungsmittels durch Gefriertrocknen als farbloses, hygroskopisches Schaumharz anfiel; da die Acetochlorneuraminsäure leicht zersetzlich ist und ihr Chlorgehalt schon bei Zimmertemperatur in kurzer Zeit schnell absinkt, konnte sie nicht analysenrein erhalten werden. Aus Peracetyl-D-neuraminsäure und Bromwasserstoff bildete sich in analoger Weise eine Acetobromneuraminsäure, die infolge ihrer leichten Zersetzlichkeit noch weniger als die Acetochlorneuraminsäure rein isolierbar war.

Für die Darstellung der Peracetyl-D-neuraminsäure-Ketoside empfahl es sich, frisch bereitete Acetochlorneuraminsäure möglichst umgehend mit einem großen Überschuß Alkohol in Gegenwart von Silbercarbonat oder von Silberoxyd und Drierite<sup>®</sup> umzusetzen. Mit primären aliphatischen und araliphatischen Alkoholen, aber auch mit dem sekundären Alkohol Cyclohexanol ging die Glykosidbildung glatt vonstatten; je nach Schmelzpunkt und Viskosität des Alkohols wurde die Reaktion bei Temperaturen zwischen 20 und 40° ausgeführt und sie war in der Regel nach 10 bis 15 Stdn. beendet. Tertiäre aliphatische Alkohole (z. B. tert.- $C_4H_9OH$ ) konnten hingegen — vermutlich aus Gründen sterischer Hinderung — mit Acetochlorneuraminsäure nicht zur Umsetzung gebracht werden.

Wenn der Siedepunkt des für die Glykosidierung eingesetzten Alkohols nicht zu hoch lag, konnte dieser durch Vakuumdestillation aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden, ohne daß die Temperatur 60° überstieg. Der Eindampfrückstand wurde in Wasser oder in wäßrigem Aceton gelöst und die Abspaltung der O-Acetylgruppen mit verdünntem wäßrigem Alkali vorgenommen. Es erwies sich als vorteilhaft, die im Gemisch

<sup>17</sup> *W. Koenigs* und *E. Knorr*, Ber. dtsch. Chem. Ges. **34**, 957 (1901).

vorhandenen Ionen mit Hilfe geeigneter Austauscherharze zu entfernen und die Glykoside an deaktiviertem Aluminiumoxid chromatographisch zu reinigen. Zur Charakterisierung nicht kristallisierender N-Acetyl-D-neuraminsäure-Ketoside wurden diese mit Essigsäureanhydrid und Pyridin wiederum acyliert, da ihre 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-Derivate in der Regel gut kristallisierten.

Noch besser hat sich für die Aufarbeitung der Glykosidierungsgemische folgende Methode bewährt: Die ungelösten Anteile wurden durch Filtrieren abgetrennt und alle sauren Anteile einschließlich des Ketosids aus dem mit wäßrigem Aceton verdünnten Filtrat an einer DOWEX 1-X8-Säule (Formiat-Form) adsorbiert. Nachdem die Säule mit verdünntem Aceton und mit Wasser gründlich ausgewaschen worden war, wurden die peracetylierten Ketoside mit 0,4*n*-Ameisensäure in wäßrigem Aceton eluiert und die Eluate im Vakuum bei niedriger Temperatur auf ein kleines Volum eingengt. In den meisten Fällen kristallisierten die Peracetylneuraminsäure-Ketoside dabei in reiner Form aus. Durch Verseifung erhielten wir die freien Ketoside. Bisher gelang es, nur ein einziges von ihnen, das N-Acetyl-D-neuraminsäure-*m*-nitrobenzyl-Ketosid, in kristallisierter Form zu gewinnen; die übrigen wurden als hygroskopische, amorphe Harze, wenn auch dünnschicht- und papierchromatographisch einheitlich, erhalten.

Bei der Synthese der Peracetyl-D-neuraminsäure-Ketoside aus Acetochlorneuraminsäure und Alkoholen läßt sich anstelle von Silbercarbonat oder Silberoxid auch Quecksilbercyanid<sup>18</sup> als säurebindendes Mittel einsetzen. Wir stellten auf diese Weise ein Cyclohexyl-Glykosid der Peracetylneuraminsäure und durch dessen Verseifung ein Präparat von N-Acetyl-D-neuraminsäure-cyclohexyl-Ketosid her, das mit dem nach der Silbercarbonat-Methode erhaltenen Präparat in allen Eigenschaften übereinstimmte. Die Verwendung des Quecksilbercyanids erschwert allerdings die Aufarbeitung der Glykosidierungsgemische; da die Quecksilberionen sich mit Hilfe eines Kationenaustauschers nicht zur Gänze entfernen ließen, mußten sie durch Einleiten von H<sub>2</sub>S in essigsaurer Lösung als (mitunter kolloidal ausfallendes) Sulfid abgetrennt werden.

Die von uns dargestellten Ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure haben eine stark acide, gut titrierbare Carboxylgruppe. Da die Amino-Gruppe der Zuckerkomponente acyliert ist, geben sie mit Ninhydrin erwartungsgemäß keine Farbreaktion. Schon bei milder saurer Hydrolyse entsteht durch Spaltung der glykosidischen Bindung freie Neuraminsäure, die sich papierchromatographisch leicht nachweisen läßt. Unter den stark sauren Bedingungen des Resorcin-Tests nach *Svennerholm*<sup>19</sup> reagieren die

<sup>18</sup> B. Helferich und W. Ost, Chem. Ber. **95**, 2612 (1962).

<sup>19</sup> L. Svennerholm, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **24**, 604 (1957).

Ketoside der Neuraminsäure so wie diese selbst stark positiv. Hingegen ist die Farbe, die sie mit Thiobarbitursäure unter den milderen Reaktionsbedingungen der Methode von *Aminoff*<sup>15</sup> geben, nur 3 bis 5% so stark wie die mit einer äquivalenten Menge N-Acetyl-D-neuraminsäure entstehende Färbung.

Die nach dem Glykosidierungsverfahren von *Koenigs* und *Knorr* synthetisierten N-Acetyl-D-neuraminsäure-Ketoside haben sich, wie in einer späteren Arbeit ausführlicher beschrieben werden wird, als Substrate sowohl der *Vibrio-cholerae*-Neuraminidase als auch der Influenzavirus-Neuraminidase erwiesen. Nach *Kuhn* und *Brossmer*<sup>20</sup> ist im Trisaccharid Lactaminsäure-lactose der durch Neuraminidase abspaltbare N-Acetyl-D-neuraminsäure-Rest  $\alpha$ -ketosidisch mit der Lactose verknüpft und die Spezifität des Fermentes demnach die einer  $\alpha$ -Ketosidase. Auch *Gottschalk*<sup>1</sup> schreibt der Neuraminidase  $\alpha$ -Ketosidase-Wirkung zu. Die synthetischen Neuraminidase-Substrate, die wir in der vorliegenden Arbeit beschreiben, wären somit  $\alpha$ -Ketoside\*. Für diese Konfigurationszuordnung sprechen auch die in der folgenden Arbeit<sup>21</sup> mitgeteilten Ergebnisse und Überlegungen.

Herrn *H. Mahr* und Frau *A. Edelmann* danken wir für vorzügliche Mitarbeit.

Der 1. Frauenklinik der Univ. Wien (Vorstand: Prof. Dr. *T. Antoine*), der Ignaz-Semmelweis-Frauenklinik (Vorstand: Prof. Dr. *H. Husslein*) und der Gynäkologischen Abteilung des Wilhelminenspitals (Vorstand: Prim. Dr. *H. Schorsch*) sind wir für die Überlassung von Meconium zu Dank verpflichtet.

### Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Heitzischmikroskop nach *Kofler* bestimmt.

Die Elementaranalysen wurden von Herrn Dr. *J. Zak*, Univ. Wien, ausgeführt; die in dieser Arbeit angegebenen Werte sind jeweils das Mittel aus den Ergebnissen einer Doppelbestimmung.

<sup>20</sup> *R. Kuhn* und *R. Brossmer*, *Angew. Chemie* **70**, 25 (1958).

<sup>21</sup> *P. Meindl* und *H. Tuppy*, *Mh. Chem.* **96**, 816 (1965).

\* Wenn bei der Synthese nach *Koenigs* und *Knorr*  $\alpha$ -Glykoside der Neuraminsäure entstehen, so doch nicht ausschließlich; wurden nämlich nach der Umsetzung von Acetochlor-neuraminsäure mit Alkoholen die Peracetyl-neuraminsäure- $\alpha$ -Ketoside durch Kristallisation gewonnen und sodann die in den Mutterlaugen verbliebenen Begleitstoffe entacetyliert, so konnten geringe Mengen von Ketosiden festgestellt und auf Grund ihres etwas niedrigeren  $R_F$ -Wertes chromatographisch abgetrennt werden, die durch Neuraminidase nicht gespalten wurden und somit vermutlich die  $\beta$ -Anomeren waren. Eine ergiebigerere und einfachere Methode zur Darstellung der  $\beta$ -Ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure wird in der folgenden Mitteilung<sup>21</sup> beschrieben.

Die optischen Drehungen wurden mit einem Zeiss Kreispolariometer  $0,01^\circ$  in 1 dm-Polarimeterrohren gemessen.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel G nach Stahl (Merck) und als Laufmittel n-Butanol—n-Propanol—0,1*n*-HCl (1:2:1, *v/v/v*), für die Papierchromatographie Schleicher & Schüll-Papier 2043 a und als Laufmittel Äthylacetat—Eisessig—Wasser (3:1:3, *v/v/v*, absteigend) verwendet. Um die Neuraminsäurederivate sichtbar zu machen, wurden die Dünnschichtchromatogramme mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Wasser (1:1, *v/v*) besprüht und erhitzt<sup>22</sup>, die Papierchromatogramme mit Natriummetaperjodat und Benzidin<sup>23</sup> behandelt. Als  $R_{NA}$  bezeichnen wir die auf den  $R_F$ -Wert der N-Acetyl-D-neuraminsäure (= 1,00) bezogenen „relativen“  $R_F$ -Werte der Neuraminsäurederivate.

N-Acetyl-D-neuraminsäure wurde nach den Angaben von Zilliken und O'Brien<sup>24</sup> aus Meconium isoliert und aus Wasser—Methanol—Äthyläther<sup>25</sup> umgelöst. Aus Ansätzen von je 500 g Kindspech erhielten wir durchschnittlich 3,6 g umkristallisierte N-Acetyl-D-neuraminsäure. Schmp.: Zers. ab  $185^\circ$ .  $[\alpha]_D^{25} = -32,7^\circ$  ( $c = 10,0$ , Wasser).

#### 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure

a) 309 mg N-Acetyl-neuraminsäure wurden mit 4 ml Pyridin (über KOH destilliert) und 4,7 ml frisch destill. Acetanhydrid unter kräftigem Rühren und Eiskühlung versetzt. Nach 36 bis 48 Stdn. war die gesamte N-Acetyl-neuraminsäure gelöst und die Reaktion beendet. Die klare gelbliche Lösung wurde auf 50 g zerkleinertes Eis gegossen und die Mischung 1 Stde. unter Kühlung gerührt. Das Pyridin wurde in einer mit der entsprechenden Menge eines Kationenaustauschers (DOWEX 50-X 8, H<sup>+</sup>-Form) beschickten Säule aus der Lösung entfernt. Die Eluate, welche die Peracetylverbindung enthielten, wurden gesammelt und lyophilisiert. Man erhielt 485,4 mg (90% d. Th.) weiße, amorphe 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acetyl-neuraminsäure. Dünnschichtchromatogramm:  $R_{NA} = 2,69$ .

C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>O<sub>14</sub>N · H<sub>2</sub>O (537,5). Ber. C 46,93, H 5,81, N 2,61.  
Gef. C 46,36, H 5,94, N 2,66.

b) 826 mg trockenes ZnCl<sub>2</sub> wurden bei Zimmertemp. durch kräftiges Schütteln in 5,7 ml frisch destill. Acetanhydrid gelöst. In diese Lösung wurden 309 mg N-Acetyl-neuraminsäure eingetragen. Nach drei Tagen bei etwa  $25^\circ$  C war die N-Acetyl-neuraminsäure in Lösung gegangen und die Acetylierung vollständig. Das überschüssige Acetanhydrid wurde, wie unter a) beschrieben, zersetzt und die Lösung mittels geeigneter Austauschharze entsalzt; ein für das Reaktionsprodukt schädliches Absinken des pH-Wertes der Lösung ließ sich dadurch vermeiden, daß zuerst die Cl<sup>-</sup>-Ionen mit der genau berechneten Menge eines Anionenaustauschers (DOWEX 2-X 10, Acetat-Form) und darauf die Zn<sup>++</sup>- und Pyridinium-Ionen mit der entsprechenden Menge eines Kationenaustauschers (DOWEX 50-X 8, H<sup>+</sup>-Form)

<sup>22</sup> K. Randerath, Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie G.m.b.H., Weinheim/Bergstraße, 1962.

<sup>23</sup> Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, E. Merck A. G., Darmstadt, 5 (Reagens Nr. 22).

<sup>24</sup> F. Zilliken und P. J. O'Brien, Biochem. Preparat. 7, 1 (1960).

<sup>25</sup> E. Martensson, A. Raal und L. Svennerholm, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] 30, 124 (1958).

entfernt wurden. Durch Lyophilisieren der Eluate erhielten wir 438,5 mg (81% d. Th.) weiße, amorphe 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acetyl-neuraminsäure.

Die nach a) und b) gewonnenen Peracetyl-neuraminsäuren waren sowohl papierchromatographisch (in den Lösungsmittelgemischen Äthylacetat—Eisessig—Wasser 3 : 1 : 3, n-Butanol—Pyridin—Wasser 6 : 4 : 3 und n-Butanol—Eisessig—Wasser 4 : 1 : 5) als auch dünn-schichtchromatographisch miteinander identisch.

#### *4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-2-chlor-neuraminsäure*

191 mg 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acetyl-neuraminsäure wurden in einer Mischung von 10 ml Eisessig und 5 ml Acetanhydrid gelöst. In diese Lösung wurde bei 0 bis 5° trockenes HCl-Gas bis zur Sättigung eingeleitet. Man ließ 12 Stdn. bei + 5° stehen. Dann wurden im Vak. bei 40° Lösungsmittel und HCl abgetrieben. Durch Lösen des farblosen, öligen Rückstandes in 15 ml Eisessig und Gefriertrocknen erhielten wir 170,5 mg (96% d. Th.) dünn-schichtchromatographisch einheitliche Acetochlorneuraminsäure in Form einer weißen, amorphen Substanz, die sich allmählich zersetzte. Dünn-schichtchromatogramm:  $R_{NA} = 3,15$ .

$C_{19}H_{26}O_{12}NCl$  (495,9). Ber. C 46,02, H 5,28, N 2,82, Cl 7,15.  
Gef. C 45,11, H 5,57, N 2,70, Cl 5,35.

Der Cl-Wert sank innerhalb weniger Tage noch weiter auf 2,97% ab.

#### *2-Methyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (I A)*

533 mg Acetochlorneuraminsäure, 25 ml absol. Methylalkohol und 553 mg Silbercarbonat wurden 16 Stdn. bei 25° unter Lichtausschluß geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde durch Hyflo-Supercel und eine mit DOWEX 50-X 8 (H<sup>+</sup>-Form) beschickte Chromatographiesäule filtriert. Man wusch zuerst mit Methanol, dann mit Wasser gründlich nach. Das Filtrat wurde im Vak. bei 40° eingedampft und der ölige Rückstand bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Aus Methanol/Wasser/Äther erhielt man 213,8 mg kristallisierte und dünn-schichtchromatographisch einheitliche 2-Methyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure vom Schmp. 184—187° (Zers.). (Vgl. Tab. 1.)

#### *2-Methyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (I B)*

In einem anderen Versuch wurden 858 mg 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-2-chlorneuraminsäure mit 40 ml absol. Methanol und 600 mg Silbercarbonat versetzt und 20 Stdn. bei Zimmertemp. geschüttelt. Die Aufarbeitung erfolgte wie oben, doch wurde das ölige Reaktionsprodukt, das sich dünn-schichtchromatographisch als 2-Methyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure identifizieren ließ, nicht kristallisiert, sondern unmittelbar mit 4 ml 4*n*-NaOH bei 50° 30 Min. verseift.

Zur Entfernung der Kationen wurde durch eine mit überschüssigem Kationenaustauscher (DOWEX 50-X 8, H<sup>+</sup>-Form) beschickte Säule filtriert, das Filtrat zur weiteren Reinigung an desaktiviertem Aluminiumoxid chromatographiert; hierzu wurde Aluminiumoxid WOELM (neutral) mit reichlich Wasser aufgeschlämmt, 1 Stde. stehengelassen und dann in ein Chromatographierrohr von ungefähr 2 cm Durchmesser 10 cm hoch eingefüllt. Da das durch Eindampfen des Eluats gewonnene Harz (408 mg) chromatographisch noch nicht einheitlich war, wurde die Reinigung an desaktiviertem Aluminiumoxid einmal wiederholt. Das nun bei der Chromatographie als einheitlicher

Tabelle 1.  $\alpha$ -Ketoside der 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure

	Glykosidisch gebundener Rest	Summenformel	% C	% H	% N	% Halogen	Schmp., °C	$R_{NA}$ *	Ausb., %
I A	Methyl	$C_{20}H_{29}O_{13}N$	Ber. 48,88 Gef. 48,53	5,74 6,10	2,85 2,76		184—187 (Zers.)	3,46	40 <sup>a</sup>
II A	n-Hoxyl	$C_{25}H_{39}O_{13}N$	Ber. 53,47 Gef. 53,51	7,00 7,19	2,49 2,65		174—175 (Zers.)	4,23	47 <sup>b</sup>
III A	n-Amyl	$C_{24}H_{37}O_{13}N$	Ber. 52,64 Gef. 52,30	6,83 6,82	2,56 2,52		185—187 (Zers.)	4,23	42 <sup>b</sup>
IV A	Benzyl	$C_{26}H_{33}O_{13}N$	Ber. 55,03 Gef. 54,89	5,86 5,92	2,47 2,46		194—195 (Zers.)	4,39	35 <sup>b</sup>
V A	Cyclohexyl	$C_{25}H_{37}O_{13}N$	Ber. 53,66 Gef. 53,55	6,66 6,93	2,53 2,49		186—188 (Zers.)	4,20	50 <sup>b</sup>
VI A	p-Methoxybenzyl	$C_{27}H_{35}O_{14}N$	Ber. 54,24 Gef. 54,36	5,90 5,78	2,34 2,33		191—192 (Zers.)	4,40	45 <sup>a</sup>
VII A	Hexahydrobenzyl	$C_{26}H_{39}O_{13}N$	Ber. 54,44 Gef. 54,48	6,85 6,64	2,44 2,38		188—191 (Zers.)	4,90	30 <sup>a</sup>

VIII A	m-Chlorbenzyl	$C_{26}H_{32}O_{13}NCl$	Ber. 51,88 Gef. 51,70	5,36 5,62	2,33 2,31	5,89 5,96	195—200 (Zers.)	4,55	48 <sup>a</sup>
IX A	m-Brombenzyl	$C_{26}H_{32}O_{13}NBr$	Ber. 48,31 Gef. 48,64	4,99 5,00	2,17 2,21	12,36 12,19	186—187 (Zers.)	4,55	47 <sup>a</sup>
X A	m-Jodbenzyl	$C_{26}H_{32}O_{13}NJ$	Ber. 45,04 Gef. 45,34	4,65 4,92	2,02 1,78	18,30 17,96	180—182 (Zers.)	4,55	30 <sup>a</sup>
XI A	n-Decyl	$C_{29}H_{47}O_{13}N$	Ber. 56,38 Gef. 56,55	7,67 7,61	2,27 2,21		158—162 (Zers.)	4,90	29 <sup>a</sup>
XII A	3'-Acetoxypropyl	$C_{24}H_{35}O_{15}N$	Ber. 49,92 Gef. 49,43	6,11 6,05	2,43 2,37		147—154 (Zers.)	4,11	30 <sup>c</sup>
XIII A	5'-Acetoxypropyl	$C_{26}H_{39}O_{15}N$	Ber. 51,55 Gef. 51,41	6,49 6,38	2,31 2,37		160—162 (Zers.)	4,35	45 <sup>c</sup>
XIV A	m-Nitrobenzyl	$C_{26}H_{32}O_{15}N_2$	Ber. 50,98 Gef. 50,91	5,27 5,45	4,57 4,51		182—183 (Zers.)	4,40	

\* Bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G mit n-Butanol—n-Propanol—0,1*n*-HCl (1:2:1) als Laufmittel bestimmte relative  $R_F$ -Werte:  $R_F$  Verbindung/ $R_F$  N-Acetyl-D-neuraminsäure.

<sup>a</sup> Ausb. bezogen auf Acetochlorneuraminsäure, aus der das acetylierte Ketosid durch Umsetzung mit dem entsprechenden Alkohol in Gegenwart von  $Ag_2CO_3$  dargestellt worden ist.

<sup>b</sup> Ausb. bezogen auf das Ketosid der N-Acetyl-D-neuraminsäure, durch dessen Umsetzung mit Acetanhydrid und Pyridin das acetylierte Ketosid dargestellt worden ist.

<sup>c</sup> Ausb. bezogen auf Acetochlorneuraminsäure, aus der das acetylierte Ketosid durch Umsetzung mit dem entsprechenden Alkohol, alkalische Verseifung und neutralisierte Acetylierung dargestellt worden ist.

Fleck wandernde  $\alpha$ -Ketosid wurde zur Gewichtskonstanz (321 mg) getrocknet. (Vgl. Tab. 2.)

2-(*n*-Hexyl)-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (II B)

600 mg 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-2-chlorneuraminsäure wurden in 20 ml absol. *n*-Hexylalkohol gelöst, mit 720 mg Silbercarbonat versetzt und 16 Stdn. bei 25° unter Ausschluß von Licht geschüttelt. Zur Entfernung des

Tabelle 2.  $\alpha$ -Ketoside der *N*-Acetyl-D-neuraminsäure

	Glykosidisch gebundener Rest	Optische Drehung			$R_{NA}^{**}$	$R_{NA}^{***}$	Ausb., %
		$[\alpha]_D$	$c^*$	°C			
I B	Methyl	— 13°	10,9	25°	1,60	1,25	57 <sup>a</sup>
II B	<i>n</i> -Hexyl	— 11°	9,7	24°	4,30	2,81	42 <sup>a</sup>
III B	<i>n</i> -Amyl	— 11°	19,5	26°	3,95	2,31	55 <sup>a</sup>
IV B	Benzyl	— 8°	8,5	27°	4,25	2,43	59 <sup>a</sup>
V B	Cyclohexyl	— 8°	6,8	22°	3,90	2,53	41 <sup>a</sup> , 34 <sup>b</sup>
VI B	<i>p</i> -Methoxybenzyl	— 16°	5,7	23°	4,10	2,43	97 <sup>c</sup>
VII B	Hexahydrobenzyl	— 6°	7,5	23°	4,50	3,36	fast 100 <sup>c</sup>
VIII B	<i>m</i> -Chlorbenzyl					2,62	fast 100 <sup>c</sup>
IX B	<i>m</i> -Brombenzyl					2,68	fast 100 <sup>c</sup>
X B	<i>m</i> -Jodbenzyl					2,78	fast 100 <sup>c</sup>
XI B	<i>n</i> -Decyl	— 10°	6,6	23°	4,80	4,00	fast 100 <sup>c</sup>
XII B	3'-Hydroxypropyl	— 6°	7,8	23°	1,88	1,10	fast 100 <sup>c</sup>
XIII B	5'-Hydroxypentyl	— 6°	6,3	23°	2,72	1,49	fast 100 <sup>c</sup>
XIV B	<i>m</i> -Nitrobenzyl	— 7°	6,2	22°	4,28	2,63	13 <sup>a</sup>

\*  $c$  = Konzentration in Wasser.

\*\* Bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G mit *n*-Butanol—*n*-Propanol—0,1 *n*-HCl (1:2:1) als Laufmittel bestimmte relative  $R_F$ -Werte:  $R_F$  Verbindung/ $R_F$  *N*-Acetyl-D-neuraminsäure.

\*\*\* Bei der Papierchromatographie mit Äthylacetat—Eisessig—Wasser (3:1:3) als Laufmittel bestimmte relative  $R_F$ -Werte:  $R_F$  Verbindung/ $R_F$  *N*-Acetyl-D-neuraminsäure.

<sup>a</sup> Ausb. bezogen auf Acetochlorneuraminsäure, aus der das Ketosid durch Umsetzung mit dem entsprechenden Alkohol in Gegenwart von  $Ag_2CO_3$  und anschließende Verseifung dargestellt worden ist.

<sup>b</sup> Ausb. bezogen auf Acetochlorneuraminsäure, aus der das Ketosid durch Umsetzung mit dem entsprechenden Alkohol in Gegenwart von  $Hg(CN)_2$  und anschließende Verseifung dargestellt worden ist.

<sup>c</sup> Ausb. bezogen auf das acetylierte Derivat, durch dessen alkalische Verseifung das Ketosid der *N*-Acetyl-D-neuraminsäure dargestellt worden ist.

Großteiles der Ag-Salze wurde nach beendeter Reaktion durch eine ca. 2 cm hohe Schicht von Hyflo-Supercel filtriert und die Filtermasse mit 20 ml Aceton ausgewaschen. Im Filtrat ließen sich neben 2-*n*-Hexyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure dünnschichtchromatographisch noch zwei langsamer wandernde Substanzen nachweisen. Es wurde bei 50—60° im Vak. eingengt und der braune ölige Rückstand in 25 ml Aceton/Wasser (1:1) gelöst. Man versetzte die Lösung hierauf mit 10 ml 1*n*-NaOH, ließ 45 Min. bei 25° C stehen und erwärmte dann 15 Min. auf 40—50°. Die Verseifung der O-Acetylgruppen war unter diesen Bedingungen vollständig. Kolloidale Ag-Verbindungen, welche z. T. langsam ausflockten, färbten die Lösung dunkel. Neben der 2-*n*-Hexyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure ließ sich im Reaktionsgemisch noch eine zweite Substanz nachweisen, welche im Dünnschichtchromatogramm etwas schneller als *N*-Acetyl-neuraminsäure wanderte. Zur

Entfernung der Kationen wurde mit überschüssigem Kationenaustauscher (DOWEX 50-X 8, H<sup>+</sup>-Form) versetzt und das stark sauer reagierende Filtrat zur weiteren Reinigung über eine Säule aus deaktiviertem Aluminiumoxid filtriert. Das neutral reagierende Eluat wurde mit etwas DOWEX 50-X 8 (H<sup>+</sup>-Form) versetzt, der Austauscher abfiltriert, mit reichlich Wasser ausgewaschen und die vereinigten Filtrate, welche nun wieder stark sauer reagierten, im Vak. bei 40—50° eingedampft. Der Eindampfrückstand, ein farbloses Harz, wurde über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bis zur Gewichtskonstanz (201 mg) getrocknet. Die Substanz war dünn-schicht- und papierchromatographisch einheitlich (vgl. Tab. 2). Zur Charakterisierung wurde sie peracetyliert.

*2-(n-Hexyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (II A)*

165 mg 2-(n-Hexyl)-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure wurden in 2,7 ml Pyridin (über KOH destilliert) gelöst und mit 3,2 ml frisch destill. Acetanhydrid unter kräftigem Rühren und Eiskühlung versetzt. Man ließ 2 Tage bei + 5° stehen, goß dann in 50 ml Eiswasser ein und rührte 1 Stde. bei 0 bis + 2°. Zur Entfernung des Pyridins wurde durch eine Säule aus DOWEX 50-X 8 (H<sup>+</sup>-Form) filtriert und das Eluat, welches 2-(n-Hexyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure enthielt, im Vak. zwischen 40° und 50° eingengt. Der teilweise kristalline Eindampfrückstand wurde aus viel Wasser umkristallisiert. Man erhielt 110 mg farblose Kristalle, die bei 174—175° C unter Zersetzung schmolzen [47% d. Th., bezogen auf die eingesetzte 2-(n-Hexyl)-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure; 19,6% d. Th., bezogen auf das Ausgangsmaterial 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-2-chlorneuraminsäure). (Vgl. Tab. 1.)

Analog der 2-(n-Hexyl)-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (II B) wurden auch das *n*-Amyl-(III B), das Benzyl-(IV B) und das Cyclohexyl- $\alpha$ -Ketosid (V B) der N-Acetyl-D-neuraminsäure dargestellt (s. Tab. 2) und zur analytischen Charakterisierung in die kristallisierenden Peracetyl-derivate übergeführt (III A, IV A und V A; Tab. 1).

*2-Cyclohexyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (V B)*

a) Aus 600 mg 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-2-chlorneuraminsäure, 25 ml absol. Cyclohexanol und 720 mg Silbercarbonat wurden 196,4 mg (41% d. Th.) dünn-schicht- und papierchromatographisch einheitliche 2-Cyclohexyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure erhalten.  $[\alpha]_D^{22} = -8^\circ$  ( $c = 6,8$ , Wasser).

b) 496 mg 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-2-chlorneuraminsäure wurden in 15 ml absol. Cyclohexanol gelöst, mit 252 mg Hg(CN)<sub>2</sub> und 180 mg HgBr<sub>2</sub> (als Katalysator) versetzt und 14 Stdn. bei Zimmertemp. stehen gelassen. Sodann wurde durch Hyflo-Supercel filtriert, mit Aceton nachgewaschen und wie üblich mit überschüss. NaOH verseift. Die Na<sup>+</sup>-Ionen wurden mittels eines Kationenaustauschers (DOWEX 50-X 8, H<sup>+</sup>-Form) entfernt, während zumindest ein Teil der Hg<sup>++</sup>-Ionen in Lösung verblieb (Dithizon-Probe positiv) und durch H<sub>2</sub>S in essigsaurer Lösung als Sulfid gefällt und abgetrennt werden mußte. Das Filtrat wurde im Vak. bei 30° bis 40° eingedampft. Der Eindampfrückstand, ein rötliches Harz, wurde in wenig Wasser aufgenommen und zur Entfernung der Cl<sup>-</sup>- und Br<sup>-</sup>-Ionen mit etwas Silbercarbonat geschüttelt. Nachdem zur weiteren Reinigung über eine Säule aus deaktiviertem Aluminiumoxid filtriert worden war, wurde das neutral reagierende Eluat mit etwas DOWEX 50-X 8 (H<sup>+</sup>-Form) versetzt, der Austauscher abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen und die vereinigten Filtrate, welche nun wieder sauer reagierten, im Vak. bei 40° eingedampft. Der Eindampf-

rückstand, ein farbloses Harz, wurde über  $P_2O_5$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Ausb. betrug 131 mg (33,5% d. Th.).  $[\alpha]_D^{21} = -7^\circ$  (in Wasser).

Die Substanz war dünnschichtchromatographisch einheitlich und mit der nach der Silbercarbonatmethode erhaltenen 2-Cyclohexyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure identisch.

*2-(p-Methoxybenzyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (VI A)*

1,89 g frisch bereitete 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-2-chlorneuraminsäure wurden in 10 ml wasserfr. p-Methoxybenzylalkohol gelöst, mit 1,20 g Silbercarbonat versetzt und 15 Stdn. bei 30—35° unter Lichtausschluß geschüttelt. Nach beendeter Reaktion wurde mit etwas Aceton/Wasser (1:1) verdünnt, durch Hyflo-Supercel filtriert und das klare Filtrat auf eine mit DOWEX 1-X 8 (Formiat-Form) beschickte Säule aufgebracht. Zuerst wurde mit 700 ml Aceton/Wasser gewaschen und dann mit einer Aceton/Wasser-Mischung (1:1), die 0,4n an Ameisensäure war, die 2-(p-Methoxybenzyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure eluiert. Die das peracetylierte  $\alpha$ -Ketosid enthaltenden Eluatfraktionen wurden im Vak. bei 40° eingedampft und der Rückstand aus Wasser umkristallisiert (vgl. Tab. 1).

*2-(p-Methoxybenzyl)-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (VI B)*

273 mg obiger Peracetylverbindung wurden in 20 ml Wasser aufgenommen und mit 5,0 ml *n*-NaOH bei 40° in 10 Min. verseift. Zur Entfernung der  $Na^+$ -Ionen wurde mit überschüssigem Kationenaustauscher (DOWEX 50-X 8,  $H^+$ -Form) versetzt und das stark sauer reagierende Filtrat zur weiteren Reinigung durch eine mit desaktiviertem Aluminiumoxid beschickte Chromatographiesäule filtriert. Das neutral reagierende Filtrat wurde nochmals mit etwas Kationenaustauscher versetzt, der Austauscher abfiltriert, mit reichlich Wasser ausgewaschen und die vereinigten Filtrate, welche nun wieder stark sauer reagierten, gefriergetrocknet. Man erhielt 191 mg 2-(Methoxybenzyl)-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure als farbloses Schaumharz.  $[\alpha]_D^{23} = -16^\circ$  ( $c = 5,7$ , Wasser). Die Substanz war sowohl dünnschicht- als auch papierchromatographisch einheitlich (vgl. Tab. 2).

Auf analoge Art wie VI A und VI B wurden auch die *Hexahydrobenzyl-, m-Chlorbenzyl-, m-Brombenzyl-, m-Jodbenzyl* und *n-Decyl- $\alpha$ -Ketoside der 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure (VII A bis XI A, Tab. 1)* und durch deren alkalische Verseifung die entsprechenden  *$\alpha$ -Ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure (VII B bis XI B, Tab. 2)* dargestellt.

*2-(3'-Acetoxypropyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (XII A)*

960 mg frisch bereitete Acetochlorneuraminsäure wurden mit 20 ml absol. Propandiol-1,3 und 800 mg Silbercarbonat 15 Stdn. bei 37° geschüttelt. Nach beendeter Reaktion wurde das Propandiol im Vak. abgedampft, der Eindampfrückstand, wie bei der 2-(n-Hexyl)-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure schon beschrieben, aufgearbeitet und die ölige 2-(3'-Hydroxypropyl)-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure peracetyliert. Man erhielt 332 mg teilweise kristallisierte 2-(3'-Acetoxypropyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (s. Tab. 1).

*2-(3'-Hydroxypropyl)-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (XII B)*

310 mg des obigen Kristallisates wurden in 26 ml Wasser gelöst und mit 6,6 ml *n*-NaOH bei Zimmertemp. verseift. Zur Entfernung der  $Na^+$ -Ionen wurde durch eine mit DOWEX 50-X 8 ( $H^+$ -Form) beschickte Säule filtriert.

Durch Gefriertrocknen erhielten wir aus dem Filtrat in nahezu quantitativer Ausb. die 2-(3'-Hydroxypropyl)-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure als farbloses, dünn-schicht- und papierchromatographisch einheitliches Schaumharz (Tab. 2).

Auf analoge Weise wie *XII A* und *XII B* wurden auch 2-(5'-Acetoxypentyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (*XIII A*, Tab. 1) und 2-(5'-Hydroxypentyl)-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (*XIII B*, Tab. 2) dargestellt.

2-(*m*-Nitrobenzyl)-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (*XIV B*)

2,10 g frisch bereitete Acetochlorneuraminsäure wurden in 20 ml wasserig. *m*-Nitrobenzylalkohol gelöst, mit 1,80 g Silbercarbonat versetzt und 15 Std. bei 40° unter Lichtausschluß geschüttelt. Nach beendeter Reaktion wurde das Volumen mit Aceton/Wasser (1:1) auf 250 ml gebracht, die Lösung durch Hyflo-Supercel filtriert und das klare Filtrat auf eine mit DOWEX 1-X 8 (Formiat-Form) beschickte Säule aufgebracht. Wir wuschen zuerst mit 2 l Aceton/Wasser (1:1) nach und eluierten dann das Reaktionsprodukt mit 1 l Aceton/Wasser (1:1), welches 0,4*n* an Ameisensäure war. Das ameisen-saure Eluat hinterließ nach dem Eindampfen im Vak. bei 40° 2,2 g eines nicht kristallisierenden Rückstandes. Dieser wurde in 200 ml Aceton/Wasser (1:1) gelöst und die Lösung im Vak. bei 40° auf ca. 50 ml eingengt. Das Öl, das sich dabei abschied (1,35 g), wurde abgetrennt, in 130 ml Wasser aufgenommen und mit 30 ml 1*n*-NaOH bei 40° (10 Min.) verseift. Die Na<sup>+</sup>-Ionen wurden mit einem Kationenaustauscher (H<sup>+</sup>-Form) entfernt und die nun stark sauer reagierende Lösung in einer mit desaktiviertem Aluminiumoxid (Aluminiumoxid WOELM neutral) beschickten Säule (Durchmesser 2,6 cm, Höhe 25 cm) chromatographiert. Das Eluat wurde in 10 ml-Fractionen gesammelt. Die Fractionen Nr. 11 bis 60 wurden nach dünn-schichtchromatographischer Prüfung vereinigt, mit etwas Kationenaustauscher (H<sup>+</sup>-Form) versetzt, der Austauscher abfiltriert und das Filtrat im Vak. bei 40° eingengt. Aus wenig Wasser kristallisierten 240 mg 2-(*m*-Nitrobenzyl)-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure. Schmp. 177—180° (vgl. Tab. 2).

C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub>N<sub>2</sub> (444,4). Ber. C 48,65, H 5,44, N 6,30.  
Gef. C 48,45, H 5,52, N 6,44.

2-(*m*-Nitrobenzyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (*XIV A*)

Das freie  $\alpha$ -Ketosid (*XIV B*) ließ sich in guter Ausbeute zu der 2-(Nitrobenzyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure peracetylieren. Schmp. 182—183° (vgl. Tab. 1).