

Über synthetische Ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure, 2. Mitt.:

Anomere n-Amyl- und n-Hexyl-ketoside der
N-Acetyl-D-neuraminsäure

Von

P. Meindl und **H. Tuppy**

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

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 27. Januar 1965)

Die Eigenschaften anomerer n-Amyl- und n-Hexyl-ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure und ihrer kristallisierenden Tetra-O-acetyl-derivate wurden miteinander verglichen. Den durch Neuraminidase nicht spaltbaren Glykosiden, die durch Erhitzen von N-Acetyl-D-neuraminsäure mit chlorwasserstoff-haltigem Amyl- bzw. Hexylalkohol erhalten werden konnten und eine stärkere Linksdrehung zeigen, wird die β -Konfiguration, den früher¹ nach dem Verfahren von *Koenigs* und *Knorr* über die Pentaacetyl-2-chlorneuraminsäure dargestellten und durch Neuraminidase spaltbaren Anomeren die α -Konfiguration zugeschrieben.

A comparison has been made of the properties of the anomeric n-amyl and n-hexyl ketosides of N-acetyl-D-neuraminic acid and of their crystalline peracetyl derivatives. The more levorotatory anomers, which have been prepared by heating N-acetyl-D-neuraminic acid with amyl or hexyl alcohol containing dry hydrogen chloride and which are not attacked by neuraminidase, are assigned the β -configuration, whereas the α -configuration is attributed to the anomers which have previously¹ been obtained via pentaacetyl-2-chloro-neuraminic acid by the method of *Koenigs* and *Knorr* and have proved to be cleaved by neuraminidase.

Die Rezeptoren, die für die Bindung von Viren der Influenzagruppe an Zelloberflächen verantwortlich sind, enthalten N-Acyl-neuraminsäure

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

und werden durch Fermente, die diese Acyl-nonulosaminsäure-Reste abspalten, inaktiviert. Zahlreiche Glykolipide, Glykoproteine, Oligo- und Polysaccharide sind gleichfalls durch den Besitz von Neuraminsäure-Resten, die von Neuraminidasen in Freiheit gesetzt werden, ausgezeichnet². Die Frage, ob die Verknüpfung der Neuraminsäure in diesen Verbindungen eine α - oder β -ketosidische ist und ob dementsprechend Neuraminidasen als α - oder β -Ketosidasen wirken, konnte bisher nicht zweifelsfrei geklärt werden. *Kuhn* und *Brossmer*, die in der N-Acetylneuraminyl-lactose der Frauenmilch ein verhältnismäßig einfach gebautes natürliches Neuraminidase-Substrat gefunden hatten³, verglichen deren optisches Drehvermögen mit jenem von freier Neuraminsäure und von Lactose und sprachen auf Grund des optischen Vergleiches die Vermutung aus, daß die Verknüpfung der Neuraminsäure eine α -glykosidische und die Spezifität des Enzyms somit die einer α -Ketosidase sei^{4, 5}. Die Autoren betonten jedoch ausdrücklich, daß derartigen optischen Vergleichen keine Beweiskraft zukommt, solange nicht Paare von epimeren α - und β -Ketosiden in der Reihe der Nonulosaminsäuren bekannt sind⁴.

Bis vor kurzem war nur ein einziges synthetisches N-Acyl-D-neuraminsäure-ketosid verfügbar. Durch Erhitzen von N-Acetyl-D-neuraminsäure mit trockenem Methanol in Gegenwart von Dowex 50 (H⁺) als saurem Katalysator hatten *Blix* et al.⁶ vor einigen Jahren den kristallisierten Methyl ester eines N-Acetyl-D-neuraminsäure-methylketosids dargestellt; auf analoge Weise gelangten *Karkas* und *Chargaff*⁷ im vergangenen Jahr, ausgehend von einem Gemisch aus N-Glycolyl- und N-Acetyl-D-neuraminsäure, zu einer Mischung von zwei Methylketosid-methylestern, aus denen bei milder alkalischer Verseifung ein nicht kristallisierendes N-Acyl-D-neuraminsäure-methylketosid („Methoxysialinsäure“) entstand. Die sterischen Verhältnisse am glykosidischen C-Atom 2 der durch Neuraminidase nicht spaltbaren „Methoxysialinsäure“ blieben ungeklärt; die Frage, ob die Methylketoside vom Enzym nicht angegriffen wurden, weil sie dessen optischer Spezifität oder weil sie dessen Substratspezifität nicht Genüge taten, wurde nicht beantwortet.

² Zusammenfassende Literatur: *A. Gottschalk*, „Chemistry and Biology of Sialic Acids and Rel. Subst.“, Cambridge 1960; *A. Gottschalk*, *Advanc. Enzymol.* **20**, 135 (1958); *F. Zilliken* und *M. W. Whitehouse*, *Advanc. Carbohydr. Chem.* **13**, 237 (1958); *A. Gottschalk*, *Perspectives of Biol. and Med.* **5**, 327 (1962); *A. Gottschalk*, *Rev. Pure and Appl. Chem.* **12**, 46 (1962).

³ *R. Kuhn* und *R. Brossmer*, *Angew. Chemie* **68**, 211 (1956); *Chem. Ber.* **89**, 2013 (1956).

⁴ *R. Kuhn* und *R. Brossmer*, *Chem. Ber.* **92**, 1667 (1959).

⁵ *R. Kuhn* und *R. Brossmer*, *Angew. Chemie* **70**, 25 (1958).

⁶ *G. Blix*, *E. Lindberg*, *L. Odin* und *I. Werner*, *Acta Soc. Med. Uppsal.* **61**, 1 (1956).

⁷ *J. D. Karkas* und *E. Chargaff*, *J. Biol. Chem.* **239**, 949 (1964).

In der vorhergehenden Arbeit¹ haben wir die Anwendung des Glykosidierungsverfahrens von *Koenigs* und *Knorr*⁸ auf N-Acetyl-D-neuraminsäure beschrieben; es wurden eine Reihe einfacher, durch Neuraminidase spaltbarer Glykoside synthetisiert, darunter auch ein n-Amyl- und ein n-Hexyl-ketosid der N-Acetyl-D-neuraminsäure. Es hat sich nunmehr als möglich erwiesen, mit Hilfe eines Verfahrens, das dem von *Blix* zur Darstellung des N-Acetyl-D-neuraminsäure-methylketosid-methylesters verwendeten ähnlich ist, ein n-Amyl- und ein n-Hexyl-ketosid der N-Acetyl-D-neuraminsäure zu synthetisieren, die zu den nach der Methode von *Koenigs* und *Knorr* hergestellten Glykosiden im Verhältnis der Anomerie stehen und von Neuraminidase nicht angegriffen werden. Die vorliegende Arbeit hat die Darstellung dieser neuen Ketoside, den Vergleich ihrer Eigenschaften mit denen ihrer Anomeren und insbesondere die Klärung der sterischen Verhältnisse am C-Atom 2 der glykosidisch gebundenen Neuraminsäure zum Inhalt.

Beim Erhitzen mit chlorwasserstoff-haltigem n-Amyl- oder n-Hexylalkohol geht N-Acetyl-D-neuraminsäure nach und nach in Lösung; dabei entsteht zunächst ein N-Acetyl-D-neuraminsäure-ester, der dann allmählich in sein Glykosid übergeht. Die Amyl- bzw. Hexyl-ester der Amyl- bzw. Hexyl-ketoside wurden als Öle gewonnen, die nicht zur Kristallisation zu bringen waren. Für die Spaltung der Esterbindung eignete sich überschüssiges Alkali in wäßrigem Aceton. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das Amylglykosid der N-Acetyl-D-neuraminsäure kristallisiert und einheitlich gewonnen; das Hexylglykosid kristallisierte nicht und blieb, wie eine chromatographische Prüfung zeigte, mit einer geringen Menge einer Begleitsubstanz, vermutlich des Anomeren, verunreinigt. Peracetylierung der Glykoside mit Essigsäureanhydrid in Pyridin führte zu kristallisierenden Tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäureketosiden.

Die durch direkte Glykosidierung der N-Acetyl-D-neuraminsäure mit Alkohol/HCl dargestellten Ketoside sind ihren zuvor¹ mit Hilfe des Verfahrens von *Koenigs* und *Knorr* synthetisierten Anomeren in vieler Hinsicht ähnlich. Sie sind gleichfalls im Besitz einer weder veresterten noch durch Lactonisierung maskierten, sondern stark sauren, quantitativ titrierbaren Carboxylgruppe. Der Ninhydrinreaktion unterworfen, geben sie keine Färbung, in Übereinstimmung damit, daß die Aminogruppe der Nonulosaminsäure nicht frei, sondern acyliert ist. Beim Thiobarbitursäure-Test nach *Aminoff*⁹, der freie, nicht jedoch die in Glykoproteinen und Glykolipiden glykosidisch gebundene N-Acetyl-neuraminsäure erfaßt, ist die von den Amyl- und Hexyl-glykosiden der N-Acetyl-D-neuraminsäure gegebene Färbung erwartungsgemäß äußerst gering. Hin-

⁸ *W. Koenigs* und *E. Knorr*, Ber. dtsch. Chem. Ges. **34**, 957 (1901).

⁹ *D. Aminoff*, Biochem. J. **81**, 384 (1961).

gegen reagieren die beiden anomeren Amyl- und die beiden Hexyl-ketoside bei der in stärker saurem Medium ausgeführten Farbreaktion mit Resorcin nach *Svennerholm*¹⁰ so wie freie N-Acetyl-D-neuraminsäure kräftig positiv; dieser Befund entspricht den Erwartungen, da bekannt ist, daß Acyl-neuraminsäure-Reste bei niedrigem pH-Wert aus ihrer ketosidischen Bindung leicht entlassen werden. (Allerdings werden die α -Ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure durch Säure um ein mehrfaches rascher gespalten als die entsprechenden β -Ketoside, wie Abb. 1 zeigt; eine größere Säurelabilität der α -Ketoside ist auch bei den Fructopyranosiden gefunden worden¹¹. Die in saurer Lösung so leichte Abtrennung der Neuraminsäure-Reste von Glykolipiden, Glykoproteinen und Oligosacchariden erklärt sich demnach zum Teil durch deren α -ketosidische Verknüpfung.) Der Nachweis, daß aus den beiden anomeren n-Amyl-ketosiden bei der sauren Hydrolyse (pH 1, 80°, 60 Min.) gleicherweise freie N-Acetyl-D-neuraminsäure ent-

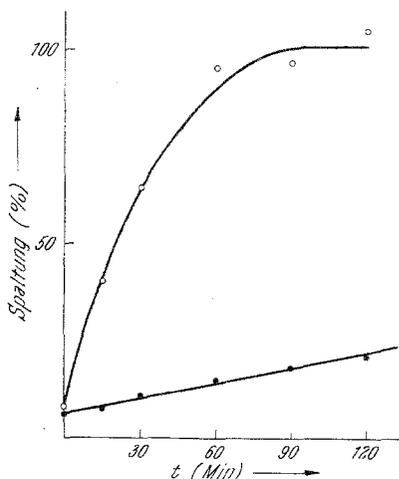


Abb. 1. Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeiten des α - und des β -n-Amyl-ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure in 0,1N-HCl bei 60°

steht, wurde auf papierchromatographischem Wege geführt. Bei der Perjodat-Oxydation verbrauchten die zwei anomeren n-Amyl-ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure ohne Unterschied 2 Mole Natriumperjodat je Mol Zuckerderivat (Tab. 1); dieser Befund steht mit dem Vorliegen eines pyranoiden Ringes, in dem das glykosidische Kohlenstoffatom 2 mit dem Kohlenstoffatom 6 über eine Sauerstoffbrücke verbunden ist, in Einklang.

Tabelle 1. Perjodat-oxydation des α - und des β -n-Amyl-ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure

Zeitdauer (Min.) der Einwirkung des Perjodats (bei 20°)	NaJO ₄ -Verbrauch (Mole je Mol)	
	n-Amyl- α -ketosid	n-Amyl- β -ketosid
15	1,81	2,00
45	1,82	2,08
105	1,87	2,02
225	1,95	2,04

¹⁰ L. *Svennerholm*, *Biochim. Biophys. Acta* [Amsterdam] **24**, 604 (1957).

¹¹ L. J. *Heidt* und C. B. *Purves*, *J. Amer. Chem. Soc.* **60**, 1206 (1938); *ibid.* **66**, 1385 (1944).

Von den beiden anomeren Tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure-amyli-ketosiden wurden in Methylenchloridlösung und in Kaliumbromid-Preßlingen Infrarotspektren aufgenommen (Abb. 2). Dabei zeigten sich nur im Gebiete der C—O—C-Schwingungen (1000 bis 1250 cm^{-1}) merk-

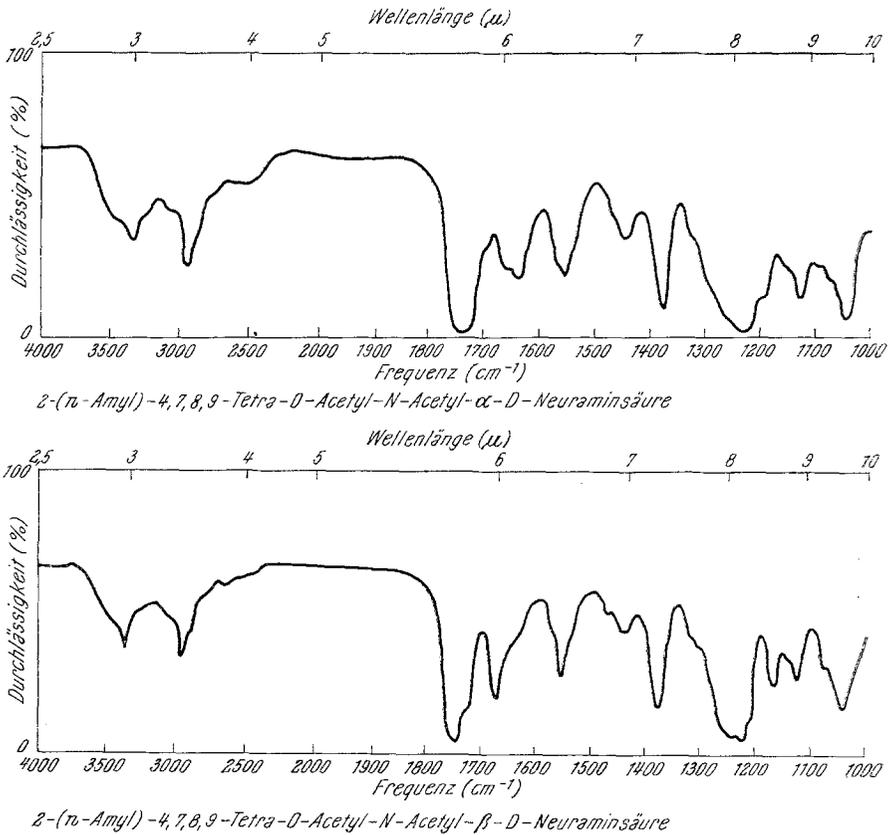


Abb. 2. IR-Spektren der anomeren n-Amylketoside der 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäuren (KBr-Preßlinge)

liche Unterschiede. Die Ähnlichkeit der Spektren widerspiegelt die Isomerie der miteinander verglichenen Verbindungen; eine IR-spektroskopische Erkennung anomerer Glykoside auf Grund von C—H-Schwingungen am glykosidischen C-Atom¹² ist bei Aldosiden, nicht jedoch bei Ketosiden, deren C-Atom 2 kein Wasserstoffatom trägt, möglich.

In den Tab. 2 und 3 sind Schmelzpunkte, chromatographische Daten sowie Drehwerte der anomeren Ketoside und ihrer Peracetylderivate einander paarweise gegenübergestellt. Die Schmelzpunkte der zwei Tetra-

¹² S. A. Barker, E. J. Bourne und D. H. Whiffen, *Methods of Biochem. Analysis* 3, 213 (1956).

Tabelle 2. Vergleich der anomeren n-Amyl- und n-Hexyl-ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure

Ketosid der N-Acetyl-D-neuraminsäure	$[\alpha]_D$ (Wasser)/°C	$[\alpha]_D$ (Eisessig)/°C	$[\alpha]_D$ (Dimethylsulfoxid)/°C	R_{NA}^*	R_{NA}^{**}
n-Amyl- α -ketosid	--- 11° (c 19,5)/26°	--- 6° (c 5,0)/26°	--- 16° (c 5,0)/23°	3,95	2,31
n-Amyl- β -ketosid	--- 23° (c 6,2)/24°	--- 27° (c 5,0)/26°	--- 42° (c 5,0)/23°	3,60	2,10
n-Hexyl- α -ketosid	--- 11° (c 9,7)/24°			4,30	2,81
n-Hexyl- β -ketosid	--- 20° (c 5,7)/23°			3,85	2,58

Tabelle 3. Vergleich der anomeren n-Amyl- und n-Hexyl-ketoside der 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure

Ketosid der 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure	% C		% H		% N		$[\alpha]_D$ (Bisessig)/°C	Schmp.	R_{NA}^*
	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.			
n-Amyl- α -ketosid	52,64	52,30	6,83	6,82	2,56	2,52	--- 22,4° (c 5,0)/26°	185---187°	4,23
n-Amyl- β -ketosid		52,89		6,99		2,58	--- 12,4° (c 5,0)/26°	199---200°	4,00
n-Hexyl- α -ketosid	53,47	53,51	7,00	7,19	2,49	2,65		174---175°	4,23
n-Hexyl- β -ketosid		53,08		7,08				175---177°	4,10

* Bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G mit n-Butanol---n-Propanol---0,1n-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.

O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure-amyglykoside unterscheiden sich voneinander signifikant; die peracetylierten Hexyl-glykoside schmelzen wohl bei nahezu gleicher Temperatur, haben ihre Nicht-Identität jedoch durch einen stark erniedrigten Mischschmelzpunkt bewiesen. Durch Papier- und Dünnschicht-Chromatographie ließen sich bei allen vier untersuchten Paaren die anomeren Ketoside auf Grund verschiedener R_f -Werte unterscheiden.

Von besonderem Interesse war natürlich der Vergleich des optischen Drehvermögens der anomeren Glykoside; sowohl bei den Amyl- als auch bei den Hexyl-ketosiden der N-Acetyl-D-neuraminsäure zeigte die nach *Koenigs* und *Knorr* dargestellte Verbindung eine geringere Linksdrehung als ihr Anomer (Tab. 2). Nach *Hudson*¹³ kommt bei einem Paar anomerer Abkömmlinge eines Zuckers der D-Reihe dem stärker nach rechts (oder weniger stark nach links) drehenden Isomeren die α -Konfiguration zu. Wenn *Hudsons* Regel auf die Ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure angewendet wird, ergibt sich, daß die nach dem Verfahren von *Koenigs* und *Knorr* dargestellten Glykoside α -Ketoside, die nach dem Verfahren der direkten säurekatalysierten Umsetzung von N-Acetyl-D-neuraminsäure mit Alkoholen synthetisierten Anomeren β -Ketoside sind. *Hudsons* Regel hat sich bei vielen Anomerenpaaren als gültig erwiesen; es sind jedoch auch einige Ausnahmen gefunden worden. In Anbetracht des überwältigenden Erfahrungsmaterials, das die Regel stützt, haben Zuordnungen der α -Konfiguration an das weniger stark und der β -Konfiguration an das stärker nach links drehende D-Zucker-Derivat einen sehr hohen Wahrscheinlichkeitswert, in Anbetracht der bestehenden Ausnahmen jedoch keine unbedingte Beweiskraft. — Im vorliegenden Fall wird ein Zweifel an der Gültigkeit von *Hudsons* Regel insbesondere durch die merkwürdige Beobachtung geweckt, daß das Tetra-O-acetyl-derivat des stärker linksdrehenden Amylketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure paradoxerweise ein geringeres Linksdrehvermögen besitzt als das Peracetyl-derivat ihres schwächer lävorotatorischen Anomeren (Tab. 3). Eine Verletzung von *Hudsons* Regel durch Umkehrung der normalen Drehungsbeziehungen ist vor kurzem von *Horton*¹⁴ für ein anderes Paar peracetylierter anomerer Aminozuckerderivate (1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-deoxy-2-dinitrophenyl-amino-D-glucopyranosen) und schon früher für einige 2'-Deoxypentose-nucleoside, deren anomeres C-Atom einem nicht-asymmetrischen Kohlenstoff benachbart ist, beschrieben worden¹⁵.

¹³ C. S. Hudson, J. Amer. chem. Soc. **31**, 66 (1909); Advanc. Carbohydr. Chem. **3**, 15 (1948).

¹⁴ D. Horton, J. Org. Chem. **29**, 1776 (1964).

¹⁵ J. J. Fox und I. Wempen, Advanc. Carbohydr. Chem. **14**, 340 (1959); R. U. Lemieux und M. Hoffer, Canad. J. Chem. **39**, 110 (1961); R. U. Lemieux, ibid. **39**, 116 (1961).

Die stärker linksdrehenden und darum von uns als β -Glykoside bezeichneten Amyl- und Hexyl-ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure, deren Synthese im Exper. Teil dieser Arbeit beschrieben wird, lassen sich weder durch bakterielle noch durch virale Neuraminidase spalten, während die früher beschriebenen α -Anomeren sich als gut spaltbar erwiesen haben. Diese Ergebnisse stehen mit der von *Kuhn* und *Brossmer*^{4, 5} vertretenen Ansicht in Einklang, daß die Neuraminidasen aus ihren Substraten α -ketosidisch gebundene terminale N-Acetyl-D-neuraminsäure-Reste abzuspalten imstande und demnach α -Ketosidasen sind. Diese Übereinstimmung ist um so erfreulicher, als sie auf Zufall beruht; denn die Überlegungen, die *Kuhn* und *Brossmer* veranlaßten, der durch Neuraminidase spaltbaren glykosidischen Bindung in der N-Acetyl-D-neuraminyl-lactose die α -Konfiguration und infolgedessen dem Enzym den Charakter einer α -Ketosidase zuzuschreiben, stützten sich auf nicht zutreffende Voraussetzungen.

Die Überlegungen dieser Autoren⁴ gingen davon aus, daß α -Methyl-D-fructopyranosid ($[\alpha]_D + 44^\circ$) nicht unbeträchtlich nach rechts und β -Methyl-D-fructopyranosid ($[\alpha]_D - 172^\circ$) sehr stark und noch bedeutend stärker als freie β -D-Fructose ($[\alpha]_D - 134^\circ$) nach links dreht. Daraus zogen sie den Analogieschluß, daß einem β -ketosidisch gebundenen N-Acetyl-D-neuraminsäure-Rest ebenfalls ein starkes und vermutlich noch stärkeres Linksdrehvermögen zukommen sollte als der freien N-Acetyl- α -D-neuraminsäure ($[\alpha]_D - 150^\circ$ bis -200°), während von einem α -ketosidischen N-Acetyl-D-neuraminsäure-Rest ein geringer lävo- oder ein dextrorotatorischer Beitrag zu erwarten wäre. Unter solchen Voraussetzungen führte ein Vergleich des Drehvermögens der N-Acetyl-D-neuraminyl-lactose (in Dimethylsulfoxid) ($[\alpha]_D + 6^\circ$) mit demjenigen der Lactose ($[\alpha]_D + 53^\circ$) zur Vermutung, daß die N-Acetyl-D-neuraminsäure mit der Lactose α -ketosidisch verknüpft sei; bei β -ketosidischer Bindung, meinten die Autoren, könnte die N-Acetyl-D-neuraminyl-lactose linksdrehend sein⁴. — Wie die Gegenüberstellung der Drehvermögen der von uns synthetisierten anomeren N-Acetyl-D-neuraminsäure-ketoside (Tab. 2) zeigt, war der Analogieschluß von den optischen Drehungen der Derivate der Fructose auf jene der N-Acetyl-D-neuraminsäure nicht gerechtfertigt; denn β -Ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure drehen weit weniger stark nach links als freie N-Acetyl-D-neuraminsäure und nur geringfügig stärker als die ebenfalls linksdrehenden anomeren α -Ketoside. Ein Vergleich der von *Kuhn* und *Brossmer*⁴ ermittelten Molekularrotationen von Neuraminyl-lactose und Lactose (in Dimethylsulfoxid) mit den von uns bestimmten Molekularrotationen des α - und β -Amylketosids der N-Acetyl-D-neuraminsäure (ebenfalls in Dimethylsulfoxid) gestattet es nicht, einer α -ketosidischen Bindung der N-Acetyl-D-neuraminsäure an die Lactose im Trisaccharid den Vorzug vor einer β -ketosidischen Bindung zu geben.

Somit liefert gegenwärtig nur der einfache optische Vergleich der anomeren Amyl- und Hexyl-ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure unter Heranziehung von *Hudsons* Regel ein stichhaltiges Argument dafür, daß die durch Neuraminidase spaltbaren Verbindungen α -ketosidisch gebundene Nonulosaminsäure-Reste enthalten und die Neuraminidasen bakteriellen

und viralen Ursprungs demnach als α -Ketosidasen wirken. Doch kommt auch diesem Argument keine unbedingte Beweiskraft zu.

Für die Aufnahme der Infrarotspektren danken wir Herrn Univ.-Doz. Dr. J. Derkosh, Organisch-Chemisches Institut der Universität Wien, für vorzügliche Mitarbeit Herrn H. Mahr und Frau A. Edelmann.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Heitztischmikroskop 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.

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

Die Dünnschicht- und Papierchromatographie wurde auf die in der vorhergehenden Arbeit¹ beschriebene Weise ausgeführt. Als R_{NA} bezeichnen wir auf den R_f -Wert der N-Acetyl-D-neuraminsäure (= 1,00) bezogene relative R_f -Werte der Neuraminsäurederivate.

Infrarotspektren wurden von festen Substanzen in Form von Kaliumbromidpreßlingen und in Methylenchloridlösung mit einem Perkin-Elmer-Spektrometer Modell 21 aufgenommen; die Konzentration der Lösungen betrug etwa 10 mg/cm³.

2-(n-Amyl)-N-acetyl- β -D-neuraminsäure

927 mg N-Acetyl-D-neuraminsäure wurden in 80 ml absol. n-Amylalkohol suspendiert und mit 3 ml n-Amylalkohol, der 27% HCl enthielt, versetzt. Das Gemisch wurde $2\frac{1}{2}$ Stdn. unter kräftigem Rühren auf 70–80° erwärmt, wobei die N-Acetyl-D-neuraminsäure langsam in Lösung ging. Die erkaltete Reaktionslösung wurde mit 50 ml eines schwach basischen Ionenaustauschers (Merck Ionenaustauscher II, OH⁻-Form) sowie mit 100 ml Wasser versetzt und kräftig geschüttelt. Sodann wurde Aceton zugegeben und von der nunmehr homogenen Flüssigkeitsmischung der Ionenaustauscher abgesaugt. Das annähernd neutral reagierende Filtrat wurde im Vak. bei 40–50° auf ein kleines Volumen (ca. 50 ml) eingengt und der dunkelbraun gefärbte Eindampfrest zur Entfernung noch vorhandener Salzsäurespuren mit 1 bis 2 Spatelspitzen Silbercarbonat und zur Esterverseifung mit 5 ml 1*n*-NaOH versetzt. Man ließ nun 15 Min. bei 40° stehen, filtrierte durch eine etwa 1 cm dicke Schicht von Hyflo-Supercel und versetzte das klare Filtrat mit 10 ml DOWEX 50-X 8 (H⁺-Form). Der Austauscher wurde abfiltriert, nachgewaschen und das klare Filtrat durch eine mit deaktiviertem Aluminiumoxid beschickte Chromatographiesäule gegossen. (Hiezu wurde Aluminiumoxid WOELM „neutral“ mit reichlich Wasser aufgeschlämmt, 1 Stde. stehen gelassen und in ein 2 cm weites Chromatographierohr 21 cm hoch eingefüllt.) Die bei der Farbreaktion nach *Svennerholm*¹⁰ positiv reagierenden Fraktionen, die bei der Elution der Aluminiumoxidsäule mit Wasser anfielen, wurden vereinigt, mit einer kleinen Menge DOWEX 50-X 8 (H⁺-Form) behandelt und nach Abfiltrieren des Austauschers im Vak. bei 40–50° eingedampft. Der Rückstand (473 mg), ein farbloses Harz, wurde in 4–5 ml Wasser gelöst, diese Lösung mit 20 ml absol. Methanol und 80 ml absol. Äther versetzt.

Die nach der Zugabe des Äthers auftretende flockige Fällung wurde mit Hilfe von Hyflo-Supercel abgetrennt, das klare Filtrat sodann mit absol. Äther bis zur bleibenden Trübung versetzt und im Eisschrank aufbewahrt. Die nunmehr langsam einsetzende Kristallisation war nach einigen Tagen abgeschlossen. Nach Absaugen des Kristallisats wurde die Mutterlauge nochmals mit 50 ml absol. Äther versetzt. Auf diese Weise konnten insgesamt 300 mg (24% d. Th.) 2-(n-Amyl)-N-acetyl- β -D-neuraminsäure mit einem Schmp. von 124—125° und in chromatographisch einheitlicher Form isoliert werden (siehe Tab. 2).

$C_{16}H_{29}O_9N \cdot 2 H_2O$ (415,4). Ber. C 46,26, H 8,01, N 3,37.

Gef. C 46,07, H 7,87, N 3,35.

2-(n-Amyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- β -D-neuraminsäure

300 mg krist. 2-(n-Amyl)-N-acetyl- β -D-neuraminsäure wurden mit 3 ml Pyridin und 4,5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Man ließ über Nacht bei 4° stehen, zersetzte dann das überschüssige Ac_2O mit Eiswasser und entfernte das Pyridin aus der wäßrigen Lösung mit überschüssigem DOWEX 50-X 8 (H^+ -Form). Der Austauscher wurde abfiltriert und das Filtrat bei 40° im Vak. auf ein kleines Volumen eingedampft. Es kristallisierten 194 mg (49% d. Th.) 2-(n-Amyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- β -D-neuraminsäure vom Schmp. 199—200° aus; der Mischschmp. mit 2-(n-Amyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- α -D-neuraminsäure¹ betrug 160—195°. Für die Elementaranalyse wurde die Substanz bei 100° im Vak. über P_2O_5 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (vgl. Tab. 3).

2-(n-Hexyl)-N-acetyl- β -D-neuraminsäure

1,0 g N-Acetyl-D-neuraminsäure wurde in 50 ml absol. n-Hexylalkohol, der 0,5% HCl enthielt, 3 Stdn. unter kräftigem Rühren auf 70° erwärmt. Die erkaltete Reaktionslösung wurde mit 50 ml schwach basischem Anionenaustauscher (Merck Ionenaustauscher II, OH^- -Form) und 100 ml Wasser versetzt und gut durchgeschüttelt. Der Austauscher wurde abgesaugt, mit Wasser—Aceton (2:1, v/v) nachgewaschen und das Filtrat im Vak. bei 60° eingedampft. Es blieb ein rotbraunes Harz zurück, das in Wasser—Aceton (2:1) gelöst und zur Esterverseifung mit 10 ml 1n-NaOH versetzt wurde. Man erwärmte 30 Min. im Wasserbad auf 50—60°. Zur Entfernung der Na^+ -Ionen wurde die Lösung, von 600 ml Wasser gefolgt, durch eine mit DOWEX 50-X 8 (H^+ -Form) beschickte Säule filtriert. Die bei der Farbreaktion nach *Svennerholm*¹⁰ positiv reagierenden Eluatfraktionen wurden miteinander vereinigt und bei 50° im Vak. eingedampft. Der braunrote Rückstand wurde in 30 ml Wasser gelöst und an einer mit deaktiviertem Aluminiumoxid beschickten Säule (1,8 × 9,0 cm) chromatographiert. Die Eluate, die beim Nachwaschen der Säule mit viel Wasser gesammelt wurden und eine für Neuraminsäurederivate spezifische Farbreaktion gaben, wurden vereinigt, mit einigen ml DOWEX 50-X 8 (H^+ -Form) durchgeschüttelt und nach dem Abfiltrieren des Ionenaustauschers bei 50° im Vak. eingedampft. Die 2-(n-Hexyl)-N-acetyl- β -D-neuraminsäure, ein fast farbloses Harz, wurde bei Zimmertemp. im Vak. über P_2O_5 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet; die Ausb. betrug 640 mg (50% d. Th.) (siehe Tab. 2).

2-(n-Hexyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- β -D-neuraminsäure

256 mg 2-(n-Hexyl)-N-acetyl- β -D-neuraminsäure wurden in 3,4 ml absol. Pyridin gelöst und nach Zugabe von 5 ml Acetanhydrid 48 Stdn. bei 4° stehen

gelassen. Dann wurde überschüssiges Ac_2O mit Eiswasser zersetzt und das Pyridin mit Hilfe von 40 ml DOWEX 50-X 8 (H^+ -Form) entfernt. Nachdem das Filtrat mit Tierkohle entfärbt und bei 40° im Vak. eingedampft worden war, wurde der bräunliche Rückstand in wenig Wasser—Aceton (2:1, v/v) gelöst. Bei langsamem Eindunsten bei Raumtemp. entstand im Verlaufe einer Woche eine ölige Fällung, die teilweise kristallisierte. Die festen Anteile wurden isoliert, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet. Die so gewonnene rohe 2-(*n*-Hexyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- β -D-neuraminsäure (40 mg) erwies sich bei dünnschichtchromatographischer Prüfung als einheitlich und schmolz nach Sintern (ab 160°) bei 174 — 175° . Durch Umkristallisieren aus wenig Aceton—Wasser konnten 22 mg und durch Einengen der Mutterlauge weitere 7 mg eines farblosen Kristallisates erhalten werden. Schmp. 174 — 176° (Sintern ab 165°). Mischschmp. mit 2-(*n*-Hexyl)-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- α -D-neuraminsäure¹: 150 — 175° . Für die Analyse wurde das umkristallisierte Material bei 100° im Vak. über P_2O_5 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (siehe Tab. 3).

Saure Hydrolyse der anomeren n-Amyl-ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure

a) Papierchromatographische Identifizierung der bei der Hydrolyse in Freiheit gesetzten N-Acetyl-D-neuraminsäure: 8 mg *n*-Amyl- α -ketosid, 8 mg *n*-Amyl- β -ketosid und (zum Vergleich) 8 mg freie N-Acetyl-D-neuraminsäure wurden in je 4 ml verd. Schwefelsäure (pH 1,3) gelöst. Die drei Lösungen wurden 1 Stde. im Wasserbad auf 80° erhitzt. Nach dem Erkalten wurden sie durch Zusatz von gesätt. Barytwasser neutralisiert, die BaSO_4 -Fällungen abzentrifugiert, die klaren Überstände abdekantiert und mit den beim Waschen der Niederschläge anfallenden Waschflüssigkeiten vereinigt. Jedes der drei Hydrolysate wurde sodann durch eine mit 3 ml DOWEX 50-X 8 (H^+ -Form) beschickte Chromatographiesäule filtriert und mit 150 ml Wasser nachgewaschen. Dann ließ man die drei Filtrate, von 150 ml Wasser gefolgt, durch je eine DOWEX 1-X 8-Säule (5 ml, Formiat-Form) fließen. Die bei der Elution der Anionenaustauschersäulen mit 0,4*n*-Ameisensäure anfallenden, durch eine positive Farbreaktion mit Resorcin nach *Svennerholm*¹⁰ ausgezeichneten Eluate wurden im Vak. bei 40° eingedampft. Die nicht kristallisierenden Rückstände, deren Gewicht 4,7 mg, 6,1 mg bzw. 7,8 mg betrug, wurden in Wasser gelöst und papierchromatographisch geprüft, wobei eine nicht mit Säure vorbehandelte Probe von N-Acetyl-D-neuraminsäure als Vergleichssubstanz diente. In den drei Hydrolysaten bildete ohne Unterschied eine mit Orcin anfärbbare und von N-Acetyl-D-neuraminsäure ununterscheidbare Substanz die Hauptkomponente; bei der Entwicklung der Chromatogramme mit Natriumperjodat und Benzidin machte sich außerdem noch in den drei Hydrolysaten eine etwas schneller als N-Acetyl-D-neuraminsäure wandernde Nebenkomponente (R_{NA} 1,66) bemerkbar.

b) Analytischer Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeiten: Je 2 mg *n*-Amyl- α -ketosid, *n*-Amyl- β -ketosid und (als Kontrolle) freie N-Acetyl-D-neuraminsäure wurden in je 4 ml 0,1*n*-HCl gelöst und bei 60° inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben (0,10 ml) entnommen und für die Bestimmung freier N-Acetyl-neuraminsäure nach *Aminoff*⁹ verwendet. Das Versuchsergebnis ist in der Abb. 1 graphisch dargestellt. Freie N-Acetyl-D-neuraminsäure wird bei der Inkubation mit verd. HCl unter den Bedingungen dieses Experiments insoferne nicht verändert, als ihre Farbreaktion mit Thiobarbitursäure nach *Aminoff* konstant bleibt.

Perjodat-oxydation der anomeren n-Amyl-ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure
(Tab. 1)

Die Versuche wurden nach der von Guthrie¹⁶ beschriebenen Methode ausgeführt. 23 mg Ketosid wurden in 10 ml Acetatpuffer (pH 4,5; 0,2*n*) gelöst, die Lösung mit 15 ml einer mit Acetat gepufferten $2,8 \cdot 10^{-2}m$ -NaJO₄-Lösung versetzt und bei 20° inkubiert. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben (5 ml) entnommen, in denen das nicht verbrauchte Perjodat nach Fleury und Lange¹⁷ titriert wurde.

¹⁶ R. D. Guthrie, Meth. Carbohydr. Chem., Vol. I, 435 (1962).

¹⁷ P. F. Fleury und J. Lange, J. pharm. chim. **17**, 107, 196 (1933).